



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Larissa Victória Backes da Cunha

**Padronização da carga bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* em painéis de  
Avaliação Externa da Qualidade**

Florianópolis

2024

Larissa Victória Backes da Cunha

**Padronização da carga bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* em painéis de  
Avaliação Externa da Qualidade**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Bazzo  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Jéssica Motta Martins

Florianópolis  
2024

Cunha, Larissa Victória Backes da  
Padronização da carga bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* em painéis de Avaliação Externa da Qualidade / Larissa Victória Backes da Cunha ; orientador, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Jéssica Motta Martins, 2024.  
50 p.

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

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Neisseria gonorrhoeae*. 3. Avaliação Externa da Qualidade. 4. Biologia Molecular. I. Bazzo, Maria Luiza . II. Martins, Jéssica Motta . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Larissa Victória Backes da Cunha

**Padronização da carga bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* em painéis de Avaliação Externa da Qualidade**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de dezembro de 2024.

---

Coordenação do Curso

**Banca examinadora**

---

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

---

Prof.(a) Dr.(a) Flavia Martinello  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.(a), Dr.(a) Thais Cristine Marques Sincero  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a equipe do LBMMS pela oportunidade de executar esta pesquisa. Admiro muito o trabalho de todos vocês desde o meu primeiro contato com o laboratório, durante meu Estágio Obrigatório em Análises Clínicas. Foi muito enriquecedor desmistificar a Biologia Molecular por meio da execução de técnicas que pareciam tão abstratas na literatura. Por meio desta pesquisa, despertei ainda mais o meu interesse por esta área.

Aos meus colegas do LBMMS, gostaria de agradecer diretamente à Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira, que sugeriu a ideia de realizar uma padronização de carga bacteriana para painéis de AEQ de *Neisseria gonorrhoeae*; À minha excelente orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo, sempre muito atenciosa; À Dr<sup>a</sup>. Jéssica Motta Martins, que me apoiou em todas as etapas deste TCC, desde o início da elaboração do projeto até a execução da pesquisa e escrita do trabalho final; Aos mestrandos Julia Kinetz Wachter e Rafael Emmanuel Godoy Martinez, que me auxiliaram tanto na execução da técnica de extração manual de material genético das suspensões bacterianas de *Neisseria gonorrhoeae*, como na análise por PCR no equipamento BioRad CFX96™; Ao mestrando Fernando Hartmann Barazzetti, que realizou todo o processo de liofilização; À bióloga Adriane Wendling Leismann, sempre muito querida, que me ensinou a operar o equipamento Cepheid® GeneXpert®; E ao Dr. Marcos André Schörner, que ofereceu um excelente feedback durante a revisão do projeto de pesquisa.

Também sou muito grata à equipe da Unidade Organizacional de Virologia LACEN/SC pela parceria na execução desta pesquisa e pelo ótimo trabalho: Agradeço às bioquímicas Ana Duarte Cardoso e Cristina Duarte Cardoso da Silva por receberem e processarem as amostras no equipamento Cobas ® 5800 e, sobretudo, por serem excelentes profissionais.

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos meus avós, José Lídio e Dalva Maria. Eu devo a minha vida a vocês.

## RESUMO

Diante da recente implementação da Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo no SUS, estabelecida pela Nota Técnica Nº 26/2023, o LBMMS/CCS/UFSC, em parceria com o DATHI/SVSA/MS, inaugurou no segundo semestre de 2023 a primeira rodada de Avaliação Externa da Qualidade da Rede Nacional de Biologia Molecular para Detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (AEQ-CT/NG). Nesse contexto, o objetivo geral desta pesquisa foi padronizar a carga bacteriana mínima e máxima para elaboração de painéis liofilizados para avaliação externa da qualidade de *Neisseria gonorrhoeae* (NG). Para isso, foi realizado o cultivo da cepa ATCC 49226 de NG em Ágar Thayer-Martin e subcultivo em Ágar Chocolate. A partir do isolado bacteriano, foi produzida uma suspensão 0,5 McF, que foi submetida ao processo de diluição seriada para produção de alíquotas com concentrações na faixa de  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  totalizando 216 criotubos amostrais. Desses, 120 foram reservados para análise direta por PCR e 96 foram liofilizados antes de serem submetidos ao processo analítico, de forma a determinar a perda de carga bacteriana pelo processo de liofilização. A PCR foi realizada em três diferentes equipamentos: Bio-Rad CFX96™, Cepheid® GeneXpert® e Roche® Cobas® 5800. Além disso, a fim de avaliar o potencial de contaminação cruzada da técnica de diluição seriada e de liofilização, foram produzidos, respectivamente, "brancos de bancada" e "brancos de liofilização", igualmente submetidos ao processo de análise por PCR nos três diferentes equipamentos. Após a coleta dos dados da pesquisa, estabeleceu-se que a faixa de diluição detectável para uma suspensão bacteriana de NG 0,5 McF foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , tanto para amostras não-liofilizadas quanto liofilizadas. Dentro deste intervalo, determinou-se com sucesso a dinâmica entre pontos de diluição mínimo e máximo a partir das equações das curvas logarítmicas Ct versus diluição, que forneceram valores satisfatórios de R<sup>2</sup>. Também foi possível determinar a variação da carga bacteriana das amostras após a liofilização, para a qual constatou-se que tal processo não interfere no status de detecção amostral. Além disso, por meio de testes de contaminação cruzada em bancada e liofilizador, notou-se que o processo de liofilização não gerou resultados falsos-positivos em nenhuma das condições testadas. Por fim, concluiu-se que a faixa ideal de diluições bacterianas para compor painéis de AEQ com Cts baixos, intermediários e altos foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ .

**Palavras-chave:** *Neisseria gonorrhoeae*; Avaliação Externa da Qualidade; Biologia Molecular.

## ABSTRACT

In view of the recent implementation of the National Network of Molecular Biology Laboratories for Detection of Chlamydia and Gonococcus in Brazilian unified health system, standardized by Technical Note No. 26/2023, LBMMS/CCS/UFSC, in partnership with DATHI/SVSA/MS, inaugurated in the second half of 2023 the first round of External Quality Assessment of the National Molecular Biology Network for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. In this context, the general objective of this research was to standardize the minimum and maximum bacterial load for the preparation of lyophilized panels for External Quality Assessment of NG. Initially, the ATCC 49226 strain of NG was cultivated in Thayer-Martin Agar and subcultivated in Chocolate Agar. Then, a 0.5 McF suspension was produced from the bacterial isolate and subjected to a serial dilution process in order to produce aliquots ranging from  $10^{-3}$  to  $10^{-10}$ , totaling 216 sample cryotubes, from which 120 were reserved for direct PCR analysis and 96 were lyophilized before being subjected to the analytical process, in order to determine loss of bacterial load during lyophilization. PCR was performed in three different equipment: Bio-Rad CFX96™, Cepheid® GeneXpert® and Roche® Cobas® 5800. Furthermore, in order to evaluate the potential for cross-contamination of serial dilution and lyophilization techniques, "bench blanks" and "lyophilization blanks" were produced, respectively, and also subjected to the PCR analysis process in the three different equipment. After collecting the research data, it was established that the detectable dilution range for a 0.5 McF NG bacterial suspension was  $10^{-3}$  to  $10^{-7}$ , for both non-lyophilized and lyophilized samples. Within this range, the dynamics between minimum and maximum dilution points were successfully determined from the equations of the logarithmic Ct x dilution curves, which provided satisfactory  $R^2$  values. It was also possible to determine the variation in bacterial load of the samples after lyophilization, for which it was found that this process does not interfere with the sample detection status. In addition, through bench and lyophilized cross-contamination tests, it was also noted that the lyophilization process did not generate false-positive results in any of the conditions tested. Finally, it was concluded that the ideal range of bacterial dilutions to compose EQA panels with low, intermediate and high Cts was  $10^{-3}$  to  $10^{-7}$ .

**Keywords:** *Neisseria gonorrhoeae*; External Quality Assessment; Molecular Biology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da metodologia de pesquisa.....	28
Figura 2. Subcultivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> em Ágar Chocolate .....	29
Figura 3. Processo de ajuste de densidade óptica de suspensão bacteriana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> em tubo de ensaio acoplado ao equipamento bioMérieux VITEK® DensiCHEK® plus.....	30
Figura 4. Tubos Falcon contendo diferentes diluições de suspensão bacteriana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 0,5 McF .....	31
Figura 5. Criotubos contendo alíquotas de diferentes diluições de suspensão bacteriana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 0,5 McF.....	31
Figura 6. Distribuição de criotubos em três diferentes bandejas do liofilizador .....	32
Figura 7. Liofilização em equipamento Terroni® LS 6000.....	33
Figura 8. Incubação de amostras em bloco de aquecimento a 56 °C .....	34
Figura 9. Inserção de amostras em equipamento Bio-Rad CFX96™.....	35
Figura 10. Inserção de cartuchos no equipamento Cepheid - GeneXpert®.....	36
Figura 11. Curva <i>Ct versus diluição</i> correspondente às diluições $10^{-3}$ a $10^{-7}$ de suspensão bacteriana 0,5 McF de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não liofilizadas e analisadas em GeneXpert®. ....	41
Figura 12. Curva <i>Ct x diluição</i> correspondente às diluições $10^{-3}$ a $10^{-7}$ de suspensão bacteriana 0,5 McF de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não liofilizadas e analisadas em Cobas® 5800. ....	42
Figura 13. Curva <i>Ct x diluição</i> correspondente às diluições $10^{-3}$ a $10^{-7}$ de suspensão bacteriana 0,5 McF de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não liofilizadas e analisadas em CFX96™. ....	42
Figura 14. Curva <i>Ct versus diluição</i> correspondente às diluições $10^{-3}$ a $10^{-7}$ de suspensão bacteriana 0,5 McF de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> liofilizadas e analisadas em GeneXpert®. ....	43
Figura 15. Curva <i>Ct x diluição</i> correspondente às diluições $10^{-3}$ a $10^{-7}$ de suspensão bacteriana 0,5 McF de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> liofilizadas e analisadas em Cobas® 5800. ....	43



Figura 16. Curva *Ct* x diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizadas e analisadas em CFX96™ .....44

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Valores de <i>Ct</i> obtidos por PCR em tempo real para diluições $10^{-3}$ a $10^{-10}$ não-liofilizadas de suspensão de <i>N. gonorrhoeae</i> 0,5 McF em equipamentos CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800.* .....	39
Quadro 2. Valores de <i>Ct</i> obtidos por PCR em tempo real para diluições $10^{-3}$ a $10^{-10}$ liofilizadas de suspensão de <i>N. gonorrhoeae</i> 0,5 McF em equipamentos CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800.* .....	40
Quadro 3. Valores de variação percentual de <i>Ct</i> após liofilização das diluições $10^{-3}$ a $10^{-10}$ de suspensão bacteriana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 0,5 McF. ....	45
Quadro 4. Resultados de amplificação por PCR em tempo real para amostras referentes aos testes de contaminação cruzada em bancada e liofilizador. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AEQ-TR	Avaliação Externa da Qualidade dos Testes Rápidos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	do inglês, <i>American Type and Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos e Culturas)
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEQ	Controle Externo da Qualidade
CIQ	Controle Interno da Qualidade
CO2	Dióxido de Carbono
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Ct	do inglês, <i>Cycle Threshold</i>
DATHI	Departamento de HIV/AIDS, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde
HIV	do inglês, <i>Human Immunodeficiency Viruses</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HU	Hospital Universitário
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
McF	Escalade McFarland
MG	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MS	Ministério da Saúde
NAATs	do inglês, <i>Nucleic Acid Amplification Tests</i> (Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos)
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCDT-IST	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
SUS	Sistema Único de Saúde
SVSA	Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$V_p$	Varição percentual
$Ct_{nl}$	<i>Cycle Threshold</i> das amostras não-liofilizadas
$Ct_l$	<i>Cycle Threshold</i> das amostras liofilizadas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BILIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	20
<b>2.1.1</b>	<b>Características gerais e condições de cultivo laboratorial</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Transmissão, patogênese, diagnóstico e resistência aos antimicrobianos</b> .....	<b>21</b>
2.2	TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NAATS).....	23
2.3	AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE .....	25
2.4	LIOFILIZAÇÃO E CONTAMINAÇÃO AMOSTRAL.....	25
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
5.1	CULTIVO BACTERIANO, SUBCULTIVO E IDENTIFICAÇÃO .....	28
<b>5.1.1</b>	<b>Cultivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i></b> .....	<b>28</b>
5.1.1.1	<i>Subcultivo</i> .....	29
5.2	PRODUÇÃO DE SUSPENSÕES BACTERIANAS.....	29
<b>5.2.1</b>	<b>Produção de suspensões bacterianas 0,5 McF</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Diluição seriada de suspensões bacterianas</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Preparo de brancos de bancada e liofilização</b> .....	<b>31</b>
5.2.3.1	<i>Preparo de brancos de bancada</i> .....	32
5.2.3.2	<i>Preparo de brancos de liofilização</i> .....	32
5.3	LIOFILIZAÇÃO .....	33
<b>5.3.1</b>	<b>Reidratação de suspensões bacterianas liofilizadas</b> .....	<b>33</b>
5.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CFX96™, GENEXPERT® E COBAS® 5800 .....	33
<b>5.4.1</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase em CFX96™</b> .....	<b>34</b>
5.4.1.1	<i>Extração de DNA</i> .....	34
5.4.1.2	<i>Preparo de Mastermix e amplificação de material genético</i> .....	35
<b>5.4.2</b>	<b>PCR em GeneXpert®</b> .....	<b>35</b>

<b>5.4.3</b>	<b>PCR em Cobas® 5800</b> .....	<b>36</b>
5.5	QUANTIFICAÇÃO DA PERDA DE CARGA BACTERIANA APÓS LIOFILIZAÇÃO .....	36
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
6.1	RESULTADOS DAS PCR PARA DILUIÇÕES $10^{-3}$ A $10^{-10}$ DE SUSPENSÃO BACTERIANA 0,5 MCF DE <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : DINÂMICA ENTRE PONTOS DE DILUIÇÃO MÍNIMO E MÁXIMO .....	38
6.2	DETERMINAÇÃO DE VARIAÇÃO DE CARGA BACTERIANA APÓS LIOFILIZAÇÃO .....	44
6.3	RESULTADOS DO TESTE DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM BANCADA E NO LIOFILIZADOR .....	45
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A gonorreia é uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST) causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae* (NG). É uma das principais causas de cervicite e doença inflamatória pélvica em indivíduos do sexo feminino, e importante causadora de uretrite em pessoas do sexo masculino. Pode, ainda, acometer regiões extragenitais como reto, faringe e conjuntiva ocular. Os indivíduos infectados, caso sigam sem tratamento, podem sofrer danos irreversíveis à saúde, incluindo infertilidade e dor pélvica crônica (BRASIL, 2023a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, com base em dados de prevalência de ISTs entre 2009 e 2016, uma incidência de 376,4 milhões de casos de IST entre pessoas de 15 a 49 anos de idade em 2016, sendo 86,9 milhões por NG. Este cenário alarmante motivou o setor de saúde global da OMS de 2016 - 2021 a elaborar uma estratégia para eliminação dessas infecções como problema de saúde mundial até o ano de 2030. O plano inclui reforços na promoção de medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento, visando melhorar a qualidade e a acessibilidade dos serviços de saúde (OMS, 2021a).

Nessa conjuntura, o mais recente “Relatório Global de Progresso em HIV, Hepatites Virais e ISTs” publicado pela OMS reportou uma incidência global de 82,4 milhões casos de gonorreia em 2020 e concluiu que o combate às principais epidemias de ISTs está progredindo lentamente, porém os serviços de diagnóstico, prevenção e tratamento ainda são pouco acessíveis para uma grande parte da população mundial infectada (OMS, 2021b).

No Brasil, o tratamento de infecções por NG é realizado principalmente por abordagem sindrômica, com base nos sintomas do paciente, conforme fluxogramas de manejo clínico presentes no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT-IST) (BRASIL, 2022). Entretanto, não é raro que as infecções por NG se manifestem de forma assintomática e permaneçam não tratadas, trazendo à tona a necessidade de efetuar o rastreamento desse agente não somente nos pacientes com sintomas clínicos, como também em indivíduos com maior exposição e/ou vulnerabilidades, possibilitando o tratamento adequado dos infectados e interrompendo a cadeia de transmissão dessa IST (BRASIL, 2023a).

Nesse contexto, foi criada a Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo no Sistema Único de Saúde (SUS), normatizada pela Nota Técnica Nº 26/2023 e implementada definitivamente no primeiro semestre de 2023. Esta rede laboratorial é mantida por meio de um Contrato de Prestação de Serviço de Exames entre o Ministério da Saúde e a empresa Roche, fornecedora das plataformas de exames de biologia molecular Cobas® 4800 e Cobas® 5800 (BRASIL, 2023a).

Cobas® 4800 e Cobas® 5800 são plataformas automatizadas para Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAATs) que utilizam a técnica de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Permitem a detecção de DNA de NG a partir de amostras de *swabs* vaginais, endocervicais, uretrais, orofaríngeos e anorretais, bem como de amostras de urina. Os equipamentos realizam automaticamente a extração de ácidos nucleicos das amostras e amplificação seletiva de duas sequências diferentes da região genômica DR-9 de NG (MARLOWE, et al; 2017). Além disso, por utilizarem a técnica de PCR em tempo real, permitem a medida relativa da quantidade inicial de sequências genômicas alvo presentes na amostra por meio do fornecimento do valor de *Ct* (*Cycle Threshold*), que corresponde ao número de ciclos de PCR ao qual a amostra foi submetida até atingir uma quantidade detectável de material genético pelo equipamento (THERMOFISHER, 2016).

Segundo a norma técnica nº 26/2023, os NAATs para detecção de NG no SUS são recomendados para investigação do agente etiológico em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, para os quais deve-se escolher o (s) sítio (s) de coleta da amostra de acordo com suas práticas sexuais e sintomatologia (quando presente). Entretanto, em casos sintomáticos, é recomendado que seja iniciado tratamento do paciente e suas parcerias sexuais o mais cedo possível, de preferência após a coleta de amostra, seguindo as instruções do PCDT-IST. Os NAATs para NG são, neste caso, de caráter confirmatório, e auxiliam na posterior revisão da terapia recomendada (BRASIL, 2023a).

Diante das demandas em saúde no Brasil, os Laboratórios Clínicos funcionam sob os requisitos técnico-sanitários estabelecidos pela RDC Nº 786, de 5 de maio de 2023. Nesse âmbito, é determinado que, entre outras especificações, esses serviços sejam submetidos a avaliações de Controle Interno da Qualidade



(CIQ) e Controle Externo da Qualidade (CEQ). O CIQ é realizado pelo próprio laboratório clínico por meio de análise de amostras controle comerciais regularizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou obtidas por comparação interlaboratorial, a fim de avaliar a reprodutibilidade dos resultados. O CEQ, por sua vez, consiste em um processo comparativo interlaboratorial para determinação da exatidão e desempenho dos processos analíticos em Exames de Análises Clínicas, que é conduzida por Provedores de Ensaio de Proficiência em Programas de Avaliação da Qualidade (BRASIL, 2023b).

Desta forma, os programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) verificam se os resultados fornecidos por laboratórios que utilizam metodologias e materiais equivalentes são semelhantes, permitindo a detecção de erros sistemáticos que passam despercebidos pelo CIQ (ANVISA, 2013).

O Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/CCS/UFSC), localizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago em parceria com o Departamento de HIV/AIDS, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde (DATHI/SVSA/MS), é um Provedor de Ensaio de Proficiência para AEQ de testes rápidos (AEQ-TR) para Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Sífilis e hepatites virais e para a redes laboratoriais clássicas e rápidas para cargas Virais do HIV, HCV, HBV e Imunofenotipagem CD4+/CD8+ (BRASIL, 2018). Além disso, diante da implementação da Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo no SUS em 2023, foi realizada no mesmo ano a primeira tentativa de Avaliação Externa da Qualidade da Rede Nacional de Biologia Molecular para Detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (AEQ-CT/NG) (LBMMS, 2023).

O LBMMS realiza a AEQ por meio de rodadas teóricas e práticas. As rodadas teóricas consistem no preenchimento individual de um questionário online pelos profissionais dos laboratórios avaliados. Rodadas práticas, por sua vez, ocorrem por meio da distribuição, via Correios, de painéis de AEQ específicos para o tipo de teste laboratorial ou teste rápido avaliado (BRASIL, 2018; LBMMS, 2023). O painel AEQ-CT/NG contém seis tubos com amostras biológicas – Preservadas por meio da técnica de Liofilização – cujo status de detecção é conhecido apenas pela equipe AEQ, seis frascos contendo 1,2 mL de tampão para reidratação, seis pipetas

de transferência tipo Pasteur, um manual de instruções para execução da rodada e um formulário de rascunho (LBMMS, 2024a; LBMMS, 2024b). Os profissionais devem, após reidratação das amostras, aplicá-las nos testes laboratoriais para os quais os painéis foram produzidos, registrar os resultados obtidos e reportá-los ao LBMMS. Em seguida, no sistema de AEQ, os dados são comparados com o gabarito oficial e atribui-se uma nota a cada participante e status de “aprovado” ou “reprovado”. Este processo tem foco educacional e não punitivo, e permite que os laboratórios e os profissionais avaliados corrijam falhas que comprometam a qualidade de seus resultados (BRASIL, 2018; LBMMS, 2023).

Para a confecção dos painéis de AEQ, amostras desidratadas de NG podem ser produzidas a partir de suspensões bacterianas por meio da liofilização, um método que utiliza sublimação e dessorção para a remoção da água de materiais congelados (GAIDHANI, 2015). Nesse contexto, é essencial garantir que as suspensões de NG tenham cargas bacterianas dentro dos limites inferior e superior de detecção da técnica de PCR avaliada. Estes limites podem ser determinados por meio da produção e análise de suspensões com cargas bacterianas padronizadas (FOROOTAN, 2017).

Para a padronização das cargas bacterianas em pesquisas microbiológicas, utiliza-se a escala de McFarland (McF), que permite a estimativa da concentração bacteriana de uma suspensão em UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro) a partir de sua densidade óptica. Atualmente, existem equipamentos que realizam a leitura digital dessa propriedade e fornecem o seu resultado automaticamente na escala McFarland (ZAPATA, 2015; BIOMÉRIEUX, 2017). Nesse sentido, ressalta-se que a equipe do LBMMS constatou, em sua rotina de processamento de amostras, a ocorrência de resultados falsos-negativos em amostras de suspensões bacterianas de NG com turbidez acima de  $5 \times 10^{-3}$  McF no equipamento GeneXpert®, que não é prevista ou explicada pelo manual de instruções do fabricante (CEPHEID, 2019).

Além dos limites de detecção de cada equipamento, outra importante preocupação em PCR é a possibilidade de contaminação cruzada entre as amostras, cujo risco é ampliado durante a manipulação de cargas bacterianas elevadas (SLOAN, 2007). Desta forma, torna-se necessário padronizar uma faixa de cargas bacterianas na qual as amostras permaneçam simultaneamente detectáveis

por PCR e apresentem baixo risco de contaminação cruzada, garantindo um processo de AEQ fidedigno.

## 2 REVISÃO BILIOGRÁFICA

### 2.1 *Neisseria gonorrhoeae*

#### 2.1.1 Características gerais e condições de cultivo laboratorial

*Neisseria gonorrhoeae* é um diplococo gram-negativo, com superfícies laterais adjacentes achatadas, imóvel e não esporulado, que majoritariamente infecta os epitélios colunares e de transição do trato urogenital da espécie humana (PROCOP, 2018; UNEMO, 2019). É um microrganismo aeróbio, porém capaz de crescer em condições anaeróbicas na presença de outros aceptores de elétrons alternativos ao oxigênio, como nitritos, por exemplo. Apesar de ser adaptado a diversas condições de oxigenação, trata-se de um microrganismo fastidioso que depende de condições específicas de temperatura, umidade e composição química ambiental para o seu desenvolvimento, sendo considerado de difícil cultivo laboratorial. Nesse contexto, deve-se mantê-lo, idealmente, sob temperaturas de 35° a 37°C, em atmosfera de 5 a 7% de dióxido de carbono e em ambiente úmido (PROCOP, 2018; UNEMO, 2019).

Adicionalmente, o microrganismo apresenta características que impossibilitam sua sobrevivência fora do organismo humano por longos períodos: sua absorção de ferro (micronutriente indispensável para seu crescimento) ocorre exclusivamente a partir de proteínas carreadoras, como hemoglobina, transferrina e lactoferrina (UNEMO, 2019). A espécie NG como um todo é incapaz de crescer em um ambiente sem o aminoácido cisteína e algum substrato metabólico a ser utilizado como fonte de energia pelo Ciclo de Krebs, como glicose, piruvato ou lactato. Muitas cepas também são incapazes de produzir aminoácidos, pirimidinas e purinas por conta própria (PROCOP, 2018).

Para o seu isolamento laboratorial, podem ser utilizados meios seletivos baseados em Ágar Chocolate, como Thayer-Martin, Thayer-Martin modificado, Lewis-Martin e GC-Lect, que contém antibióticos para inibição do crescimento de outras espécies bacterianas e de leveduras (SPENCE, 2008).

### **2.1.2 Transmissão, patogênese, diagnóstico e resistência aos antimicrobianos**

A transmissão de NG ocorre por meio de sexo vaginal, anal ou oral desprotegido, desencadeando um quadro infeccioso sintomático ou assintomático. A infecção acomete principalmente o trato genital e urinário, porém infecções retais e faríngeas são também frequentes. Outra possibilidade é a transmissão vertical durante o parto, especialmente para conjuntivas oculares de neonatos (oftalmia neonatal). A transmissão durante a gravidez não é possível, pois a bactéria é incapaz de penetrar a pele e necessita de contato com membranas mucosas para adentrar o hospedeiro (UNEMO, 2019).

Uma vez estabelecida a infecção por NG, em casos sintomáticos, é manifestada a produção de exsudatos purulentos decorrente da ativação de leucócitos polimorfonucleares. Além disso, a bactéria é capaz de sobreviver a diversos mecanismos de defesa proporcionados por essas células, como fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio e produção de enzimas antimicrobianas, dificultando a reversão espontânea do quadro pelo hospedeiro. Em contrapartida, nas infecções assintomáticas, a NG notoriamente evade as vias de ativação clássica e alternativa do sistema complemento (UNEMO, 2019).

No contexto de infecções sintomáticas, podem ocorrer reações inflamatórias urogenitais, como irritação local, presença de prurido, dor e sangramentos, acompanhadas ou não de febre (BRASIL, 2022). Esta gama de sintomas costuma ser pouco específica para indivíduos do sexo feminino, principalmente quando há apenas a presença de corrimento. Conseqüentemente, quadros sintomáticos são mais frequentemente detectados em indivíduos do sexo masculino, pois 95 a 99% dos homens apresentam característica secreção uretral em alguma fase da infecção gonocócica (PROCOP, 2018). Em se tratando de complicações clínicas, quadros de uretrite e cervicite são frequentemente associados a NG, e devem ser investigados conforme instruções do PCDT-IST (BRASIL, 2022). A evolução para um quadro infeccioso disseminado é rara, sendo epididimite e salpingite os agravos mais relatados (UNEMO, 2019).

Embora nem todos os mecanismos estejam completamente elucidados, sabe-se que a infecção por NG também amplia o risco de infecção e transmissão de outras ISTs, possivelmente por fatores atrelados à produção de secreções e dano tecidual. Neste contexto, ressalta-se a necessidade de investimento em medidas eficientes de diagnóstico para que as intervenções médicas adequadas sejam feitas (UNEMO, 2019).

No que tange o diagnóstico de NG no Brasil, o PCDT-IST preconiza que as amostras destinadas a exames rápidos e/ou laboratoriais devem ser coletadas no momento da primeira consulta clínica e, mesmo que o resultado não esteja disponível de imediato, em caso de diagnóstico sintomático, deve-se intervir com medidas de tratamento empírico e orientação ao paciente, bem como de suas parcerias sexuais (BRASIL, 2022).

Em se tratando de exames rápidos e/ou laboratoriais, o atual método de escolha no Brasil para casos sintomáticos e assintomáticos é a detecção do material genético do(s) agente(s) infeccioso(s) por biologia molecular, sendo mais comumente utilizados os NAATs. Casos sintomáticos com presença de cervicite ou uretrite gonocócica também podem ser investigados por meio da cultura de amostras endocervicais ou de corrimento uretral em meio seletivo Thayer-Martin modificado (posteriormente confirmado com provas bioquímicas para NG). Como recurso alternativo, a bacterioscopia com coloração de Gram também pode ser utilizada e é recomendada apenas para pacientes sintomáticos, porém apresenta bom desempenho apenas para amostras de descarga uretral em indivíduos do sexo masculino, pois amostras endocervicais apresentam densa flora bacteriana vaginal que compromete a visualização de NG e resulta em falsos-negativos em até 60% dos casos (BRASIL, 2022).

No contexto dos exames de detecção por biologia molecular, os NAATs são comprovadamente mais sensíveis do que os métodos de cultura em meio seletivo e bacterioscopia, justificando a recente implementação da Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo no SUS (BRASIL, 2023a; MEYER, 2020).

Uma vez estabelecida e diagnosticada a infecção gonocócica, torna-se necessário efetuar um tratamento adequado com antimicrobianos. No Brasil, o tratamento de primeira escolha é realizado com dupla terapia de ceftriaxona e

azitromicina. Entretanto, NG é um microrganismo notório por carregar genes de resistência aos antimicrobianos, com capacidade de realizar eficiente transferência genética horizontal por meio de transformação do DNA mediada por pili. Conseqüentemente, após anos de diagnóstico sindrômico e tratamento empírico, foram mundialmente isoladas cepas resistentes a todas as opções previamente consideradas de primeira e segunda linha de tratamento, como penicilinas, tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e macrolídeos (UNEMO, 2019).

No Brasil, o primeiro Programa Nacional de Vigilância de Suscetibilidade aos Antimicrobianos para NG, realizado pelo LBMMS em parceria com o MS e Sítios Sentinela (gestões estaduais e municipais, centros de coleta e laboratório de apoio local) entre os anos de 2015 e 2016, reportou “alta resistência a ciprofloxacino, emergente resistência à azitromicina e diminuição da suscetibilidade a cefalosporina de espectro estendido”, atentando para a necessidade de implementação de medidas contínuas de vigilância para obtenção dos dados necessários para o manejo adequado do cenário brasileiro (BAZZO, 2018).

## 2.2 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NAATs)

Os NAATs disponíveis comercialmente para pesquisa de NG são majoritariamente baseados em PCR, porém também existem *kits* baseados em amplificação isotérmica mediada por laço (MEYER, 2020). A elevada sensibilidade dos NAATs para pesquisa NG se deve ao fato de que estes testes são capazes de detectar bactérias não-viáveis, em contrapartida ao método de cultura em meio seletivo, sendo extremamente úteis para detecção extragenital. Também oferecem como vantagem a capacidade de automatização completa e agilidade de processamento de amostras, fornecendo resultados em algumas dezenas de minutos e contrastando com o tempo necessário para cultivar NG em placas. O uso de NAATs é recomendado para diagnóstico de infecção uretral ou cervical por NG em amostras de urina de primeiro jato masculina e *swabs* vaginais femininos, respectivamente. Também pode ser utilizado para diagnóstico de infecções extragenitais em amostras de *swabs* retais ou faríngeos. O processamento de amostras pode ser realizado com *kits* comerciais para testagem de patógeno único (somente NG), *duplex* (geralmente NG e CT) ou *multiplex* (pesquisa de múltiplos

patógenos além de NG, como CT, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis*) (MEYER, 2020).

O teste efetuado pelo equipamento Cepheid® GeneXpert® é um ensaio do tipo *duplex*, oferecendo a pesquisa de CT e NG simultaneamente (MEYER, 2020). O teste pesquisa dois alvos diferentes de NG (NG2 e NG4, que devem ser ambos positivos para gerar *status* “detectado”) e um alvo para CT (CT1). Para isso, são utilizados cartuchos descartáveis de uso único, que contém todos os reagentes necessários para realização da PCR e, uma vez inseridos no equipamento, realizam a extração e subseqüentes reações de forma automática (CEPHEID, 2019). A tecnologia de cartuchos oferece como vantagem a velocidade de processamento de amostras, sendo indicada para diagnósticos rápidos (cerca de 90 minutos) (MEYER, 2020). Além disso, a individualização do processo de extração em cartuchos fechados minimiza as chances de contaminação cruzada entre amostras de diferentes pacientes (CEPHEID, 2019). O teste é capaz de detectar NG e CT com alta sensibilidade (98,0 - 100%), com limite inferior de detecção de 10 cópias de material genético para NG, e especificidade (99,9 -100%) (MEYER, 2020).

O equipamento Roche® Cobas® 5800 também efetua um ensaio do tipo *duplex* para NG e CT. É indicado para processamento de amostras de *swab* de mucosas ou urina de primeiro jato masculina, que devem ser transferidas para um tubo de Cobas® PCR *Media* antes de serem inseridas no equipamento, onde são extraídas e analisadas de forma automatizada (ROCHE, 2021). O teste realiza a amplificação e detecção de dois alvos na região genômica DR-9 de NG (MEYER, 2020). Possui limite inferior de detecção de 1 a 2 unidades infecciosas por mL (MEYER, 2016).

Por fim, o equipamento Bio-Rad CFX96™ é um sistema de detecção de PCR que pode ser utilizado com o *kit* Seegene Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay, do tipo *multiplex*, que possibilita a detecção de NG, CT, *Mycoplasma genitalium* (MG) e *Trichomonas vaginalis* (TV) a partir de amostras de esfregaço genital, urina e citologia líquida. Ao contrário das tecnologias empregadas nos equipamentos anteriores, requer extração manual dos ácidos nucleicos das amostras antes da sua inserção no equipamento para execução da PCR, que pode ser feita por *kits* apropriados como o Promega ReliaPrep™. Possui um limite inferior de detecção



para NG de 10 cópias de DNA genômico por reação e sensibilidade  $\geq 95\%$  (PROMEGA, 2021; SEEGENE, 2018).

### 2.3 AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A mais recente rodada prática de AEQ-CT/NG realizada pelo LBMMS/CCS/UFSC em parceria com o DATHI/SVSA/MS teve início em 12 de agosto de 2024. Foram avaliados os 45 laboratórios integrantes da Rede Nacional de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo, dos quais 29% utilizavam o equipamento Cobas® 4800 e 71% utilizavam Cobas® 5800. Destes, 82% obtiveram excelência, 14% obtiveram aprovação e 4% obtiveram reprovação por contaminação de amostra negativa (LBMMS, 2024b).

A participação de todos os laboratórios integrantes da Rede Nacional de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo do SUS no programa AEQ do Ministério da Saúde é obrigatória e está prevista no contrato com a empresa Roche, fornecedora dos equipamentos Cobas® 4800 e Cobas® 5800, de forma a monitorar e garantir a qualidade do serviço prestado no SUS (LBMMS, 2024b).

### 2.4 LIOFILIZAÇÃO E CONTAMINAÇÃO AMOSTRAL

Liofilizadores, embora não entrem em contato direto com o produto, podem contribuir para contaminação cruzada entre amostras bacterianas de painéis de AEQ por meio da turbulência e liberação de partículas no ar circulante interno do equipamento, bem como pela presença de bandejas contaminadas e defeitos e brechas internas. A abertura e manipulação do equipamento para retirada das amostras após a liofilização também pode contribuir para contaminação cruzada por meio da suspensão do pó dos criotubos (DENK, 2019). Desta forma, torna-se relevante avaliar o possível impacto do uso da técnica de liofilização no status de detecção amostral.

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando a recente implementação do programa AEQ-CT/NG no LBMMS, tornou-se necessário padronizar as cargas bacterianas ideais para produção de painéis de *Neisseria gonorrhoeae* compatíveis com os equipamentos disponíveis nas redes molecular e laboratorial Clássica (Roche) e Rápida (Cepheid), de forma a garantir o êxito das futuras rodadas práticas e contribuir para a Avaliação Externa da Qualidade da Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de Clamídia e Gonococo no SUS.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

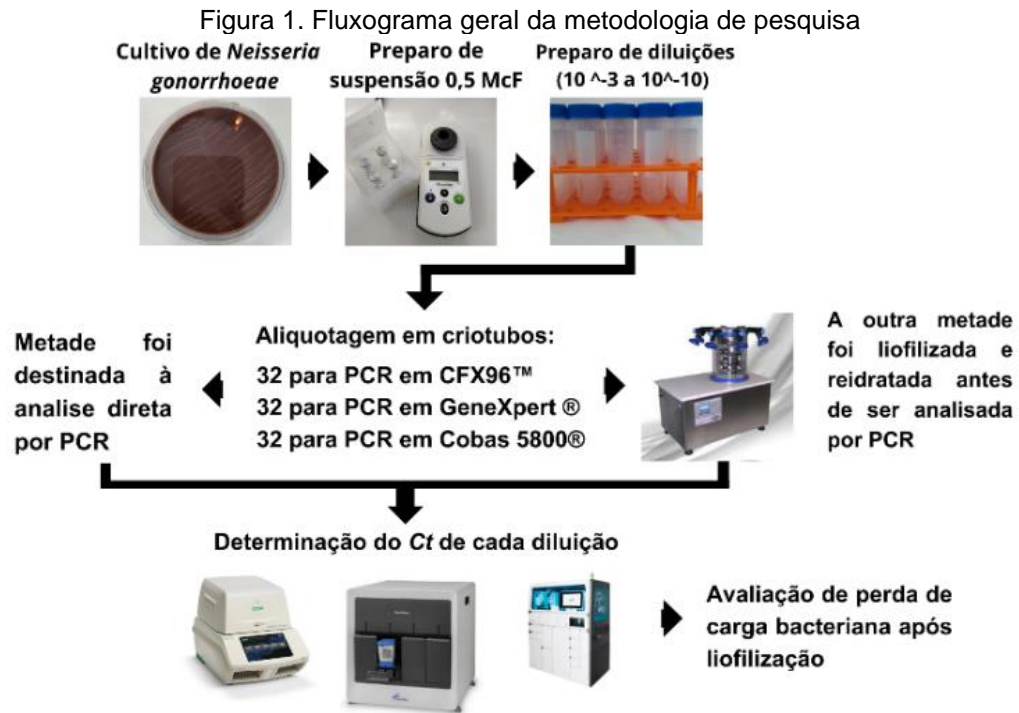
Padronizar a carga bacteriana mínima e máxima para elaboração de painéis liofilizados para avaliação externa da qualidade de *Neisseria gonorrhoeae*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer a dinâmica entre pontos de diluição mínimo e máximo de suspensões bacterianas 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* e seus respectivos Cts;
- b) Determinar as melhores diluições bacterianas para compor painéis de AEQ com Cts baixos, intermediários e altos;
- c) Avaliar a perda de carga bacteriana após liofilização para as diluições estudadas;
- d) Avaliar potencial de contaminação cruzada em bancada e liofilizador.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma geral da metodologia de pesquisa pode ser visualizado na Figura 1 e será descrito detalhadamente nos próximos subcapítulos.



Fonte: A autora (2024)

### 5.1 CULTIVO BACTERIANO, SUBCULTIVO E IDENTIFICAÇÃO

Para o processo de cultivo bacteriano, subcultivo e identificação, foram seguidos os protocolos internos do LBMMS.

#### 5.1.1 Cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*

Primeiramente, com uma alça bacteriológica descartável de 1  $\mu$ L, foi retirada de um criotubo uma alçada de 10  $\mu$ L da cepa ATCC 49226 de *Neisseria gonorrhoeae*, congelada a  $-80$  °C. O conteúdo foi inoculado pela técnica de semeadura por esgotamento em uma placa de Petri contendo Ágar Thayer-Martin da marca Laborclin. O processo foi realizado em condições de esterilidade. Em

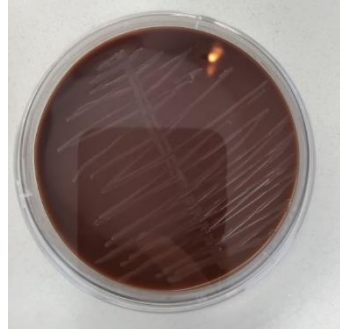
seguida, a placa foi fechada e incubada em estufa bacteriológica a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h.

Após o tempo de incubação, foram verificadas as características macroscópicas da cultura microbiológica e efetuado o subcultivo.

#### 5.1.1.1 Subcultivo

Em condições de esterilidade e nas proximidades da chama de um bico de *Bunsen*, foi efetuada a raspagem de uma das colônias crescidas no Ágar Thayer-Martin com uma alça bacteriológica descartável de 1  $\mu\text{L}$ . Em seguida, o conteúdo foi inoculado pela técnica de estriamento quantitativo em uma Placa de Petri contendo Ágar Chocolate da marca Laborclin (Figura 2). A incubação da cultura foi realizada em estufa bacteriológica a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h.

Figura 2. Subcultivo de *Neisseria gonorrhoeae* em Ágar Chocolate



Fonte: A autora (2024)

## 5.2 PRODUÇÃO DE SUSPENSÕES BACTERIANAS

A partir da metodologia descrita a seguir, foram produzidas 12 alíquotas de cada diluição ( $10^{-3}$  até  $10^{-10}$ ), totalizando 96 criotubos amostrais. Desses, 48 foram reservados para análise direta por PCR e 48 foram liofilizados antes de serem submetidos ao processo analítico, de forma a determinar a perda de carga bacteriana pelo processo de liofilização. A PCR foi realizada em três diferentes equipamentos: Bio-Rad CFX96™, Cepheid® GeneXpert® e Roche® Cobas® 5800.

### 5.2.1 Produção de suspensões bacterianas 0,5 McF

Em condições de esterilidade, foi calibrado o equipamento bioMérieux VITEK® DensiCHEK® *plus* com o kit DensiCHEK® *plus standards*. Para isso, o equipamento foi previamente zerado com o branco 0,0 McF. Em seguida, prosseguiu-se para a verificação das densidades ópticas de suspensões padronizadas para  $0,5 \pm 0,06$  McF,  $2,0 \pm 0,15$  McF e  $3,0 \pm 0,21$  McF. Após ser constatado que todas estavam dentro da faixa de desvio padrão estabelecida, o equipamento foi colocado no modo *plastic* e zerado com um tubo de ensaio de plástico preenchido com tampão fosfato-salino (PBS) de pH 7,2 com 3% de albumina (BIOMÉRIEUX, 2017).

Em seguida, foram preparadas as suspensões bacterianas 0,5 McF: Com auxílio de uma alça bacteriológica descartável de 10  $\mu$ L, foi raspada e transferida uma pequena quantidade de *Neisseria gonorrhoeae* (placa de cultivo) para a parede seca de um tubo de ensaio de plástico estéril (12 X 75 mm) preenchido com 2 mL de PBS com 3% de albumina. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado por agitação da alça contra a parede do tubo, evitando a formação de grumos, e encaminhado para homogeneização final em vórtex por cerca de 10 segundos. Após esse processo, o tubo de ensaio foi acoplado ao equipamento VITEK® DensiCHEK® *plus* para a leitura de sua densidade óptica (Figura 3). Caso o valor registrado estivesse fora da faixa de  $0,5 \pm 0,05$  McF, a alíquota seria devolvida para o tubo Falcon para a realização de um ajuste por meio da adição de mais bactérias e/ou PBS com 3% de albumina até a obtenção densidade óptica desejada (BIOMÉRIEUX, 2017).

Figura 3. Processo de ajuste de densidade óptica de suspensão bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* em tubo de ensaio acoplado ao equipamento bioMérieux VITEK® DensiCHEK® *plus*

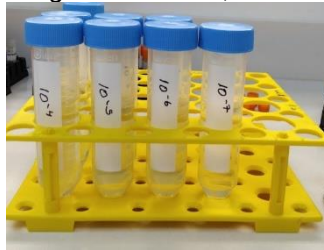


Fonte: A autora (2024)

### 5.2.2 Diluição seriada de suspensões bacterianas

Para um tubo de Falcon estéril contendo 39,96 mL de PBS com 3% de albumina, foram pipetados 0,04 mL da suspensão bacteriana de 0,5 McF, formando uma diluição na proporção de 1:1000. O processo foi realizado em condições de esterilidade. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex por 10 segundos e o processo de diluição foi repetido na proporção 1:10 por 7 vezes seguidas, totalizando 8 diluições ( $10^{-3}$  até  $10^{-10}$ ) (Figura 4).

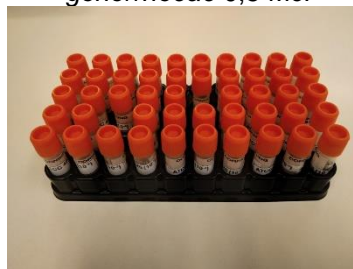
Figura 4. Tubos Falcon contendo diferentes diluições de suspensão bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* 0,5 McF



Fonte: A autora (2024)

Após o preparo das diluições, foram separados 12 criotubos para cada diluição, totalizando 96 criotubos, que receberam alíquotas de 1 mL cada (Figura 5).

Figura 5. Criotubos contendo alíquotas de diferentes diluições de suspensão bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* 0,5 McF



Fonte: A autora (2024)

### 5.2.3 Preparo de brancos de bancada e liofilização

O potencial de contaminação cruzada foi determinado em duas diferentes etapas da produção de painéis de AEQ: preparo das diluições bacterianas e processo de liofilização. Para isso, foram produzidos brancos de bancada e brancos de liofilização.

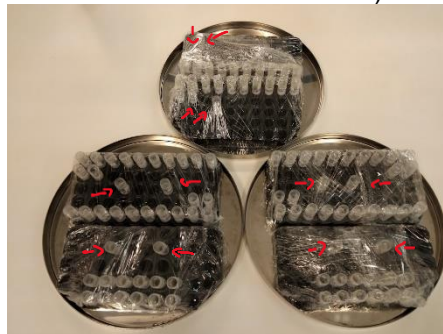
### 5.2.3.1 *Preparo de brancos de bancada*

Durante o processo de diluição seriada das suspensões bacterianas, foram separados 5 criotubos e pipetado 1 mL de PBS com 3% de albumina em cada um. Em seguida, o conteúdo dos 5 criotubos foi unido em um *pool*, do qual foram separados 400 µl para PCR em CFX96™, 1 mL para GeneXpert e 600 µl para Cobas® 5800.

### 5.2.3.2 *Preparo de brancos de liofilização*

Em condições de esterilidade, foram separados 12 criotubos e, em cada um, foi pipetado 1 mL de PBS com 3% de albumina. Em seguida, essas alíquotas foram encaminhadas para o processo de liofilização em conjunto com as diluições bacterianas, distribuídas em três diferentes prateleiras do liofilizador (Figura 6).

Figura 6. Distribuição de criotubos em três diferentes bandejas do liofilizador (controles destacados com setas em vermelho)



Fonte: A autora (2024)

Após a liofilização, o conteúdo de cada branco foi reidratado com 400 µl de água ultrapura do tipo 1 e misturado ao dos demais brancos liofilizados na mesma bandeja. Desta forma, foram produzidos três *pools* de brancos de liofilização. De cada um, foram separados 400 µl para PCR em CFX96™, 1 mL para GeneXpert e 600 µl para Cobas® 5800.



### 5.3 LIOFILIZAÇÃO

Os criotubos destinados à liofilização foram armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 8h. Em seguida, foram transferidos para freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24h. Por fim, foram liofilizados no equipamento LS 6000 da marca Terroni® por 24 horas, conforme protocolo estabelecido pelo LBMMS (Figura 7).

Figura 7. Liofilização em equipamento Terroni® LS 6000



Fonte: A autora (2024)

#### 5.3.1 Reidratação de suspensões bacterianas liofilizadas

Duas semanas após a liofilização, os liofilizados foram cobertos com 1 mL de PBS (pH 7,2) cada. Em seguida, foram deixados em repouso por 30 minutos para reidratação e, por fim, homogeneizados por inversão.

### 5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CFX96™, GENEXPERT® E COBAS® 5800

As análises por PCR em CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800 foram realizadas com um intervalo de uma semana entre as amostras não-liofilizadas e liofilizadas, conforme o cronograma interno de processamento de amostras elaborado pelo LBMMS.

### 5.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase em CFX96™

#### 5.4.1.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras, foi utilizado o kit ReliaPrep™ *Blood gDNA Miniprep System*. Foi separado um microtubo do tipo *Eppendorf* para cada amostra a ser extraída (incluindo os brancos) e, com auxílio de uma micropipeta, foram transferidos 20 µL de Proteinase K, 200 µL de tampão de lise celular e 200 µL de suspensão bacteriana reidratada para cada um. As misturas foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em um bloco de aquecimento a 56 °C por 10 minutos (Figura 8).

Figura 8. Incubação de amostras em bloco de aquecimento a 56 °C



Fonte: A autora (2024)

Após o tempo de incubação, foram acrescentados 250 µL de Tampão de Ligação em cada um. Novamente, foi realizada a homogeneização em vórtex por 10 segundos. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para sua respectiva coluna de ligação ReliaPrep™ acoplada a um microtubo de coleta. Os recipientes foram fechados e centrifugados por 1 minuto a 11.000 g. Após a centrifugação, foi efetuada a remoção dos microtubos de coleta e descarte de seus conteúdos (PROMEGA, 2021).

As colunas foram acopladas a novos microtubos, preenchidas com 500 µL de Tampão de Lavagem de Colunas e centrifugadas a 11.000 g por 1 minuto.

Após a última centrifugação, as colunas foram acopladas a novos tubos, preenchidas com 60 µL de água livre de nuclease e centrifugadas por 1 minuto a

11.000 g. Por último, as colunas foram descartadas e os microtubos foram fechados e armazenados em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  (PROMEGA, 2021).

#### 5.4.1.2 *Preparo de Mastermix e amplificação de material genético*

Em uma capela de fluxo laminar estéril, foi preparada a Mastermix de PCR com reagentes do kit Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay da marca Seegene™. A mistura foi feita na proporção de 2  $\mu\text{L}$  de CGMT MOM (mistura de oligonucleotídeos de MuDT), 5  $\mu\text{L}$  de reagente de amplificação e detecção EM4 (DNA polimerase, Uracil-DNA glicosilase) e 5  $\mu\text{L}$  de tampão EM4 para cada amostra a ser analisada, incluindo controles negativo (água livre de RNase e DNase) e positivo (CGMT PC) de PCR. Os reagentes foram pipetados para um microtubo e a mistura foi homogeneizada em vórtex. Em seguida, o recipiente foi fechado, centrifugado por 1 segundo e transferido para uma cabine de PCR. A mistura foi fracionada em alíquotas de 12  $\mu\text{L}$ , que foram distribuídas em microtubos de PCR. Por fim, foram adicionados 8  $\mu\text{L}$  de analito em cada um (DNA extraído, controle negativo e controle positivo). Os microtubos foram fechados e a reação ocorreu no equipamento Bio-Rad CFX96™ (Figura 9) (SEEGENE, 2018).

Figura 9. Inserção de amostras em equipamento Bio-Rad CFX96™



Fonte: A autora (2024)

#### 5.4.2 **PCR em GeneXpert®**

Para cada diluição liofilizada e não liofilizada de suspensão bacteriana, bem como brancos de liofilização e de bancada, foi separado um cartucho de GeneXpert® (Cepheid) apropriado para detecção de NG e uma pipeta de

transferência fornecida pelo fabricante. Com conteúdo amostral, as pipetas foram preenchidas ligeiramente acima das demarcações presentes em suas hastes e esvaziadas para o interior de seus respectivos cartuchos, que foram inseridos no equipamento GeneXpert® conforme instruções do fabricante (Figura 10) (CEPHEID, 2019).

Figura 10. Inserção de cartuchos no equipamento Cepheid - GeneXpert®



Fonte: A autora (2024)

#### 5.4.3 PCR em Cobas® 5800

Foram encaminhados 36 criotubos amostrais para o Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) para análise por PCR em Cobas® 5800 conforme instruções do fabricante, sendo eles: 16 diluições não-liofilizadas, 16 diluições liofilizadas, 3 pools de brancos de liofilização e 1 pool de brancos de bancada.

### 5.5 QUANTIFICAÇÃO DA PERDA DE CARGA BACTERIANA APÓS LIOFILIZAÇÃO

A perda de carga bacteriana foi avaliada por meio do cálculo de variação percentual entre os valores de  $C_t$  das amostras não-liofilizadas e suas respectivas correspondentes liofilizadas. Para a disposição das incógnitas na equação, considerou-se o fato de que o maior valor numérico deve ser utilizado como minuendo e divisor no cálculo de Variação Percentual (KHAN, 2020). Visto que o  $C_t$  das amostras liofilizadas seria, teoricamente, superior ao das não-liofilizadas, o cálculo foi realizado conforme expresso na Equação 1:

$$Vp = \frac{(Ct_l - Ct_{nl})}{Ct_l} \times 100 \quad (1)$$

Onde  $Vp$  corresponde à variação percentual,  $Ct_l$  ao  $Ct$  das amostras liofilizadas e  $Ct_{nl}$  ao  $Ct$  das amostras não-liofilizadas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 RESULTADOS DAS PCR PARA DILUIÇÕES $10^{-3}$ A $10^{-10}$ DE SUSPENSÃO BACTERIANA 0,5 MCF DE *Neisseria gonorrhoeae*: DINÂMICA ENTRE PONTOS DE DILUIÇÃO MÍNIMO E MÁXIMO

Os valores de *Ct* obtidos para diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  não-liofilizadas da suspensão de *Neisseria gonorrhoeae* 0,5 McF nos equipamentos CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800 estão apresentados no Quadro 1, enquanto os valores referentes às amostras liofilizadas podem ser visualizados no Quadro 2. Para os equipamentos CFX96™ e Cobas® 5800, foi possível efetuar a análise em duplicata e obter a média dos valores de *Ct*. Entretanto, devido ao limitado estoque de cartuchos Xpert® CT/NG no momento das análises, não foi possível realizar duplicata para o equipamento GeneXpert®. Desta forma, foi calculada apenas a média entre os valores de *Ct* obtidos para os dois diferentes alvos da região genômica DR-9 de NG amplificados pelo equipamento: NG2 e NG4 (CEPHEID, 2019).

Analisando o Quadro 1, nota-se que a faixa de detecção foi semelhante entre os três equipamentos. Em todos eles, houve detecção de NG em todas as diluições no intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . Tanto Cobas® 5800 quanto GeneXpert® forneceram resultados de “não-detectado” na faixa de  $10^{-8}$  a  $10^{-10}$ , sem a presença de pontos isolados de detecção indicativos de contaminação. Os três equipamentos também indicaram aumento de *Ct* com avanço do grau de diluição, condizente com a metodologia empregada, visto que o número de ciclos de PCR necessários para ultrapassar o *Threshold* é inversamente proporcional ao número de cópias de material genético presente na amostra inicial (MARLOWE, et al; 2017).

Quadro 1. Valores de *Ct* obtidos por PCR em tempo real para diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  não-liofilizadas de suspensão de *N. gonorrhoeae* 0,5 McF em equipamentos CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800.\*

Diluição	Equipamento							
	CFX96™			GeneXpert®		Cobas® 5800		
	Amostra 1 (Ct)	Amostra 2 (Ct)	Média	Amostra única (Ct)	Média	Amostra 1 (Ct)	Amostra 2 (Ct)	Média
$10^{-3}$	24,06	23,50	23,78	NG2: 21,6 NG4: 22,0	21,8	24,18	23,64	23,91
$10^{-4}$	27,04	26,84	26,94	NG2:25,2 NG4:24,8	25,0	27,39	27,56	27,48
$10^{-5}$	30,71	30,19	30,45	NG2:29,2 NG4: 28,5	28,8	31,13	31,14	31,14
$10^{-6}$	33,91	33,93	33,92	NG2: 32,5 NG4: 31,5	32,0	34,50	34,71	34,60
$10^{-7}$	37,25	37,08	37,16	NG2: 35,3 NG4: 35,0	35,2	39,34	38,25	38,80
$10^{-8}$	NG não detectado	36,57	36,57	NG não detectado	-	NG não detectado	NG não detectado	-
$10^{-9}$	NG não detectado	NG não detectado	-	NG não detectado	-	NG não detectado	NG não detectado	-
$10^{-10}$	NG não detectado	NG não detectado	-	NG não detectado	-	NG não detectado	NG não detectado	-

\* CT, TV e MG não foram detectados em nenhuma das amostras em análises por CFX96™; CT não foi detectada em nenhuma das amostras em análises por GeneXpert® e Cobas® 5800.

Houve apenas uma inconformidade em uma das amostras lidas pelo equipamento CFX96™, que exibiu um *Ct* de 36,57 em uma das amostras de diluição  $10^{-8}$ . Este valor é dissonante do padrão observado nas diluições anteriores, visto que a diluição  $10^{-7}$  forneceu um *Ct* mais elevado (37,08). Isto indica que, possivelmente, houve contaminação durante o processo de manipulação ou processamento da amostra em questão, para a qual os processos de extração de material genético e adição dos reagentes de PCR foi efetuada de forma manual, em contraste com as metodologias empregadas nos dois outros equipamentos.

Apesar desse pontual suposto evento de contaminação, ressalta-se que nenhuma das amostras, em nenhum dos três equipamentos, exibiu resultado de detecção para nenhum microrganismo além de NG, indicando que não houve contaminação amostral por espécies detectáveis pelas metodologias empregadas. Este fato é de grande relevância no contexto de boas práticas de laboratório, visto que tanto o LBMMS/CCS/UFSC quanto o LACEN/SC processam amostras de pacientes que podem conter material genético de outros microrganismos detectáveis e, conseqüentemente, deixar resíduos no ambiente laboratorial, equipamentos e instrumentos utilizados. Além de NG, os kits utilizados para PCR em GeneXpert® e

Cobas ® 5800 pesquisam a presença de *Chlamydia trachomatis* (CT), enquanto o kit empregado para PCR em CFX96™ detecta não só CT e NG, como também *Trichomonas vaginalis* (TV) e *Mycoplasma genitalium* (MG).

No que diz respeito às amostras liofilizadas (Quadro 2), observa-se que a faixa de detecção foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  para CFX96™ e GeneXpert®, semelhante aos dados coletados para as amostras não-liofilizadas. Entretanto, o intervalo obtido para Cobas® 5800 foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ . Isto pode ser justificado pelo fato de que o limite inferior de detecção deste equipamento é menor do que o dos outros dois equipamentos comparados (MEYER, 2016; MEYER, 2020; SEEGENE, 2018). Além disso, não houve detecção de NG para a Amostra 2 da diluição  $10^{-7}$  analisada no equipamento CFX 96™. Este evento pode ser justificado por variações entre as condições analíticas das amostras não-liofilizadas e liofilizadas (processadas em dias diferentes) ou por uma possível perda de carga bacteriana após a liofilização, investigada no subcapítulo 6.2.

Quadro 2. Valores de Ct obtidos por PCR em tempo real para diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  liofilizadas de suspensão de *N. gonorrhoeae* 0,5 McF em equipamentos CFX96™, GeneXpert® e Cobas® 5800.\*

Diluição	Equipamento							
	CFX96™			GeneXpert®		Cobas® 5800		
	Amostra 1 (Ct)	Amostra 2 (Ct)	Média	Amostra única (Ct)	Média	Amostra 1 (Ct)	Amostra 2 (Ct)	Média
$10^{-3}$	24,01	23,30	23,65	NG2: 21,1 NG4: 20,5	20,8	24,34	24,67	24,50
$10^{-4}$	27,36	27,00	27,18	NG2: 23,1 NG4: 23,1	23,1	27,80	27,68	27,74
$10^{-5}$	31,06	31,35	31,20	NG2: 26,9 NG4: 26,7	26,8	31,01	30,85	30,93
$10^{-6}$	33,42	33,65	33,54	NG2: 29,7 NG4: 29,8	29,6	34,21	34,51	34,36
$10^{-7}$	38,60	NG não detectado	38,60	NG2: 32,2 NG4: 32,8	32,5	41,19	37,36	39,28
$10^{-8}$	NG não detectado	NG não detectado	-	NG não detectado	-	40,64	41,08	40,86
$10^{-9}$	NG não detectado	NG não detectado	-	NG não detectado	-	NG não detectado	NG não detectado	-
$10^{-10}$	NG não detectado	NG não detectado	-	NG não detectado	-	NG não detectado	NG não detectado	-

\* CT, TV e MG não foram detectados em nenhuma das amostras em análises por CFX96™; CT não foi detectada em nenhuma das amostras em análises por GeneXpert® e Cobas® 5800.

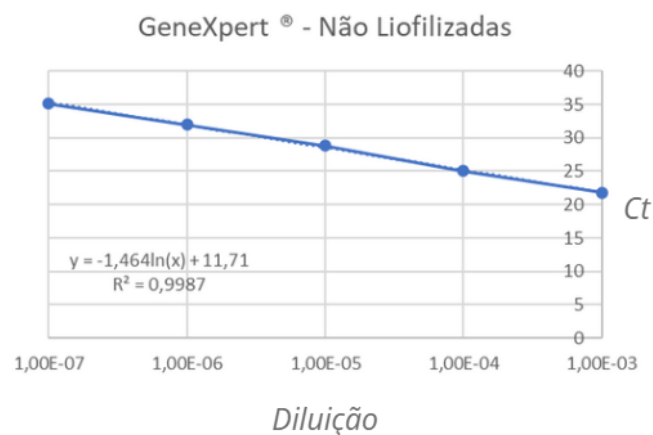
Ressalta-se que, de forma semelhante às amostras não-liofilizadas, os três equipamentos indicaram um aumento de Ct condizente com avanço do grau de diluição e não apresentaram contaminantes detectáveis pelos kits utilizados.



Com base na análise dos resultados dos quadros 1 e 2, constatou-se que, no intervalo analisado ( $10^{-3}$  a  $10^{-10}$ ), o ponto de diluição mínimo detectável para a suspensão bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* 0,5 McF foi de  $10^{-3}$ , enquanto o máximo foi de  $10^{-7}$ . A partir disso, foram calculadas funções que expressam a dinâmica entre  $Ct$  e diluição correspondentes ao intervalo detectável para as suspensões não-liofilizadas (Figuras 11, 12 e 13) e liofilizadas (Figuras 14, 15 e 16) analisadas em GeneXpert®, Cobas® 5800 e CFX96™.

Para as diluições não-liofilizadas, a função obtida a partir dos dados do equipamento GeneXpert® foi “ $y = -1,464 \ln(x) + 11,71$ ”, com  $1,00 \cdot 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \cdot 10^{-3}$  (Figura 11).

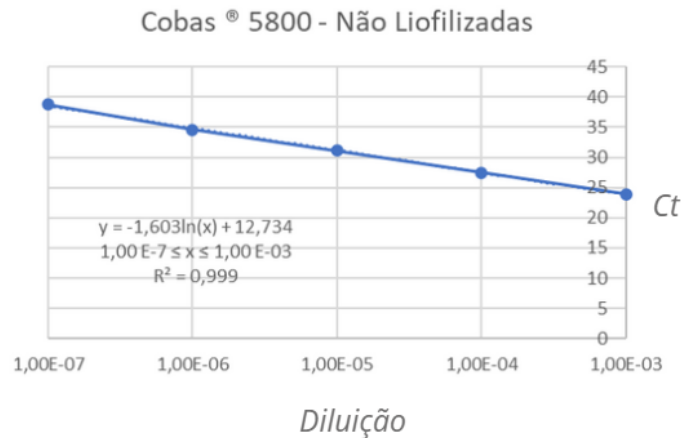
Figura 11. Curva  $Ct$  versus diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* não liofilizadas e analisadas em GeneXpert®.



Fonte: A autora (2024)

Cobas® 5800 forneceu, para as amostras não-liofilizadas, dados para a função “ $y = -1,603 \ln(x) + 12,734$ ”, com  $1,00 \cdot 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \cdot 10^{-3}$  (Figura 12).

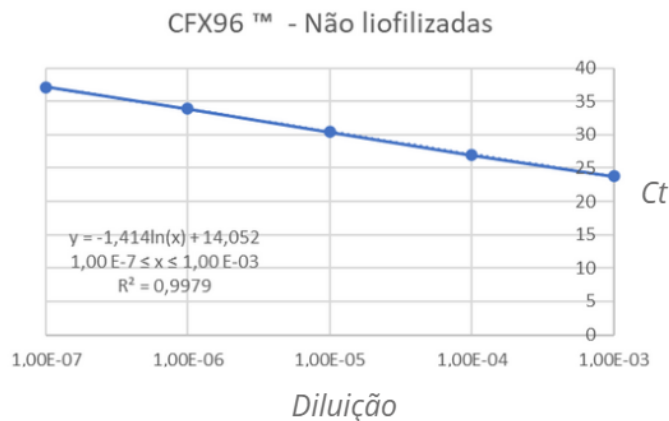
Figura 12. Curva  $Ct$  x diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* não liofilizadas e analisadas em Cobas® 5800.



Fonte: A autora (2024)

Os dados fornecidos pelo equipamento CFX96™ para as amostras não-liofilizadas foram sintetizados na função “ $y = -1,414 \ln(x) + 14,052$ ”, com  $1,00 \times 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \times 10^{-3}$  (Figura 13).

Figura 13. Curva  $Ct$  x diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* não liofilizadas e analisadas em CFX96™.



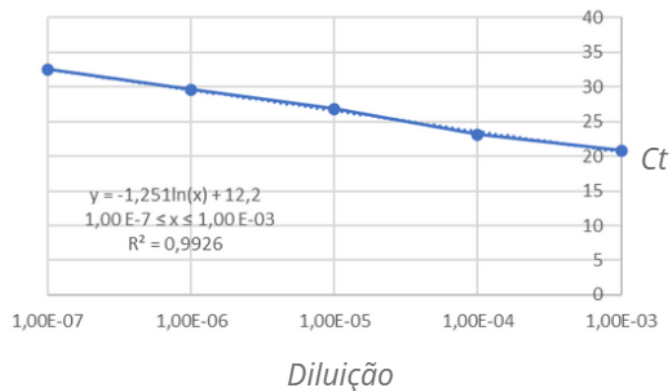
Fonte: A autora (2024)

Para o modelo matemático obtido a partir dos dados coletados do GeneXpert® para as amostras não-liofilizadas, o valor obtido para  $R^2$  (coeficiente de determinação) foi de 0,9987, ou seja, 99,87% da variância na variável dependente ( $Ct$ ) é explicada pela função. Isso sugere que a função obtida desempenha bom papel em prever o valor de  $Ct$  a partir de um determinado valor de diluição. Uma qualidade semelhante de resultados foi observada nas funções correspondentes às metodologias Cobas® 5800 ( $R^2 = 0,999$ ) e CFX96™ ( $R^2 = 0,9979$ ). Entretanto,

ressalta-se que, uma vez que as análises foram efetuadas em duplicata (Cobas ® 5800 e CFX96™) ou em medida única (GeneXpert ®), o conjunto de dados analisado pode não ser representativo, o que pode ser uma limitação deste trabalho.

No que diz respeito às diluições liofilizadas, a função obtida para os dados do equipamento GeneXpert® foi “ $y = -1,251 \ln(x) + 12,2$ ”, com  $1,00 \cdot 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \cdot 10^{-3}$  (Figura 14)

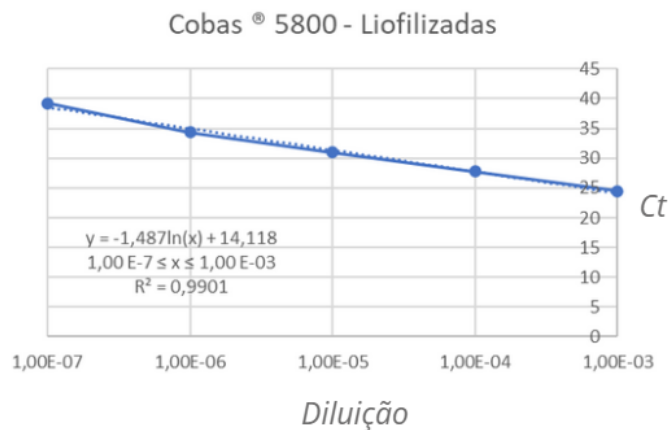
Figura 14. Curva  $Ct$  versus diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizadas e analisadas em GeneXpert®.  
GeneXpert® - Liofilizadas



Fonte: A autora (2024)

Para as amostras liofilizadas e analisadas em Cobas ® 5800, obteve-se a função “ $y = -1,487 \ln(x) + 14,118$ ”, com  $1,00 \cdot 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \cdot 10^{-3}$  (Figura 15).

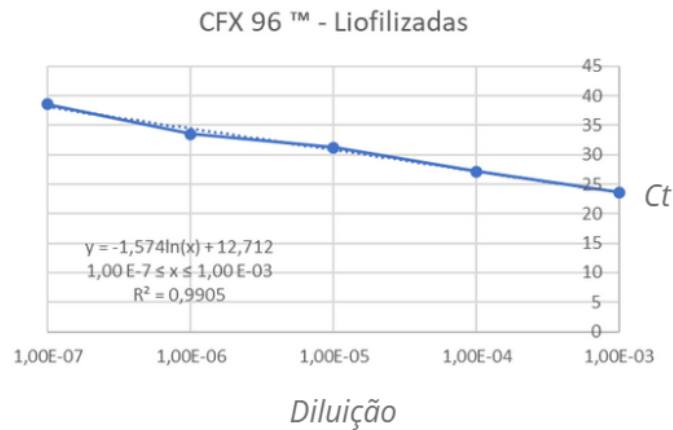
Figura 15. Curva  $Ct$  x diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizadas e analisadas em Cobas ® 5800.



Fonte: A autora (2024)

Por fim, as amostras liofilizadas e analisadas em CFX96™ forneceram dados sintetizados na função “ $y = -1,574 \ln(x) + 12,712$ ”, com  $1,00 \cdot 10^{-7} \leq x \leq 1,00 \cdot 10^{-3}$  (Figura 16).

Figura 16. Curva  $Ct \times$  diluição correspondente às diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  de suspensão bacteriana 0,5 McF de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizadas e analisadas em CFX96™.



Nota-se que as curvas obtidas para os dados coletados a partir das análises das amostras liofilizadas, de forma semelhante às não-liofilizadas, forneceram valores de  $R^2$  próximos de 1: 0,9926 para GeneXpert®, 0,9901 para Cobas® e 0,9905 para CFX96™.

## 6.2 DETERMINAÇÃO DE VARIAÇÃO DE CARGA BACTERIANA APÓS LIOFILIZAÇÃO

Os resultados referentes aos testes de variação percentual de carga bacteriana após liofilização estão dispostos no Quadro 3. Neste contexto, observa-se que foram registrados não somente valores de variação percentual negativos, como também positivos. Quando as médias dos percentuais de variação são comparadas, nota-se que, embora CFX96™ (+0,5401%) e Cobas® 5800 (+0,7902%) tenham registrado médias positivas, GeneXpert® forneceu uma média negativa (-7,144%) e de módulo aproximadamente 10 vezes maior do que os outros dois valores. A elevada média de variação percentual pode ser explicada pelo fato de que as análises realizadas neste equipamento foram feitas de forma única, comprometendo para uma maior dispersão de dados. Entretanto, não foi possível

descrever o motivo do padrão de diminuição de *Ct* observado em todas as amostras liofilizadas analisadas em GeneXpert<sup>®</sup>, e sugere-se a realização de pesquisas futuras e com um maior número de replicatas para investigar o ocorrido.

Quadro 3. Valores de variação percentual de *Ct* após liofilização das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  de suspensão bacteriana de *Neisseria gonorrhoeae* 0,5 McF.

Diluição	Equipamento		
	CFX96™	GeneXpert <sup>®</sup>	Cobas <sup>®</sup> 5800
$10^{-3}$	-0,5467 %	-4,59 %	+2,468 %
$10^{-4}$	+0,8909 %	-7,60 %	+0,9461 %
$10^{-5}$	-0,3986 %	-6,94 %	-0,006744 %
$10^{-6}$	-1,120 %	-7,50 %	-0,6936 %
$10^{-7}$	+3,875 %	-9,09 %	+1,237 %
$10^{-8}$	-	-	-
$10^{-9}$	-	-	-
$10^{-10}$	-	-	-
<b>Média</b>	+0,5401 %	-7,144 %	+0,7902 %

Não obstante, observa-se que o processo de liofilização não causou alterações na faixa de detecção de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$ . Esta informação é de extrema relevância para o processo de produção de painéis de AEQ, pois indica que suspensões 0,5 McF de NG amostras preparadas dentro desta faixa de diluição não correm risco de fornecer *status* de detecção negativo nas condições experimentais empregadas (PCR realizada duas semanas após a liofilização). Como ensaio complementar, sugere-se a verificação do percentual de variação de carga bacteriana por um período de 6 meses, a fim de garantir que os painéis de AEQ preparados mantenham seus *status* de detecção durante todo o semestre de uma rodada de avaliação prática.

### 6.3 RESULTADOS DO TESTE DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM BANCADA E NO LIOFILIZADOR

Os resultados referentes aos testes de contaminação cruzada em bancada e no processo de liofilização estão dispostos no Quadro 4. Observa-se que não houve detecção de NG em nenhuma das amostras analisadas. Também não foram detectados outros microrganismos pesquisados pelos kits de PCR utilizados nos três

diferentes equipamentos (CT, TV e MG para CFX96™ e CT para GeneXpert® e Cobas® 5800).

Quadro 4. Resultados de amplificação por PCR em tempo real para amostras referentes aos testes de contaminação cruzada em bancada e liofilizador.

Amostra	Equipamento		
	CFX96™	GeneXpert®	Cobas® 5800
<b>Branco de bancada</b>	NG não detectado CT não detectado TV não detectado MG não detectado	NG não detectado CT não detectado	NG não detectado CT não detectado
<b>Branco de liofilização (Bandeja 1)</b>	NG não detectado CT não detectado TV não detectado MG não detectado	NG não detectado CT não detectado	NG não detectado CT não detectado
<b>Branco de liofilização (Bandeja 2)</b>	NG não detectado CT não detectado TV não detectado MG não detectado	NG não detectado CT não detectado	NG não detectado CT não detectado
<b>Branco de liofilização (Bandeja 3)</b>	NG não detectado CT não detectado TV não detectado MG não detectado	NG não detectado CT não detectado	NG não detectado CT não detectado

No que se refere aos resultados para o *pool* de “Branco de bancada”, nota-se que os processos de elaboração de suspensões bacterianas, diluições seriadas e preparo de alíquotas nas proximidades de criotubos abertos contendo PBS com 3% de albumina não alterou o status de detecção dessas amostras, sugerindo que possibilidade de contaminação cruzada durante o processo de confecção dos painéis de AEQ de NG é nula, dentro das condições experimentais.

Para os “Branco de liofilização”, constatou-se que, independentemente da bandeja na qual as amostras foram liofilizadas, o status de detecção permaneceu inalterado. Isto sugere que o processo de liofilização não contribuiu para a criação de resultados falsos-positivos em nenhuma das condições testadas e o resultado permaneceu inalterado nos três diferentes equipamentos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados e análises expostos, estabeleceu-se que a faixa de diluição detectável para uma suspensão bacteriana de NG 0,5 McF foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , tanto para amostras não-lioofilizadas quanto lioofilizadas. Dentro deste intervalo, determinou-se com sucesso a dinâmica entre pontos de diluição mínimo e máximo a partir das equações das curvas logarítmicas  $Ct \times$  diluição, que forneceram valores satisfatórios de  $R^2$ .

Também foi possível determinar a variação da carga bacteriana das amostras após a liofilização, para a qual não foi possível observar um padrão consistente de aumento de  $Ct$  e constatou-se que tal processo não interfere no status de detecção amostral, uma vez que o teste não é quantitativo.

Por meio dos testes de contaminação cruzada em bancada e liofilizador, notou-se também que o processo de liofilização não gerou resultados falsos-positivos em nenhuma das condições testadas.

Por fim, concluiu-se que a faixa ideal de diluições bacterianas para compor painéis de AEQ com  $Cts$  baixos, intermediários e altos foi de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . Sendo assim, todos os objetivos desta pesquisa foram alcançados com sucesso.

## REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 2: Controle Externo da Qualidade/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: Anvisa, 2013.

BAZZO, M. L. *et al.* **First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Vol. 73, p. 1854–1861. 2018. DOI: doi:10.1093/jac/dky090

BIOMÉRIEUX. **VITEK® DensiCHEK User Manual.** 2017

BRASIL, Ministério da Saúde. **Avaliação Externa da Qualidade dos Testes Rápidos. Módulo 1: Entendendo o programa AEQ-TR.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Nº 26/2023-CGIST/.DATHI/SVSA/MS.** Brasília: Ministério da Saúde, 2023a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST).** Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 1.ed.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 786, de 5 de maio de 2023.** Brasília: Ministério da Saúde, 2023b

CEPHEID. **Xpert® CT/NG.** Estados Unidos da América, 2019.

DENK, R. *et al.* **Preventing Cross-Contamination during Lyophilization: GMP and Occupational Cleaning Requirements for Nonproduct and Indirect Product-Contact Parts.** *Parenteral Drug Association Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol.73, p.487-495, 2019. DOI: 10.5731/pdajpst.2018.009530.

FOROOTAN, A. *et al.* **Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR).** *Biomolecular Detection and Quantification*, Vol.12, p.1–6. 2017. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.04.001

GAIDHANI, K. A. *et al.* **Lyophilization / Freeze Drying – A review.** *World Journal of Pharmaceutical Research*, Vol.4, p.516–543, 2018.



KHAN, M. A. *et al.* **Strength Comparison of Accelerated Cured and Normal Cured Fly-Ash Based Concrete.** *Mehran University Research Journal of Engineering & Technology*, Vol. 39, No. 1. Paquistão, 2020. DOI: 10.22581/muet1982.2001.03

LBMMS, Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia. **Manual de Instruções para Execução da Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) para Detecção de CT/NG por Biologia Molecular.** 2 ed. Florianópolis: LBMMS/CCS/UFSC, 2024a.

LBMMS, Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia. **Relatório de Desempenho - Rodada Prática. Terceira Avaliação Externa da Qualidade da Rede Nacional de Laboratórios de Biologia Molecular para Detecção de CT/NG: 4AEQ-CT/NG.** Florianópolis: LBMMS/CCS/UFSC, 2024b.

LBMMS, Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia. **Relatório de Desempenho - Rodada Prática. Avaliação Externa da Qualidade da Rede Nacional de Biologia Molecular para Detecção de CT/NG.** Florianópolis: LBMMS/CCS/UFSC, 2023.

MARLOWE, E. *et al.* **High-throughput testing of urogenital and extragenital specimens for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with cobas® CT/NG.** *European Journal of Microbiology and Immunology*, Vol. 7, p.176–186, 2017. DOI:10.1556/1886.2017.00018.

MEYER, T. *et al.* **Performance evaluation of the PelvoCheck CT/NG test kit for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*.** *British Medical Journal Open*, Vol.6 (1). 2016. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-009894

MEYER, T; Buder, S. **The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands.** *Pathogens*. Vol 9 (2). 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020091.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections.** 2021b

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for the Management of Symptomatic Sexually Transmitted Infections.** 2021a

PROCOP, Gary W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico.** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2018.

PROMEGA. **ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System: Instructions for Use of Products A5080, A5081 and A5082.** Estados Unidos da América, 2021.

ROCHE. **Cobas® PCR Urine Sample Kit: Para utilização em diagnóstico *in vitro*.** Alemanha, 2021.

SEEGENE. **Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay.** Coréia do Sul, 2018

SLOAN, L. M. **Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Verification, Validation, and Contamination Control.** Clinical Microbiology Newsletter. Vol. 29, No. 12. Nova Iorque, 2007.

SPENCE, J. M., Wright *et al.* **Laboratory Maintenance of *Neisseria gonorrhoeae*.** Current Protocols in Microbiology. Capítulo 4. 2008. DOI:10.1002/9780471729259.mc04a01s8

THERMOFISHER. **Real-Time PCR: Understanding Ct.** 2016

UNEMO, M. *et al.* **Gonorrhoea.** Nature Reviews Disease Primers. Vol. 5, No. 1. 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0128-6

ZAPATA, A; Ramirez-Arcos, S. **A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density.** In Current Microbiology, Vol. 70, p. 907–909. 2015. DOI: 10.1007/s00284-015-0801-2