

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

PATRÍCIA FERREIRA E SILVA

**PRODUÇÃO DE SORO DE REFERÊNCIA ANTI-*BRUCELLA*  
*ABORTUS* SEGUNDO AS NORMAS PARA MATERIAIS DE  
REFERÊNCIA CERTIFICADOS**

Belo Horizonte

2020

PATRÍCIA FERREIRA E SILVA

**PRODUÇÃO DE SORO DE REFERÊNCIA ANTI-*BRUCELLA*  
*ABORTUS* SEGUNDO AS NORMAS PARA MATERIAIS DE  
REFERÊNCIA CERTIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Coorientador: Dr. Paulo Martins Soares Filho

Belo Horizonte

2020

S586p Silva, Patrícia Ferreira e.  
Produção de soro de referência *Anti-Brucella Abortus* segundo as normas para materiais de referência certificados / Patrícia Ferreira e Silva. – 2020.  
126 f. : il.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.  
Coorientador: Paulo Martins Soares Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Brucella abortus – Teses. 2. Confiabilidade analítica – Teses. 3. Zoonoses – Teses. 4. Leite – Contaminação – Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Soares Filho, Paulo Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

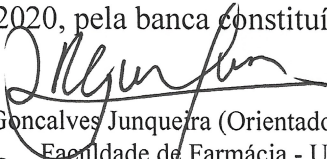
## FOLHA DE APROVAÇÃO

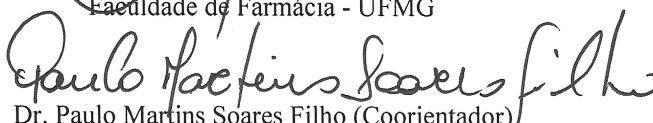
PRODUÇÃO DE SORO DE REFERÊNCIA ANTI-BRUCCELLA ABORTUS  
SEGUNDO AS NORMAS PARA MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

**PATRÍCIA FERREIRA E SILVA**


Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 10 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador e Presidente da Comissão)  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Dr. Paulo Martins Soares Filho (Coorientador)  
LANAGRO-MG

  
Dra. Andréa de Melo Garcia Oliveira  
LANAGRO-MG

  
Profa. Dra. Scheillá Vitorino Carvalho de Souza Ferreira  
Faculdade de Farmácia - UFMG

Belo Horizonte, 10 de março de 2020.

*Dedico esse trabalho a meus filhos, Guilherme e Leticia, que são a razão maior do meu viver, para que eles saibam que quem acredita sempre alcança.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde, esperança e força ao longo dessa caminhada, sempre me conduzindo e me surpreendendo com suas bênçãos, para que eu chegasse até aqui.

A minha amada família, especialmente meus filhos, meu marido, meus pais e meu irmão, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo todo o apoio possível, com muito amor, carinho e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Roberto Junqueira, que acreditou neste trabalho desde o primeiro momento e atuou de modo brilhante, me incentivando, respeitando minhas decisões, compreendendo minhas dificuldades e me socorrendo prontamente em todos os momentos de aperto. Suas contribuições foram fundamentais para o alcance dos resultados pretendidos.

Ao meu coorientador Paulo Martins, idealizador deste trabalho, sempre presente em todas as etapas de execução, contribuindo com sua grande experiência profissional, trabalhando incansavelmente, com muito comprometimento e competência.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da FAFAR/UFMG, por me proporcionaram um grande aprendizado.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-MG) e demais órgãos do MAPA envolvidos, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela disponibilização de sua infraestrutura, equipamentos, insumos, dentre outros.

À Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), especialmente à Karina Diniz Baumgarten e ao pessoal do Departamento Regional de Chapecó cuja contribuição foi imprescindível para viabilização deste trabalho.

À toda equipe do DDB, especialmente à Patrícia Souza, por toda colaboração na realização dos ensaios.

Ao amigo Mikael pelo constante incentivo e pela valiosa contribuição nas etapas de realização dos contatos com a CIDASC e coleta do soro em Chapecó.

Às amigas Maiara, Viviane e Andréa sempre muito compreensivas e dispostas a ajudar, que assumiram muitas atividades durante os momentos em que estive ausente e me apoiaram ao longo desses dois anos.

Ao colega Gabriel Barros, sempre muito prestativo e atencioso, por todo o empenho no tratamento estatístico dos dados.

Às colegas Graciele e Roseane, por compartilharem suas experiências, fornecendo referências bibliográficas e outros documentos importantes.

Ao colega Rodrigo Ramos pela colaboração no preparo do material.

Aos demais colegas não mencionados, que torceram por mim e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Não podemos fazer grandes coisas,  
só pequenas coisas com grande amor”.*

*Madre Teresa de Calcutá*

## RESUMO

Os materiais de referência desempenham um importante papel na garantia da qualidade dos resultados analíticos, todavia, em muitas áreas, especialmente a biológica, a baixa disponibilidade destes materiais dificulta a demonstração da competência técnica dos laboratórios. A brucelose é uma zoonose endêmica em nosso país e está associada ao consumo de leite e derivados contaminados. Para assegurar a confiabilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas no programa oficial de controle e erradicação dessa doença no Brasil, não há material de referência disponível que possa ser amplamente empregado. Neste trabalho, foi desenvolvido um candidato a material de referência para diagnóstico de brucelose a partir de soro bovino naturalmente infectado. A presença de *Brucella abortus* foi comprovada por meio do isolamento e da identificação do patógeno por PCR-AMOS modificada. O material foi produzido e avaliado segundo os requisitos das normas ISO 17034 e ISO Guide 35. Foram empregadas quatro técnicas sorológicas independentes: o teste do antígeno acidificado tamponado, a soroaglutinação lenta em tubos e redução pelo 2-mercaptoetanol, a fixação do complemento e a polarização fluorescente. O candidato a material de referência foi considerado homogêneo ( $p > 0,05$ ) e a incerteza associada à avaliação da homogeneidade entre unidades e dentro da unidade foi determinada. Nos ensaios de estabilidade, o material foi considerado estável mesmo quando submetido a uma condição de temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias e, ainda, mostrou-se estável após quatro ciclos repetidos de descongelamento. Os resultados obtidos evidenciam o potencial deste material de ser futuramente caracterizado e utilizado como soro de referência nacional.

**Palavras-chave:** *Brucella*. Soro padrão. Confiabilidade analítica. Zoonose.

## ABSTRACT

Reference materials play an important role in ensuring the quality of analytical results, however, in many areas, especially the biological; the low availability of these materials makes it difficult to demonstrate the technical competence of laboratories. Brucellosis is an endemic zoonosis in our country and it is associated with the consumption of contaminated milk and dairy products. To ensure the reliability of the diagnostic techniques used in the official program for the control and eradication of this disease in Brazil, there is no reference material available that can be widely used. In this work, a candidate for reference material for the serological diagnosis of brucellosis was developed from serum of naturally infected cow. The presence of *Brucella abortus* bv. was proven through isolation and identification by modified PCR-AMOS. The material was produced and evaluated according to the requirements of ISO 17034 and ISO Guide 35. Four independent serological techniques were used: the buffered acidified antigen test, slow agglutination in tubes and reduction by 2-mercaptoethanol, complement fixation and fluorescent polarization. The candidate reference material was considered homogeneous ( $p > 0.05$ ) and the uncertainty associated with the assessment of homogeneity between units and within unit was determined. In the stability tests, the material was considered stable even when submitted to a temperature condition of  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 12 days and, still, it was stable after four repeated thawing cycles. The results obtained show the potential of this material to be further characterized and used as a national reference serum.

**Keywords:** *Brucella*. Standard serum. Analytical reliability. Zoonosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de <i>Brucella</i> , biovars e hospedeiros preferenciais .....	25
Figura 2 - Características observadas nas amostras submetidas ao teste AAT .....	36
Figura 3 - Características observadas no teste SAL/2-ME.....	38
Figura 4 - Leitura da prova de FC .....	40
Figura 5 - Aspecto das colônias de <i>Brucella abortus</i> .....	43
Figura 6 - Hierarquia de calibração e rastreabilidade metrológica para os padrões internacionais WHO .....	46
Figura 7 - Delineamento do estudo de homogeneidade entre unidades .....	50
Figura 8 - Delineamento do estudo de homogeneidade dentro da unidade.....	52
Figura 9 - Modelo de planilha para cálculo dos volumes necessários para o preparo de diluições não seriadas para o teste SAL .....	62
Figura 10 - Padrões de turbidez para avaliação do percentual de aglutinação.....	62
Figura 11 - Processamento das peças anatômicas para diagnóstico bacteriológico	66
Figura 12 - Inoculação em placas com meio de cultura .....	66
Figura 13 - Envase do candidato a MR.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por AAT .....	75
Gráfico 2 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por SAL .....	76
Gráfico 3 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por 2-ME.....	77
Gráfico 4 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato à MR por AAT.....	84
Gráfico 5 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por SAL.....	85
Gráfico 6 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por 2-ME.....	86
Gráfico 7 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por FC.....	87
Gráfico 8 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de <i>outliers</i> pelo <i>Boxplot</i> nos resultados dos frascos mantidos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	92
Gráfico 9 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	93
Gráfico 10 - Resíduos da análise de regressão na temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	94
Gráfico 11 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de <i>outliers</i> pelo <i>Boxplot</i> nos resultados dos frascos mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	95
Gráfico 12 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	96
Gráfico 13 - Resíduos da análise de regressão na temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	96
Gráfico 14 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de <i>outliers</i> pelo <i>Boxplot</i> nos resultados dos frascos mantidos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias.....	98
Gráfico 15 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias.....	99
Gráfico 16 - Resíduos da análise de regressão na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias .....	100

Gráfico 17 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 dias.....	101
Gráfico 18 - Resíduos da análise de regressão na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 dias .....	102
Gráfico 19 - Distribuição dos <i>outliers</i> detectados pelo <i>Boxplot</i> ao longo do tempo nos ensaios de estabilidade em três temperaturas .....	103
Gráfico 20 - <i>Boxplot</i> dos resultados obtidos no estudo de subamostragem.....	105
Gráfico 21 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR durante ciclos repetidos de descongelamento .....	106
Gráfico 22 - Resíduos da análise de regressão no estudo de subamostragem .....	107

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das amostras reagentes no teste AAT .....	36
Quadro 2 - Interpretação dos resultados do teste SAL/2-ME .....	38
Quadro 3 - Caracterização bioquímica da <i>Brucella</i> .....	44
Quadro 4 - Informações dos bovinos selecionados.....	65
Quadro 5 - Condições do estudo de estabilidade em prazo curto.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação da prova de FC .....	40
Tabela 2 - Rastreabilidade das amostras do <i>pool</i> .....	73
Tabela 3 - Resultados dos testes AAT, SAL/2-ME e FC obtidos nos frascos amostrados para o estudo de homogeneidade do material piloto .....	74
Tabela 4 - Avaliação da homogeneidade do material piloto por FPA.....	78
Tabela 5 - ANOVA fator único aplicada aos dados obtidos por FPA no estudo exploratório.....	79
Tabela 6 - Resultados da avaliação da homogeneidade entre unidades do candidato à MR por FPA.....	88
Tabela 7 - ANOVA aninhada aplicada para avaliação da homogeneidade do candidato à MR por FPA .....	90
Tabela 8 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	94
Tabela 9 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	97
Tabela 10 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias.....	100
Tabela 11 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 dias.....	102
Tabela 12 - ANOVA da regressão aplicada no estudo de subamostragem .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	2-Mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
$a_w$	atividade de água
bv.	biovar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
FC	Fixação do Complemento
FPA	Polarização Fluorescente
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
ISO	International Standards Organization
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais
LFDA-MG	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais
LPS	lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mP	milipolarização
MR	material de referência
MRC	material de referência certificado
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal
SAL	Soroaglutinação Lenta
SC	Santa Catarina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	unidades internacionais
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	23
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
<b>3.1 Brucelose</b> .....	24
3.1.1 <i>Etiologia</i> .....	24
3.1.2 <i>Espécies e hospedeiros</i> .....	24
3.1.3 <i>Transmissão</i> .....	26
3.1.4 <i>Sintomas</i> .....	26
3.1.5 <i>Histórico</i> .....	27
3.1.6 <i>Epidemiologia</i> .....	28
<b>3.2 Controle da <i>Brucella</i> em alimentos</b> .....	29
3.2.1 <i>Alimentos como fonte da infecção</i> .....	29
3.2.2 <i>Legislação</i> .....	31
3.2.3 <i>Prevenção</i> .....	32
3.2.4 <i>Programas de controle</i> .....	33
<b>3.3 Métodos de diagnóstico de brucelose bovina</b> .....	34
3.3.1 <i>Métodos indiretos</i> .....	34
3.3.2 <i>Método direto</i> .....	42
<b>3.4 Materiais de referência</b> .....	45
3.4.1 <i>Conceito e importância</i> .....	45
3.4.2 <i>Disponibilidade de materiais de referência</i> .....	46
3.4.3 <i>Produção de materiais de referência</i> .....	47
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56

<b>4.1 Material</b> .....	56
4.1.1 <i>Material para coleta de sangue e obtenção do soro</i> .....	56
4.1.2 <i>Material para o teste sorológico AAT</i> .....	56
4.1.3 <i>Material para o teste sorológico SAL/2-ME</i> .....	56
4.1.4 <i>Material para o teste sorológico FC</i> .....	57
4.1.5 <i>Material para o teste sorológico FPA</i> .....	57
4.1.6 <i>Material para o diagnóstico bacteriológico</i> .....	57
4.1.7 <i>Material para produção do soro candidato a MR</i> .....	57
<b>4.2 Equipamentos</b> .....	58
4.2.1 <i>Equipamentos para coleta de sangue e obtenção do soro</i> .....	58
4.2.2 <i>Equipamentos para o teste sorológico AAT</i> .....	58
4.2.3 <i>Equipamentos para o teste sorológico SAL/2-ME</i> .....	58
4.2.4 <i>Equipamentos para o teste sorológico FC</i> .....	58
4.2.5 <i>Equipamentos para o teste sorológico FPA</i> .....	58
4.2.6 <i>Equipamentos para o diagnóstico bacteriológico</i> .....	59
4.2.7 <i>Equipamentos para a produção do candidato a MR</i> .....	59
<b>4.3 Reagentes, soluções e padrões</b> .....	59
<b>4.4 Métodos</b> .....	60
4.4.1 <i>Estudo exploratório inicial</i> .....	60
4.4.2 <i>Seleção e obtenção do material de partida para produção do candidato a MR</i> .....	64
4.4.3 <i>Diagnóstico bacteriológico de Brucella abortus</i> .....	65
4.4.4 <i>Preparação do candidato a material de referência</i> .....	67
4.4.5 <i>Avaliação da homogeneidade</i> .....	69
4.4.6 <i>Avaliação da estabilidade</i> .....	70
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	73
<b>5.1 Estudo exploratório</b> .....	73

<b>5.2</b>	<b>Obtenção do material de partida para produção do candidato a MR</b>	<b>81</b>
<b>5.3</b>	<b>Diagnóstico bacteriológico de <i>Brucella abortus</i></b>	<b>82</b>
<b>5.4</b>	<b>Produção do candidato a material de referência</b>	<b>83</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da homogeneidade</b>	<b>83</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação da estabilidade</b>	<b>91</b>
5.6.1	<i>Estudo de estabilidade em prazo curto</i>	91
5.6.2	<i>Estudo de subamostragem</i>	105
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Brucelose é a denominação usualmente empregada para se referir a infecções que acometem humanos e animais, que são ocasionadas por bactérias do gênero *Brucella* (OIE, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), já foram descritas onze espécies pertencentes ao gênero *Brucella*, que diferem principalmente quanto a sua patogenicidade e quanto a seu hospedeiro preferencial. Apesar de cada espécie possuir predileção por um hospedeiro específico, estas bactérias têm capacidade de infectar outros hospedeiros, incluindo os seres humanos (OIE, 2018).

A brucelose é uma zoonose que ocasiona perdas econômicas e risco à saúde pública. Nos animais é tipicamente assintomática, sendo os principais sintomas clínicos abortos e problemas reprodutivos (OIE, 2018). Nos humanos, manifesta-se como uma doença febril, acompanhada de sintomas inespecíficos como cefaleia, fadiga, mialgia, perda de peso, dentre outros, que pode progredir para complicações severas e incapacitantes (CORBEL, 2006; DEAN *et al.*, 2012).

A transmissão da brucelose para humanos ocorre devido ao contato direto ou indireto com os animais infectados e seus produtos, especialmente por meio da ingestão de leite e derivados não pasteurizados (CORBEL, 2006). Por esta razão, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a brucelose uma Doença Transmitida por Alimento (DTA) (WHO, 2015, 2020).

Apesar da pasteurização do leite ser o processo mais seguro para produção de derivados lácteos, observa-se uma tendência do aumento do consumo de alimentos naturais. Queijos artesanais produzidos a partir de leite cru têm ganhado cada vez mais espaço no mercado, o que pode aumentar o risco de transmissão de brucelose e torna a prevenção e controle desta zoonose cada vez mais críticos (DADAR *et al.*, 2019).

Diversos autores enfatizam que a forma mais efetiva de prevenir a brucelose em humanos é garantindo a sanidade do rebanho, uma vez que existe forte correlação da doença em humanos, com a doença em animais (CORBEL, 2006; LAWINSKY *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2015).

*Brucella abortus* é a espécie que tem sido mais comumente notificada no Brasil e, por esta razão, objeto do “Programa Nacional de Controle e Erradicação da

Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001, 2017). A eficácia do programa nacional está diretamente relacionada à qualidade e padronização dos meios de diagnósticos utilizados. Neste contexto, o PNCEBT estabelece quatro testes sorológicos de diagnóstico da brucelose: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), que é o teste de triagem empregado na rotina e, três testes confirmatórios, que são os testes de Soro Aglutinação Lenta e Redução pelo 2-Mercaptoetanol (SAL/2-ME), Fixação de Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (FPA), definindo ainda, seus critérios de utilização e interpretação (BRASIL, 2017).

Considerando que o controle e a erradicação da brucelose dependem da aplicação de testes diagnósticos que permitam distinguir com confiabilidade os animais doentes dos animais sadios, é imprescindível que os laboratórios que executam estes diagnósticos disponham de mecanismos para garantia da qualidade analítica dos resultados emitidos. A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 estabelece que os laboratórios devem dispor de procedimento para monitorar a validade dos seus resultados, incluindo o uso de materiais de referência (ABNT, 2017). Entretanto, a oferta de materiais de referência é extremamente reduzida, principalmente tratando-se de materiais em matriz, que são aqueles característicos de amostras reais (ABNT, 2016).

Para diagnóstico sorológico de brucelose, o material que possui o mais elevado nível metrológico é o soro padrão denominado *WHO Second International Standard anti-Brucella abortus Serum* (NIBSC, 2017). Este soro não se destina ao uso rotineiro pois está disponível em quantidade limitada e é reconhecido pela WHO e pela OIE como o material de referência primário a partir do qual devem ser estabelecidos padrões secundários ou nacionais (OIE, 2018).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver o primeiro material de referência nacional para diagnóstico sorológico de *Brucella abortus*, seguindo os princípios estabelecidos nas normas internacionais que tratam da produção e certificação de materiais de referência ISO 17034 e ISO Guide 35 (ISO, 2017).

O resultado pretendido é a obtenção de um material de referência que possa ser amplamente utilizado para garantia da qualidade dos resultados analíticos dos laboratórios que atuam no programa oficial brasileiro de controle e erradicação da

brucelose e, ainda, que possa ser futuramente caracterizado por comparação ao soro internacional, para ser estabelecido como padrão nacional.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir um soro de referência anti-*Brucella abortus* segundo as normas para materiais de referência certificados.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar bovinos comprovadamente infectados por *Brucella abortus*.
- b) A partir do soro dos bovinos selecionados, preparar o candidato a material de referência em consonância com os requisitos da norma ISO 17034:2017.
- c) Avaliar a homogeneidade e a estabilidade do material preparado atendendo aos requisitos da norma ISO Guide 35:2017.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Brucelose

##### 3.1.1 Etiologia

Brucelose é a denominação usualmente empregada para se referir a infecções que acometem humanos e animais, que são ocasionadas por bactérias do gênero *Brucella*. Estes microrganismos pertencem à família *Brucellaceae*, da ordem Rhizobiales, da classe Alphaproteobacteria (OIE, 2018).

Estes patógenos são Gram negativos, imóveis, não formadores de esporos e aeróbios, apesar de algumas linhagens necessitarem de suplemento de CO<sub>2</sub> para crescerem (ALTON *et al.*, 1988). São bactérias exigentes, que apresentam crescimento lento, mesmo em temperatura ótima de 37°C e pH ótimo de 6,6 a 7,4 (FALENSKI *et al.*, 2011). Apresentam-se na forma de cocobacilos que medem de 0,6 a 1,5 µm de comprimento por 0,5 a 0,7 µm de largura (ALTON *et al.*, 1988).

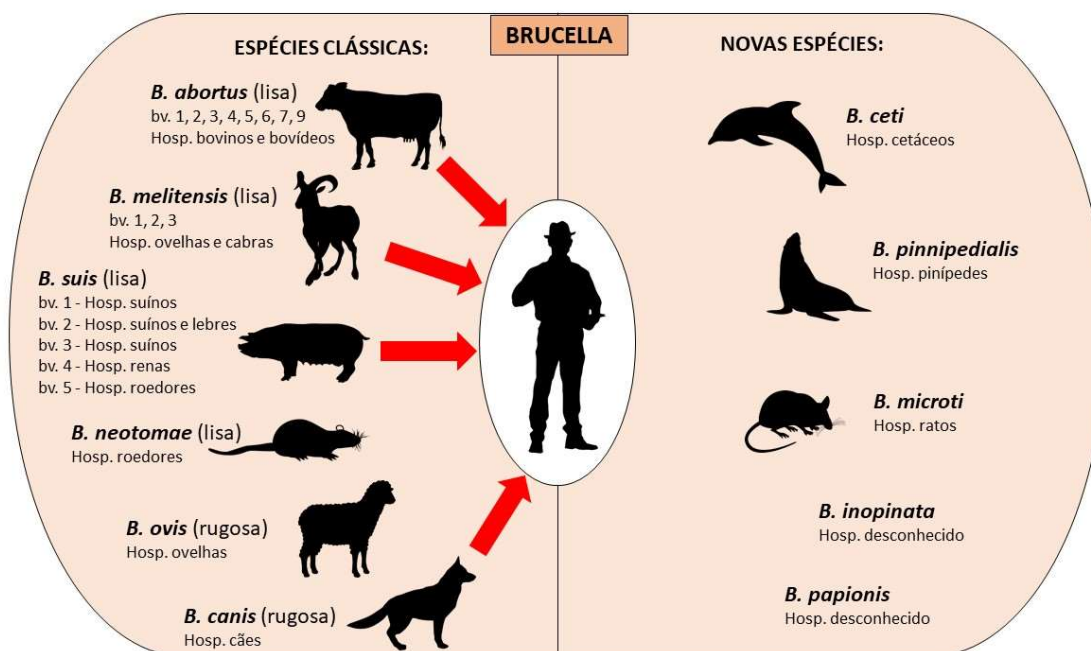
As bactérias do gênero *Brucella* também podem ser definidas como parasitas intracelulares facultativos que sobrevivem e se multiplicam em macrófagos (CORBEL, 2006; GOLDING *et al.*, 2001).

Em relação à morfologia das colônias, características da superfície celular e estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS), as bactérias do gênero *Brucella* podem ser classificadas como lisas ou rugosas (MANCILLA, 2016; WHATMORE, 2009). As espécies lisas são mais patogênicas que as espécies rugosas. (ALTON *et al.*, 1988).

##### 3.1.2 Espécies e hospedeiros

Já foram descritas onze espécies pertencentes ao gênero *Brucella*, que são capazes de infectar mamíferos terrestres e aquáticos. Elas diferem entre si quanto a sua patogenicidade e quanto a seu hospedeiro preferencial. Apesar de cada espécie possuir predileção por um hospedeiro específico, estas bactérias têm capacidade de infectar outros hospedeiros, incluindo os seres humanos (OIE, 2018; WHATMORE, 2009). A figura 1 apresenta as principais espécies descritas do gênero *Brucella*, seus biovars e seus hospedeiros preferenciais.

**Figura 1 - Espécies de *Brucella*, biovars e hospedeiros preferenciais**



Hosp.: hospedeiro preferencial, bv.: biovar. As setas indicam as espécies com potencial zoonótico.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a brucelose é a zoonose mais difundida do mundo, mas classifica-se como uma das sete doenças mais negligenciadas (CORBEL, 2006; HULL & SCHUMAKER, 2018).

Das onze espécies descritas, quatro têm potencial zoonótico: *B. melitensis*, *B. suis* (bv. 1, 3 e 4), *B. abortus* e *B. canis*, sendo as três primeiras altamente patogênicas para humanos (MORENO, 2014; OIE, 2018).

A *B. melitensis* é a espécie mais virulenta para humanos, associada a casos severos da doença (CORBEL, 2006), felizmente não há relatos desta espécie no Brasil (OIE, 2019).

Por outro lado, a *B. abortus* é a espécie mais difundida mundialmente (CORBEL, 2006). Esta espécie é endêmica no Brasil em bovinos, sendo encontrada em vários estados (POESTER *et al.*, 2002), inclusive no Estado de Minas Gerais (SOARES FILHO *et al.*, 2012). Segundo estimativa de Gonçalves *et al.* (2009), a prevalência de focos de brucelose em bovinos em Minas gira em torno de 6,0%.

### 3.1.3 Transmissão

Por se tratar de uma zoonose, a transmissão da brucelose para humanos ocorre devido ao contato direto ou indireto com os animais infectados e seus produtos (CORBEL, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a brucelose é uma DTA – Doença Transmitida por Alimento e o consumo de leite cru e seus derivados é a maior fonte de infecção em humanos (WHO, 2015, 2020).

A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto com vísceras, secreções, placenta e fetos abortados de animais infectados. Os grupos de risco devido à exposição ocupacional são: tratadores de animais, veterinários e trabalhadores de abatedouros (LAWINSKY *et al.*, 2010).

Outras formas de infecção incluem a exposição acidental a vacinas de *Brucella* atenuadas e a exposição laboratorial, por via subcutânea ou por meio de aerossóis, em decorrência da baixa dose infectante. As atividades de isolamento e cultura deste patógeno requerem nível 3 de biossegurança (CDC, 2017; CORBEL, 2006; HULL & SCHUMAKER, 2018).

Os fatores determinantes para o desenvolvimento da infecção são a virulência da espécie, a carga bacteriana da exposição e o sistema imunológico do indivíduo exposto.

### 3.1.4 Sintomas

A brucelose em humanos é uma infecção sistêmica que provoca sintomas inespecíficos. Na fase inicial provoca febre, sudorese, cefaleia, mialgia, cansaço, perda de peso, distúrbios gastrointestinais e dores nas articulações persistentes (CDC, 2017; CORBEL, 2006; DEAN *et al.*, 2012). À medida que a doença vai progredindo surgem complicações severas e incapacitantes osteoarticulares, hepatobiliares, respiratórias, genitourinárias, neurológicas e cardiovasculares (CORBEL, 2006).

Além de um problema de saúde pública, a brucelose em humanos provoca perdas econômicas devido à incapacidade parcial ou total para o trabalho (LAWINSKY *et al.*, 2010).

O diagnóstico imediato, seguido do tratamento apropriado com antibióticos, reduz significativamente a incapacidade do paciente (CORBEL, 2006). Todavia, os sintomas inespecíficos e a baixa suspeição podem retardar o diagnóstico.

Nos animais, a brucelose é geralmente assintomática e o principal sintoma clínico é o aborto no terço final da gestação (OIE, 2018).

### 3.1.5 Histórico

A história da brucelose, doença também conhecida como Febre de Malta, Febre Ondulante ou Febre do Mediterrâneo, está relacionada ao episódio ocorrido na Ilha de Malta no final do século XIX, no qual centenas de soldados das tropas inglesas adquiriram uma doença desconhecida e debilitante, cujo agente causador foi descoberto em 1887 por David Bruce, após ser isolado do baço de algumas vítimas fatais. Nesta ocasião, o microorganismo recebeu o nome de “*Micrococcus melitensis*”.

Bang, em 1897, isolou e descreveu o microorganismo “*Bacillus abortus*”, responsável por causar aborto contagioso em bovinos (BANG, 1897; MORENO, 2014).

Em 1905 Zammit e Horrocks demonstraram a associação da contaminação humana por *M. melitensis* com o consumo de leite das cabras maltesas (VASSALO, 1992). Esta descoberta desencadeou medidas de Saúde Pública severas, que incluíram a descontinuação do consumo de leite de cabra naquela região.

Alice Evans, em 1918, demonstrou a similaridade das bactérias isoladas por Bruce e Bang (EVANS, 1918) e contribuiu significativamente para o esclarecimento da epidemiologia da brucelose, bem como para a adoção de medidas preventivas como a pasteurização do leite (MORENO, 2014).

Em 1920, Meyer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* em homenagem a David Bruce (MEYER & SHAW, 1920).

Recentemente, outro fato histórico curioso foi publicado: a descoberta do resíduo sólido arqueológico mais antigo de um queijo, datando 3200 A. C., que foi encontrado durante escavações na tumba de Ptahmes no Egito. Neste resíduo arqueológico de queijo foi identificada uma sequência de um peptídeo que pode estar relacionada à *Brucella melitensis*, fornecendo indícios da presença desta bactéria no período faraônico (GRECO *et al.*, 2018).

### 3.1.6 Epidemiologia

Apesar de a brucelose ser uma infecção que acomete humanos há vários séculos, esta zoonose ainda persiste nos dias de hoje e permanece endêmica em várias partes do mundo, com aproximadamente 500.000 casos relatados anualmente (PAPPAS *et al.*, 2006).

A brucelose humana possui distribuição mundial e está presente em países mediterrâneos da Europa, norte e leste da África, Oriente Médio, regiões sul e central da Ásia, Américas Central e do Sul (CDC, 2017; CORBEL, 2006; DEAN *et al.*, 2012; PAPPAS *et al.*, 2006).

As informações sobre a distribuição geográfica da brucelose em humanos são concordantes com as informações da base de dados “WAHIS Interface” da OIE - Organização Mundial da Saúde Animal, que fornece relatórios sobre a distribuição global da doença em animais. (OIE, 2019).

Estudos epidemiológicos que apresentam resultados sobre a incidência e a prevalência da brucelose em humanos são escassos. Os dados de incidência e prevalência variam muito entre os diferentes países e até mesmo dentro de um mesmo país. (DEAN *et al.*, 2012). Um estudo global sobre a frequência da brucelose em humanos que avaliou 2385 artigos publicados entre 1990 e 2010 apontou que, de modo geral, os valores de incidência são mais baixos em países desenvolvidos como Estados Unidos e Alemanha (até 0,09 casos por 100.000 pessoas-ano) e mais elevados em países de baixa e média renda (até 268,81 casos por 100.000 pessoas-ano) (DEAN *et al.*, 2012). Estas variações podem estar relacionadas a fatores socioeconômicos, hábitos alimentares, programas de vigilância, dentre outros.

Acredita-se que números reais sejam bem maiores que os valores relatados, devido ao subdiagnóstico e à subdeclaração. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mesmo nos países desenvolvidos a incidência pode ser cinco ou mais vezes superior do que os números oficiais (LAWINSKY *et al.*, 2010). Além disso, dados oficiais obtidos de forma passiva também podem subestimar a doença (DEAN *et al.*, 2012).

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos e negligenciados. A brucelose humana não está na lista de doenças de notificação compulsória do

Ministério da Saúde. Deste modo não há obrigatoriedade de informar casos isolados, somente a notificação de surtos é obrigatória (SOARES *et al.*, 2015). A subnotificação também está associada ao baixo índice de suspeita por parte dos médicos, às dificuldades de diagnóstico e, principalmente, devido à falta de uma rede estruturada na saúde pública e um serviço de vigilância epidemiológica desta doença (LAWINSKY *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2015).

Em 2018 foi descrito um surto de brucelose em humanos no estado do Paraná, no sul do Brasil. No período estudado (2009 a 2017), verificou-se que inicialmente os casos da doença eram menos de 20 por trimestre e subiram para mais de 100 por trimestre no ano de 2014. A redução do número de casos só ocorreu após a adoção de medidas de prevenção (LEMOS *et al.*, 2018).

Uma investigação sorológica realizada nos anos de 2003-2004 em uma população urbana de uma comunidade na cidade de Salvador, Bahia, indicou uma soroprevalência de 13% para *B. abortus* (ANGEL *et al.*, 2012).

Outro estudo de soroprevalência de *Brucella* spp na população humana no município de Marechal Deodoro, Alagoas, demonstrou que a população pesquisada estava exposta à infecção, com uma prevalência estimada de 4,4%. Além disso, 50% dos casos positivos para *Brucella* spp afirmaram consumir leite cru e ou derivados (SOARES *et al.*, 2015).

## **3.2 Controle da *Brucella* em alimentos**

### **3.2.1 Alimentos como fonte da infecção**

A presença de bactérias do gênero *Brucella* no leite de animais infectados foi demonstrada há várias décadas, sendo a carga bacteriana eliminada extremamente variável ( $10^1$  a  $10^6$  UFC/mL) em função da virulência da estirpe e da fase da infecção no animal (CARPENTER & BOAK, 1928; DAVIES & CASEY, 1973; EVANS, 1916).

Considerando a presença de *Brucella* spp no leite cru, o consumo do mesmo e de seus derivados não pasteurizados pode acarretar esta infecção em humanos, sendo a brucelose uma DTA – Doença Transmitida por Alimento (CORBEL, 2006).

Bactérias do gênero *Brucella* já foram detectadas em queijos, manteigas (DADAR *et al.*, 2019), iogurtes (FALENSKI *et al.*, 2011) e até mesmo em sorvetes (KUPLULU & SARIMEHMETOGLU, 2004).

A sobrevivência e o crescimento de *Brucella* spp no leite e seus derivados está diretamente relacionada aos métodos de produção e condições de armazenamento (FALENSKI *et al.*, 2011).

Os pesquisadores Davies e Casey avaliaram os efeitos da temperatura e do pH na sobrevivência de *B. abortus* em leite. No leite fluido mantido em temperatura ambiente (17-24°C) ocorreu uma acentuada acidificação, atingindo pH 4,0, o que ocasionou a eliminação completa de organismos viáveis em 4 dias. Já no leite mantido à temperatura de 5°C houve um ligeiro declínio (de pH 5,9 para pH 5,4) e não houve redução do número de organismos viáveis no período estudado (6 dias). No leite que foi submetido à pasteurização não foram encontrados organismos viáveis, demonstrando a eficiência deste processo na eliminação da *Brucella* (DAVIES & CASEY, 1973).

Em queijos produzidos a partir de leite cru, a maturação é um processo importante para segurança alimentar, uma vez que organismos patogênicos que estejam inicialmente presentes vão perdendo sua viabilidade em decorrência da redução do pH, redução da atividade de água ( $a_w$ ), aumento da concentração salina e competição por nutrientes com outros microrganismos da microbiota do queijo, como as bactérias ácido-láticas (BROOKS *et al.*, 2012).

Em experimento realizado com queijo Cheddar, verificou-se que uma maturação de 60 dias oferece uma boa garantia da ausência de bactérias *B. abortus* viáveis (GILMAN *et al.*, 1946).

No entanto, a inativação da *Brucella* durante a maturação do queijo dependerá de uma combinação de fatores que incluem: espécie da *Brucella*, carga microbiana inicial, temperatura, pH,  $a_w$ , concentração de NaCl, presença de outros microrganismos e outras alterações nas características intrínsecas e extrínsecas do queijo (MÉNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Apesar da pasteurização do leite ser o processo mais seguro para produção de derivados lácteos, observa-se uma tendência do aumento do consumo de alimentos naturais. Queijos artesanais produzidos a partir de leite cru têm ganhado cada vez mais espaço no mercado, o que pode aumentar o risco de transmissão de brucelose

e torna a prevenção e controle desta zoonose cada vez mais críticos (DADAR *et al.*, 2019).

### **3.2.2 Legislação**

A legislação brasileira proíbe a comercialização de leite cru para consumo humano direto, de acordo com o Decreto nº 66.183 de 5 de fevereiro de 1970 (BRASIL, 1970) e o Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017 (BRASIL, 2017).

Já a fabricação de queijos a partir do leite cru é permitida em situações específicas. A Portaria MAPA nº 146 de 07 de março de 1996 que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, exclui a obrigatoriedade de pasteurização ou outro tratamento térmico do leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5º C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996).

A Instrução Normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013 permite que queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias, quando houver estudos técnico-científicos que comprovem a inocuidade destes produtos. A avaliação destes estudos será realizada pelos órgãos de inspeção estadual e ou municipal (BRASIL, 2013). Estabelece ainda que a produção de queijos a partir de leite cru ficará restrita a queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controladas para brucelose e tuberculose pelo Órgão Estadual de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 2013).

A legislação do Estado de Minas Gerais, por meio da Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 e da Portaria nº 1736 de 2017 do IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária regulamenta a produção de queijo minas artesanal a partir de leite cru de vaca, definindo o período de maturação para a microrregião de Araxá de no mínimo de 14 dias, do Serro mínimo de 17 dias e para as microrregiões da Serra da Canastra, do Cerrado, de Campo das Vertentes, da Serra do Salitre e do Triângulo Mineiro em 22 dias (MINAS GERAIS, 2013, 2017). Todavia, o número de queijarias que atendem

aos requisitos estabelecidos na legislação ainda é baixo. O comércio de queijos mineiros artesanais ocorre muitas vezes modo informal e alcança grandes mercados consumidores, como São Paulo e Rio de Janeiro (MUSSI, 2018). Estes produtos possuem boa aceitação pelo consumidor, que geralmente desconhece os riscos relacionados à segurança alimentar.

A fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal é regulada pela Lei 13.680 de 14 de junho de 2018 que alterou o disposto na Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. Esta alteração permitiu a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, empregadas boas práticas agropecuárias e de fabricação, desde que submetidos à fiscalização de órgãos estaduais. Estes produtos artesanais serão identificados, em todo o território nacional, por selo com a indicação ARTE. A Lei 13.680 estabelece ainda que as exigências para o registro dos estabelecimentos e dos produtos deverão ser adequadas às dimensões e às finalidades do empreendimento, e os procedimentos de registro deverão ser simplificados, sendo a inspeção e a fiscalização de natureza prioritariamente orientadora (BRASIL, 2018, 1950).

### **3.2.3 Prevenção**

Desde que surgiram os relatos de brucelose humana, sucessivas ações de prevenção da doença foram sendo adotadas. Inicialmente, a medida básica foi a pasteurização do leite. Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que permitiram identificar os animais infectados e de vacinas para proteção do rebanho (MORENO, 2014).

Diversos autores enfatizam que a forma mais efetiva de prevenir a brucelose em humanos é garantindo a sanidade do rebanho, uma vez que existe forte correlação da doença em humanos, com a doença em animais (CORBEL, 2006; LAWINSKY *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2015). Conforme relatado por Moreno, o aumento e a diminuição dos casos de brucelose humana acompanham, respectivamente, o aumento e a diminuição da infecção no rebanho (MORENO, 2014).

Países que obtiveram êxito no controle e erradicação da brucelose aplicaram um conjunto de medidas, incluindo: protocolos consistentes de imunização do

rebanho, aplicação de testes sorológicos de diagnóstico para triagem e confirmação de casos e eliminação dos animais doentes (DADAR *et al.*, 2019; MORENO, 2014).

Muito além das estratégias anteriormente descritas, a OIE tem defendido um conceito mais amplo denominado “*One Health*” ou Saúde Única, que envolve uma abordagem global e colaborativa dos riscos relacionados à saúde humana, à saúde animal (incluindo animais domésticos e silvestres) e ao ecossistema, de forma integrada (OIE, 2020).

A aplicação deste conceito no controle da brucelose envolve o desenvolvimento de uma estrutura com atuação multidisciplinar, para realização do isolamento, da identificação e da caracterização molecular da *Brucella* spp, para investigação da origem da infecção, para amplo conhecimento da doença e para o planejamento de medidas de controle apropriadas (GODFROID *et al.*, 2013).

#### **3.2.4 Programas de controle**

Programas de controle de brucelose animal têm como objetivo reduzir o impacto da doença na saúde humana e as consequências econômicas (CORBEL, 2006).

*Brucella abortus* é a espécie que tem sido mais comumente notificada no Brasil e associada a impactos do ponto de vista econômico e da saúde pública sendo, por esta razão, objeto do “Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O PNCEBT foi criado em 2001 (BRASIL, 2001) e revisto pela Instrução Normativa SDA nº 10 de 03 de março de 2017. Este programa tem o objetivo de reduzir a incidência de brucelose e tuberculose em rebanhos bovinos e bubalinos (BRASIL, 2017).

A estratégia de atuação do PNCEBT é baseada na classificação das unidades federativas quanto ao grau de risco para essas doenças e na definição e aplicação de procedimentos de defesa sanitária animal, de acordo com a classificação de risco. Estes procedimentos incluem medidas sanitárias compulsórias tais como: vacinação, controle de trânsito de animais, identificação de focos por meio de diagnóstico e saneamento dos mesmos, além de ações de adesão voluntária como a certificação de propriedades livres da doença (BRASIL, 2017).

A eficácia do programa nacional está diretamente relacionada à qualidade e padronização dos meios de diagnósticos utilizados. Neste contexto, no PNCEBT são determinados os testes de diagnóstico indireto aprovados, seus critérios de utilização e interpretação (BRASIL, 2017).

O PNCEBT estabelece quatro testes sorológicos de diagnóstico da brucelose: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), que é o teste de triagem empregado na rotina e, três testes confirmatórios, que são os testes de Soro Aglutinação Lenta e Redução pelo 2-Mercaptoetanol (SAL/2-ME), Fixação de Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (FPA).

Os testes confirmatórios devem ser realizados por laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, atendendo os critérios da Instrução Normativa nº 34 de 8 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017).

### **3.3 Métodos de diagnóstico de brucelose bovina**

#### **3.3.1 Métodos indiretos**

Os métodos indiretos de diagnóstico são aqueles que se baseiam na identificação de anticorpos contra um antígeno específico de um patógeno. Os testes sorológicos estabelecidos pelo PNCEBT enquadram-se nesta classificação e são usualmente empregados no diagnóstico da brucelose (BRASIL, 2017).

Entretanto, não há um teste sorológico único que seja apropriado para todas as espécies animais e em todas as situações epidemiológicas. Deste modo, amostras positivas em testes de triagem devem ser também avaliadas em testes confirmatórios ou por meio de estratégias complementares (OIE, 2018).

##### **3.3.1.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado**

O teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), também conhecido como Rosa de Bengala é empregado para o diagnóstico sorológico de brucelose causada por espécies lisas de *Brucella*. O diagnóstico baseia-se na demonstração da presença

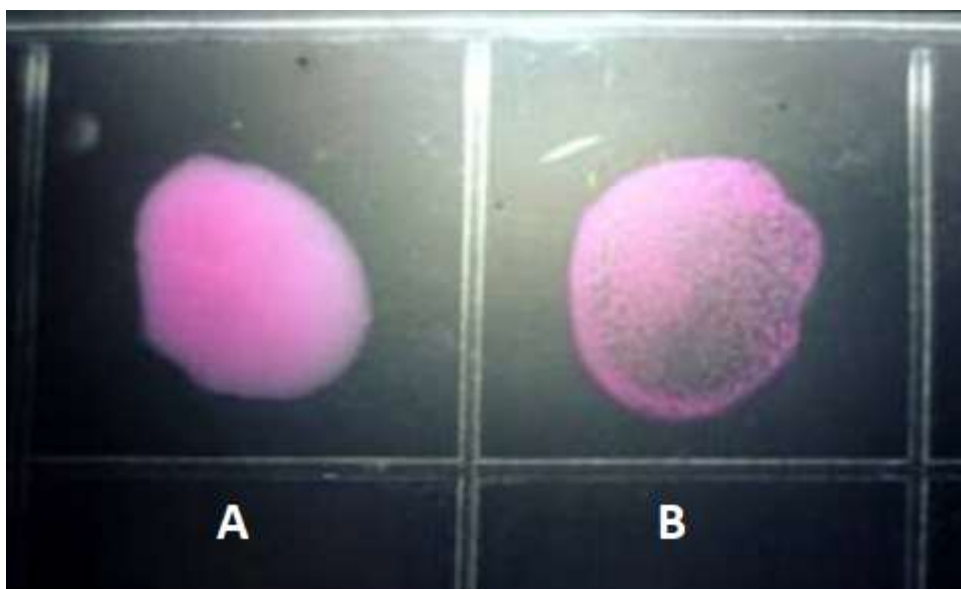
de anticorpos IgG no soro de animais. É uma prova qualitativa, de rápida execução e muito empregada como teste de triagem do rebanho (LANAGRO, 2016).

A sensibilidade do teste é afetada pela temperatura na qual a reação acontece. Por esta razão, a temperatura do soro e do antígeno deve se equilibrar com a do ambiente, que deve estar a  $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  (ALTON *et al.*, 1988).

A execução da prova consiste em dispensar 30  $\mu\text{L}$  de soro em um quadrículo da placa vidro e igual volume do antígeno ao seu lado. Misturá-los com auxílio de misturadores de modo a se obter um círculo de aproximadamente 2 cm. Em seguida, a placa deve ser movimentada ininterruptamente por 4 minutos. Transcorrido este tempo, a leitura deve ser feita imediatamente em caixa com luz indireta (BRASIL, 2017).

A interpretação do resultado baseia-se na visualização da aglutinação. Uma amostra não reagente apresenta-se como um líquido róseo, com ausência de aglutinação. Uma amostra reagente será caracterizada pela presença de aglutinação (grumos avermelhados) (figura 2).

**Figura 2 - Características observadas nas amostras submetidas ao teste AAT**



Fotografia de uma placa de soroaglutinação com soros submetidos ao teste AAT. O quadrículo A apresenta uma amostra não reagente (presença de líquido róseo, sem aglutinação). O quadrículo B apresenta uma amostra reagente (presença de aglutinação).

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

As amostras reagentes podem ser classificadas em quatro níveis de intensidade, conforme quadro 1.

**Quadro 1 - Classificação das amostras reagentes no teste AAT**

Classificação	Características
Muito fraca (+1)	Aglutinação fracamente perceptível, sem formação de halo periférico, com líquido róseo homogêneo.
Fracamente positiva (+2)	Aglutinação fina, um pouco mais perceptível, formação de halo periférico, com líquido róseo homogêneo.
Positiva (+3)	Aglutinação intensa, bastante visível, halo periférico bem evidente, pequena quantidade de líquido róseo.
Fortemente positiva (+4)	Aglutinação muito intensa, halo periférico muito evidente, com líquido transparente.

Fonte: Adaptado de LANAGRO, 2016.

### 3.3.1.2 Soroaglutinação Lenta em Tubos e Redução pelo 2-Mercaptoetanol

A técnica de Soroaglutinação Lenta (SAL) em Tubos e Redução pelo 2-Mercaptoetanol (2-ME) também se baseia na detecção de anticorpos contra espécies lisas de *Brucella*. Trata-se de uma prova sorológica semi-quantitativa, utilizada para confirmar amostras reagentes no teste de triagem (LANAGRO, 2018).

O 2-ME é utilizado em associação com o SAL com a finalidade de tornar a prova seletiva para IgG, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. O 2-ME possui em sua estrutura química o grupo –SH, que reduz as ligações S–S dos anticorpos da classe IgM, desassociando as subunidades, evitando que elas aglutinem e interfiram no resultado da prova (LANAGRO, 2018).

A execução da prova consiste basicamente em preparar dois conjuntos de tubos (um para SAL e um para 2-ME) contendo 4 tubos cada. Os 4 tubos corresponderão às diluições de soro 1:25, 1:50; 1:100 e 1:200. Para alcançar estas diluições serão adicionados respectivamente 80 µL, 40 µL, 20 µL e 10 µL de soro em cada tubo. Nos tubos destinados à prova SAL deve-se acrescentar 2 mL do antígeno para SAL diluído 100 vezes em solução salina fenicada. Nos tubos destinados à prova 2-ME deve-se acrescentar 1 mL de solução de 2-ME 0,1 mol/L, deixar em repouso por 15 minutos e, em seguida, acrescentar 1 mL de antígeno para SAL diluído 50 vezes em salina. Posteriormente os tubos devem ser incubados a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $48\text{h} \pm 4\text{h}$  (BRASIL, 2017).

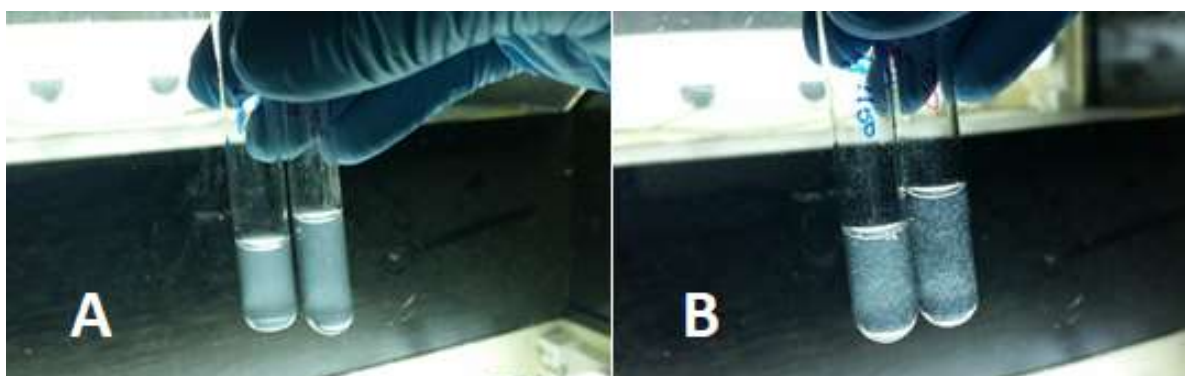
A leitura é realizada por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco.

A interpretação é baseada na observação visual da turbidez inicial dos tubos e na firmeza da aglutinação formada após agitação suave dos tubos, conforme quadro 2 e figura 3.

**Quadro 2 - Interpretação dos resultados do teste SAL/2-ME**

Interpretação do resultado	Características
Reação negativa	O líquido da mistura soro-antígeno apresenta-se turvo e uma agitação suave do tubo não revela aglutinação.
Reação positiva incompleta	O líquido da mistura soro-antígeno apresenta-se turvo e uma agitação suave do tubo não rompe a aglutinação.
Reação positiva completa	O líquido da mistura soro-antígeno apresenta-se transparente e uma agitação suave do tubo não rompe a aglutinação.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017.

**Figura 3 - Características observadas no teste SAL/2-ME**

Leitura dos tubos do teste SAL/2-ME por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro. A imagem A apresenta uma amostra negativa (presença de líquido turvo, sem aglutinação). A imagem B apresenta uma amostra positiva (presença de aglutinação).

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Na técnica SAL/2-ME os resultados são expressos na forma de título. O título corresponde ao inverso da maior diluição onde ocorreu uma reação positiva completa ou incompleta (BRASIL, 2017).

### 3.3.1.3 Fixação do complemento

O teste de fixação do complemento (FC) é empregado para o diagnóstico indireto de brucelose causada por espécies lisas de *Brucella*. Apresenta boa capacidade de distinguir reações vacinais de infecções reais, uma vez que possui

baixa sensibilidade para anticorpos produzidos em resposta a estirpes atenuadas de *B. abortus* e elevada sensibilidade para anticorpos de animais naturalmente infectados (ALTON *et al.*, 1988). Apesar de ser um teste complexo, que exige pessoal bastante treinado, é o teste de referência que deve ser utilizado para o trânsito internacional de animais (BRASIL, 2017).

O teste de FC requer um total de cinco componentes, dos quais quatro devem ser padronizados ou titulados (suspensão de eritrócitos, hemolisina, complemento e antígeno) para a detecção da atividade biológica do quinto, que é o anticorpo anti-*Brucella* no soro. O complemento consiste em uma complexa série de proteínas que, quando ativadas pela presença de um complexo antígeno-anticorpo, reagem de modo sequencial para causar a lise celular. A prova é realizada em dois estágios. No primeiro estágio, o antígeno de *Brucella* e o soro teste são misturados com o soro de cobaia (fonte do complemento). Se o soro teste contiver anticorpos contra *Brucella*, o complemento será gasto ou fixado e não estará disponível no segundo estágio, quando será adicionado o indicador ou sistema hemolítico. No segundo estágio, são adicionados eritrócitos de carneiro que foram sensibilizados, ou seja, com anticorpos anti-eritrócito de carneiro adsorvidos em sua superfície (hemolisina). Se todo complemento tiver sido fixado durante o primeiro estágio da prova, não ocorrerá hemólise, o que significa que o soro contém anticorpos contra *Brucella* e é portanto positivo. Por outro lado, se ocorrer hemólise dos eritrócitos, significa que o complemento não foi fixado no primeiro estágio, porque o soro não continha anticorpos contra *Brucella*, e é portanto negativo (ALTON *et al.*, 1988).

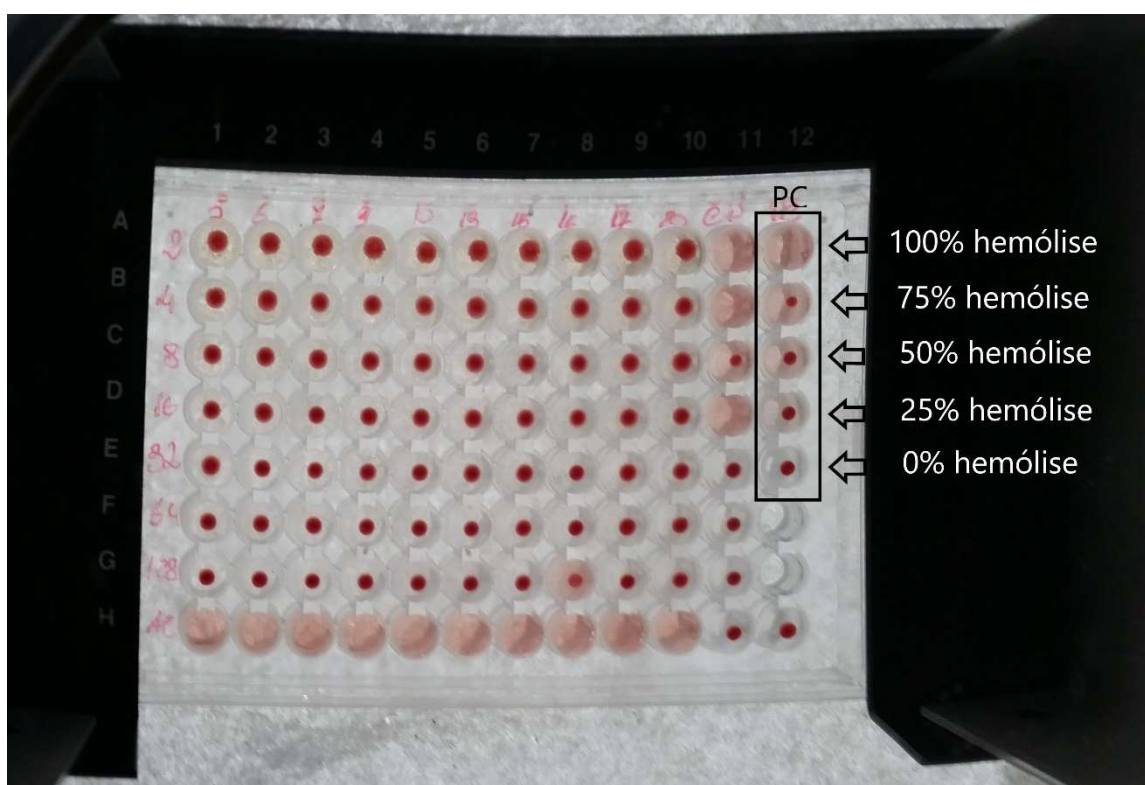
A lise das hemácias é evidenciada pela presença de um líquido róseo no orifício da microplaca de FC, devido a presença de hemoglobina sobrenadante. Por outro lado, a fixação do complemento é evidenciada pelo aparecimento de um botão de hemácias, em decorrência da sedimentação de células intactas.

A interpretação dos resultados da FC é baseada no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados, conforme descrito na tabela 1, que deve ser comparado com o padrão de cor apresentado na figura 4.

**Tabela 1 - Interpretação da prova de FC**

Hemólise (%)	Fixação do complemento (%)	Interpretação do resultado	Escore
100	0	Negativo	0
75	25	Positivo	+1
50	50	Positivo	+2
25	75	Positivo	+3
0	100	Positivo	+4

Fonte: Adaptado de LANAGRO, 2016.

**Figura 4 - Leitura da prova de FC**

PC indica padrão de cor. O percentual de hemólise é baseado no tamanho do botão de hemácias, na cor do sobrenadante e na espessura do botão.

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Os resultados são expressos na forma de título. O título é a maior diluição onde ocorreu fixação do complemento.

### 3.3.1.4 Polarização fluorescente

O método da polarização fluorescente baseia-se no princípio de que uma molécula fluorescente estacionária, quando excitada pela luz polarizada, emitirá luz no mesmo plano. No entanto, as moléculas estão em movimento constante e a taxa de rotação pode ser avaliada medindo a intensidade da luz nos planos horizontal e vertical. Moléculas grandes giram a uma taxa mais lenta, limitando assim a luz emitida mais a um único plano (mais polarizada). Moléculas menores giram a uma taxa mais rápida, emitindo luz em mais de um plano (mais despolarizada) (NIELSEN *et al.*, 1996).

O teste é realizado através do emprego do equipamento analisador de polarização, que mede o retorno da luz em planos paralelos e perpendiculares ao da excitação (NIELSEN *et al.*, 2001) e um kit de reagentes específicos.

A molécula fluorescente do kit é um conjugado composto pelo Polissacarídeo-O (OPS), extraído de células de *B. abortus* e fluoresceína. Este conjugado OPS-fluoresceína é relativamente pequeno e pode rotacionar livremente em solução. (NIELSEN *et al.*, 1996).

Quando o soro do animal possui anticorpos contra *B. abortus*, estes anticorpos se ligam ao antígeno conjugado com fluoresceína, formando uma molécula maior, que emitirá uma luz mais polarizada (alta polarização). Na ausência de anticorpos, não haverá a formação de complexos antígeno-anticorpo, a taxa rotacional será maior e a luz emitida em diferentes planos, apresentando baixa polarização (NIELSEN *et al.*, 2001).

Os resultados são expressos em unidades de luz polarizada ou de milipolarização (mP). O valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro. A interpretação dos resultados se baseia na diferença entre a leitura do soro em teste e a leitura média dos controles negativos da prova. Quando a diferença for menor que 10 mP o soro é classificado como negativo. Quando for maior que 20 mP é positivo. Entre 10 mP e 20 mP o resultado é inconclusivo (BRASIL, 2017).

### 3.3.2 Método direto

O diagnóstico bacteriológico é um método direto de detecção de *Brucella* spp, que demonstra a presença do agente infeccioso em espécimes clínicos de animais suspeitos. É considerado o padrão-ouro no diagnóstico da brucelose, entretanto as taxas de isolamento são muito variáveis, sendo influenciadas pela viabilidade e número de *Brucella* spp na amostra, além dos cuidados na coleta, tempo de transporte e temperatura de recebimento das amostras no laboratório, dentre outros fatores (ALTON *et al.*, 1988).

Demanda um tempo longo de análise, sendo inviável seu emprego como teste de rotina, mas é muito útil para investigações específicas e pode ainda, ser empregado para monitorar os métodos sorológicos (ALTON *et al.*, 1988).

O diagnóstico bacteriológico consiste no isolamento e na identificação de *Brucella* spp. A etapa inicial, que é o isolamento, visa o crescimento das bactérias do gênero *Brucella*, para posterior identificação por métodos bioquímicos ou de biologia molecular.

Em carcaças de bovinos adultos, as chances de isolamento são maiores quando se emprega os órgãos de eleição (linfonodos supramamário, ílico interno, retrofaríngeo, preescapular e mesentérico, e baço) (ALTON *et al.*, 1988).

Para o preparo de tecidos sólidos, como linfonodos e baço, deve-se remover a gordura, cortar os tecidos em pequenos pedaços (aproximadamente 2 cm) e acondicioná-los em sacos estéreis contendo salina peptonada, para realizar a maceração em homogeneizador de amostras tipo "Stomacher". Em seguida, o macerado deve ser inoculado em placas contendo ágar triptose com 5% de soro e ágar triptose com inibidor seletivo de Farrel. As placas devem ser incubadas invertidas a 37°C ± 2°C por até 14 dias em atmosfera contendo 5% a 10% de CO<sub>2</sub> (LANAGRO, 2015).

As colônias de *Brucella* podem ser visualizadas na superfície do ágar a partir do terceiro ou quarto dia de incubação. As colônias típicas de *B. abortus* são arredondadas, brilhantes, convexas, com coloração branco-pérola, com bordas lisas e diâmetro aproximado de 1 mm a 2 mm (figura 5). Quando as placas são colocadas contra a luz apresentam-se translúcidas, com cor de mel (ALTON *et al.*, 1988).

**Figura 5 - Aspecto das colônias de *Brucella abortus***



Arquivo LFDA-MG, 2018.

Após o isolamento, as colônias típicas são submetidas à etapa de identificação, que consiste na sua caracterização por meio de um conjunto de testes. O primeiro deles é a coloração de Gram. Como as bactérias do gênero *Brucella* são Gram-negativas, eles apresentam coloração avermelhada neste teste. A morfologia colonial é avaliada através da prova de dissociação, que permite diferenciar colônias lisas de rugosas. Outros testes incluem: o teste de hemólise, o teste de fermentação da lactose e o teste de fermentação da glicose. As bactérias do gênero *Brucella* não produzem hemólise, não fermentam a lactose e não fermentam a glicose.

As provas bioquímicas incluem: prova da catalase, prova da oxidase, utilização do citrato como única fonte de carbono, atividade urease, liquefação da gelatina, motilidade, produção de indol, redução do nitrato e relação com o oxigênio. Os resultados esperados para bactérias do gênero *Brucella* nas provas bioquímicas estão descritos no quadro 3.

**Quadro 3 - Caracterização bioquímica da *Brucella***

Prova Bioquímica	Resultado esperado
Catalase	Positivo
Oxidase	Positivo (exceto para <i>B. ovis</i> e <i>B. neotomae</i> )
Citrato como única fonte de carbono	Negativo
Urease	Positivo (exceto para <i>B. ovis</i> )
Liquefação da gelatina	Negativo
Motilidade	Negativo
Produção de indol	Negativo
Redução do nitrato	Positivo (exceto <i>B. ovis</i> e <i>B. abortus</i> RB51*)
Relação com o oxigênio	Aeróbio

\* *B. abortus* RB51: cepa vacinal rugosa  
 Fonte: Adaptado de ALTON *et al.*, 1988.

Adicionalmente, podem ser realizados testes de tipificação de cultura de *Brucella*, para se estabelecer a espécie e o biovar. A identificação da espécie é baseada na lise por fagos, requerimento de soro e hospedeiro preferencial. A classificação do biovar é feita por meio dos testes de requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de sulfito de hidrogênio, sensibilidade a corantes e aglutinação com antissoro monoespecífico A e M (ALTON *et al.*, 1988).

Outra alternativa à identificação e tipificação de espécies e biovars de *Brucella* é empregar a prova de reação em cadeia de polimerase (PCR) em suspensões bacterianas inativadas. Esta técnica possui elevada sensibilidade e especificidade e possibilita a caracterização em tempo consideravelmente menor, além de reduzir a exposição do analista ao agente infeccioso. A PCR AMOS, cujo nome é uma abreviação de *abortus*, *melitensis*, *ovis* e *suis*, é uma PCR multiplex, que se fundamenta na amplificação da região do elemento de inserção 711, por meio do uso de iniciadores diferentes e específicos, que geram produtos amplificados de tamanhos diferentes para cada uma das quatro espécies. Esta técnica passou por modificações, com inclusão de outros iniciadores específicos, permitindo discriminar os biovars (1, 2 e 4; 3b, 5, 6 e 9) de *B. abortus*, de forma agrupada e, ainda, diferenciar a cepa vacinal B19 (ORZIL *et al.*, 2016).

### **3.4 Materiais de referência**

#### **3.4.1 Conceito e importância**

Considerando que o controle e a erradicação da brucelose dependem fundamentalmente da aplicação de testes diagnósticos que permitam distinguir com confiabilidade os animais doentes dos animais sadios, é imprescindível que os laboratórios que executam estes diagnósticos disponham de mecanismos para garantia da qualidade analítica dos resultados emitidos.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 que estabelece requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, determina em seu requisito 7.7 que o laboratório disponha de procedimento para monitorar a validade dos seus resultados, incluindo o uso de materiais de referência (ABNT, 2017).

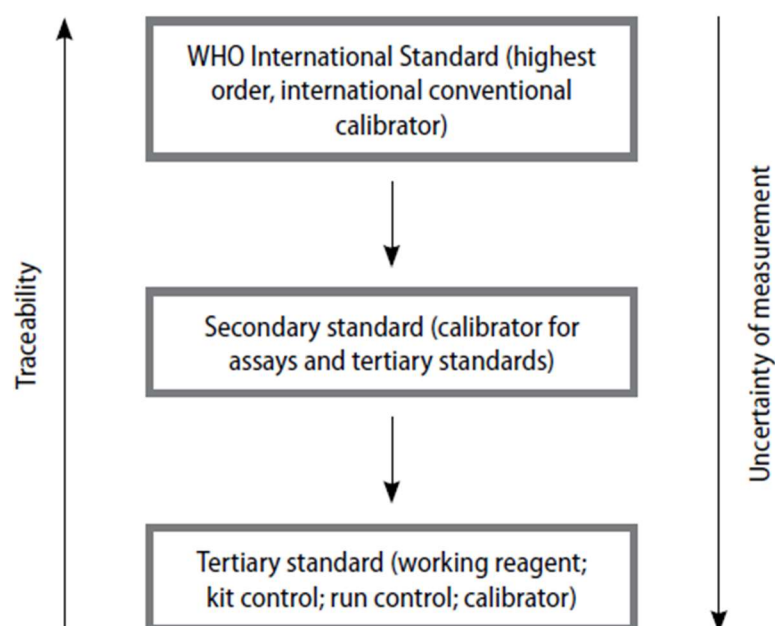
Material de referência (MR) é um material suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição (ABNT, 2016).

Material de referência certificado (MRC) é um material de referência caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica (ABNT, 2016).

Os materiais de referência podem ser usados na calibração, na avaliação de um procedimento de medição, no controle de qualidade, em ensaios de proficiência, na validação de métodos e para atribuir valores a outros materiais. Os materiais de referência certificados são empregados para se confirmar ou se estabelecer a rastreabilidade metrológica a uma referência internacionalmente aceita (ISO, 2017).

Na área biológica, os Padrões Internacionais da WHO são reconhecidos como os padrões primários (figura 6), que estão no topo da cadeia de rastreabilidade e devem ser empregados na padronização de padrões secundários (WHO, 2017).

**Figura 6 - Hierarquia de calibração e rastreabilidade metrológica para os padrões internacionais WHO**



Fonte: WHO, 2017.

Os padrões secundários são padrões de referência estabelecidos por autoridades regionais ou nacionais, ou por outros laboratórios, que tenham sido calibrados por comparação e rastreáveis aos materiais de referência da WHO (WHO, 2017).

### 3.4.2 Disponibilidade de materiais de referência

A oferta de materiais de referência é extremamente reduzida, principalmente tratando-se de materiais de referência em matriz, que são aqueles característicos de amostras reais (ABNT, 2016).

Em consulta realizada à base de dados mundial de materiais de referência “Code d'Indexation des Matériaux de Référence – COMAR” verificou-se a indisponibilidade de MRC para diagnóstico sorológico de brucelose (COMAR, 2018).

Segundo a OIE, os padrões de referência primários que devem ser empregados no diagnóstico de brucelose são aqueles designados como “International Standard Serum” (soro padrão internacional) (OIE, 2018).

Para as técnicas AAT, SAL/2-ME e FC deve ser utilizado o soro OIEISS (OIE *International Standard Serum*), previamente denominado “*WHO Second International standard anti-Brucella abortus Serum*”. Este soro é de origem bovina e contém 1000 UI (unidades internacionais) (OIE, 2018).

O primeiro soro padrão anti-*Brucella abortus* foi estabelecido em 1952 e amplamente utilizado para padronização dos testes de aglutinação para brucelose. Em 1965 os estoques deste soro estavam quase esgotados e o Comitê de Padronização de Produtos Biológicos da WHO designou o laboratório “*Central Veterinary Laboratory*” de Weybridge na Inglaterra para produzir o segundo soro padrão anti-*Brucella abortus* (DAVIDSON *et al.*, 1969). Este soro está disponível em quantidade limitada e é reconhecido pela WHO e pela OIE como o material de referência primário a partir do qual devem ser estabelecidos padrões secundários ou nacionais (OIE, 2018).

Uma vez que o soro padrão internacional OIESS possui o valor designado de 1000 UI por mL, ele permite estabelecer o fator de conversão de resultados expressos em títulos para unidades internacionais. O fator de conversão é estabelecido analisando o OIESS por uma das técnicas anteriormente citadas e identificando a diluição que produz 50% de aglutinação (ALTON *et al.*, 1988).

Desde 1998, o soro “*WHO International Standard anti-Brucella abortus*” está sob custódia do “*National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC*”, que realiza sua distribuição, adotando a identificação NIBSC code 2BADS (NIBSC, 2017).

### **3.4.3 Produção de materiais de referência**

Os procedimentos metrologicamente válidos para produção e certificação de materiais de referência são definidos em um conjunto de normas usualmente denominado ISO série 30.

A norma ISO Guia 30 contém os termos e definições relacionados a materiais de referência (ABNT, 2016). A norma ISO 17034 traz os requisitos gerais para que o produtor de materiais de referência demonstre sua competência (ABNT, 2017). A norma ISO Guide 35 fornece orientações técnicas específicas para avaliação da homogeneidade, avaliação da estabilidade e caracterização, para certificação dos materiais de referência (ISO, 2017). Por fim, a norma ISO Guia 31 descreve o

conteúdo dos certificados dos MRCs e dos documentos que acompanham outros MRs (ABNT, 2017).

### 3.4.3.1 Avaliação da homogeneidade

Homogeneidade, segundo a ISO Guia 30, é a uniformidade de um valor de propriedade especificado por meio de uma porção definida de um MR (ABNT, 2016). Normalmente a homogeneidade é avaliada por meio de estudos experimentais, empregando o material produzido em sua embalagem final.

A quantidade de unidades amostradas para avaliação da homogeneidade deve ser representativa do número total produzido ( $N_{prod}$ ). A recomendação da norma ISO Guide 35 é adotar pelo menos o número mínimo ( $N_{min}$ ) descrito pela equação 1.

$$N_{min} = \max(10, \sqrt[3]{N_{prod}}) \quad (1)$$

onde  $\max(\dots)$  indica o máximo dos termos entre parênteses.

Fonte: ISO, 2017.

As unidades devem ser escolhidas aleatoriamente, por meio de seleção aleatória simples, seleção aleatória estratificada ou seleção sistemática a partir de um ponto inicial aleatório (ABNT, 2016).

Idealmente, o método de medição escolhido para avaliar a homogeneidade deve apresentar boa precisão, com um desvio padrão da repetibilidade inferior a um terço da incerteza desejável para o valor de propriedade. Em termos práticos, nem sempre é possível empregar um método que atenda este critério.

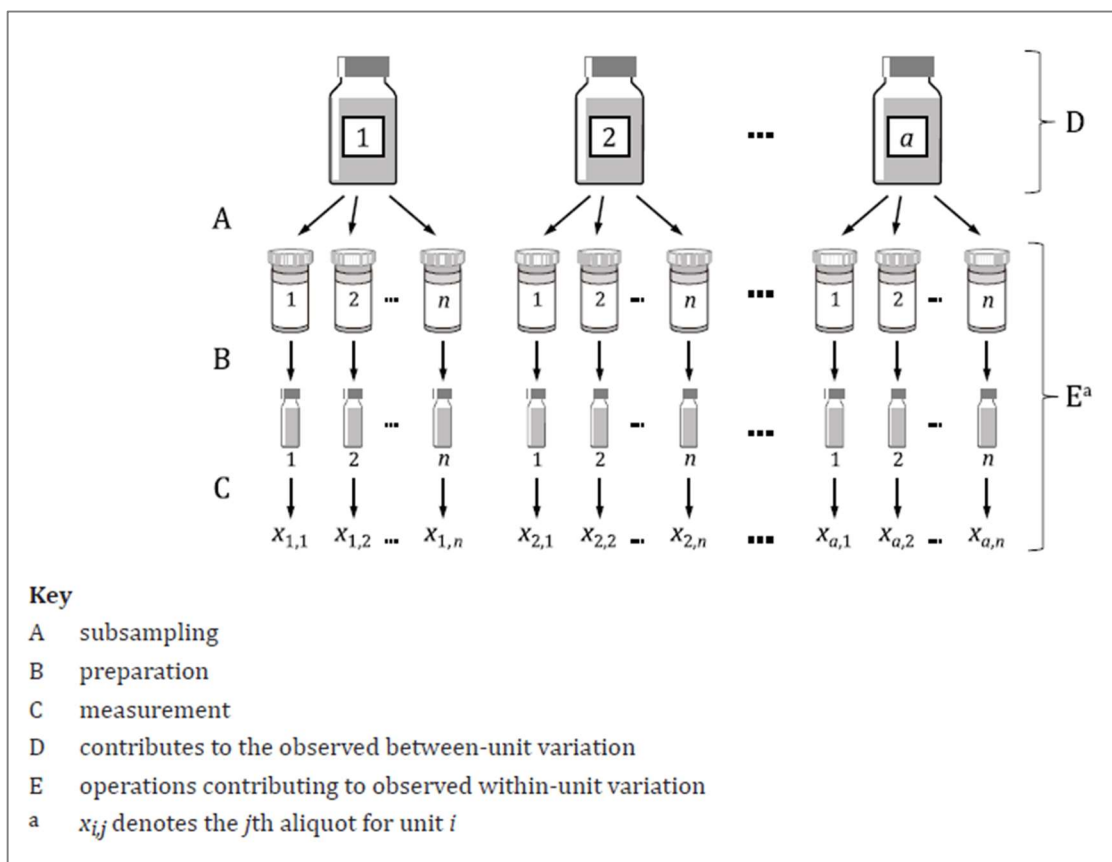
Existem dois tipos de estudo experimental que são empregados para avaliação da homogeneidade. O primeiro é o estudo experimental da homogeneidade entre unidades, que avalia a variação entre as unidades que compõem um mesmo lote ou batelada. Este estudo constitui uma etapa fundamental na certificação de materiais de referência e é importante para assegurar que todas as unidades carregam o mesmo valor de propriedade (ISO, 2017). O segundo é o estudo experimental da homogeneidade dentro da unidade, que avalia a variação entre alíquotas ou sub amostras retiradas de uma unidade. Sua realização é recomendada quando é

permitido ao usuário do MR o uso repetido de uma unidade, especialmente quando serão retiradas alíquotas substancialmente menores do que o conteúdo total de uma unidade (ABNT, 2017; ISO, 2017). O elemento comum dos dois tipos de estudo de homogeneidade é que eles permitem estabelecer a separação entre o efeito da heterogeneidade e a variabilidade da medição (LINSINGER *et al*, 2001).

O delineamento mais simples para o estudo de homogeneidade entre unidades está apresentado na figura 7 e consiste em:

- selecionar aleatoriamente um número mínimo de 10 unidades;
- analisar as unidades selecionadas como repetições independentes (repetições reais);
- empregar um delineamento balanceado, no qual o número de repetições é igual para todas as unidades;
- conduzir todas as medições em condições de repetibilidade, ou seja, numa corrida única.

Figura 7 - Delineamento do estudo de homogeneidade entre unidades



Fonte: ISO, 2017.

Nesta situação, a análise de variância (ANOVA) fator único poderá ser utilizada e o desvio padrão entre unidades, denominado pela ISO Guide 35 como *between-unit* ( $s_{bb}$ ), é calculado pela equação 2:

$$s_{bb}^2 = \max\left(\frac{M_{between} - M_{with}}{n_0}, 0\right) \quad (2)$$

sendo:

$s_{bb}$  a componente da variância entre unidades (*between unit*) do estudo de homogeneidade, expressa como desvio padrão;

$\max(\dots)$  indica o máximo dos termos entre parênteses;

$M_{between}$  o quadrado médio da fonte de variação “entre unidades” do quadro ANOVA;

$M_{within}$  o quadrado médio do resíduo do quadro ANOVA;

$n_0$  indica o número de repetições por unidade.

Fonte: ISO, 2017.

Neste caso mais simples, a variância entre unidades  $s_{bb}^2$  será igual ao quadrado da contribuição da incerteza associada à variabilidade entre unidades  $u_{bb}^2$ .

Quando o método de medição empregado no estudo experimental da homogeneidade possui uma repetibilidade limitada, ou seja, quando o valor de  $s_{bb}$  é menor que o desvio padrão da repetibilidade, é recomendado empregar uma abordagem mais conservadora, na qual calcula-se  $u'_{bb}$  pela equação 3:

$$u'_{bb} = \sqrt{\frac{M_{with}}{n_0}} + \sqrt[4]{\frac{2}{v_{M_{with}}}} \quad (3)$$

onde:

$v_{M_{within}}$  corresponde aos graus de liberdade da fonte de variação residual.

Fonte: LINSINGER *et al*, 2001.

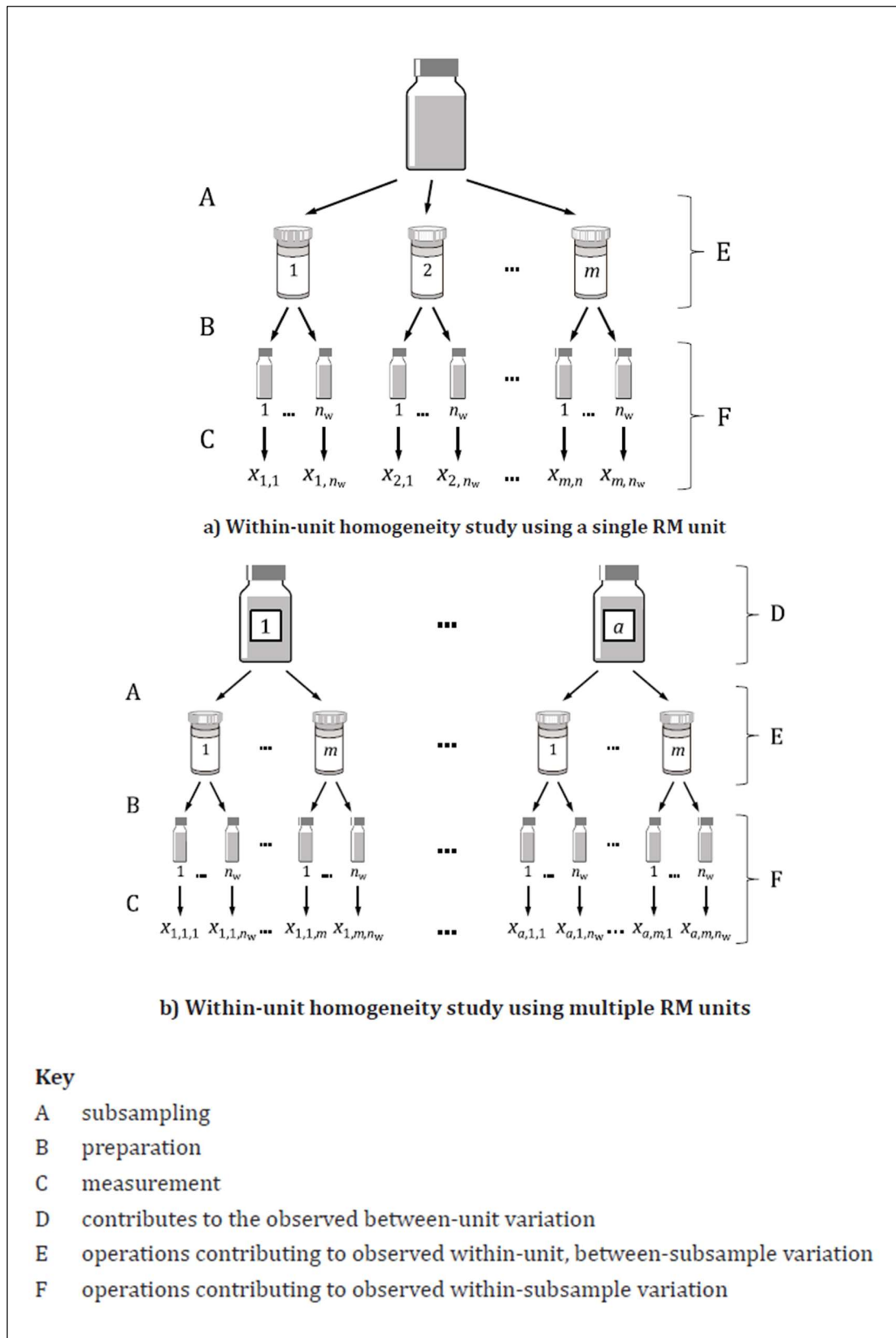
O desvio padrão da repetibilidade  $s_r$  é dado pela equação 4:

$$s_r = \sqrt{M_{within}} \quad (4)$$

Fonte: ISO, 2017.

O estudo experimental da homogeneidade dentro da unidade segue um procedimento similar, com a diferença que a fonte de variação de interesse é a dispersão entre alíquotas ou sub amostras da unidade, que será comparada com a precisão do procedimento de medição. A norma ISO Guide 35 estabelece que o delineamento adotado deverá resultar em pelo menos 5 graus de liberdade no termo “entre alíquotas”, o que pode ser alcançado retirando-se pelo menos seis alíquotas de uma única unidade do MR ou ainda, retirando-se três alíquotas de três ou mais unidades do MR, conforme figura 8. No primeiro caso é possível empregar a ANOVA fator único, enquanto no segundo, a ANOVA aninhada seria mais apropriada (ISO, 2017).

Figura 8 - Delineamento do estudo de homogeneidade dentro da unidade



A incerteza padrão associada com a heterogeneidade  $u_{hom}$  é calculada pela equação 5:

$$u_{hom} = \sqrt{u_{bb}^2 + u_{wb}^2} \quad (5)$$

onde:

$u_{bb}$  indica a incerteza padrão associada à variabilidade entre unidades;

$u_{wb}$  indica a incerteza padrão associada à heterogeneidade dentro da unidade (*within unit*).

Fonte: ISO, 2017.

Após determinar a incerteza relacionada à variação entre unidades e à variação dentro da unidade, o produtor de MR deve verificar se a incerteza é desprezível ou suficientemente pequena para o uso pretendido. Os critérios para avaliar a homogeneidade suficiente incluem (ISO, 2017):

- a) comparar o desvio padrão entre unidades e ou o desvio padrão dentro da unidade com a incerteza da caracterização;
- b) calcular a incerteza combinada do valor certificado do MRC e verificar se ela é aceitável para o uso pretendido;
- c) verificar se o desvio padrão entre unidades é pequeno quando comparado ao desvio padrão da reprodutibilidade observado em interlaboratoriais da mesma natureza;
- d) empregar o teste F para confirmar se a variação observada não é estatisticamente significativa com 95% de confiança.

### 3.4.3.2 Avaliação da estabilidade

Estabilidade, segundo a definição da ISO Guia 30, é a característica de um material de referência, quando armazenado sob condições especificadas, de manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um período de tempo especificado (ABNT, 2016).

A avaliação da estabilidade também é realizada por meio de estudos experimentais que têm o intuito de identificar possíveis mudanças nos valores de propriedade durante o armazenamento do material em condições ideais de conservação ou durante o transporte. Quando o uso repetido de uma unidade do MR é permitido, deve-se também considerar os potenciais efeitos desta subamostragem na avaliação da estabilidade.

Os estudos de estabilidade podem ser classificados como clássicos ou isócronos, em relação às condições em que são feitas as medições. Em um estudo clássico as medições ocorrem ao decorrer do estudo, em condições de precisão intermediária, enquanto em um estudo isócrono as medições são feitas em um mesmo momento, em condições de repetibilidade (ISO, 2017).

Em relação a duração e as condições aplicadas, os estudos de estabilidade podem ser classificados em: estudos de estabilidade em tempo real e estudos de estabilidade acelerada. No último o material é submetido a condições extremas com o intuito de acelerar a ocorrência de efeitos de degradação.

Por fim, os estudos de estabilidade podem ser classificados em relação ao objetivo do estudo: estudo de estabilidade ao transporte (também denominado estudo de curta duração) e estudo de estabilidade de longa duração.

Do mesmo modo que no estudo de homogeneidade, a estabilidade deve ser realizada no material em sua embalagem final e as unidades devem ser selecionadas aleatoriamente. A norma ISO Guide 35 recomenda a seleção de no mínimo duas unidades para cada combinação de tempo/temperatura/outro.

O tratamento estatístico que será empregado dependerá do delineamento do estudo. Em um delineamento simples no qual o valor de propriedade é acompanhado ao longo do tempo em uma condição única de conservação emprega-se usualmente a regressão linear ou a análise de variância para testar a significância das diferenças ao longo do tempo. Para verificar a linearidade é necessário um mínimo de três

momentos de observação em estudos isócronos e um mínimo de quatro momentos de observação em estudos não isócronos (ISO, 2017).

A estabilidade/instabilidade do material pode ser avaliada pela significância da inclinação da curva obtida da resposta em função do tempo, empregando um teste de hipótese, como o teste t de Student.

Ainda que a inclinação seja significativamente diferente de zero é possível avaliar se a tendência observada é tecnicamente relevante e se a degradação ao longo do período de validade do material é importante quando comparada à incerteza do valor de propriedade.

### **3.4.3.3 Caracterização**

A caracterização de um material de referência é a etapa na qual são atribuídos os valores de propriedade (ABNT, 2016).

Uma propriedade certificada de um MRC deve ser uma boa estimativa do valor verdadeiro e deve possuir rastreabilidade metrológica a uma referência estabelecida (ISO, 2017).

A caracterização pode ser realizada em um ou mais laboratórios, empregando um ou mais métodos. As abordagens preconizadas pela ISO 17034 e ISO Guide 35 para caracterização são:

- a) utilização de um único procedimento de medição de referência em um único laboratório;
- b) caracterização de um mensurando não definido operacionalmente utilizando dois ou mais métodos com acurácia demonstrada, em um ou mais laboratórios competentes;
- c) caracterização de um mensurando definido operacionalmente usando uma rede de laboratórios competentes;
- d) transferência de valor de um MR para um candidato a MR estreitamente similar usando um único procedimento de medição realizado por um laboratório;
- e) caracterização baseada em massa ou volume de ingredientes utilizados no preparo do MR.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Material para coleta de sangue e obtenção do soro**

Adaptador de agulhas

Agulhas

Caixas para transporte

Cateter

Gelo reciclável

Tubos estéreis para coleta de sangue de 10 mL com ativador de coágulo

Tubos cônicos de centrífuga de 50 mL

Vidrarias (balão volumétrico, erlenmeyer, pipeta, proveta etc.)

#### **4.1.2 Material para o teste sorológico AAT**

Caixa com luz indireta para leitura

Misturadores

Placas de vidro quadriculadas

Ponteiras descartáveis para micropipetas

#### **4.1.3 Material para o teste sorológico SAL/2-ME**

Caixa com luz indireta para leitura

Estantes para tubos

Ponteiras descartáveis para micropipetas

Tubos de ensaio 13 mm x 75 mm

Tubos cônicos de centrífuga de 50 mL

#### **4.1.4 Material para o teste sorológico FC**

Cuba para banho de gelo

Cubetas para reagentes

Espelho para leitura das microplacas

Estantes para tubos

Microplacas

Ponteiras descartáveis para micropipetas

Tubos cônicos de centrífuga de 15 mL e de 50 mL

Tubos de ensaio

Vidrarias (balão volumétrico, erlenmeyer, pipeta, proveta etc.)

#### **4.1.5 Material para o teste sorológico FPA**

Ponteiras descartáveis para micropipetas

Tubos de borosilicato 10 mm x 75 mm

Vidrarias (balão volumétrico, erlenmeyer, pipeta, proveta etc.)

#### **4.1.6 Material para o diagnóstico bacteriológico**

Alças bacteriológicas estéreis descartáveis

Bandejas de aço inox

Pinças, tesouras e bisturis estéreis

Placas de petri com aproximadamente 9,5 mm de diâmetro

#### **4.1.7 Material para produção do soro candidato a MR**

Etiquetas para tubos criogênicos

Caixas para tubos criogênicos

Tubos criogênicos (criotubos) de 1,8 mL

## **4.2 Equipamentos**

### **4.2.1 Equipamentos para coleta de sangue e obtenção do soro**

Centrífuga para tubos tipo Falcon

Refrigerador

### **4.2.2 Equipamentos para o teste sorológico AAT**

Cronômetro

Micropipetas

### **4.2.3 Equipamentos para o teste sorológico SAL/2-ME**

Capela de exaustão química

Estufa

Micropipetas

### **4.2.4 Equipamentos para o teste sorológico FC**

Agitador de microplacas

Banho-maria

Centrífuga

Cronômetro

Espectrofotômetro digital (alcance 540 nm)

Estufa

Micropipetadores

### **4.2.5 Equipamentos para o teste sorológico FPA**

Agitador de tubos

Equipamento para leitura de polarização fluorescente (Sentry 200)

Micropipetadores

#### **4.2.6 Equipamentos para o diagnóstico bacteriológico**

Cabine de segurança biológica Classe A Tipo II

Estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub>

Homogeneizador de amostras tipo Stomacher

#### **4.2.7 Equipamentos para a produção do candidato a MR**

Bomba peristáltica

Chapa agitadora com magneto

Estufa

Refrigerador

Ultrafreezer

#### **4.3 Reagentes, soluções e padrões**

2-Mercaptoetanol (pureza  $\geq 99,0\%$ )

Ágar triptose com 5% de soro

Ágar triptose com 5% de soro e suplemento seletivo Farrel

Antígeno acidificado tamponado

Antígeno para soroaglutinação lenta

Complemento

Gelatina 10%

Hemolisina

KCN 500 mg/dL

Kit para teste de polarização fluorescente

Salina 0,85%

Salina 0,85%, peptonada 1%

Salina fenicada 0,5%

Solução ACD

Solução de hemoglobina  
Soro controle positivo  
Soro controle negativo  
Suspensão de eritrócitos de carneiro  
Tampão veronal (VBS)

#### **4.4 Métodos**

##### **4.4.1 Estudo exploratório inicial**

Como não havia sido realizado nenhum experimento anterior de preparo de material de referência no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Bacterianas (DDB) do LFDA-MG, optou-se por realizar uma avaliação prévia dos procedimentos necessários para o preparo e para a avaliação da homogeneidade de um candidato a MR, pela produção de um material piloto.

A produção do material piloto foi realizada a partir de uma mistura (*pool*) de soros positivos para brucelose, pertencentes ao banco de soros do DDB/LFDA-MG. As amostras de soro que compõem este banco possuem registros de sua rastreabilidade no laboratório, possuem resultados de análise e são armazenadas em condições controladas de temperatura ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ).

Adotou-se como critério para seleção das amostras: baixo grau de hemólise e resultados positivos e concordantes em dois testes sorológicos.

As amostras selecionadas foram descongeladas e, quando atingiram a temperatura ambiente foram homogeneizadas manualmente em balão volumétrico. Em seguida, alíquotas de 1,5 mL do *pool* de soros foram acondicionadas em criotubos identificados e numerados, com capacidade de 1,8 mL.

Para avaliação da homogeneidade do material piloto foram amostradas, de modo aleatório, dez unidades do *pool*, que foram analisadas em duplicata, em condições de repetibilidade. As análises foram realizadas por quatro técnicas independentes: o teste qualitativo AAT, os testes semi-quantitativos SAL/2-ME e FC e o teste quantitativo FPA. Os procedimentos analíticos foram executados de acordo com os métodos de ensaio das amostras de rotina do DDB, que são validados e

acreditados na ISO 17025 e seguem a Instrução Normativa nº 34 de 08 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017).

O estudo de homogeneidade foi repetido empregando-se outras 11 unidades, com a finalidade de aprofundar a avaliação da homogeneidade para as técnicas sorológicas cujos resultados são expressos com base nas diluições utilizadas. O intuito de se repetir a avaliação da homogeneidade foi identificar possíveis variações entre as unidades em diluições próximas ao título final, ou seja, no limiar entre resultados positivos e negativos.

Inicialmente, para alcançar o título final, o material piloto foi sendo sucessivamente diluído, por meio de diluições seriadas. Posteriormente, a abordagem adotada foi preparar individualmente diluições igualmente espaçadas, o que inevitavelmente, introduziu modificações nos procedimentos de execução das provas.

Levando em consideração a necessidade de se evitar a retirada de volumes muito reduzidos, que ocasionariam imprecisão, bem como a importância de não se fazer alterações que invalidassem os resultados ou modificassem os volumes finais das provas, foram desenvolvidas planilhas de cálculo para o preparo das diluições não seriadas.

O estudo de homogeneidade aplicando os testes AAT, SAL/2-ME e FC foi realizado novamente, empregando onze unidades do material piloto, que foram analisadas em duplicata, em condições de repetibilidade e em ordem aleatória.

Para a prova AAT foram preparadas diluições do material piloto de 1:10 até 1:55, com intervalos de 5. O preparo destas diluições não seriadas foi realizado a partir de uma diluição inicial de 1:10, empregando como diluente soro negativo. Para se obter um volume suficiente de soro negativo foi preparado um *pool* com amostras negativas registradas no DDB. As diluições subsequentes foram preparadas empregando-se proporções diferentes de soro negativo e do material piloto diluído 1:10. Na execução do teste foi empregado o volume usual de 30 µL, conforme os procedimentos definidos na Instrução Normativa nº 34 de 2017 (BRASIL, 2017).

A leitura das reações observadas nos quadrículos das placas de vidro baseou-se na intensidade da aglutinação conforme procedimento de rotina, com classificação dos resultados por meio dos escores: 0, +1, +2, +3 e +4.

Para a prova SAL/2-ME foram preparadas diluições do material piloto de 1:900 a 1:1700, com intervalos de 100. Para isto, preparou-se uma diluição inicial do material

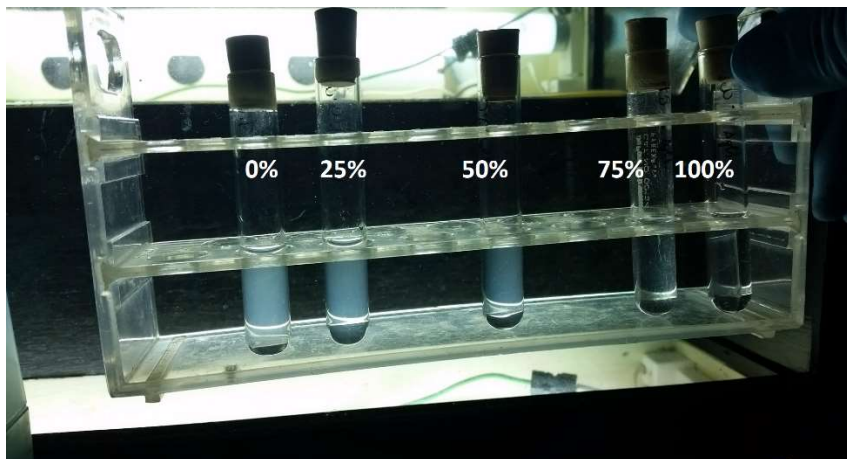
piloto de 1:100, empregando como diluente o próprio antígeno para SAL, diluído 50 vezes em salina 0,85%. As diluições subseqüentes foram preparadas a partir da diluição inicial de 1:100, empregando-se proporções diferentes de soro diluído e solução de antígeno, de modo a sempre totalizar um volume final de 1 mL. Nos tubos para a prova SAL, o volume final da prova (2 mL) foi atingido por meio da adição de 1 mL de salina 0,85% (figura 9). Nos tubos para a prova 2-ME, o volume final de 2 mL foi atingido adicionando-se 1 mL de solução de 2-Mercaptoetanol.

**Figura 9 - Modelo de planilha para cálculo dos volumes necessários para o preparo de diluições não seriadas para o teste SAL**

PREPARO DE DILUIÇÕES NÃO SERIADAS PARA AS PROVAS SAL/2-ME					
1) Preparar o Ag 1:50 (para calcular o volume, preencha a planilha abaixo). Usar como diluente salina 0,85%. Não usar salina fenicada.					
2) Preparar uma diluição inicial do soro de 1:100. Usar como diluente o Ag 1:50					
3) Preparar as demais diluições do soro (volumes calculados nas colunas D e E da planilha, após informar as diluições desejadas).					
Instruções para uso da planilha:					
a) Preencha a coluna B com as diluições finais desejadas do soro na prova SAL/2-ME					
SAL					
		Volumes para a prova:			
	Diluição final do soro em 2 mL (1 mL de soro diluído em Ag 1:50 + 1 mL salina)	Diluição final do soro em 1 mL (1 mL de soro diluído em Ag 1:50)	Volume de soro 1:100 (µL)	Volume de Ag 1:50 (µL)	Volume de salina (µL)
1	900	450	222	778	1000
2	1000	500	200	800	1000
3	1100	550	182	818	1000
4	1200	600	167	833	1000
5	1300	650	154	846	1000
6	1400	700	143	857	1000
7	1500	750	133	867	1000
8	1600	800	125	875	1000
9	1700	850	118	882	1000
10					
Volume total (µL) para SAL			1443	7557	9000

A classificação dos percentuais de aglutinação, por meio da avaliação visual, foi realizada por comparação a padrões de turbidez (figura 10), que foram preparados por meio da mistura de salina 0,85% e antígeno para SAL em diferentes proporções.

**Figura 10 - Padrões de turbidez para avaliação do percentual de aglutinação**



Da esquerda para a direita o tubo com líquido mais turvo representa 0% de aglutinação, na sequência 25%, 50% e 75% de aglutinação, até chegar ao tubo com o líquido transparente que representa 100% de aglutinação.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Para a prova FC foram preparadas diluições do material piloto de 1:350 a 1:750, com intervalos de 50. O preparo destas diluições não seriadas foi realizado a partir de uma diluição inicial de 1:100, utilizando tampão veronal (VBD) como diluente. As diluições subsequentes foram preparadas a partir da diluição inicial, empregando-se proporções diferentes de soro diluído e VBD, completando um volume final de 0,5 mL. Na execução da prova foi utilizado o volume usual de 25  $\mu$ L e foram executados os procedimentos definidos na legislação (BRASIL, 2017).

A leitura foi realizada por comparação com os padrões de cor que simulam os diferentes graus de hemólise, permitindo a classificação do percentual de fixação do complemento.

O teste FPA, única técnica quantitativa disponível, foi executado sem modificações, conforme descrito na legislação (BRASIL, 2017).

O tratamento estatístico dos dados foi realizado nos softwares Microsoft® Office Excel e Minitab.

Os resultados obtidos na forma de título, pelas técnicas AAT, SAL/2-ME e FC foram avaliados por meio da média e da variância, como calculadas para dados agrupados.

Os resultados obtidos pela técnica FPA foram inicialmente avaliados quanto à presença de dispersos analíticos (*outliers*) pelo teste C de Cochran para valores em duplicata. Em seguida, verificou-se a aderência à distribuição normal pelo teste de Anderson-Darling. Para avaliação da homogeneidade, os dados foram submetidos à

análise de variância ANOVA fator único conforme procedimentos descritos na ISO Guide 35 (ISO, 2017).

#### **4.4.2 Seleção e obtenção do material de partida para produção do candidato a MR**

Para alcançar o resultado final pretendido neste projeto que é a obtenção do soro de referência nacional, extensivamente caracterizado e com o valor de propriedade com rastreabilidade ao soro internacional, fazia-se necessário conseguir um volume de soro expressivo, que permitisse produzir um lote de pelo menos 1.000 unidades, possibilitando amplo uso nos Laboratórios de Defesa Agropecuária do Brasil.

Para isto, seria imprescindível localizar bovinos comprovadamente infectados por *B. abortus*, para retirada de sangue e obtenção do material de partida.

Considerando que seria realizada a coleta de sangue de animais, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, sob o número 332/2018.

A identificação de bovinos infectados com *Brucella* foi realizada com o apoio da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina – CIDASC, empresa pública sob a responsabilidade da Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca de Santa Catarina.

A CIDASC identificou uma propriedade no município de Saudades, onde foi constatado um foco da doença e selecionou duas fêmeas da espécie bovino (*Bos taurus*) da raça holandesa, pertencentes à propriedade.

Os bovinos selecionados possuíam identificação unívoca (brincos de identificação) e registros de todo seu histórico. Não haviam recebido as vacinas de brucelose B19 ou RB51 e apresentaram resultados classificados como “positivo” no teste de triagem (AAT) e resultados classificados como “positivo forte” no teste confirmatório (SAL/2-ME), conforme apresentado no quadro 4.

**Quadro 4 - Informações dos bovinos selecionados**

ID	Nº do brinco	Espécie	Raça	Sexo	Idade	Resultado SAL	Resultado 2-ME
01	879182	bovino	holandesa	fêmea	3 a. 2 m.	1:200	1:200
02	505831	bovino	holandesa	fêmea	10 a. 2 m.	1:200	1:200

ID: identificação do bovino no estudo; a: anos; m: meses.

Após a aprovação da CEUA, a coleta do sangue dos animais selecionados foi realizada por médicos veterinários do serviço oficial de defesa sanitária animal de SC e auditores fiscais federais agropecuários do MAPA, adotando as medidas necessárias para minimizar contaminações durante o procedimento de coleta. Todo o sangue coletado foi acondicionado em tubos estéreis de coleta de sangue de 10 mL, contendo ativador de coágulo.

Conforme preconizado pelo PNCETB, os animais foram submetidos ao abate sanitário, para saneamento do foco de brucelose. O abate ocorreu em frigorífico, acompanhado pelo serviço de inspeção oficial, cumprindo os procedimentos higiênico-sanitários estabelecidos na legislação. Peças anatômicas foram colhidas e encaminhados ao LFDA-MG para diagnóstico laboratorial.

Os tubos contendo o sangue foram encaminhados ao Laboratório Regional de Diagnóstico Animal da CIDASC em Chapecó-SC, onde foram centrifugados por tempo necessário para separação do soro do coágulo. O soro obtido foi congelado e enviado ao LFDA-MG em caixas para transporte de material biológico.

#### **4.4.3 Diagnóstico bacteriológico de *Brucella abortus***

As peças anatômicas colhidas dos bovinos abatidos foram: baço e linfonodos (parotídeos, ilíacos internos, retromamário e bronquial). Elas foram recebidas no LFDA-MG e submetidas ao diagnóstico bacteriológico no DDB (laboratório com nível 3 de biossegurança), para confirmação da presença de *B. abortus*.

Para o isolamento, os linfonodos e o baço foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 g e transferidos para sacos plásticos estéreis contendo 20 mL de salina peptonada (figura 12), sendo, em seguida, macerados em Stomacher por 3 (três) minutos.

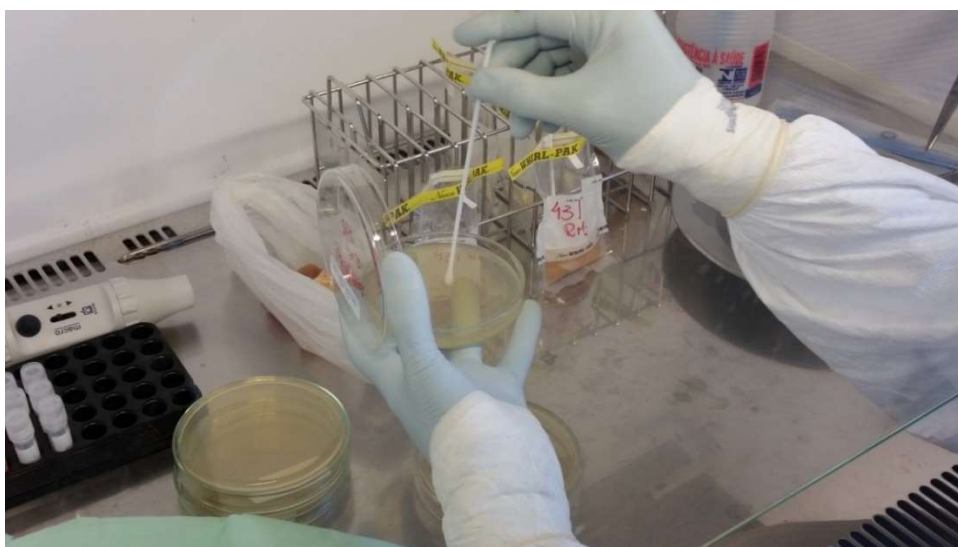
**Figura 11 - Processamento das peças anatômicas para diagnóstico bacteriológico**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Cada macerado obtido foi inoculado em uma placa contendo ágar triptose com 5% de soro e em uma placa contendo ágar triptose com 5% de soro e suplemento de Farrel (figura 13).

**Figura 12 - Inoculação em placas com meio de cultura**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

A incubação foi realizada em estufa com atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C ± 2°C.

As placas foram observadas após 24 horas, 72 a 96 horas, 7 dias e 14 dias de incubação. Quando foi observado o crescimento de colônias típicas de *Brucella*, as mesmas foram recolhidas e encaminhadas para identificação pela técnica PCR-AMOS modificada (ORZIL *et al.*, 2016).

#### **4.4.4 Preparação do candidato a material de referência**

Todo o volume de soro obtido foi descongelado até atingir a temperatura ambiente e, em seguida, homogeneizado em Erlenmeyer de 3 L, por 30 minutos em chapa agitadora com magneto. Em seguida, iniciou-se o envase, que foi realizado sob agitação, empregando bomba peristáltica (figura 14). Foram distribuídas alíquotas de 1,5 mL do material produzido em criotubos identificados e numerados, com capacidade de 1,8 mL.

**Figura 13 - Envase do candidato a MR**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Todas as unidades produzidas foram acondicionadas em caixas para tubos criogênicos e armazenadas em ultrafreezer em temperatura inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.5 Avaliação da homogeneidade

A homogeneidade do candidato à MR foi avaliada no material em sua embalagem final (criotubo de 1,8 mL). Foram selecionadas aleatoriamente 13 (treze) unidades do material, que é um número representativo do lote, uma vez que é superior ao número mínimo recomendado pela ISO Guide 35 (raiz cúbica do número de unidades produzidas).

As unidades amostradas foram analisadas pelos testes: AAT, SAL/2-ME, FC e FPA em condições de repetibilidade e em ordem aleatória.

Para definição das faixas de diluições empregadas nos três primeiros testes, foram realizados ensaios preliminares do título final, empregando uma unidade. As etapas subsequentes de preparo das diluições individuais não seriadas e análise do material seguiram os mesmos procedimentos descritos no estudo exploratório.

Para a prova AAT foram preparadas diluições do candidato a MR de 1:10 até 1:50, com intervalos de 5. Foi empregado como diluente o mesmo *pool* de soros negativos do estudo exploratório.

Para a prova SAL/2-ME foram preparadas diluições do candidato a MR de 1:700 a 1:1400, com intervalos de 100. Os padrões de turbidez foram utilizados na classificação dos percentuais de aglutinação.

Para a prova FC foram preparadas diluições do candidato à MR de 1:100 a 1:550, com intervalos de 50. A leitura foi realizada por comparação com os padrões de cor.

O teste FPA foi empregado para avaliar a homogeneidade entre unidades, e ainda, para avaliar a homogeneidade dentro da unidade, que não havia sido contemplada no estudo exploratório. Este teste foi executado sem modificações em relação ao procedimento convencional, empregando as 13 unidades amostradas. A única diferença é que no delineamento experimental foram incluídas releituras de cada medição, uma vez que no estudo exploratório já havia sido observado uma variação inesperada que parecia estar associada à própria técnica analítica.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado no software Microsoft® Office Excel.

Os resultados obtidos pelas técnicas AAT, SAL/2-ME e FC foram avaliados por meio da média e da variância, como calculadas para dados agrupados.

Os resultados obtidos pela técnica FPA foram avaliados quanto à presença de *outliers* pelo teste C de Cochran, para valores dispersos em duplicatas, e, quanto à aderência à distribuição normal, pelo teste de Anderson-Darling. Para avaliação da homogeneidade entre unidades e dentro da unidade, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA completamente aninhada, considerando as fontes de variação em ordem hierárquica.

#### **4.4.6 Avaliação da estabilidade**

A avaliação da estabilidade foi dividida em duas etapas descritas nos itens 4.4.6.1. e 4.4.6.2.

As unidades amostradas para avaliação da estabilidade foram analisadas pelo teste FPA, seguindo o método de rotina do DDB/LFDA (LANAGRO, 2019). O tratamento estatístico dos dados foi realizado em software Microsoft® Office Excel. Os dados foram inicialmente avaliados quanto à presença de *outliers* pelo método de Tukey (1977), representado graficamente como Boxplot ou gráfico de Box-Whiskers e em relação à aderência à distribuição normal, pelo teste de Anderson-Darling.

A avaliação da estabilidade das unidades foi realizada por regressão linear conforme os procedimentos estatísticos descritos na norma ISO Guide 35 (ISO, 2017). Os resíduos jackknife da análise de regressão foram verificados segundo Souza & Junqueira (2005).

##### **4.4.6.1 Estudo de estabilidade em prazo curto**

Foi realizado um estudo de estabilidade em prazo curto no qual o material foi submetido a condições distintas de sua temperatura ideal de conservação, para avaliar seu comportamento em condições extremas de temperatura e antecipar uma possível degradação durante o transporte do material, por exemplo. As condições estabelecidas para o estudo em prazo curto estão descritas no quadro 5.

**Quadro 5 - Condições do estudo de estabilidade em prazo curto**

Local de armazenamento	Temperatura	Frequência de avaliação	Duração do estudo
Refrigerador	5°C ± 3°C	De 3 em 3 dias	12 dias
Estufa	25°C ± 2°C	De 3 em 3 dias	12 dias
Estufa	37°C ± 2°C	Diariamente	3 dias
		De 3 em 3 dias	9 dias

O estudo de estabilidade em prazo curto teve a duração total de 12 (doze) dias. A frequência de avaliação estabelecida foi de 3 em 3 dias, com exceção das unidades armazenadas na estufa a 37°C, que foram monitoradas diariamente nos 3 primeiros dias.

Para cada condição estabelecida no estudo foram utilizadas 3 (três) unidades. Foi adotado o modelo isócrono, em que as análises ocorreram em condições de repetibilidade. Neste modelo, as unidades retiradas da condição extrema retornavam à temperatura de referência ( $\leq -70^\circ \text{C}$ ) até o término do estudo, quando as análises foram realizadas simultaneamente, em ordem aleatória. Nesta ocasião foi analisada também uma unidade que havia sido mantida na temperatura de referência durante todo o estudo, para servir como controle. No total foram analisadas 43 unidades do material produzido.

#### **4.4.6.2 Estudo de subamostragem**

O estudo de subamostragem foi realizado com o intuito de se avaliar a influência dos ciclos de descongelamento e recongelamento, que ocorrem para obtenção de alíquotas do material ao longo de sua vida útil.

Foram selecionadas aleatoriamente 12 (doze) unidades do material produzido e estas foram divididas em quatro grupos. No primeiro grupo, as unidades inicialmente mantidas na temperatura  $\leq -70^\circ \text{C}$  foram descongeladas até a temperatura ambiente, em seguida, os frascos foram abertos, retiradas as alíquotas e novamente congelados a  $\leq -70^\circ \text{C}$ . No segundo grupo, as unidades selecionadas foram submetidas a este ciclo por duas vezes. No terceiro grupo por três vezes e no quarto grupo por quatro vezes.

Foi adotado o modelo isócrono, no qual as análises ocorreram ao final, em condições de repetibilidade e em ordem aleatória.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo exploratório

O estudo exploratório, no qual foi preparado um lote de material em pequena escala, a partir de um *pool* de soros, foi realizado para verificar a viabilidade de execução do projeto de produção de um candidato à MR, para diagnóstico de *B. abortus*.

As amostras selecionadas para preparação do material piloto (*pool* de soros) estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2 - Rastreabilidade das amostras do *pool***

N°	Identificação das amostras	Resultado AAT	Resultado SAL	Resultado 2-ME
1	CSLB000027	+2	200	200
2	CSLB000028	+2	200	200
3	CSLB000030	+2	200	200
4	CSLB000033	+2	200	200
5	CSLB000251	+1	200 (I)	200 (I)
6	CSLB000320	+3	200	200

Os resultados do teste AAT são expressos em escores, sendo 0 = não reagente; +1 = reação muito fraca; +2 = fracamente positiva; +3 = positiva; +4 = fortemente positiva.

Os resultados do teste SAL/2-ME são expressos na forma de título, sendo que o título corresponde a maior diluição na qual ocorreu reação positiva. (I) indica reação incompleta.

Os resultados obtidos na avaliação da homogeneidade do *pool* empregando os testes AAT, SAL/2-ME e FC, conforme procedimentos analíticos de rotina estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3 - Resultados dos testes AAT, SAL/2-ME e FC obtidos nos frascos amostrados para o estudo de homogeneidade do material piloto**

Frasco	AAT		SAL		2-ME		FC	
	Resultado das repetições		Resultado das repetições		Resultado das repetições		Resultado das repetições	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	+3	+3	200	200	200	200	128	128
2	+3	+3	200	200	200	200	128	128
3	+3	+3	200	200	200	200	128	128
4	+3	+3	200	200	200	200	128	128
5	+3	+3	200	200	200	200	128	128
6	+3	+3	200	200	200	200	128	128
7	+3	+3	200	200	200	200	128	128
8	+3	+3	200	200	200	200	128	128
9	+3	+3	200	200	200	200	128	128
10	+3	+3	200	200	200	200	128	128

Os frascos correspondem às dez unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade.

Os resultados do teste AAT são expressos em escores, sendo 0 = não reagente; +1 = reação muito fraca; +2 = fracamente positiva; +3 = positiva; +4 = fortemente positiva.

Nas técnicas SAL/2-ME e FC os resultados são expressos na forma de título, sendo que o título corresponde a maior diluição onde ocorreu reação positiva.

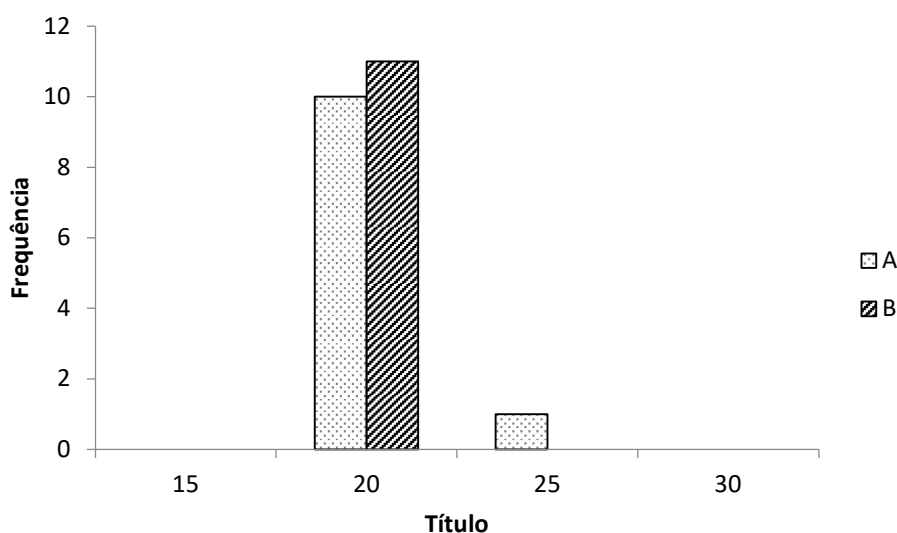
Tanto na técnica sorológica qualitativa AAT, quanto nas técnicas semi-quantitativas SAL/2-ME e FC, observou-se um elevado grau de homogeneidade do material piloto, com uniformidade das respostas e ausência de variação entre as unidades. Tal resultado indicou uma adequação do material piloto para uso como controle positivo de prova, nas faixas de trabalho destes métodos. Todavia, como se tratava de um material positivo forte, este resultado não foi considerado suficiente para demonstrar sua homogeneidade, pois não permitia estimar uma possível variabilidade em diluições próximas ao título final, ou seja, no limiar entre resultados positivos e negativos.

Na reavaliação do material piloto após diluições sucessivas e seriadas, foram obtidas apenas estimativas grosseiras do título final (resultados não apresentados), uma vez que o intervalo entre diluições seriadas aumenta geometricamente.

A avaliação da homogeneidade com o rigor pretendido só foi possível após a repetição do estudo experimental, preparando individualmente diluições não seriadas e igualmente espaçadas.

As leituras obtidas para todas as diluições não seriadas preparadas a partir de cada uma das unidades amostradas estão apresentadas nos Apêndices A, B, C e D. Os gráficos 1 a 3 apresentam a síntese dos resultados para as provas AAT, SAL e 2-ME.

**Gráfico 1 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por AAT**

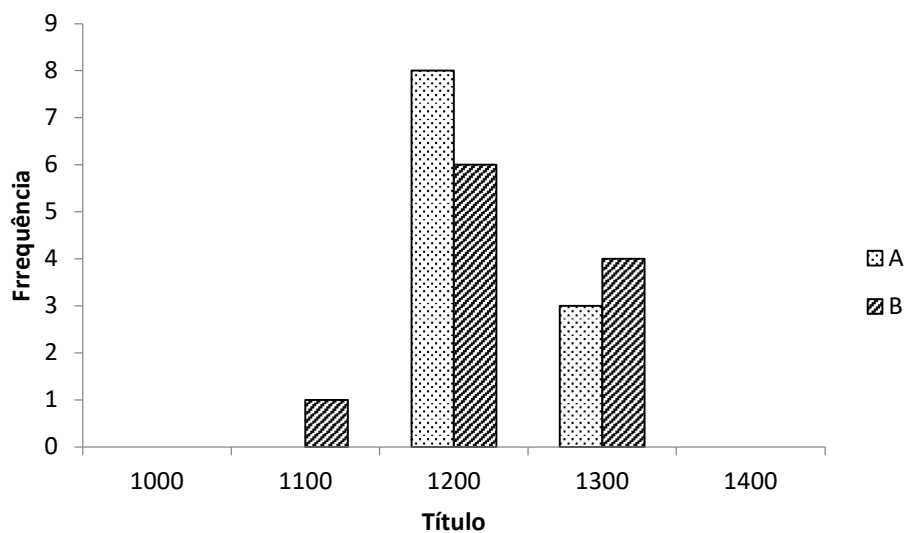


A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados das onze unidades amostradas, sendo que A e B representam réplicas de uma mesma unidade.

Para a técnica AAT, adotou-se como título final, o inverso da maior diluição onde foi obtida uma resposta positiva que corresponde a 50% (escore = +2). Este percentual de aglutinação foi adotado por ser o critério estabelecido para padronização do Soro Padrão Internacional anti-*Brucella abortus* (ALTON *et al.*, 1988).

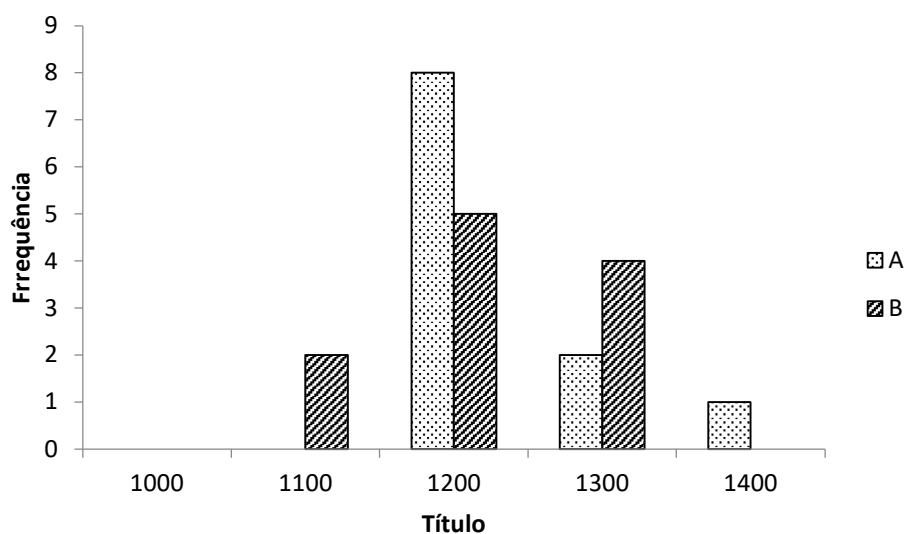
Empregando o conceito de média ponderada, o título médio obtido para o material piloto por AAT foi 20,2. A variância calculada como para dados agrupados foi de 1,1. O coeficiente de variação foi de 5,3%.

**Gráfico 2 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por SAL**



A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados das onze unidades amostradas, sendo que A e B representam réplicas de uma mesma unidade.

**Gráfico 3 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por 2-ME**



A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados das onze unidades amostradas, sendo que A e B representam réplicas de uma mesma unidade.

Segundo os critérios do PNCEBT, o título final de um soro no teste SAL/2-ME é a maior diluição na qual se obteve resultado positivo com, pelo menos, 25% de aglutinação, todavia, para avaliação dos resultados do estudo de homogeneidade e demais etapas subsequentes foi adotado 50% de aglutinação como ponto de corte. Do ponto de vista teórico, esta decisão foi fundamentada nas informações da literatura (OIE, 2018) e no fato de 50% de aglutinação também ter sido o critério adotado para padronização do Soro Padrão Internacional. Do ponto de vista prático, observou-se que quando se trabalha com um soro diluído, a aglutinação em percentuais inferiores a 50% é de difícil visualização, mesmo utilizando os padrões de turbidez, não fornecendo segurança ao analista para classificá-la corretamente.

Empregando-se os mesmos conceitos de média ponderada e variância para dados agrupados, calculou-se um título médio de  $1.227,3 \pm 55,0$  para SAL e um título médio de  $1.227,3 \pm 70,3$  para 2-ME. Os valores do coeficiente de variação foram 4,5% e 5,7% para SAL e 2-ME, respectivamente.

Para a técnica FC, o PNCEBT considera o título como sendo a maior diluição onde ocorreu pelo menos 25% de fixação do complemento. Para os propósitos deste trabalho, adotou-se o mesmo critério da padronização do soro internacional, com ponto de corte fixado em 50% de fixação do complemento (ALTON *et al.*, 1988).

Na técnica FC, todas as unidades analisadas do material piloto apresentaram uma resposta positiva com 50% de fixação do complemento na diluição 1:550. Como não foi observada nenhuma variação entre as unidades, o título final foi igual a 550,0  $\pm$  0.

A técnica FPA, único método quantitativo disponível para avaliar a homogeneidade, foi executada sem adaptações, por realizar a leitura direta do soro, sem a necessidade do preparo de diluições. Os resultados obtidos para as onze unidades analisadas em duplicata, em condições de repetibilidade, estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4 - Avaliação da homogeneidade do material piloto por FPA**

Frasco	Resultado (mP)		$\Delta$ mP	
	A	B	A	B
1	256,9	265,7	180,3	189,1
2	262,6	262,6	186,0	186,0
3	273,2	263,6	196,6	187,0
4	262,7	280,1*	186,1	203,5
5	266,5	256,7	189,9	180,1
6	257,8	273,6	181,2	197,0
7	280,8*	268,1	204,2	191,5
8	262,4	268,4	185,8	191,8
9	265,8	263,6	189,2	187,0
10	266,3	265,4	189,7	188,8
11	263,7	267,0	187,1	190,4

Os frascos correspondem às 11 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. O resultado em unidades de milipolarização (mP) indica a leitura obtida no equipamento.  $\Delta$ mP é a diferença entre o resultado do frasco e a média do controle negativo, que nesta corrida foi de 76,6 mP. Os valores com asterisco são os *outliers* identificados no BoxPlot.

Aplicando o teste C de Cochran, com 95% de confiança, para valores dispersos em duplicata, verificou-se que não há outliers entre as leituras do material piloto por FPA ( $p > 0,05$ ).

A homocedasticidade dos dados não precisou ser testada porque, a rigor, o teste C de Cochran é um teste de homogeneidade de variâncias. Além disso, do ponto de vista teórico, não há razão para supor que a variância entre as unidades não se

mantenha constante, pois por imposição experimental todos os frascos derivam de uma mesma solução.

A independência dos dados foi assumida em decorrência do delineamento experimental randômico, ou seja, a aquisição dos dados ocorreu sempre em ordem aleatória.

Em relação à aderência à distribuição normal, o teste de Anderson-Darling indicou que os dados seguem a distribuição normal somente a 99,0% de confiança. Apesar de o teste C de Cochran não ter identificado a presença de dispersos analíticos, quando os dados são avaliados pelo método de Tukey (1977), representado pelo gráfico de Box-Whiskers ou Boxplot, dois resultados são apontados como *outliers*. A remoção destes valores dispersos corrige o desvio da normalidade, fazendo com que os dados sigam a distribuição normal com  $p > 0,10$ .

Como a análise de variância é uma ferramenta robusta, optou-se por aplicar a ANOVA fator único sem remover os valores dispersos identificados pelo método de Tukey (1977) (tabela 5).

**Tabela 5 - ANOVA fator único aplicada aos dados obtidos por FPA no estudo exploratório**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F calculado	F crítico
Entre unidades	10	323,733	32,373	0,69	2,85
Resíduo	11	515,935	46,903		
Total	21	839,668	39,984		

O desvio padrão entre unidades  $s_{bb}$  foi calculado pela equação descrita na norma ISO Guide 35. Como o valor do quadrado médio do resíduo do quadro ANOVA foi maior que o quadrado médio da fonte de variação entre unidades,  $s_{bb}$  pode ser considerado como sendo zero, assumindo a repetibilidade do método. Neste caso, a incerteza relacionada à heterogeneidade entre unidades poderia ser considerada desprezível. Entretanto, como o desvio padrão da repetibilidade do método ( $s_r = 6,85$  mP) parece superar outras fontes de variação, foi adotada uma abordagem mais conservadora e a incerteza foi calculada conforme descrito na ISO Guide 35, para

métodos que não possuem repetibilidade suficiente, resultado num valor de  $u'_{bb} = 3,16$  mP.

Segundo a norma ISO Guide 35 não existe um critério único estabelecido para se chegar a uma conclusão acerca da homogeneidade. O produtor de um MR pode comparar o valor de incerteza obtido no estudo experimental de homogeneidade com uma incerteza alvo, que pode ser, por exemplo, a incerteza da caracterização ou a incerteza final do valor certificado, para verificar se ela é aceitável para o uso pretendido do material. Na ausência de um valor definido de incerteza alvo, empregou-se o teste F, que também é uma das abordagens descritas na ISO Guide 35 e verificou-se que  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ . Como a aprovação por meio do teste F é um critério rigoroso, obteve-se evidência objetiva de que o material piloto é homogêneo ( $p > 0,05$ ).

Alternativamente, foi realizada a remoção dos dois outliers identificados no Boxplot, antes de aplicar a ANOVA fator único. Nesta situação, a recomendação é remover o frasco, ou seja, o par de dados, para não causar o desbalanceamento. Consequentemente, restariam nove frascos para a análise de variância, que é um número menor que o mínimo recomendado pela ISO Guide 35 para avaliação da homogeneidade. Apesar desta limitação, chegou-se à mesma conclusão: o material piloto foi considerado homogêneo no teste F com  $p > 0,05$ .

O estudo exploratório inicial demonstrou a viabilidade de produção de um candidato a MR para diagnóstico sorológico de *B. abortus*, uma vez que foi possível determinar o desvio padrão entre unidades por quatro técnicas independentes. Empregando os resultados obtidos na técnica FPA foi possível concluir que o material é suficientemente homogêneo e calcular a incerteza associada à heterogeneidade. Obviamente, a avaliação subsequente da estabilidade é imprescindível para se estabelecer a vida útil do material.

A obtenção de um soro homogêneo a partir de um *pool* de amostras indica que uma das alternativas possíveis para obter um volume suficiente de soro para produzir um material de referência, pode ser a mistura de soros de animais distintos, ainda que estes apresentem variações de título, devendo apenas ser assegurado que possuam baixo grau de hemólise e estejam armazenados em condições adequadas. Resultado semelhante foi alcançado por Mc Given *et al.* (2011) na produção do soro padrão internacional para *B. melitensis*, que foi produzido a partir de um pool de soros de sete cabras infectadas e não apresentou diferença significativa entre as unidades.

A produção de materiais de referência para controle da qualidade analítica pela mistura de soros de animais contaminados é uma alternativa mais acessível, que não requer a infecção experimental de animais e possui ainda a vantagem de representar a variabilidade de resposta imune dos mesmos.

Ressalta-se que o estudo exploratório foi imprescindível para prover a experiência técnica necessária para superar dificuldades relacionadas ao preparo das diluições sem promover alterações que poderiam invalidar as provas e à análise de um número grande de unidades em condições de repetibilidade. Possibilitou ainda, definir estratégias para realizar o tratamento estatístico de dados desta natureza e aprimorar o delineamento experimental das etapas posteriores.

## **5.2 Obtenção do material de partida para produção do candidato a MR**

Ainda que os soros armazenados no banco de soro do DDB possuam registros dos resultados sorológicos e da procedência das amostras, nem sempre estes soros dispõem de informações sobre resultados bacteriológicos associados e nem sempre é possível ter acesso às informações sobre a situação da doença no rebanho, histórico vacinal, dentre outras relevantes.

Para se alcançar o objetivo posterior de obtenção de um soro padrão nacional, com rastreabilidade ao soro internacional, considerou-se mais apropriado empregar como material de partida soros de animais comprovadamente infectados, amplamente caracterizados por um conjunto de informações que assegurassem o *status* sanitário do rebanho de origem.

A iniciativa de selecionar animais provenientes de focos de brucelose no estado de Santa Catarina (SC), com o apoio da CIDASC, fundamentou-se no fato de este estado brasileiro estar em processo avançado de erradicação da brucelose, numa fase em que a vacinação do rebanho já está proibida (SANTA CATARINA, 2012). Deste modo, seria possível assegurar que a atividade de anticorpos por meio dos testes sorológicos não poderia ser atribuída a reações vacinais.

Os dois animais selecionados para o estudo pertenciam a uma mesma propriedade no município de Saudades-SC, onde foi identificado um foco de brucelose em bovinos.

Nesta mesma propriedade também foi relatado um caso de diagnóstico de brucelose em humano. O indivíduo que manifestou a doença informou que consumia leite proveniente dos bovinos infectados. Por questões éticas, estes dados não serão apresentados no trabalho.

A coleta do sangue dos animais foi realizada em conformidade com a proposta aprovada pela CEUA. Foi coletado um volume aproximado de 4,5 L de sangue do bovino 01 (brinco 879182) e um volume aproximado de 5,0 L do bovino 02 (brinco 505831).

Após a centrifugação do sangue, o rendimento de soro foi de aproximadamente 2 L para o bovino 01 e de 3L para o bovino 02.

### **5.3 Diagnóstico bacteriológico de *Brucella abortus***

As placas inoculadas com os extratos obtidos das peças anatômicas dos animais selecionados foram observadas até o final do período de incubação (14 dias).

Em relação ao bovino 01, observou-se o crescimento de várias colônias morfológicamente típicas de *B. abortus* nas placas inoculadas com os macerados provenientes dos linfonodos retromamário e ilíaco interno. Este crescimento foi observado tanto nos meios contendo apenas ágar triptose com 5% de soro, quanto nos meios com adição de suplemento de Farrel (meio seletivo). Já para o bovino 02 não foi possível identificar a presença de colônias típicas de *B. abortus*. Em ambos os casos, as suspensões bacterianas preparadas a partir dos isolados foram encaminhadas para análise por PCR-AMOS modificado. No bovino 01 foi identificado a presença de *B. abortus* bv. 1, 2 ou 4, o que confirma de forma inequívoca a infecção no rebanho. No bovino 02 não foi identificada a presença de *B. abortus*.

A obtenção de um resultado negativo no diagnóstico bacteriológico pode ser explicada pela baixa sensibilidade desta técnica. Souza (2013) relatou uma sensibilidade de 50%, com intervalos de credibilidade a 95%, que variaram de 44% a 56%.

A sensibilidade varia especialmente em função da concentração e da viabilidade de *Brucella* na amostra, e da contaminação da amostra com outros microrganismos durante as etapas de coleta, armazenamento, transporte e

processamento. O resultado negativo na PCR-AMOS confirma que não houve isolamento de *Brucella* nas placas preparadas a partir de tecidos do bovino 02.

#### **5.4 Produção do candidato a material de referência**

Segundo a diretriz da OIE que trata de padrões internacionais de referência para ensaios de anticorpos, os padrões de referência podem ser preparados a partir de um único animal ou empregando um pool de amostras de um determinado número de animais (OIE, 2008). Como não foi possível comprovar a infecção do bovino 02 por *B. abortus*, optou-se por empregar apenas o soro do bovino 01 na produção do candidato a material de referência.

Normalmente, materiais de referência liofilizados apresentam uma maior estabilidade e, conseqüentemente, uma maior vida útil do que as preparações líquidas. Entretanto, a liofilização é um processo oneroso e que precisa ser validado para determinar o impacto desta técnica na atividade biológica e na comutatividade. Uma preparação líquida é uma alternativa aceitável para padrões secundários e possui as vantagens de não necessitar de reconstituição e de ser representativa de amostras reais (WHO, 2017). Considerando o exposto, o candidato à MR foi produzido na forma líquida. Todo o volume de soro obtido do bovino 01 foi homogeneizado por 30 minutos e envasado em criotubos sob agitação. O rendimento da produção foi de 1296 unidades contendo 1,5 mL cada, que é um volume suficiente para realização dos quatro métodos sorológicos disponíveis, em duplicata.

A obtenção de um grande volume de material candidato à MR, produzido a partir de soro naturalmente infectado, cujos resultados confirmam de forma inequívoca a identificação do microrganismo *B. abortus*, representa um importante passo se estabelecer um soro padrão para diagnóstico de brucelose.

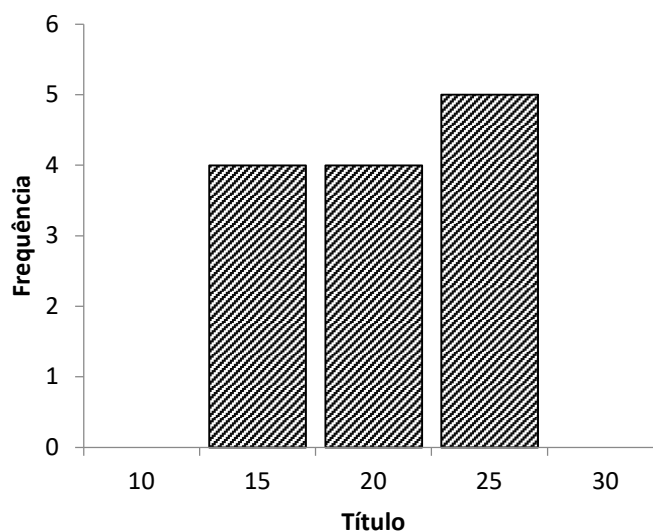
#### **5.5 Avaliação da homogeneidade**

O material candidato à MR foi avaliado quanto a sua homogeneidade, empregando as técnicas sorológicas disponíveis. Todas as leituras obtidas por AAT, SAL/2-ME e FC, para cada uma das diluições não seriadas preparadas para as treze

unidades amostradas, estão apresentadas nos Apêndices E, F, G e H. Nos gráficos 4 a 7 está representada a síntese dos resultados para estas provas.

Na prova AAT, o *pool* de soros negativos empregado no preparo das diluições foi o mesmo utilizado no estudo exploratório e foi analisado na mesma corrida, apresentando resultado não reagente.

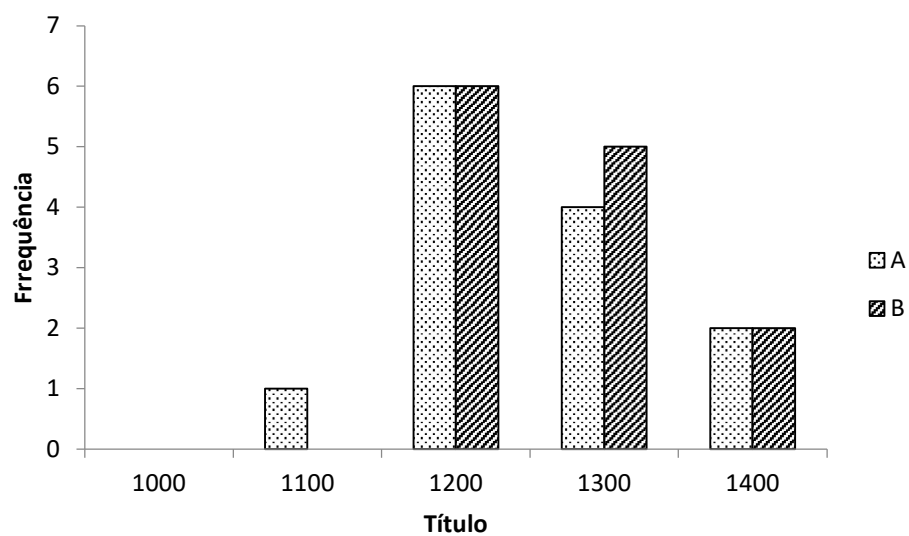
**Gráfico 4 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato à MR por AAT**



A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados dos títulos das treze unidades amostradas.

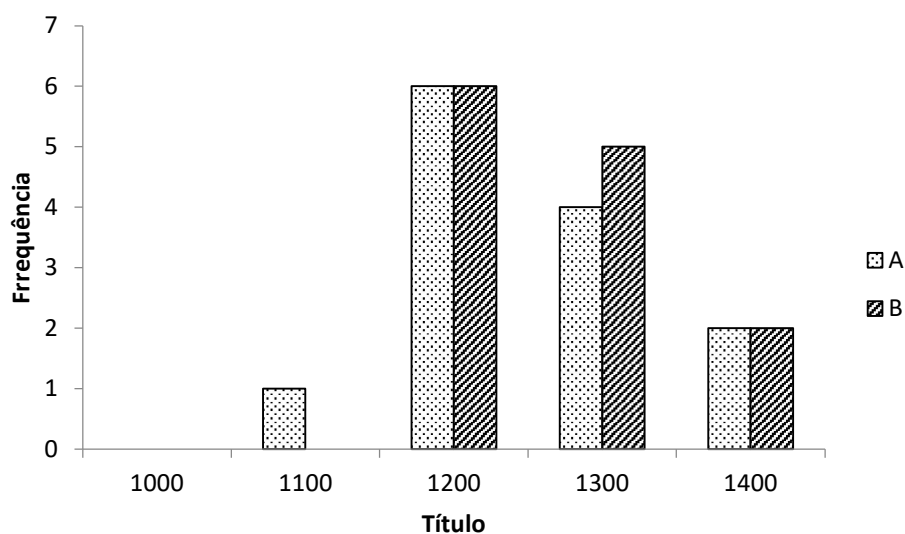
Pela técnica AAT, considerando o título final igual ao inverso da maior diluição em que foi obtida uma resposta positiva com 50% de aglutinação (escore = +2), o título médio calculado para o candidato a MR foi 20,4. A variância calculada como para dados agrupados foi de 4,3. O coeficiente de variação foi 21,2%.

**Gráfico 5 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por SAL**



A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados das treze unidades amostradas, sendo que A e B representam réplicas de uma mesma unidade.

**Gráfico 6 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por 2-ME**

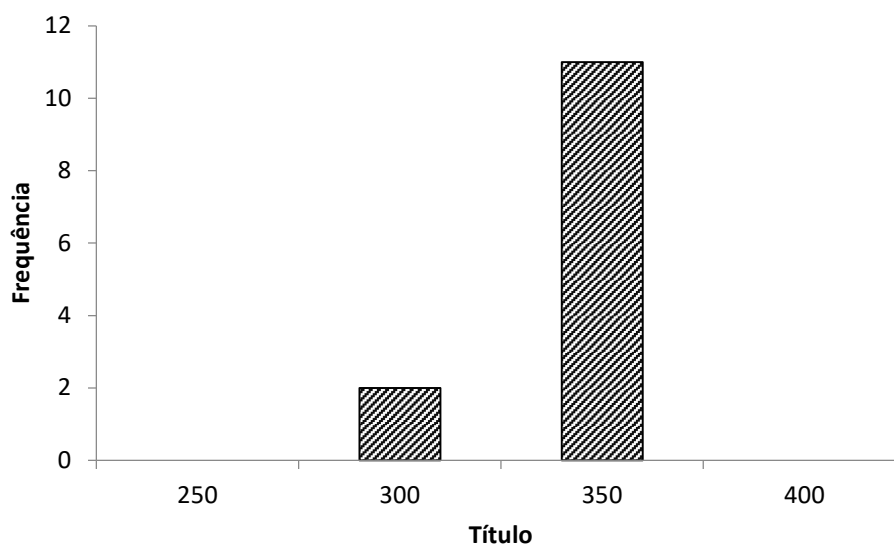


A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados das treze unidades amostradas, sendo que A e B representam réplicas de uma mesma unidade.

Na avaliação da homogeneidade do candidato à MR por SAL/2-ME, observou-se que o título final variou de 1100 a 1400, considerando-se 50% de aglutinação. Os valores calculados de título médio e variância para os testes SAL/2-ME foram  $1261,5 \pm 80,4$ .

O valor do coeficiente de variação foi 6,4%.

**Gráfico 7 - Distribuição de frequência dos títulos obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato a MR por FC**



A distribuição de frequências foi construída a partir dos resultados dos títulos das treze unidades amostradas.

Pela técnica FC, os resultados do título final variaram de 300 a 350, considerando 50% de fixação do complemento. A atividade anticomplementar do soro candidato à MR apresentou resultado negativo em todas as diluições. O valor estimado para o título médio foi  $342,3 \pm 18,8$ . O coeficiente de variação foi 5,5%.

Comparando os resultados obtidos pelas três provas sorológicas cujos resultados são expressos na forma de título, observou-se que a prova de triagem AAT apresentou a maior variação (21,2%) em relação ao título médio, enquanto a FC apresentou a menor variação (5,5%). Entretanto, não foram encontradas referências em relação ao desvio esperado nestas técnicas em condições de repetibilidade. Em termos de reprodutibilidade, aparentemente, o desvio admitido é muito superior ao encontrado neste estudo, uma vez que em ensaios de proficiência da mesma natureza, geralmente admite-se como resultados satisfatórios aqueles que estão um título acima ou um título abaixo do valor designado, empregando diluições seriadas, com intervalos que crescem geometricamente. Em termos epidemiológicos, a variabilidade admitida também parece ser semelhante, à obtida por Thrusfield (2004) que relata que deve ser considerado que houve alteração no *status* sanitário de um rebanho, quando se observa uma variação de dois títulos em relação à resposta anterior (empregando diluições seriadas geométricas). Neste contexto, acredita-se

que as variações observadas no estudo da homogeneidade, empregando diluições igualmente espaçadas, são pouco significativas, fornecendo indícios de um elevado grau de homogeneidade do candidato à MR.

Empregando a técnica FPA, que fornece resultados quantitativos, foi possível avaliar a homogeneidade de modo mais objetivo, empregando os procedimentos descritos na ISO Guide 35. Os dados obtidos na avaliação da homogeneidade do candidato à MR pela técnica FPA estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6 - Resultados da avaliação da homogeneidade entre unidades do candidato à MR por FPA**

Frasco	Resultado (mP)				$\Delta mP$			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
1	258,3	256,9	253,6	254,2	179,7	178,3	175	175,6
2	256,3	253,2	257,4	262,5	177,7	174,6	178,8	183,9
<b>3*</b>	117,2	260,2	214,2	260,7	38,6	181,6	135,6	182,1
4	258,7	258,4	260,5	257	180,1	179,8	181,9	178,4
5	258,7	258,9	260,4	260,4	180,1	180,3	181,8	181,8
6	259	260,9	261	261,9	180,4	182,3	182,4	183,3
<b>7*</b>	258	258,7	214,8	250,5	179,4	180,1	136,2	171,9
8	254,9	259,1	254,1	254,3	176,3	180,5	175,5	175,7
9	259,6	260,3	257,2	258,2	181	181,7	178,6	179,6
<b>10*</b>	261,9	52,8	251,4	256,5	183,3	0	172,8	177,9
11	254,3	257,9	252,3	257,9	175,7	179,3	173,7	179,3
12	253,2	257,9	254,7	254,5	174,6	179,3	176,1	175,9
13	258,2	267,4	253,2	259,2	179,6	188,8	174,6	180,6

Os frascos correspondem às 13 unidades amostradas. As letras A e B indicam repetições de uma mesma unidade. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> são releituras da repetição A. B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> são releituras da repetição B. O resultado expresso em unidades de milipolarização (mP) indica a leitura obtida no equipamento.  $\Delta mP$  é a diferença entre a leitura do material e a média do controle negativo, que nesta corrida foi de 78,6 mP. Os frascos marcados com asterisco são os *outliers* identificados no teste C de Cochran.

Empregando o teste C de Cochran para dispersos em duplicatas, foi detectado um *outlier* no primeiro ciclo de verificação, um *outlier* no segundo ciclo e mais outro *outlier* no terceiro ciclo. Após a remoção dos três frascos, destacados na tabela 6, que continham leituras apontadas como valores dispersos, nenhum outro *outlier* foi identificado no conjunto de dados.

O número de valores dispersos removidos correspondeu a 23,0% dos dados, excedendo a quantidade recomendada por Horwitz (1995) de um número até 22,2% ( $=2/9$ ) dos dados originais. Do ponto de vista técnico, a remoção destes dados é justificável, pelo fato de as respostas dispersas obtidas não terem sido confirmadas por meio de suas releituras. Segundo Thompson (2008), um par de resultados dispersos de uma mesma unidade é um indicativo de heterogeneidade e estes resultados não devem ser descartados antes da análise de variância. Por outro lado, uma diferença discrepante entre pares duplicados geralmente está mais relacionada à análise do que ao material.

A recomendação de Thompson (2006) é rejeitar o par de resultados que contém um disperso individual, pois o disperso analítico pode ajudar a aprovar o material no teste F.

Dentro deste contexto, a realização das releituras foi importante para a constatação de que a variação instrumental superava outras fontes de variação, inclusive a variação entre unidades, fornecendo mais segurança em relação à decisão de remoção dos *outliers*.

Após a remoção dos valores dispersos, foi evidenciado pelo teste de Anderson-Darling, que a distribuição dos dados segue a normal ( $p > 0,10$ ).

A homocedasticidade dos dados foi testada pelo próprio teste C de Cochran, que avalia a homogeneidade de variâncias.

A independência dos dados foi assumida em decorrência do delineamento experimental randômico.

Com a aplicação da ANOVA aninhada, com as fontes de variação ordenadas hierarquicamente (tabela 7), calculou-se a variabilidade entre unidades e dentro da unidade do candidato a MR. Pelas razões anteriormente descritas, foram excluídos da análise de variância todos os frascos nos quais foram detectados resultados dispersos. Deste modo, foram mantidas 10 unidades das 13 amostradas.

**Tabela 7 - ANOVA aninhada aplicada para avaliação da homogeneidade do candidato à MR por FPA**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F <sub>calculado</sub>	F <sub>crítico</sub>	p
Unidade (Fonte A)	9	150,566	16,730	1,61	3,02	0,23
Alíquota (Fonte B)	10	103,945	10,395	1,59	2,35	0,18
Resíduo	20	130,500	6,525			
Total	39	385,011	9,872			

A média das leituras do candidato à MR foi igual a 258,6 mP, que equivale a 180  $\Delta$ mP. O desvio padrão entre unidades  $s_{bb}$  foi 1,26 mP, que é também o valor da incerteza relacionada à heterogeneidade entre unidades  $u_{bb}$ .

O desvio padrão da repetibilidade  $s_r$  foi 2,55 mP.

O desvio padrão dentro da unidade  $s_{wb}$  foi 1,39 mP, que é o valor da incerteza relacionada à heterogeneidade dentro da unidade  $u'_{wb}$ .

Em relação à conclusão sobre a homogeneidade entre unidades e a homogeneidade dentro da unidade, o material candidato à MR foi considerado homogêneo ( $p > 0,05$ ), uma vez que passou no teste F ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ ) em ambos os casos.

O valor total da incerteza do estudo experimental da homogeneidade, que inclui a variação entre unidades e dentro da unidade, foi  $u_{ho} = 1,88$  mP. Este valor será uma das componentes da incerteza do valor de propriedade, ao final da futura caracterização do MR.

Aplicando os princípios da ISO Guide 35, foi possível produzir um material homogêneo e quantificar a incerteza associada à heterogeneidade do material. Do ponto de vista biológico, a homogeneidade do material produzido também era esperada, considerando as características intrínsecas da própria matriz. Destaca-se que foi empregado soro de um único bovino, eliminando possíveis variações entre animais em relação à atividade de anticorpos e, ainda, foram adotados procedimentos de produção que contribuíram para a obtenção de um material homogêneo.

## 5.6 Avaliação da estabilidade

O estudo experimental da estabilidade do candidato a MR foi realizado por FPA, por esta ser a única técnica quantitativa disponível, cujos resultados expressos em unidades de milipolarização (mP), poderiam ser avaliados pela análise de regressão, conforme procedimento descrito na ISO Guide 35 (ISO, 2017). Os resíduos *jackknife* da regressão foram verificados segundo Souza & Junqueira (2005).

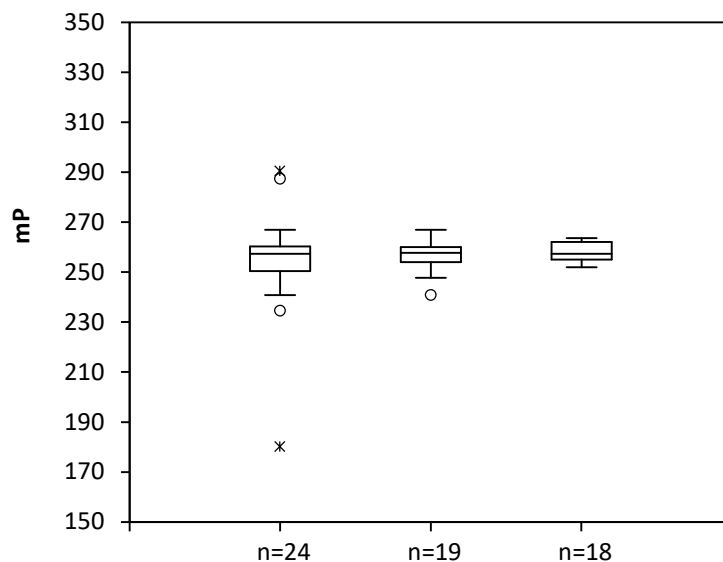
### 5.6.1 Estudo de estabilidade em prazo curto

O estudo de estabilidade em prazo curto foi realizado em três temperaturas:  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ;  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os dados obtidos foram verificados quanto à presença de *outliers*, empregando o método de Tukey (1977), representado pelo *Boxplot*. Os valores dispersos identificados foram removidos e ciclos sucessivos de verificação foram realizados, até que não houvesse mais nenhum valor apontado como *outlier*. Uma das vantagens da aplicação desse método é não ter a necessidade de fazer qualquer suposição quanto à distribuição estatística dos dados, além de ser um teste baseado em medidas robustas.

Está representado no gráfico 8 o procedimento cíclico de eliminação dos *outliers* para os ensaios na temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

**Gráfico 8 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de *outliers* pelo *Boxplot* nos resultados dos frascos mantidos a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$**



A linha central da caixa é a mediana dos dados, a linha inferior é o primeiro quartil e a linha superior é o terceiro quartil. A haste inferior e a haste superior correspondem aos limites inferior e superior, respectivamente e representam a faixa sem *outliers*. Os pontos fora destes limites, denotados por "o" correspondem a *outliers* e têm valores externos a 1,5 unidades da variação interquartilica e os pontos denotados por "x" correspondem a *outliers* extremos, superiores à variação de três unidades interquartilicas.

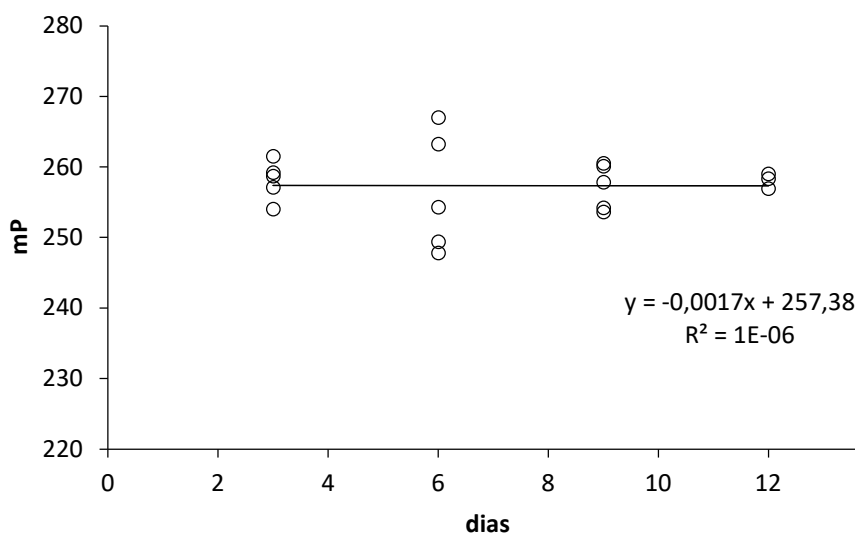
No primeiro ciclo de verificação dos dados obtidos na temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  foi detectada a presença de cinco *outliers*, sendo dois deles considerados *outliers* extremos. Após a remoção destes valores dispersos, o método indicou a presença de mais um valor disperso, no segundo ciclo de verificação. Este dado também foi removido e não foram identificados outros *outliers* no conjunto de dados.

A remoção de seis dados indicados como *outliers* pelo método de Tukey (1977) de um total de 24 resultados, correspondeu a 25%, excedendo a quantidade recomendada por Horwitz (1995) e reduzindo a variância dos dados. Entretanto, esta abordagem foi adotada pelo fato de os valores dispersos afetarem a regressão, podendo, inclusive, deslocar a inclinação (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

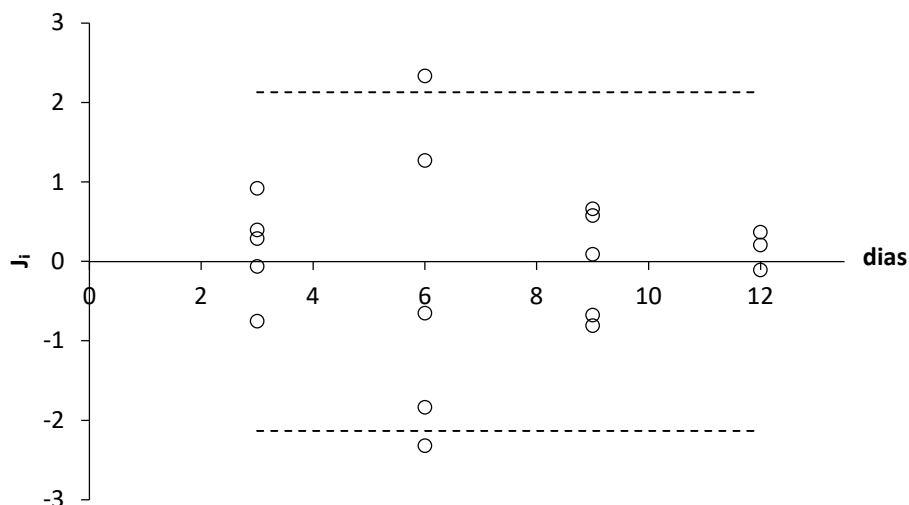
Nos gráficos 9 e 10, que representam a análise de regressão e os resíduos *jackknife*, verifica-se o comportamento do candidato à MR, após 12 dias de conservação na temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A análise de regressão foi aplicada sem considerar os pontos indicados como *outliers* pelo método de Tukey (1977). Nos gráficos de resíduos *jackknife* da regressão é possível perceber que o método

empregado para a eliminação dos *outliers* não produziu gráficos de resíduos com tendências aparentes. Pode-se notar, também, a correspondência dos métodos de detecção de *outliers*, uma vez que há poucos pontos fora do intervalo que determina a significância dos resíduos *jackknife* da regressão ( $\pm t_{0,975;n-3g.l.}$ ), como indicado por Souza & Junqueira (2005).

**Gráfico 9 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura 5°C ± 3°C**



O eixo y representa a leitura dos frascos em mP e o eixo x representa o período de monitoramento da estabilidade em dias. O material candidato à MR foi avaliado a 5°C em quatro momentos: 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias. Em cada um deles, três frascos foram analisados em duplicata.

**Gráfico 10 - Resíduos da análise de regressão na temperatura 5°C ± 3°C**

O eixo y representa os resíduos *jackknife* e o eixo x os tempos de monitoramento em dias. Os pontos localizados fora da linha pontilhada ( $\pm t_{0,975;n-3g,l}$ ) são resíduos *jackknife* considerados *outliers* na regressão.

Aplicando a ANOVA na análise de regressão (tabela 8), verificou-se que a inclinação não foi significativa ( $p > 0,05$ ) e concluiu-se que o material é estável na temperatura 5°C ± 3°C por até 12 dias.

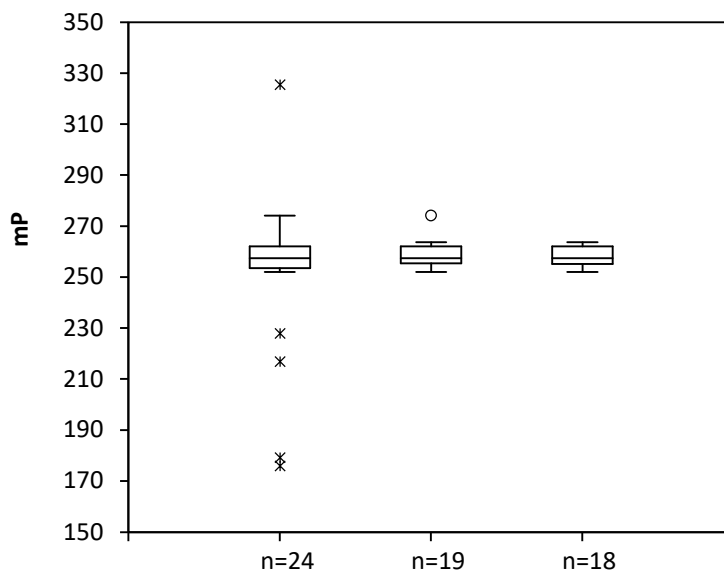
**Tabela 8 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura 5°C ± 3°C**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	p
Regressão	1	0,001	0,0005	2,16E-05	9,96E-01
Resíduo	16	370,300	23,1437		
Total	17	370,300			

Em relação às demais temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade em prazo curto, adotou-se o mesmo procedimento.

Os dados do estudo na temperatura de 25°C ± 2°C, submetidos a ciclos sucessivos de verificação da presença de *outliers*, empregando o método de Tukey (1977), estão apresentados no gráfico 11.

**Gráfico 11 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de *outliers* pelo *Boxplot* nos resultados dos frascos mantidos a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$**

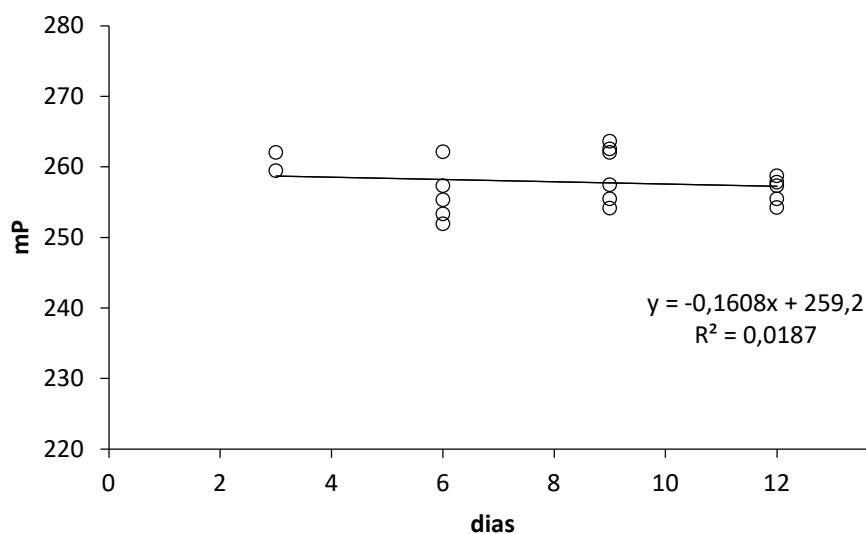


A linha central da caixa é a mediana dos dados, a linha inferior é o primeiro quartil e a linha superior é o terceiro quartil. A haste inferior e a haste superior correspondem aos limites inferior e superior, respectivamente e representam a faixa sem *outliers*. O ponto fora destes limites, denotado por "o" corresponde a um *outlier* e tem valor externo a 1,5 unidades da variação interquartilica e os pontos denotados por "x" correspondem a *outliers* extremos, superiores à variação de três unidades interquartilicas.

Foram detectados cinco *outliers* extremos no primeiro ciclo de verificação dos dados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Desconsiderando esses *outliers*, pode-se observar que a distribuição dos dados tem assimetria positiva, evidenciada pela haste superior. Após a remoção desses dados, o método indicou a presença de um *outlier* no segundo ciclo de verificação. Este dado também foi removido e não foram identificados outros *outliers* no terceiro ciclo. Ao final, a quantidade total de dados removidos foi de 25%.

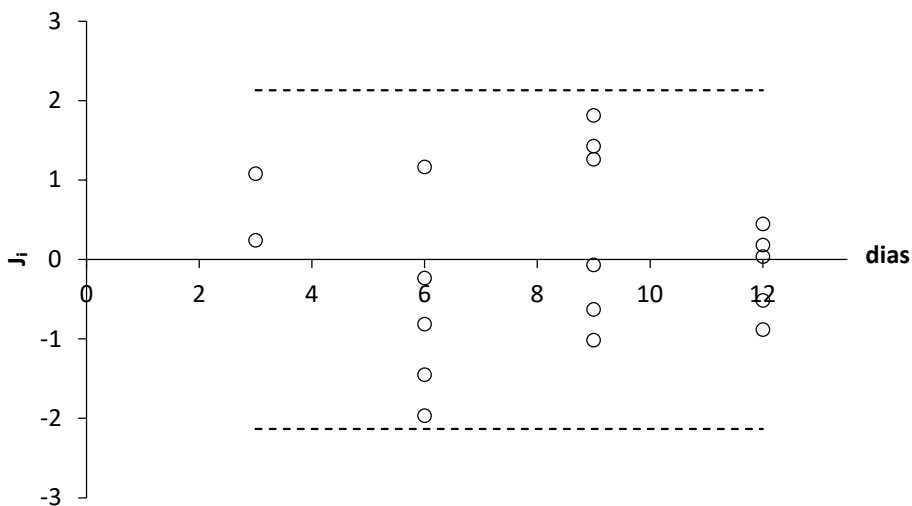
O comportamento do candidato à MR, após 12 dias de conservação na temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , está apresentado nos gráficos da análise de regressão e de resíduos, após exclusão dos *outliers* (gráficos 12 e 13). Nota-se no gráfico dos resíduos da regressão que houve correspondência entre os métodos de detecção de *outliers*, uma vez que após a eliminação dos dados indicados como *outliers* no *Boxplot*, não foram observados *outliers* detectados pelo método do resíduo *jackknife*.

**Gráfico 12 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura 25°C ± 2°C**



O eixo y representa a leitura dos frascos em mP. O eixo x representa o período de monitoramento da estabilidade em dias. O material candidato à MR foi avaliado a 25°C em quatro momentos: 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias. Em cada um deles, três frascos foram analisados em duplicata.

**Gráfico 13 - Resíduos da análise de regressão na temperatura 25°C ± 2°C**



O eixo y representa os resíduos *jackknife* e o eixo x representa os tempos de monitoramento em dias. Pontos localizados fora da linha pontilhada ( $\pm t_{0,975;n-3g,l.}$ ) indicariam resíduos *jackknife* considerados *outliers* na regressão.

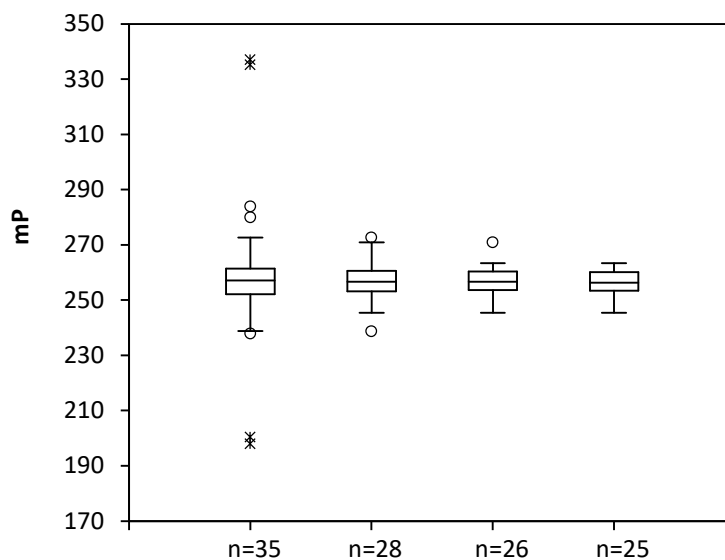
O candidato à MR também foi considerado estável na temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por até 12 dias, uma vez que a ANOVA da regressão (tabela 9) indicou que a inclinação não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 9 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	p
Regressão	1	3,983	3,983	0,30492	5,88E-01
Resíduo	16	209	13,062		
Total	17	212,98			

Quando mantido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , o candidato à MR apresentou um comportamento diferente em relação às temperaturas anteriormente avaliadas. Observou-se que a eliminação dos valores dispersos contidos neste conjunto de dados, só foi alcançada no quarto ciclo de verificação (gráfico 14).

**Gráfico 14 - Aplicação de ciclos sucessivos de remoção de *outliers* pelo *Boxplot* nos resultados dos frascos mantidos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias**



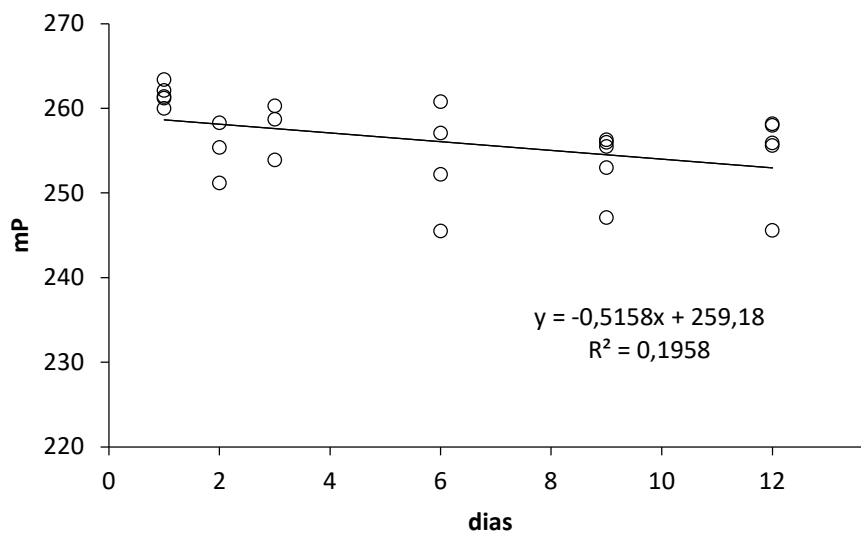
A linha central da caixa é a mediana dos dados, a linha inferior é o primeiro quartil e a linha superior é o terceiro quartil. A haste inferior e a haste superior correspondem aos limites inferior e superior, respectivamente e representam a faixa sem *outliers*. Os pontos fora destes limites, denotados por "o" correspondem a *outliers* e têm valores externos a 1,5 unidades da variação interquartílica e os pontos denotados por "\*" correspondem a *outliers* extremos, superiores à variação de três unidades interquartílicas.

Dos 36 dados referentes à avaliação do candidato a MR a  $37^{\circ}\text{C}$ , um dado já havia sido eliminado durante a fase experimental devido a uma leitura inválida. Durante o tratamento estatístico, 10 dados foram removidos por terem sido apontados como *outliers* pelo método de Tukey, o que correspondeu a 28,6%.

Cabe ressaltar que o tratamento de *outliers* poderia tornar estável um material que, na verdade, apresenta instabilidade. Por isso é importante observar se o método de tratamento dos valores dispersos não está afetando a interpretação do teste, eliminando dados predominantemente dos frascos que permaneceram maior tempo na condição extrema. Tal situação não ocorreu, verificou-se que os dispersos foram eliminados dos dois lados da distribuição, ao longo de todos os tempos avaliados, o que embasou o tratamento aplicado.

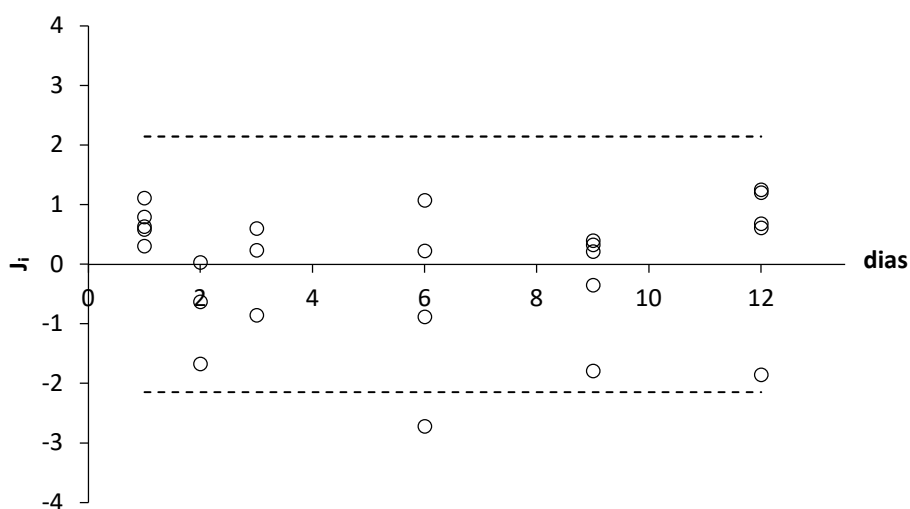
Após a remoção dos *outliers*, o comportamento do candidato a MR quando mantido por 12 dias em estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  está apresentado nos gráficos da análise de regressão e de resíduos (gráficos 15 e 16).

**Gráfico 15 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias**



O eixo y representa a leitura dos frascos em mP. O eixo x representa o período de monitoramento da estabilidade em dias. O material candidato à MR foi avaliado a  $37^{\circ}\text{C}$  em seis momentos: 1 dia, 2 dias, 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias. Em cada um deles, três frascos foram analisados em duplicata.

**Gráfico 16 - Resíduos da análise de regressão na temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias**



O eixo y representa os resíduos *jackknife* e o eixo x representa os tempos de monitoramento em dias. A linha pontilhada ( $\pm t_{0,975;n-3g.l.}$ ) representa os limites de significância para os resíduos *jackknife* serem considerados *outliers* na regressão.

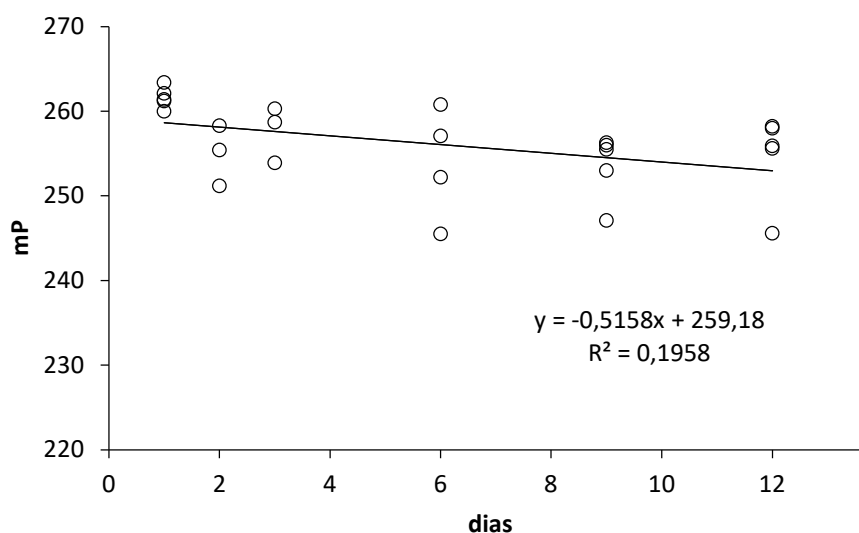
Observou-se pela ANOVA da regressão (tabela 10) que a inclinação foi significativa ( $p < 0,05$ ) e o candidato à MR foi considerado instável, quando mantido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias.

**Tabela 10 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 12 dias**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	p
Regressão	1	113,0580	113,0580	5,5998	2,68E-02
Resíduo	23	464,3603	20,1896		
Total	24	577,4184			

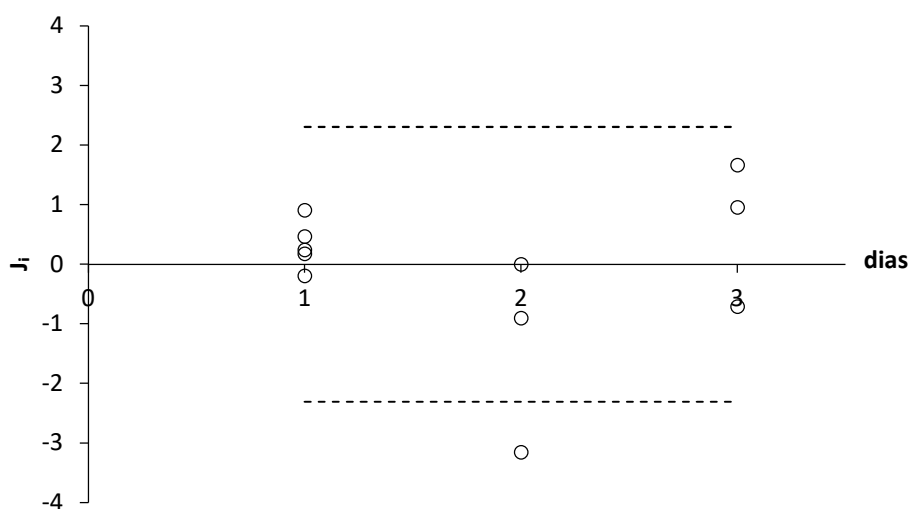
Como se imaginava que tal instabilidade poderia ocorrer em razão do período prolongado em uma condição extrema de temperatura foi realizado um monitoramento diário nos primeiros três dias. Aplicando a ANOVA da regressão apenas nos dados dos três primeiros dias, foi observado que a inclinação não foi significativa ( $p > 0,05$ ) (tabela 11). Nos gráficos 17 e 18 estão apresentados a análise de regressão e os resíduos. Conclui-se que o candidato à MR se mantém estável por 3 dias, quando mantido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Gráfico 17 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 3 dias**



O eixo y representa a leitura dos frascos em mP. O eixo x representa o período de monitoramento da estabilidade em dias. O material candidato à MR foi avaliado a  $37^{\circ}\text{C}$  em três momentos: 1 dia, 2 dias e 3 dias. Em cada um deles, três frascos foram analisados em duplicata.

**Gráfico 18 - Resíduos da análise de regressão na temperatura 37°C ± 2°C por 3 dias**



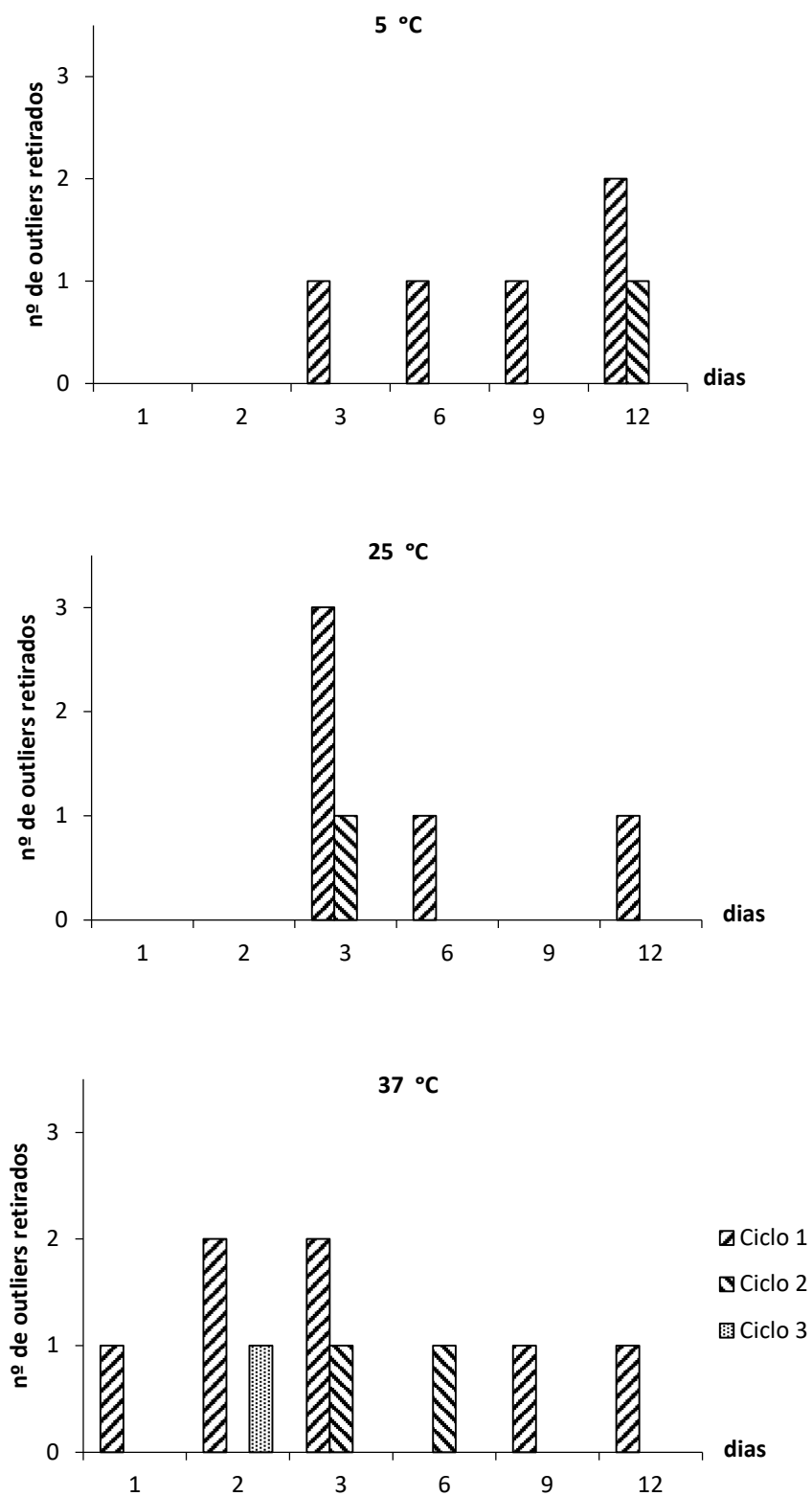
O eixo y representa os resíduos *jackknife* e o eixo x representa os tempos de monitoramento em dias. Os pontos localizados fora da linha pontilhada ( $\pm t_{0,975;n-3g,l.}$ ) são resíduos *jackknife* considerados *outliers* na regressão.

**Tabela 11 - ANOVA da regressão aplicada para avaliação da estabilidade do candidato à MR na temperatura 37°C ± 2°C por 3 dias**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	p
Regressão	1	32,2192	41,3216	3,7021	8,65E-02
Resíduo	9	247,83	100,4548		
Total	10	280,0492			

Está representada no gráfico 19 a distribuição dos *outliers* detectados pelo *Boxplot* ao longo do tempo, nas três temperaturas. Pela análise do gráfico, percebe-se que os *outliers* foram detectados em todos os tempos. Cabe ressaltar que o tratamento de *outliers* é um assunto complexo. Nem sempre se verifica concordância entre os métodos estatísticos de identificação destes valores dispersos, mas houve concordância entre os métodos utilizados.

**Gráfico 19 - Distribuição dos *outliers* detectados pelo *Boxplot* ao longo do tempo nos ensaios de estabilidade em três temperaturas**



O eixo y indica o número de *outliers* detectados. O eixo x indica os tempos de monitoramento em dias, nos quais foi realizada a identificação dos *outliers*.

Todos os *outliers* detectados pelo método de Tukey (1997) foram também observados pelo método do resíduo *jackknife*. Entretanto, o último método requereu um número maior de ciclos para a detecção dos mesmos *outliers* e levou a identificação de um número maior de dados dispersos, como pôde ser observado nos gráficos 10; 16 e 18. A remoção desses pontos gerou outros *outliers* não detectados pelo Boxplot, levando a uma redução significativa do número de resultados válidos para a análise de regressão. A opção pelo método de Tukey (1977) deveu-se a sua simplicidade, robustez e independência da análise de regressão.

Após a identificação dos *outliers*, resta a dúvida se estes valores são representativos ou não do conjunto de dados. Segundo Figueira (1998), antes de decidir como os *outliers* serão tratados é conveniente ter conhecimento das causas que levam ao seu aparecimento, que podem ser: erros de medição, erros de execução e variabilidade inerente dos elementos da população. No estudo de estabilidade em prazo curto, a remoção dos *outliers* fundamentou-se, entre outras razões, na hipótese de que a variabilidade observada na técnica FPA está associada a um problema instrumental, que precisa ser mais bem investigado.

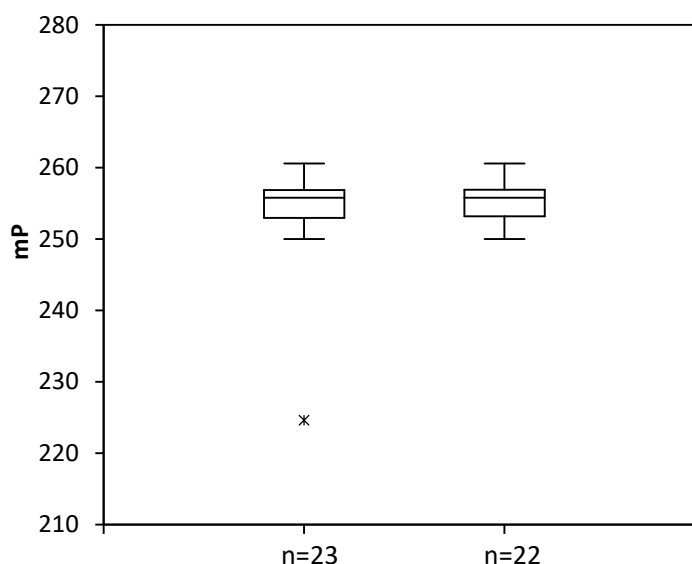
O estudo de estabilidade em prazo curto permitiu antecipar possíveis mudanças que podem ocorrer quando o material está fora da sua temperatura ideal de conservação. Os resultados obtidos indicam que o candidato à MR pode resistir, por exemplo, a uma situação de transporte, na qual seja atingida uma temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por um curto período de tempo. Por outro lado, apesar da quantidade limitada de dados, o material aparenta sofrer degradação com a elevação da temperatura, perdendo sua estabilidade após três dias a 37°C. Estas informações são úteis para que o produtor de MR estabeleça requisitos de transporte do material e forneça aos usuários orientações sobre sua adequação ao uso após situações adversas.

### 5.6.2 Estudo de subamostragem

O estudo de subamostragem avaliou a influência de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento do material.

O conjunto de dados obtidos foi avaliado pelo método de Tukey (1977), que detectou a presença de um valor disperso extremo (gráfico 20). Após a remoção deste dado, nenhum outro *outlier* foi identificado no ciclo seguinte de verificação.

**Gráfico 20 - *Boxplot* dos resultados obtidos no estudo de subamostragem**

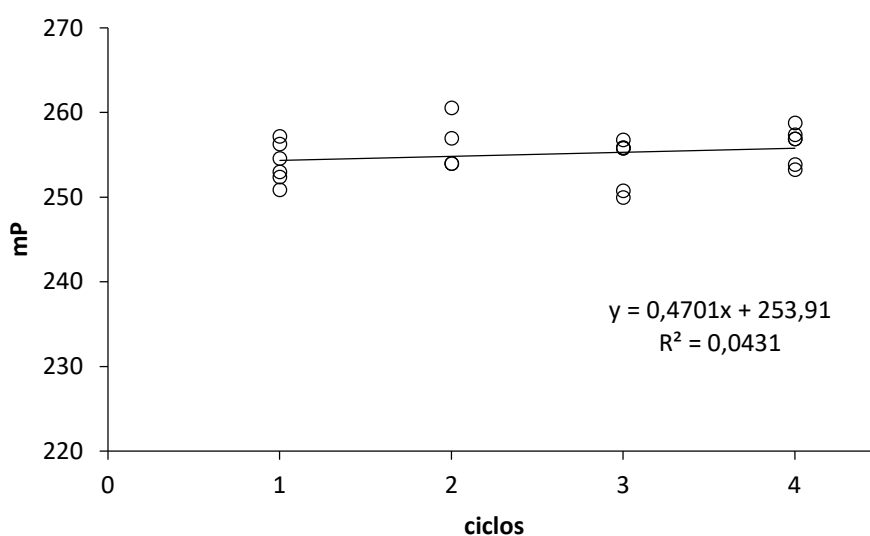


A linha central da caixa é a mediana dos dados, a linha inferior é o primeiro quartil e a linha superior é o terceiro quartil. A haste inferior e a haste superior correspondem aos limites inferior e superior, respectivamente e representam a faixa sem *outliers*. O ponto fora destes limites, denotado por "x" corresponde a um *outliers* extremo, com variação superior a três unidades interquartílicas.

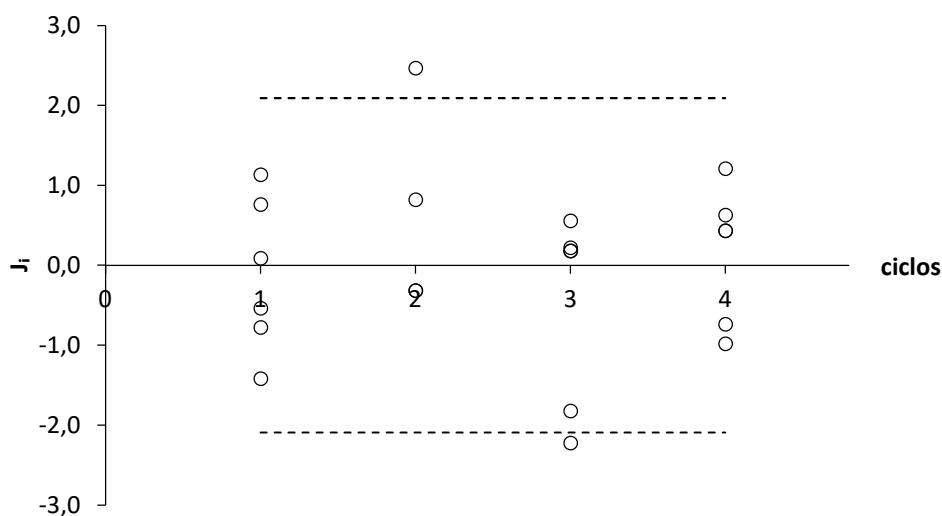
A remoção de um valor disperso correspondeu a 4,3% dos dados e não excedeu a recomendação de Horwitz de 2/9 dos dados. Do ponto de vista técnico, foi observado que se tratava de um valor aberrante e que não era proveniente de frascos que foram submetidos à condição mais extrema, ou seja, quatro ciclos sucessivos de descongelamento. Esta avaliação criteriosa forneceu segurança de que a eliminação do disperso não levaria a uma interpretação equivocada em relação à estabilidade do material.

Nos gráficos 21 e 22 estão apresentados a análise de regressão e os resíduos. Na ANOVA da regressão (tabela 12), verificou-se que a inclinação não foi significativa ( $p > 0,05$ ) e conclui-se que o candidato à MR permaneceu estável por 4 ciclos sucessivos de descongelamento.

**Gráfico 21 - Avaliação da estabilidade do candidato à MR durante ciclos repetidos de descongelamento**



O eixo y apresenta a leitura dos frascos em mP. O eixo x apresenta o número de ciclos de descongelamento. O material candidato à MR foi avaliado em quatro momentos: 1 ciclo, 2 ciclos, 3 ciclos e 4 ciclos de descongelamento. Em cada um deles, três frascos foram analisados em duplicata.

**Gráfico 22 - Resíduos da análise de regressão no estudo de subamostragem**

O eixo y representa os resíduos *jackknife* e o eixo x representa os ciclos de descongelamento do material. Os pontos localizados fora da linha pontilhada ( $\pm t_{0,975;n-3g.l.}$ ) são resíduos *jackknife* considerados *outliers* na regressão.

**Tabela 12 - ANOVA da regressão aplicada no estudo de subamostragem**

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma quadrática (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	p
Regressão	1	6,5082	6,5082	0,9017	3,54E-01
Resíduo	20	144,3613	7,2181		
Total	21	150,8695			

O estudo de subamostragem demonstrou a adequação do candidato à MR em uma situação de uso repetido, na qual alíquotas são retiradas em quatro momentos distintos, durante a vida útil do material. Para realizar a subamostragem, o material deve, necessariamente, ser levado à temperatura ambiente, aberto e homogeneizado. Esta situação corresponde à realidade de uso de materiais da mesma natureza, portanto, este estudo foi importante para subsidiar a elaboração de instruções de manuseio aos usuários, fornecendo segurança em relação ao uso repetido por até quatro vezes.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho resultou na produção de um material de referência de soro bovino para ser empregado no diagnóstico sorológico de *Brucella abortus*.

A cooperação técnica entre o MAPA e a CIDASC possibilitou uma seleção extremamente criteriosa do material de partida, que envolveu a identificação de um foco de brucelose numa região onde havia a garantia de que os bovinos não haviam sido vacinados, evitando assim possíveis interferências de uma resposta vacinal. Do ponto de vista ético, evitou-se a infecção experimental de animais. Este esforço interinstitucional permitiu ainda, a conservação adequada de todas as amostras biológicas, durante as etapas de coleta, manuseio e transporte.

Empregou-se como material de partida soro bovino, cuja infecção foi comprovada de modo inequívoco, empregando o diagnóstico bacteriológico, que é um método direto, considerado o padrão ouro, com 100% de especificidade. Pela PCR AMOS modificada, identificou-se a presença de *B. abortus* bv. 1, 2 ou 4. A obtenção deste material de partida em grande volume e com registro de toda sua rastreabilidade é, por si só, um resultado importante, considerando a dificuldade de se produzir materiais de referência a partir de fontes naturais, que sejam representativos de amostras reais.

A produção do material de referência foi realizada em instalações adequadas, com o nível de biossegurança requerido e adotando as melhores práticas para se evitar contaminações e obter um material com elevado grau de homogeneidade.

O material produzido foi avaliado em relação à sua homogeneidade, por meio de quatro técnicas sorológicas independentes, estabelecidas no PNCEBT: AAT, SAL/2-ME, FC e FPA. Por meio das três primeiras técnicas foi possível calcular o título médio e a variância do material. Empregando a técnica FPA, foi possível aplicar os procedimentos estatísticos descritos na ISO Guide 35, que permitiram concluir que o material é homogêneo e calcular a incerteza associada à avaliação da homogeneidade, que é uma das componentes da incerteza do valor de propriedade.

O delineamento experimental do estudo de homogeneidade, que resultou em um número elevado de medições, incluindo repetições e releituras, apontou a existência de um problema de repetibilidade da técnica FPA, evidenciado pela presença de um número elevado de valores dispersos. A razão desses valores dispersos deverá ser mais bem investigada. Na literatura não foram encontradas

referências para o parâmetro repetibilidade da técnica FPA, uma vez que as validações desta prova se baseiam na sensibilidade e especificidade.

Apesar da limitação observada, a técnica FPA foi empregada para a avaliação da estabilidade, por fornecer resultados quantitativos. A presença de um número elevado de *outliers* entre os dados obtidos, afeta adversamente a análise de regressão, portanto diversos testes estatísticos foram realizados para assegurar a consistência do tratamento dos dados e evitar conclusões equivocadas. Os resultados obtidos indicaram que o material é estável por até quatro ciclos de descongelamento, sendo este estudo de subamostragem imprescindível em materiais destinados ao uso repetido. Quando submetido a condições forçadas de temperatura, evidenciou-se que o material pode permanecer temporariamente resfriado ou até mesmo resistir a uma perda da condição de resfriamento por até 12 dias, desde que a temperatura não exceda  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Por outro lado, se houver elevação desta temperatura, não é possível assegurar a estabilidade do material, uma vez que houve indícios de degradação após 3 dias de armazenamento em temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Ressalta-se a grande dificuldade de produzir materiais de referência biológicos, adotando-se os modelos estatísticos descritos na ISO Guide 35, pois os métodos de medição comportam-se de modo diferente dos métodos da área química e são mais complexos de se controlar em decorrência da variação inerente à atividade biológica. Além disso, são escassas as referências sobre critérios de aceitação de desvios observados nas técnicas empregadas.

Pretende-se dar prosseguimento a este trabalho realizando o estudo de estabilidade de longa duração, no qual o material é avaliado em tempo real, mantido nas condições preconizadas de conservação (temperatura  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ ). Estima-se que este estudo tenha uma duração aproximada de seis meses.

Posteriormente, a intenção é caracterizar o material de referência, determinando seu valor de propriedade e sua incerteza associada. Dentre as estratégias preconizadas na ISO Guide 35, será adotada a abordagem de transferência de valor de um MR para um candidato a MR estreitamente similar. Nesta abordagem, a caracterização será feita por comparação com o Soro Padrão Internacional anti-*Brucella abortus*, fazendo a transferência do valor de propriedade, com a conversão das respostas obtidas para unidades internacionais. Ao final deste processo, a estabilidade continuará a ser monitorada, ao longo da vida útil do material,

como parte do gerenciamento de riscos. Este material de referência, com rastreabilidade estabelecida ao padrão primário, poderá ser reconhecido como soro padrão nacional e ser amplamente utilizado para garantia da qualidade analítica dos laboratórios que atuam no programa oficial de controle e erradicação da brucelose no Brasil, além de poder ser empregado também como insumo para controle de qualidade dos antígenos utilizados no diagnóstico de brucelose.

## 7 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho resultou na produção de um candidato a material de referência de soro bovino para ser empregado no diagnóstico sorológico de brucelose.

O material obtido é representativo de amostras reais, pois foi preparado a partir do soro de um bovino naturalmente infectado em que houve a identificação da presença de *Brucella abortus* de modo inequívoco.

A avaliação por quatro técnicas sorológicas independentes permitiu concluir que o material é homogêneo, segundo os procedimentos estatísticos descritos na ISO Guide 35. A incerteza associada à avaliação da homogeneidade, que é uma das componentes da incerteza do valor de propriedade, foi determinada.

Os resultados obtidos também indicaram que o material é estável por até quatro ciclos de descongelamento, no uso repetido. Quando submetido a condições forçadas de temperatura, pode resistir por até 12 dias a uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , apresentando indícios de instabilidade somente após 3 dias a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Após a realização do estudo de estabilidade de longa duração, nas condições preconizadas de conservação, estima-se que o material estará apto a ser caracterizado por comparação ao Soro Padrão Internacional anti-*Brucella abortus*. Este material de referência, com rastreabilidade estabelecida ao padrão primário, poderá ser reconhecido como soro padrão nacional e ser amplamente utilizado para garantia da qualidade analítica dos laboratórios que atuam no programa oficial de controle e erradicação da brucelose no Brasil.

## REFERÊNCIAS

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA Publications, 1988.

ANGEL, M. O.; RISTOW, P.; KO, AI ; DI-LORENZO, C. Serological trail of Brucella infection in an urban slum population in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**, 6(9):675±9, 2012. Epub 2012/09/25. <https://doi.org/10.3855/jidc.2347> PMID: 23000868; PubMed Central PMCID: PMC3800144.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 30**. Materiais de referência: termos e definições selecionados. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO Guia 31**. Materiais de referência: conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO 17034**. Material de referência: requisitos gerais para a competência de produtores. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

BANG, B. The etiology of epizootic abortion. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, 10:125-149.1897. IN2. DOI:10.1016/s0368-1742(97)80014-8

BRASIL. Decreto nº 66.183 de 5 de fevereiro de 1970. Regulamenta o Decreto-lei n. 923 de 10 de outubro de 1969, que dispõe sobre a comercialização do leite cru. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 fev.1970. Seção 1.

BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 1950. Seção 1.

BRASIL. Lei 13.680 de 14 de junho de 2018. Altera a Lei n. 1283 de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jun 2018. Seção 1.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Decreto nº 9013 de 29/03/2017**. Regulamenta as leis 1283/1950 e 7889/1898, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001**. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa n. 30 de 07/08/2013**. Permite que os queijos feitos a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias. Disponível em: <[http://www.lex.com.br/legis\\_24684623\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_30\\_DE\\_7\\_D\\_E\\_AGOSTO\\_DE\\_2013.aspx](http://www.lex.com.br/legis_24684623_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_7_D_E_AGOSTO_DE_2013.aspx)> Acesso em: 11 jan. 2020.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa SDA nº 10, de 3 de março de 2017**. Estabelece o Regulamento Técnico do PNCEBT. Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Portaria n. 146 de 07 de março de 1996**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Brasília, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa nº 34 de 08 de setembro de 2017**. Define os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de brucelose. Brasília, 2017.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 154–158, 2012.

CARPENTER, C. M.; BOAK, R. Brucella abortus in milk and dairy products. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, v. 18, n. 6, p. 743–51, 1928.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Brucellosis reference guide: exposures, testing and prevention, 2017**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/brucellosis/pdf/brucellosi-reference-guide.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2018.

COMAR “Code d'Indexation des Matériaux de Référence”. Disponível em: <https://rrr.bam.de/RRR/Navigation/EN/Reference-Materials/COMAR/comar.html>. Acesso em: 12/07/18.

CORBEL, M. J.; FAO; WHO; OIE. **Brucellosis in humans and animals**. World Health Organization, 2006. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597>.

DADAR, M.; SHAHALI, Y; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: a review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 39–47, 2019. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.009

DAVIDSON, I.; HEBERT, C. N.; MORGAN, W. J. B. The second international standard for Anti-Brucella abortus serum\*. **Bulletin of the World Health Organization**, 40 (1), 129 – 140, 1969.

DAVIES, G; CASEY, A. The survival of Brucella abortus in milk and milk products. **Br Vet J.**, Jul-Aug.,129(4):345-53., 1973.

DEAN, A. S.; CRUMP, L.; GRETER, H.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. **PLOS Neglected Tropical Diseases** , 6(10): e1865, 2012.  
DOI:10.1371/journal.pntd.0001865

EVANS, A. C. “The bacteria of milk freshly drawn from normal udders”. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 18, no. 5, 1916, pp. 437–476. *JSTOR*, [www.jstor.org/stable/30084251](http://www.jstor.org/stable/30084251). Accessed 10 jan. 2020.

EVANS, A. C. Further studies on bacterium abortus and related bacteria: II. A comparison of bacterium abortus with bacterium bronchisepticus and with the Organism which Malta Fever. **Journal of Infectious Diseases**, 22(6), 580–593, 1918. DOI:10.1093/infdis/22.6.580

FALENSKI, A.; MAYER-SCHOLL, A.; FILTER, M.; GOLLNER, C.; APPEL, B.; NOCKLER, K. Survival of Brucella spp. in mineral water, milk and yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, 145(1), 326–330, 2011.  
DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.033

FIGUEIRA, M. M. C. Identificação de outliers. **Millenium**, n. 12, out 1998.

GILMAN, H. L.; DAHLBERG, A. C.; MARQUARDT, J. C. The occurrence and survival of *Brucella abortus* in cheddar and limburger cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 29, n. 2, p. 71–85, 1946.

GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTH, F. *et al.* A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 36(3), 241–248, 2013. DOI:10.1016/j.cimid.2012.09.001

GOLDING, B.; SCOTT, D. E.; SCHAT, O.; HUANG, L.-Y. *et al.* Immunity and protection against brucella abortus. **Microbes and Infection**, 3(1), 43–48,2001.  
DOI:10.1016/s1286-4579(00)01350-2

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A. *et al.* Situação epidemiológica de brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl. 1, p.35-45, 2009.

GRECO, E.; EI-AGUIZY, O.; ALI, M. F.; FOTI, S. *et al.* Proteomic analyses on an Ancient Egyptian cheese and biomolecular evidence of brucellosis. **Analytical Chemistry**, 90(16), 9673–9676, 2018. DOI:10.1021/acs.analchem.8b02535

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Thecnical report; revised 1994. **Pure & Appl. Chem.**, v.67, n.2, p. 331-343, 1995.

HULL, N. C.; SCHUMAKER, B. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. **Infection Ecology & Epidemiology**, 8:1, 2018. 1500846. DOI:10.1080/20008686.2018.1500846

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Guide 35**. Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: ISO, 2017.

KUPLULU, O.; SARIMEHMETOGLU, B. Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. **Food Control**, 15(7), 511–514, 2004. DOI:10.1016/j.foodcont.2003.08.002

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM MINAS GERAIS (LANAGRO/MG). **Diagnóstico bacteriológico de brucelose animal**. Método de Ensaio: MET/DDB/PL/003 versão 4. Pedro Leopoldo, 2015.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM MINAS GERAIS (LANAGRO/MG). **Diagnóstico de brucelose bovina pela prova do antígeno acidificado tamponado**. Método de Ensaio: MET/DDB/PL/009 versão 4. Pedro Leopoldo, 2016.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM MINAS GERAIS (LANAGRO/MG). **Diagnóstico de brucelose bovina por soroglutinação lenta em tubos e redução pelo 2-mercaptoetanol**. Método de Ensaio: MET/DDB/PL/004 versão 4. Pedro Leopoldo, 2018.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM MINAS GERAIS (LANAGRO/MG). **Diagnóstico de brucelose bovina por polarização fluorescente**. Método de Ensaio: MET/DDB/PL/006 versão 3. Pedro Leopoldo, 2019.

LAWINSKY, M. L. D. J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. D. R.; FARIA, N. D. C. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 75–84, dez. 2010.

LEMOS, T. S; CEQUINEL, J. C.; COSTA, T. P; NAVARRO, A. B. *et al.* Outbreak of human brucellosis in Southern Brazil and historical review of data from 2009 to 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 12(9): 2018. e0006770. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006770>

LINSINGER, T. P. J. *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. **Accred Qual Assur**, 6:20-25, 2001.

MANCILLA, M. Smooth to rough dissociation in *Brucella*: the missing link to virulence. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** ,5:98, 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00098

McGIVEN, J. *et al.* The first International Standard anti-*Brucella melitensis* serum. **Rev. sci. tech. off. Int. Epiz.**, 30(3), 809-819, dec. 2011.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F. *et al.* *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.12, p.1257-61, dez. 2011.

MEYER, K. F.; SHAW, E. B. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*: studies on the genus *Brucella* Nov. Gen. I. **Journal of Infectious Diseases**, 27(3), 173-184, 1920. DOI:10.1093/infdis/27.3.173

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria 1305 de 30 de Abril de 2013**. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, Belo Horizonte, 2013.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria 1736 de 27 de julho de 2017**. Altera a Portaria n. 1305, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2017.

MORENO, E. Retrospective and prospective, perspectives on zoonotic brucellosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-18, 2014.

MUSSI, J. M. S. **Efeito do antagonismo in vitro de bacterias ácido-lácteas e da maturação na sobrevivência de *Brucella abortus* em queijo tipo Minas artesanal**. Orientador: Andrey Pereira Lage. Co-orientadores: Marcelo Resende de Souza, Marcos Bryan Heinemann. 2018. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL (NIBSC). **WHO International Standard Anti-*Brucella abortus* Serum**, bovine. NIBSC code: 2BADS; Instructions for use. Version 10.0, 14/06/2017. Disponível em: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/2BADS.pdf> Acesso em: 04/02/2020.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G. *et al.* A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **J. Immunol. Methods**, v. 195, p. 161-168, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W. *et al.* Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.80, p.163-170, 2001.

ORZIL, Livia de Lima *et al.* Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.5, p.847-852, mai 2016.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOW, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infect Dis.**, 6(2):91±9, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6) PMID: 16439329.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.

SANTA CATARINA (Estado). Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. Portaria SAR nº17 de 20 de julho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico do Programa de Erradicação da Brucelose Bovina e Bubalina no Estado de Santa Catarina...**Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis, 24 jul. 2012. ed. 19380, p.3.

SOARES, C. de P. O. C.; TELES, J. A. A.; SANTOS, A. F. dos; SILVA, S. O. F.; CRUZ, M. V. R. A.; SILVA JUNIOR, F. F. da. Prevalence of *Brucella* spp in humans. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 23(5), 919–926, 2015. DOI:10.1590/0104-1169.0350.2632

SOARES FILHO, P. M. *et al.* Confirmação de infecção por *Brucella abortus* em um rebanho bovino certificado livre em Minas Gerais: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 64, n.5, p. 1133-1136, out. 2012.

SOUZA, M. R. S. **Estimação da sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos da brucelose bovina via inferência bayesiana**. Orientador: Carlos Henrique Osório Silva. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SOUZA, S. V. C. & JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, 552, p. 25-35, 2005.

THOMPSON, M. Test for 'sufficient homogeneity' in a reference material. **AMC Technical Briefs Recommendation**, 17A, re-issued set 2008. Disponível em: [https://www.rsc.org/images/homogeneity-test-technical-brief-17A\\_tcm18-214886.pdf](https://www.rsc.org/images/homogeneity-test-technical-brief-17A_tcm18-214886.pdf). Acesso em 24/02/2020.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.

TUKEY, J. W. **Exploratory data analysis**. Addison-Wesley, v.2, 1977.

VASSALO, D. J. The corps disease: brucellosis and Its historical association with the Royal Army Medical Corps. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, 138(3), 140–150, 1992. DOI:10.1136/jramc-138-03-09

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, 9(6), 1168–1184, 2009. DOI:10.1016/j.meegid.2009.07.001

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE); International Office of Epizooties. International reference antibody standards for antibody assays. *In: OIE Quality standard and guidelines for veterinary laboratories: infectious diseases*. Paris: Office International des Epizooties, 2008, guide 3.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Brucellosis. *In: - Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 8th ed, 2018. v.1, chapter

3.1.4. Disponível em:

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELLO\\_SIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLO_SIS.pdf) Acesso em: 08/01/2020.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **One Health**, c2020.

Disponível em: <https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/> Acesso em: 11/01/2020.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. Disease information: **Brucellosis**. Report Jan-Jun 2019. Disponível em:

[https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=182&species\\_t=0&disease\\_id\\_aquatic=-999&species\\_a=0&sta\\_method=semesterly&selected\\_start\\_year=2019&selected\\_report\\_period=1&selected\\_start\\_month=1&date\\_submit=OK](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=182&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2019&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK) Acesso em: 29/01/2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO manual for the preparation of secondary reference materials for in vitro diagnostic assays designed for infectious disease nucleic acid or antigen detection: calibration to WHO International Standards. In: **WHO Technical Report Series**, n. 1004, 2017. Annex 6, p. 389-455.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. 255 p. 2015. Disponível em:

[http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/fergreport/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/) Acesso em: 11/07/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Brucellosis**, c2020. Disponível em:

<http://www.who.int/zoonoses/diseases/brucellosis/en/> Acesso em: 29/01/2020.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Resultados obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por AAT

Título	Resultados dos frascos (escores)																					
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
10	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
15	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
20	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	+2	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>
25	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	<b>+2</b>	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
30	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
35	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1	0	0	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os frascos correspondem às 11 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste AAT são expressos em escores, sendo 0 = não reagente, +1 = reação muito fraca, +2 = fracamente positiva, +3 = positiva, +4 = fortemente positiva. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com escore igual a +2 (indicado em negrito), que corresponde a 50% de aglutinação.

### APÊNDICE B – Resultados obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por SAL

Título	Resultados dos frascos (% de aglutinação)																					
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
900	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1000	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1100	75	75	75	<b>50</b>	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	50	50	75	75
1200	50	50	<b>50</b>	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	50	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	50	50	50	<b>50</b>	50
1300	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	<b>50</b>	25	25	25	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	
1400	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1500	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1600	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1700	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Os frascos correspondem às 11 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste SAL são expressos em percentuais de aglutinação. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de aglutinação (indicado em negrito).

### APÊNDICE C – Resultados obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por 2-ME

Título	Resultados dos frascos (% de aglutinação)																					
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
900	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1000	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1100	75	75	75	<b>50</b>	75	75	75	75	75	<b>50</b>	75	75	75	75	75	75	75	75	50	50	75	75
1200	50	50	<b>50</b>	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	50	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	50	50	50	<b>50</b>	50	
1300	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	50	25	25	25	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	
1400	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
1500	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
1600	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
1700	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	

Os frascos correspondem às 11 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste 2-ME são expressos em percentuais de aglutinação. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de aglutinação (indicado em negrito).

### APÊNDICE D – Resultados obtidos na avaliação da homogeneidade do material piloto por FC

Título	Resultados dos frascos (escores)																						
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
350	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	
400	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	
450	+3	+4	+3	+4	+3	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+4	+4	+4	+4	
500	+2	+3	+2	+3	+2	+3	+3	+3	+2	+3	+2	+3	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+4	+3
550	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	
600	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	+1	
650	+1	+1	0	+1	0	+1	0	+1	0	+1	0	+1	+1	0	+1	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	+1	
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Os frascos correspondem às 11 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste FC são expressos em escores, sendo: 0 = 0% de fixação do complemento, +1 = 25% de fixação do complemento, +2 = 50% de fixação do complemento, +3 = 75% de fixação do complemento e +4 = 100% de fixação do complemento. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de fixação do complemento (indicado em negrito).

### APÊNDICE E – Avaliação da homogeneidade do candidato à MR por AAT

Título	Resultados dos frascos (escores)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
10	+3	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
15	+2	+2	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	<b>+2</b>
20	<b>+2</b>	<b>+2</b>	+1	+1	+1	<b>+2</b>	+2	+2	+2	<b>+2</b>	+2	+2	+1
25	+1	+1	+1	+1	+1	+1	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	+1	<b>+2</b>	<b>+2</b>	+1
30	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
35	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
40	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	+1	+1
45	0	0	0	0	0	+1	+1	+1	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0

Os frascos correspondem às 13 unidades amostradas. Os resultados do teste AAT são expressos em escores, sendo 0 = não reagente, +1 = reação muito fraca, +2 = fracamente positiva, +3 = positiva, +4 = fortemente positiva. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com escore igual a +2 (indicado em negrito), que corresponde a 50% de aglutinação.

### APÊNDICE F – Resultados da avaliação da homogeneidade do candidato à MR por SAL

Título	Resultados dos frascos (% aglutinação)																									
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
700	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
800	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
900	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1000	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	50	50	50	50	50	75	50	75
1100	50	75	50	50	75	75	75	75	50	50	75	50	75	50	50	50	50	50	50	50	50	50	<b>50</b>	50	50	50
1200	50	50	50	50	<b>50</b>	50	50	50	<b>50</b>	50	75	50	50	<b>50</b>	<b>50</b>	50	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
1300	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	50	<b>50</b>	25	50	50	50	<b>50</b>	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1400	25	25	25	25	25	25	<b>50</b>	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Os frascos correspondem às 13 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste SAL são expressos em percentuais de aglutinação. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de aglutinação (indicado em negrito).

**APÊNDICE G – Resultados da avaliação da homogeneidade do candidato à MR por 2-ME**

Título	Resultados dos frascos (% aglutinação)																									
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
700	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
800	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
900	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1000	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	50	50	50	75	50	50	75	50	75
1100	75	75	50	50	75	75	75	75	50	50	75	50	75	50	75	50	50	50	50	50	50	<b>50</b>	50	50	50	50
1200	75	50	50	50	<b>50</b>	50	50	50	<b>50</b>	50	75	50	50	<b>50</b>	<b>50</b>	50	50	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
1300	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	<b>50</b>	50	<b>50</b>	25	50	75	50	<b>50</b>	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1400	25	25	25	25	25	25	<b>50</b>	25	25	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Os frascos correspondem às 13 unidades amostradas. As letras A e B indicam as repetições de uma mesma unidade. Os resultados do teste 2-ME são expressos em percentuais de aglutinação. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de aglutinação (indicado em negrito).

### APÊNDICE H – Resultados da avaliação da homogeneidade do candidato à MR por FC

Título	Resultados dos frascos (escores)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
100	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
150	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
200	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
250	+3	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
300	<b>+2</b>	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	<b>+2</b>	+3	+3	+3	+3
350	+1	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	0	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>	<b>+2</b>
400	0	0	0	+1	0	+1	0	+1	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os frascos correspondem às 13 unidades amostradas. Os resultados do teste FC são expressos em escores, sendo: 0 = 0% de fixação do complemento, +1 = 25% de fixação do complemento, +2 = 50% de fixação do complemento, +3 = 75% de fixação do complemento e +4 = 100% de fixação do complemento. O título é o inverso da maior diluição na qual foi obtida resposta positiva com 50% de fixação do complemento (indicado em negrito).