

Artigo original

Monitoramento da estabilidade do controle de qualidade interno para ensaios sorológicos de HIV/aids

Stability monitoring of internal quality control sera for HIV/AIDS serological assay

Márcia Jorge Castejon^[1] , Karen Cristina Rolim Madureira^[2] , Meire Bocoli Rossi^[2] , Elaine Lopes de Oliveira^[1] , Juliana Failde Gallo^[2] , Rosemeire Yamashiro^[1] , Francisco Erisnaldo Nunes^[2] 

^[1]Coordenaroria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, São Paulo, São Paulo, Brasil.

^[2]Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Imunologia, São Paulo, São Paulo, Brasil

Autor para correspondência

Márcia Jorge Castejon

E-mail: marcia.castejon@ial.sp.gov.br

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 351, 10º andar. CEP: 01246-000. São Paulo, São Paulo, Brasil

Como citar

Castejon MJ, Madureira KCR, Rossi MB, Oliveira EL, Gallo JF, Yamashiro R et al. Monitoramento da estabilidade do controle de qualidade interno para ensaios sorológicos de HIV/aids. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2024; 21: e40675. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2024.v.21.40675>

Primeira submissão: 29/07/2024 • Aceito para publicação: 22/10/2024 • Publicação: 22/11/2024

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade das amostras de controle de qualidade interno (CQI), produzidas com baixo limite de reatividade (fracamente positivo), quanto à persistência da reatividade dos anticorpos anti-HIV nos soros após o armazenamento de longo prazo a -20°C . Os soros analisados – dois lotes HIV fortemente positivo (067 e 075) e dois lotes HIV fracamente positivo (CQI061 e CQI067) com diluições padronizadas para os ensaios imunoenzimático do tipo ELISA (terceira geração) e de Western blot (WB) – foram provenientes de um estudo de estabilidade realizado por Castejon *et al* (2014). Nesta reavaliação, após 13 anos de armazenamento, foram utilizados diferentes ensaios sorológicos disponíveis no laboratório. Os resultados revelaram a manutenção da estabilidade dos anticorpos anti-HIV; no entanto, os lotes CQI061 e CQI067 apresentaram-se fortemente reagentes nos ensaios de quarta geração e houve variação da reatividade de algumas bandas no Western blot. Em razão da inclusão de novas metodologias no mercado, o CQI (fracamente reagente) padronizado para um determinado teste sorológico e armazenado por longo prazo não pode executar o seu papel pretendido.

Palavras-chave: controle de qualidade, anticorpos anti-HIV, estabilidade proteica, soro, testes sorológicos.

Abstract

The present study aimed to evaluate the stability of internal quality control (IQC) samples (IQC), produced with low reactivity limit (weakly positive), for persistency of anti-HIV antibodies reactivity after long-term storage at -20°C . The analyzed sera – two HIV strongly positive lots (numbers 067 and 075) and two HIV weakly positive lots (IQC061 and IQC067) with standardized dilutions for enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA (third generation) and Western blot – were derived from a stability study carried out by Castejon *et al* (2014). In this re-evaluation, after 13 years of storage, different serological assays available in the laboratory were used. The results revealed the anti-HIV antibodies stability maintenance; however the serum lots – IQC061 and IQC067 – were HIV strongly reactive in the fourth generation assays and also, there was reactivity variation of some bands in the Western blot. Due to the inclusion of new methodologies on the market, IQC (weakly reactive) that was standardized for a specific test and storage for long-term for long-term cannot perform its intended role.

Keywords: quality control, HIV antibodies, protein stability, serum, serologic tests.

Introdução

O monitoramento da fase analítica tem sido uma estratégia relevante em laboratórios clínicos que prezam pela qualidade na prestação de serviços. A excelência no desempenho preciso dos testes laboratoriais é fundamental para a produção de resultados fidedignos. A participação em programas de controles de qualidade e a verificação de equipamentos e de reagentes estão entre os componentes para monitorar as áreas de diagnóstico.¹⁻³

O controle de qualidade interno (CQI), considerado material de referência (MR) é de extrema importância para a verificação diária do desempenho dos procedimentos analíticos e, conseqüentemente, para maior confiabilidade dos resultados emitidos. Na sua grande maioria, o controle positivo que acompanha o kit de reagentes diagnóstico é projetado para apresentar-se fortemente reagente (ampla faixa de aceitação). Ademais, há fabricantes que não o disponibilizam. O CQI preparado para ser fracamente reagente é ideal para avaliar o desempenho dos ensaios em detectar as amostras de pacientes com perfil semelhante. Contudo, o uso constante do MR comercial não é economicamente viável para muitos países devido à indisponibilidade ou ao elevado custo.⁴⁻⁶

Há mais de 15 anos o Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (CIM-IAL) vem produzindo painéis de amostras de soro para CQI em ensaios sorológicos para HIV (CQI HIV), os quais têm sido distribuídos à sub-rede de laboratórios do estado de São Paulo.² Na produção de cada lote de soro candidato a MR, preliminarmente deve ser feita a caracterização das amostras com o emprego de ensaios específicos que confirmem a presença dos analitos (anticorpos) esperados. Durante o preparo, destaca-se a padronização de amostras positivas por meio de diluição seriada para obtenção de soro com baixo limite de reatividade. Logo após o fracionamento do material, a etapa seguinte é garantir a homogeneidade das amostras para que valores a partir da medição em alguns frascos, escolhidos aleatoriamente, sejam válidos para as demais unidades do mesmo lote produzido. Além dos testes de homogeneidade, outro parâmetro crítico é a verificação da estabilidade do material para demonstrar o seu estado de preservação durante o período de armazenamento em condições de temperatura específica.⁷⁻¹¹

O estudo de estabilidade dos analitos presentes em amostras biológicas é primordial para verificar se há diferença entre as medições iniciais (amostras recém-colhidas) e as amostras pós-período de armazenamento de longo prazo. O objetivo é, portanto, assegurar que não tenham sido afetados significativamente os parâmetros determinados.¹²⁻¹⁵ Assim, compreender a estabilidade de um padrão de referência torna-se possível estimar o seu prazo de validade durante o armazenamento para o uso pretendido (tempo de prateleira) e determinar as condições adequadas que o mantêm como controle de qualidade dos ensaios laboratoriais.¹⁵⁻¹⁶

Embora muitos estudos referem-se à estabilidade de vários componentes bioquímicos, na literatura há poucos que abordam as imunoglobulinas do soro humano e suas condições ideais de estocagem, como tempo e temperatura.¹⁷ Em geral, a atividade de

anticorpos presentes no soro é estável a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período de tempo específico.¹¹ Essa avaliação é fundamental para garantir o padrão de qualidade do soro controle durante o seu armazenamento e, com isso, detectar possíveis falhas na execução dos ensaios.

Nos últimos anos, o cenário laboratorial mudou bastante, tendo em vista a inovação de metodologias aplicadas, a crescente utilização de equipamentos automatizados e outros impulsionadores internos e externos. Com foco no paciente, o avanço se reflete em tecnologias cada vez mais sensíveis e específicas para um diagnóstico precoce e fidedigno. Atrelado a isso, houve a ampliação do uso de materiais de controle de qualidade para o monitoramento do desempenho laboratorial.^{5,18-20}

Este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade das amostras de controle de qualidade interno, padronizadas com baixo limite de reatividade (fracamente reagente), quanto à persistência da reatividade dos anticorpos anti-HIV após o armazenamento de longo prazo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Métodos

Trata-se de uma pesquisa vinculada ao Programa de Controle de Qualidade Interno para HIV implantado no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Inicialmente, como Projeto de Pesquisa, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz no 0029D/2010.

Nessa investigação retrospectiva, foram utilizados os mesmos lotes de soro HIV positivo ($n = 4$) provenientes do estudo de estabilidade realizado por Castejon *et al* (2014)¹⁰, preparados em 2011 e, após um período de 13 anos de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, os seguintes soros foram reavaliados: dois lotes HIV fracamente positivo (CQI061 e CQI067), diluídos em soro negativo e numerados de acordo com os soros positivos empregados, e dois lotes HIV fortemente positivo (067 e 075).

Os lotes de soro foram confeccionados a partir do processamento de bolsas de plasma provenientes de serviços de hemoterapia pela técnica de trombinização. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas quanto à reatividade anti-HIV em diferentes ensaios sorológicos específicos, fracionadas (volume 1,0 mL) em criotubos, verificada a homogeneidade dos soros e armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.²¹ O preparo do CQI positivo foi de acordo com os procedimentos recomendados pelo manual técnico utilizado no Laboratório de HIV do CIM-IAL.²¹ Para obtenção de um soro HIV fracamente positivo no ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) [Vironostika HIV Uni-Form Plus O (Biomérieux SA, France)], a diluição estabelecida – equivalente ao valor de densidade óptica (DO) na faixa de 1,5 a 4,5 vezes o valor do *cut off* (CO) da reação – para os lotes CQI061 e CQI067 foi 1:60.000 e 1:20.000, respectivamente. No ensaio de Western blot (WB) [Cambridge Biotech HIV-1 (Maxim Biomedical, Inc., USA)], a diluição padronizada correspondente à última de uma sequência de diluições em que o

padrão de positividade para anticorpos anti-HIV mantinha-se presente, foi 1:100 ao CQI061 e 1:400 para o CQI067.^{10,21} Em relação aos lotes 067 e 075, considerados HIV fortemente reagente, a positividade encontrada foi superior ao valor máximo de detecção (DO > 3,000) estabelecido no leitor de microplacas.

No estudo prévio de estabilidade de longa duração no CIM-IAL, realizado entre 2011 e 2012, os lotes de soro foram avaliados por um período de 56 semanas (392 dias), quanto à invariabilidade da reatividade de anticorpos contra o HIV por meio dos mesmos kits de reagentes imunodiagnósticos utilizados na caracterização dessas amostras, não havendo a ocorrência de resultado falso-negativo.¹⁰

Em 2024, o critério estabelecido para a reavaliação da reatividade dos anticorpos anti-HIV nos quatro lotes de soro foi por meio de ensaios laboratoriais disponíveis no Centro de Imunologia do IAL (CIM-IAL) e no Laboratório de Imunologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. As metodologias empregadas foram: ELISA [Murex HIV Ag/Ab Combination (Diasorin S.p.A, United Kingdom)], quimioluminescência (CLIA) [Vitros HIV Combo (Ortho-Clinical Diagnostics, United Kingdom)], Western blot [HIV Blot 2.2 (MP Diagnostics, Germany) e imunoblot rápido DPP HIV1/2 (IBR) [Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil]. Os CQI 061(1:60.000) e 067 (1:20.000) foram avaliados no ELISA e CLIA, enquanto as diluições 1:100 (CQI061) e 1:400 (CQI067) no WB e IBR.

Os resultados do ELISA e CLIA foram reportados como a média dos valores da razão DO/CO e dos índices (unidade relativa de luz/CO), respectivamente. Para o WB e IBR adicionou-se a reatividade do perfil de bandas com a sua respectiva intensidade – forte (2+), fraca (1+) e muito fraca (1-). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e por três profissionais de cada laboratório.

Resultados

Os resultados da reatividade dos anticorpos anti-HIV presentes nas amostras de soro nas diferentes metodologias estão descritos na tabela abaixo, em paralelo com os do estudo da estabilidade em 2012. ([Tabela 1](#)).

Tabela 1. Resultados da estabilidade dos lotes de soros avaliados em diferentes períodos de armazenamento

Lote MR	Estabilidade em 2012			Monitoramento em 2024					
	ELISA (Ab) DO/CO	WB	Interpretação	ELISA (Ag/Ab) DO/CO	CLIA (Ag/Ab) Índice	Interpretação	WB	IBR	Interpretação
CQI061	2,40	gp160(2+), gp120(2+), p66(1+), p51(1+), gp41(2+), p31(1+), p24(1+)	HIV (reagente fraco)	15,31	59,90	HIV (reagente forte)	gp160(2+), gp120(2+), gp41(2+), p24(1+)	gp160(1+), gp41(2+)	HIV (reagente fraco)
CQI067	2,33	gp160(2+), gp120(2+), p66(2+), gp41(1+), p24(1+), p17(1+)		10,84	13,23		gp160(2+), gp120(1+), gp41(1+), p24(1+)	gp160(1-), gp120(1-), gp41(1+), p24(1-)**	
67	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17*	HIV (reagente forte)	15,65	278,33	HIV (reagente forte)	gp160(2+), gp120(2+), p66(2+), p51(2+), gp41(2+), p39(2+), p31(1+), p24(2+), p17(2+)	gp160, gp120, gp41, p24*	HIV (reagente forte)
75	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17*		14,89	72,10		gp160(2+), gp120(2+), p66(2+), p51(2+), gp41(2+), p39(1+), p31(2+), p24(2+), p17(2+)	gp160(2+), gp120(1+), gp41(2+), p24(2+)	

Fonte: Elaborado pelos autores

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática; Ab: anticorpo; Ag: antígeno; DO: densidade ótica; CO: ponto de corte (cut off); CLIA: imunoenensaio de quimioluminescência; WB: Western blot; IBR: imunoblot rápido; (2+): intensidade forte; (1+): intensidade fraca; (1-): intensidade muito fraca; *todas as bandas com intensidade forte (2+); **abaixo do preconizado para controle de qualidade interno.

Nesta reavaliação, as amostras de soro dos lotes anti-HIV fracamente reagente avaliadas nos ensaios (ELISA e CLIA), que detectam simultaneamente antígeno e anticorpo, apresentaram positividade muito superior à faixa de variação aceitável – de 1,5 a 4,5 vezes o valor do *cut off*. Como no estudo da estabilidade realizado em 2012,¹⁰ os soros 067 e 075 mantiveram-se fortemente reagentes para HIV. No ELISA, os valores de absorbância (450 nm) das triplicatas do CQI061 estavam acima de 3,000 e do CQI067 acima de 2,000 e, no CLIA, os resultados foram muito superiores ao seu ponto de corte (1,00).

As diluições estabelecidas, em 2011, para os CQI061 e CQI067 no WB, quando avaliadas, em 2024, no WB e no IBR atenderam ao critério de positividade para HIV-1, que é definido pela presença de pelo menos duas das seguintes bandas: gp160, gp120, gp41 ou p24.²² No entanto, algumas bandas estruturais não estavam presentes no WB (HIV blot 2.2), como as proteínas p66 (CQI061 e CQI067), p51 e p31 (CQI061) e a p17 (CQI067). No IBR, a diluição 1:100 do CQI061 estava de acordo com o preconizado, mas no CQI067 (1:400) as bandas apresentaram intensidade muito fraca, abaixo do padrão de reatividade ideal para um controle interno.

Discussão

Ao longo da última década, com os avanços tecnológicos e atualizações em regulamentos de testagem, o panorama dos testes laboratoriais para HIV foi substancialmente modificado. Conseqüentemente, os algoritmos de testagem têm sido atualizados para acompanhar apropriadamente os ensaios. Os imunoenaios de quarta geração possibilitam a detecção simultaneamente do antígeno p24 e de anticorpos anti-HIV, que são empregados na triagem sorológica da infecção, e permitem a redução no período da janela diagnóstica. A variabilidade na sensibilidade dos testes reflete diretamente no resultado da amostra em função do estágio da infecção no momento da coleta do sangue. Os laboratórios clínicos têm acompanhado a evolução e, com isso, os novos kits de reagentes são empregados na rotina diagnóstica.²²⁻²⁵

A degradação do material biológico armazenado por longo tempo é um fator importante a ser investigado, porém a interpretação dos resultados em uma reavaliação pode ser complexa quando há indisponibilidade de ensaios similares aos empregados anteriormente. Torna-se difícil verificar se a degradação do material ocorreu de fato ou se a diferença dos resultados é consequência do uso de testes laboratoriais mais sensíveis.^{26,27} A avaliação do impacto do armazenamento em longo prazo deve ser comparada com a variabilidade dos resultados de detecção de anticorpos presentes, aplicando-se análises estatísticas para assegurar a estabilidade. Neste estudo, a indisponibilidade do ensaio de terceira geração (detecção somente de anticorpos) foi um fator limitante.

O armazenamento de longo prazo durante a padronização de um CQI deve ser levado em consideração. Na reavaliação os resultados dos CQI061 (1:60.000) e CQI067 (1:20.000) foram reagentes nos ensaios de quarta geração – ELISA e CLIA – porém as diluições apresentam valores acima do recomendado para serem consideradas amostra controle (fracamente reagente). Com o propósito de estabelecer a diluição ideal do CQI (reatividade de 1,5 a 4,5 vezes o valor do cut off) para o ELISA Murex HIV Ag/Ab, foram analisadas as sequências de diluições na base 10 (1:10 a 1:100.000) de ambos os lotes HIV positivo – 061 e 067 – em soro negativo. O valor da relação DO/CO para o soro 067 pode ser estabelecido na diluição 1:100.000 (2,94), todavia o lote 061, mesmo nesta diluição, a DO/CO (8,67) permaneceu acima da faixa preconizada para o CQI. Esses resultados corroboram o recomendado para o CQI, ser preparado especificamente para cada conjunto de reagentes diagnóstico com o objetivo de estabelecer a faixa de reatividade que mais facilita a percepção dos erros ocorridos durante a realização dos ensaios.²⁸

Ao compararmos os resultados do WB do estudo anterior da estabilidade¹⁰ aos desta reavaliação, nas amostras dos CQI061 e CQI067 algumas bandas estruturais do HIV não foram reproduzidas, como p66, p51, p31 e p66 e p17, respectivamente. As condições de armazenamento podem influenciar na estabilidade dos anticorpos pela precipitação ou degradação das proteínas, alterando sua estrutura e atividade.^{13,15} Os mecanismos de degradação dos soros durante o armazenamento e a metodologia analítica utilizada são fatores diretamente associados à qualidade das amostras.²⁷ Por outro lado, na primeira

avaliação da estabilidade foi verificado que as bandas p66 e p17 estavam presentes tanto no lote 067 (fortemente reagente) como no CQI067 (067 diluído). Diferentemente do que aconteceu na reavaliação, essas bandas não apresentaram reatividade no soro diluído. Embora a metodologia seja a mesma, pode haver diferença na sensibilidade analítica dos kits de reagentes diagnósticos empregados, assim como na instabilidade desses anticorpos durante o armazenamento.

Laperche *et al* (1997),²⁹ em um estudo comparativo entre as técnicas de Western blot e imunoblot em amostras de painéis de soroconversão para HIV, verificaram que a sensibilidade dos ensaios foi semelhante. Quando analisados os resultados desses ensaios em nosso estudo, o IBR não detectou a banda p24 presente no WB dos soros 075 e CQI067, considerando que no lote 067, precursor do CQI067, essa banda foi identificada em ambos os ensaios. Deve ser levada em conta a robustez dos métodos analíticos, que pode mudar em razão das variações amostrais.¹²

A troca da metodologia é um fator fundamental para a compreensão das limitações que podem ocorrer com as amostras ao serem empregadas em análises futuras.²⁷ O IBR não foi realizado no estudo de estabilidade anterior¹⁰, sendo empregado nesta reavaliação a fim de experimento. Em relação às bandas presentes no CQI067 (1:400), com exceção da gp41 (1+), que estava com intensidade fraca, as demais – gp160 (1-), gp120 (1-) e p24 (1-) – estavam muito fracas, abaixo do preconizado pelo laboratório para um controle de qualidade interno. Além da intensidade muito fraca, o padrão de bandas não foi mantido nas réplicas, havendo a intermitência da p24. Pela experiência do laboratório, esta diluição, em decorrência do seu limite de reatividade, pode apresentar um resultado indeterminado e, assim, ser confundida com falhas no procedimento do ensaio. Para este ensaio, a diluição ideal do CQI067 é 1:100, com presença das bandas – gp160, gp120, gp41 e p24 – em intensidade fraca (1+). Garantir a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados de um MR é de extrema importância na verificação diária do desempenho dos procedimentos analíticos. Por isso, na validação de um CQI várias réplicas da amostra são analisadas antes de sua liberação.

No CIM-IAL, faz parte o monitoramento constante das amostras de MR armazenadas para confirmar a estabilidade do analito (anticorpos) antes de encaminhá-las aos laboratórios participantes dos programas oferecidos. Em um processo analítico, a fase de armazenamento dos soros é considerada crítica em razão do impacto que pode causar na qualidade dos resultados. Sabe-se que cortes de energia ou oscilações de tensão dos equipamentos (freezer) são inevitáveis e podem futuramente levar a valores divergentes.³⁰⁻³²

Limitação

A maioria das metodologias utilizadas na avaliação da estabilidade dos anticorpos anti-HIV do estudo de Castejon *et al* (2014)¹⁰ ficou indisponível no período desta reavaliação. Com isso, os CQI apresentaram-se fortemente reagentes nos ensaios de quarta geração (ELISA e CLIA), que impossibilitaram a aplicação de métodos estatísticos.

Conclusão

Os avanços no diagnóstico laboratorial, principalmente na identificação precoce da infecção pelo HIV com a finalidade de tratamento e prevenção, têm contribuído significativamente para a população. Aliado à evolução, o emprego de amostras de controle de qualidade, principalmente aquelas com baixa reatividade, tem sido fundamental no monitoramento do procedimento analítico. No entanto, o controle de qualidade interno, quando preparado para um determinado ensaio e armazenado por longos períodos, pode deixar de cumprir o seu papel planejado em razão da inclusão de novas metodologias no mercado. Este estudo demonstra que a melhor forma do armazenamento de longo prazo para o soro HIV positivo, destinado para material de referência, é em seu estado "primário" para, futuramente, ser preparado e padronizado como amostra controle no teste laboratorial disponível.

Agradecimentos

Ao profissional André Rodrigues de Campos, do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo suporte técnico na realização deste estudo.

Referências

1. Gray JJ, Wreghitt TG, McKee TA, McIntyre P, Roth CE, Smith DJ, *et al.* Internal quality assurance in a clinical virology laboratory. I. Internal quality assessment. *J Pathol.* 1995; 48(2):168-1. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.2.168>.
2. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CAF, Ueda M. Implementation of a strategy for improving the serological diagnosis of HIV/AIDS by introducing the internal quality control. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010; 69(2):157-64. <https://doi.org/10.53393/rial.2010.v69.32650>.
3. Mendes ME. Estudo de estabilidade de amostras no laboratório clínico: garantia de qualidade dos resultados e da segurança para o paciente. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2019; 55(3):244-5. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190030>.
4. Jamtsho R. Stability of lyophilized human serum for use as quality control material in Bhutan. *Ind J Clin Biochem.* 2013; 28(4):418–21. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0328-x>.
5. Kulkarni S, Pierre SA, Kaliaperumal R. Efficacy of pooled serum internal quality control in comparison with commercial internal quality control in clinical biochemistry laboratory. *J Lab Physicians.* 2020; 12(3):191–5. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721151>.
6. Dhoot A, Mammen JJ, Mathews NS, Rajesh Kannangai R, Daniel D, Prasannakumar S. Internal quality control for HIV testing of blood donors - dried tube specimen as a cost-effective alternative. *Asian J Transfus Sci* 2022; 16:231-7. https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_75_21.
7. International Standards Organization. ISO Guide 34: General requirements for the competence of reference material producers. Geneva, Switzerland, 2009.
8. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ISO Guia 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Brasil, 2012.
9. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Olivieri JC, Oliveira CAF, Ueda M. Homogeneity study of the internal quality control sera for immunodiagnosis of HIV/AIDS. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(1):46-52. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442014000100006>.
10. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Granato D, Oliveira CAF, Ueda M. Study on the stability of internal quality control sera for HIV/AIDS immunodiagnostic tests. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(1):36-45. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442014000100005>.
11. World Health Organization. WHO manual for the preparation of reference materials for use as secondary standards in antibody testing. Geneva, 2022. [Acesso em 20 mai. 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/who-manual-for-reference-material-for-antibody-testing>.
12. Gislefoss RE. Quality aspects of long-term stored samples. Studies in the Janus Serum Bank of Norway [Doctoral dissertation]. Oslo: University of Oslo; 2010. [Acesso em 20 mai. 2024]. Disponível em: <https://www.duo.uio.no/handle/10852/27900?show=full>.
13. Ellervik C, Vaught J. Preanalytical variables affecting the integrity of human biospecimens in biobanking. *Clin Chem.* 2015; 61(7):914-34. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228783>.

14. Pawlik-Sobecka L, Sołkiewicz K, Kokot I, Kiraga A, Płaczkowska S, Schlichtinger AM, *et al.* The influence of serum sample storage conditions on selected laboratory parameters related to oxidative stress: A preliminary study. *Diagnostics*. 2020; 10(1):51. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010051>.
15. Jensen CZ, Nygaard B, Faber J, Pedersen PL, Larsen MK, Kanters JK, *et al.* Long-term stability of thyroid peroxidase antibody (anti-TPO) in serum in the Danish general suburban population study. *Clin Chem Lab Med*. 2023; 61(9):1590–6. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0845>.
16. Venelinov T, Sahuquillo A. Optimizing the uses and the costs of reference materials in analytical laboratories. *Trends Anal Chem*. 2006; 25(5):528-33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.02.006>.
17. Dard C, Bailly S, Drouet T, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Long-term sera storage does not significantly modify the interpretation of toxoplasmosis serologies. *J Microbiol Methods*. 2017;134(1):38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.003>.
18. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta*. 2019; 489(1):49-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.021>.
19. Plebani M, Aita A, Sciacovelli L. Patient safety in laboratory medicine. In: Donaldson L, Ricciardi W, Sheridan S, Tartaglia R. *Textbook of patient safety and clinical risk management* [Internet]. Cham: Springer; 2021. v. 24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59403-9_24.
20. Plebani M. Value-based laboratory medicine: the time is now. *Clin Chem Lab Med* 2024; 62(4):579-80. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1095>.
21. 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: IAL; 2007. [Acesso em 20 mai. 2024]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/biblio-933229>.
22. Ministério da Saúde (BR). Portaria SVS/MS nº 29, de 17 de dezembro de 2013. Aprova o manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças e dá outras providências. Brasília; Diário Oficial da União. Dec. 18, 2013. Seção 1; 245.
23. World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV testing services. 5Cs: consent, confidentiality, counselling, correct results and connection. Geneva, 2015. [Acesso em 21 mai. 2024]. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/179870>.
24. Alexander TS. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin Vaccine Immunol*. 2016; 23(4):249-53. <https://doi.org/10.1128/CVI.00053-16>.
25. Williams E, Moso M, Lim C, Chibo D, Nicholson S, Jackson K, *et al.* Laboratory diagnosis of HIV: a contemporary overview in the Australian context. *Pathology*. 2023; 55(5):610-20. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2023.04.001>.
26. Tworoger SS, Hankinson S E. Collection, processing, and storage of biological samples in epidemiologic studies: sex hormones, carotenoids, inflammatory markers, and proteomics as examples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(9):1578-81. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0629>.
27. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Oliveira CAF, Ueda M. Stability of anti-HIV antibodies in serum samples stored for two to eighteen years periods. *J Bras Patol Med Lab*. 2014; 50(4):272-77. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20140026>.

28. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CAF. Manual técnico – Programa de controle de qualidade interno em ensaios sorológicos para HIV/aids. 2016; p.24. [Acesso em 21 mai. 2024]. Disponível em: https://saude.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_7_15/manualtecnico_cqi_hiv_bvs_maio_2016.pdf.
29. Laperche S, Eughouzzi MH, Rannou C, Faucher V. Western-blot ou immunoblot VIH? Immunoanal Biol Spéc. 1997; 12(4):173-80. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(97\)89653-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(97)89653-6).
30. Simundic A-M, Lippi G. Preanalytical phase – a continuous challenge for laboratory professionals. Biochem Med. 2012; 22(2):145-9. <https://doi.org/10.11613/bm.2012.017>.
31. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. Biochem Med. 2013; 23(1):70-7. <https://doi.org/10.11613/bm.2013.009>.
32. Englezopoulou A, Kechagia M, Chatzikiriakou R, Kanellopoulou M, Valenti M, Masedu F. Pre analytical errors as quality indicators in clinical laboratory. Austin J Public Health Epidemiol. 2016; 3(5):1048. [Acesso em 21 mai. 2024]. Disponível em: <https://austinpublishinggroup.com/public-health-epidemiology/fulltext/ajphe-v3-id1048.php>.

Contribuição dos autores

Márcia Jorge Castejon: elaboração e aprovação final do manuscrito. Karen Cristina Rolim Madureira, Meire Bocoli Rossi, Elaine Lopes de Oliveira, Juliana Failde Gallo, Rosemeire Yamashiro e Francisco Erisnaldo Nunes: revisão crítica do conteúdo e aprovação final da versão do manuscrito.

Preprint

O manuscrito não foi previamente publicado em servidores preprint.

Aprovação dos autores

Os autores participaram efetivamente do trabalho, aprovam a versão final do manuscrito para publicação e assumem total responsabilidade por todos os seus aspectos, garantindo que as informações sejam precisas e confiáveis.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse de natureza política, comercial e financeira no manuscrito.

Financiamento

Os autores declaram que não houve fontes de financiamento.