

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Rosemary dos Santos Conrado

**VALIDAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA ANÁLISE DAS  
CONTAGENS PADRÃO EM PLACAS E DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE  
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2023

ROSEMARY DOS SANTOS CONRRADO

**VALIDAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA ANÁLISE DAS  
CONTAGENS PADRÃO EM PLACAS E DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE  
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2023

C754v Conrado, Rosemary dos Santos ,1980-  
Validação dos limites de quantificação para análise das contagens padrão em placas e de células somáticas no leite por Citometria de fluxo /Rosemary dos Santos Conrado. – 2023.  
97f: il

**Orientador:** Leorges Moraes da Fonseca  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.  
Bibliografias: f: 87 a 97.

1. Leite - Análise - Teses - 2. Leite – Qualidade – Teses - I. Fonseca, Leorges Moraes da - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROSEMARY DOS SANTOS CONRRADO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovado(a) em 10 de fevereiro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Leorges Moraes da Fonseca - Orientador(a)

Dr.(a). Elisa Helena Paz Andrade

Dr.(a). Juliana Soares Lima



Documento assinado eletronicamente por **Leorges Moraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 13/02/2023, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Helena Paz Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 13/02/2023, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Soares Lima, Usuária Externa**, em 13/02/2023, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2065292** e o código CRC **5ABB3150**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora, pela vida, saúde, proteção, por acompanhar-me em todos os momentos e por me proporcionar a conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais Dilceia e Adenilson, meus irmãos Johnny e Diego, minha bússola; por todo o carinho, por terem me dado valores, pela confiança e pelo estímulo...foram sem dúvida os maiores incentivadores.

Ao meu marido Paulo César, pela paciência, pela sua incansável boa vontade em querer ajudar, pela compreensão. Obrigada pela companhia, pela tolerância, por estar sempre ao meu lado e pelo amor que nos une.

Ao meu orientador querido, Professor Leorges, por ter me aceitado, acreditado em mim e permitido trabalhar ao seu lado, desde a época de estagiária do CEFET, pela ajuda em toda a trajetória, pela referência profissional e sobretudo pela amizade de décadas; fica meu carinho, meu respeito, minha admiração e imensa gratidão por tudo.

Aos professores e colegas do DTIPOA, agradeço pelos ensinamentos e pelo pronto auxílio, reitero minha estima e consideração. Principalmente ao professor Marcelo que aceitou o convite em me orientar no início do curso.

A Universidade Federal de Minas Gerais, minha escola, meu local profissional de tantos anos.

Aos colegas de turma do programa de pós-graduação, em especial a Ana Clara, Sinara, Letícia, Bárbara, Thaís e Larissa...nossos estudos, nossas conversas...enorme carinho por todas vocês.

Ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG, minha segunda casa, no qual respondo pela gerência técnica e da qualidade, agradeço pelos conhecimentos adquiridos.

Aos queridos integrantes e amigos do LabUFMG, Professor Ronon, Professora Mônica Leite, Professora Elisa, Adriana, Maria dos Anjos, Claudianne, Wendel, Raquel, Taynara, Wanderlan, Márcia e Patrícia, orgulho de fazer parte dessa equipe fenomenal!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, meu mais sincero muito obrigada!

## RESUMO

Nas últimas décadas, os avanços na tecnologia e na produção exigiram o desenvolvimento de métodos analíticos precisos e confiáveis. Inúmeros estudos para testes analíticos foram propostos criando diversos parâmetros de respostas que levam a conflitos de interpretação. Para comparar e verificar a confiabilidade desses métodos, agências e instituições reguladoras determinam e regulamentam normas que permitem sua validação, certificando como parâmetros metodológicos a serem seguidos. No Brasil, o INMETRO é a agência reguladora para validação de metodologias analíticas, orientando a validação de métodos através do documento DOQ-CGCRE-008, bem como as normas relativas a cada analito. A citometria de fluxo é fonte de pesquisa em metodologias analíticas para quantificação da contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite cru. No Brasil, essa metodologia é referenciada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), como a que deve ser seguida pelos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) para análise de CCS e CPP, em atendimento a Instrução Normativa 77 de 2018. O objetivo do presente estudo foi validar os limites de quantificação das contagens de CPP e CCS utilizando a metodologia de citometria de fluxo, seguindo o documento orientativo DOQ-CGCRE-008, assim como as normas relacionadas a cada analito. Em relação aos parâmetros analíticos empregados para a validação, a linearidade, a exatidão, a precisão e a avaliação da incerteza de medição foram avaliados antes da determinação dos limites de quantificação. A exatidão foi confirmada pela comparação de métodos (oficial e citometria de fluxo), em que se observou correlação positiva, também avaliada pela calibração usando material de referência certificado e pelo estudo do ensaio de proficiência por meio da avaliação do Z score. A precisão foi confirmada pela repetibilidade e reprodutibilidade. A incerteza de medição foi avaliada no analito contagem de células somáticas. Após análises, observou-se que os dados estatísticos se encontravam dentro dos limites estabelecidos pelas normas e consonantes com os verificados na literatura. O presente estudo determinou como limite de quantificação 1 UFC x 1000/mL para contagem padrão em placas (CPP) e 1 célula x 1000/mL para contagem de células somáticas (CCS). Este trabalho evidencia a importância da validação de métodos, o que possibilita o conhecimento das limitações e da

confiabilidade das medidas realizadas, assim como os limites de quantificação determinados.

Palavras-chave: qualidade; leite; contagem bacteriana; contagem de células somáticas; citometria de fluxo; validação; limite de quantificação.

## **ABSTRACT**

In recent decades, advances in technology and production have required the development of accurate and reliable analytical methods. In order to compare and verify the reliability of these methods, regulatory agencies and institutions determine and regulate standards that allow their validation, certifying as required methodological parameters. In Brazil, INMETRO is the regulatory agency which validates analytical methodologies, through the document DOQ-CGCRE-008, as well as the standards related to each analyte. Flow cytometry is an analytical methodology used for quantification of microbial standard plate count (SPC) and somatic cell count (SCC) in raw milk samples. In Brazil, this methodology is referenced by the Ministry of Agriculture (MAPA), as the one to be followed by the laboratories of the Brazilian Network of Milk Quality Control Laboratories (RBQL) for analysis of SCC and SPC, in compliance with Instruction Normative 77 of 2018/MAPA. The aim of the present study was to validate the limits of quantification of SPC and SCC using the flow cytometry methodology, following the guidance document DOQ-CGCRE-008, as well as the rules related to each analyte. The analytical parameters used for validation (linearity, accuracy, precision and uncertainty) were evaluated before determining the limits of quantification. Accuracy was confirmed by methods comparison, where a positive correlation was observed between methods, also assessed by calibration using certified reference material and by studying the proficiency test through the evaluation of the Z score. Accuracy was confirmed by repeatability and reproducibility. Measurement uncertainty was assessed on the somatic cell count analytic. Accuracy was confirmed by repeatability and reproducibility. Uncertainty was measured for the somatic cell count. After analyses, it was observed that the statistical data were within the limits established by the norms and consistent with those found in the literature. The present study determined as quantification limit: 1 UFC x 1000/mL for SPC and 1 cell x 1000/mL for SCC. This work highlights the importance of method validation, which enables knowledge of the limitations and reliability of the measurements, such as the quantification limits.

Keywords: quality; milk; bacterial count; somatic cell count; flow cytometry; validation; limit of quantification.



## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Médias geométricas das amostras de leite cru refrigerado para CPP x 1.000 UFC/mL e CCS x 1.000 cél/mL no Brasil, entre 2013 e 2020.....   | 27 |
| Figura 2: Médias aritméticas nacionais de Lactose (g/100g), Gordura (g/100g) e Proteína (g/100g) das amostras de leite cru refrigerado analisadas por ano na RBQL, entre 2013 e 2020 .....  | 28 |
| Figura 3: Médias aritméticas nacionais de Sólidos Totais (g/100g) e Sólidos Não Gordurosos (g/100g) das amostras de leite cru refrigerado analisadas por ano na RBQL, entre 2013 e 2020.....  | 28 |
| Figura 4: Exemplo típico de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “Faixa de trabalho”, “Faixa Linear de Trabalho”, “Sensibilidade”, “Limite de Detecção (LD)” e “Limite de Quantificação (LQ)” .....               | 37 |
| Figura 5: Equipamento Combiscope <sup>TM</sup> FTIR, composto pelo citometro de fluxo, através do equipamento integrado Somascope (Delta Instruments, Drachten, Holanda) .....  | 42 |
| Figura 6: Fluxograma para a metodologia de análise da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo, no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG seguindo as diretrizes da ISO 13366/IDF 148 Part 2, 2006..... | 43 |
| Figura 7: Estrutura química de um cátion de DAPI.....   | 44 |
| Figura 8: Esquema do princípio da citometria de fluxo aplicada à análise da contagem de células somáticas.....  | 45 |
| Figura 9: Exemplo de histograma, extraído do visor do equipamento Somascope, representando o número de células somáticas no eixo vertical e o tamanho das células no eixo horizontal.....   | 46 |
| Figura 10: Diagrama de Ishikawa para análise das fontes de incerteza da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo, no LabUFMG.....   | 51 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 11: Equipamento BactoScan FC da Foss Electric A/S, para análise de CBI/ $\mu$ L em leite cru, por meio da metodologia por citometria de fluxo.....  | 55 |
| Figura 12: Percurso da amostra no fluxo laminar ( <i>flow cell</i> ) em equipamento de citometria de fluxo.....  | 56 |
| Figura 13: Fluxograma de procedimento adotado na recepção das amostras de leite cru refrigerado, no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite - LabUFMG para a execução das análises.....   | 58 |
| Figura 14: Fluxograma da formação das amostras derivadas (alíquotas) sem conservante azidiol para análise de CPP/ $\mu$ L e equivalentes contendo o conservante azidiol, para análise de CBI/ $\mu$ L para serem analisadas pela metodologia de referência por contagem padrão em placas e por citometria de fluxo, respectivamente..... | 59 |
| Figura 15: Linearidade apresentada pelos valores de contagens de células somáticas obtidos entre os valores de referência e os obtidos pela citometria de fluxo.....   | 63 |
| Figura 16: Carta controle representando o nível 1 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.....  | 66 |
| Figura 17: Carta controle representando o nível 2 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.....  | 66 |
| Figura 18: Carta controle representando o nível 3 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.....  | 67 |
| Figura 19: Teor de células somáticas (CS/ $\mu$ L) determinadas por citometria de fluxo nos três ensaios de proficiências avaliados em comparação ao método microscopia direta, em faixas distintas de concentração.....   | 69 |

Figura 20: Curva analítica (CBI/ $\mu$ L) obtida por meio de 12 determinações de amostras em diferentes concentrações, em triplicata, no equipamento Bactoscan por citometria de

fluxo.....75

Figura 21: Carta controle adquirida do resultado da reprodutibilidade intralaboratorial entre os equipamentos Bactoscan por citometria de

fluxo.....79

Figura 22: Comparação entre os métodos de referência e o método de citometria de fluxo para análise de CPP, representados pela curva linear.....81

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Requisitos físicos e químicos estabelecidos para leite cru refrigerado segundo a Instrução Normativa nº 76, de 2018, do MAPA.....   | 26 |
| Tabela 2: Requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas estabelecidos para leite cru refrigerado segundo a Instrução Normativa nº 76, de 2018, do MAPA.....  | 26 |
| Tabela 3: Valores de CCS x 1.000 cél/mL obtidos após análise em quadruplicata no equipamento Somascope por citometria de fluxo, como descrito na norma ISO 13366:2006 .....   | 62 |
| Tabela 4: Resultados obtidos para o cálculo do desvio padrão relativo (Sr%), critérios de aceitabilidade e diferença absoluta entre amostras individuais, segundo normas ISO 8196-2 (IDF 128-2) e ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2).....                                 | 64 |
| Tabela 5: Dados para avaliação da exatidão do método de citometria de fluxo para contagem de células somáticas, obtidos a partir da calibração do equipamento Somascope utilizando três níveis do material de referência certificado, fornecido pelo LFDA/MAPA..... | 65 |
| Tabela 6: Valores do material referência (método da microscopia direta) e os resultados das determinações de CCS pelo método de citometria de fluxo, dos três ensaios avaliados para a comparação de métodos.....   | 68 |
| Tabela 7: Determinações dos resultados após calibração do equipamento Somascope usando os padrões de baixa, média e alta contagem de células somáticas em leite cru, para compor o cálculo da incerteza de medição.....   | 70 |
| Tabela 8: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de baixa contagem (197 CS/ $\mu$ L) .....  | 71 |
| Tabela 9: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de média contagem (413 CS/ $\mu$ L) .....  | 71 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 10: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de alta contagem (858 CS/ $\mu$ L).....  | 72 |
| Tabela 11: Resultados das 30 amostras de branco analisadas em duplicata no equipamento Somascope por citometria de fluxo para determinação do desvio padrão.....   | 73 |
| Tabela 12: Valores de CBI/ $\mu$ L obtidos após análise em triplicata no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo de amostras de branco e amostras com contagens variadas.....  | 74 |
| Tabela 13: Resultados obtidos na análise em duplicata de amostras com contagem bacteriana média de 3.690 CBI/ $\mu$ L no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo, assim como o desvio padrão da média.....                             | 76 |
| Tabela 14: Resultados em CBI/mL e em Log <sub>10</sub> das médias das amostras piloto analisadas em duplicata, nos equipamentos Bactoscan FOSS 01 – CBT03 e FOSS 02 – CBT04 por citometria de fluxo para avaliação da reprodutibilidade..... | 78 |
| Tabela 15: Resultados em Log <sub>10</sub> dos resultados gerados pelo método de referência CPP e os resultados gerados no equipamento Bactoscan FC – FOSS02- CBT04, por citometria de fluxo, também em Log <sub>10</sub> .....              | 80 |
| Tabela 16: Valores de referência de BCS e PCS e as médias de leitura obtidas no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo.....   | 82 |
| Tabela 17: Resultados obtidos no ensaio de proficiência realizado pelo MAPA, no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo.....   | 83 |
| Tabela 18: Valores de amostra branco determinados no equipamento Bactoscan, por citometria de fluxo, já convertidos para UFC/mL e a estatística descritiva.....  | 84 |

## Lista de Quadros

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1: Composição centesimal média do leite de vaca .....   | 20 |
| Quadro 2: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio, segundo documento orientativo DOQ-CGCRE-008 de 09 de junho de 2020.....   | 33 |
| Quadro 3: Critérios de repetibilidade avaliados, de acordo com o item 11.1 da norma ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2) .....   | 49 |
| Quadro 4: Valores das faixas de precisão, representada pela reprodutibilidade intralaboratorial para CCS estabelecidas na norma ISO 13366-2 / IDF 148-2.....   | 53 |
| Quadro 5: Critérios de julgamento relativos ao Z score para avaliação dos programas de ensaio de proficiência realizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária entre os laboratórios da RBQL para o ensaio de contagem de células somáticas..... | 68 |
| Quadro 6: Critérios de julgamento relativos ao Z score para avaliação dos programas de ensaio de proficiência realizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária entre os laboratórios da RBQL.....  | 83 |

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | 17 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>   | 19 |
| 2.1 Qualidade do Leite  | 19 |
| 2.1.1 Composição  | 20 |
| 2.1.2 Contagem de células somáticas   | 21 |
| 2.1.3 Contagem padrão em placas   | 23 |
| 2.2 Aspectos legais quanto a contagem de células somáticas, contagem padrão em placas e composição do leite cru refrigerado | 25 |
| 2.3 Método de Análise dos parâmetros de contagem de células somáticas e contagem padrão em placas em laboratórios da RBQL   | 29 |
| 2.4 Métodos de ensaio qualitativos e quantitativos  | 30 |
| 2.5 Validação de métodos de ensaio  | 30 |
| 2.5.1 Seletividade  | 34 |
| 2.5.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho  | 34 |
| 2.5.3 Linearidade – sensibilidade (inclinação da curva)   | 35 |
| 2.5.4 Limite de detecção (LD)   | 35 |
| 2.5.5 Limite de quantificação (LQ)  | 36 |
| 2.5.6 Tendência/recuperação   | 37 |
| 2.5.7 Precisão  | 38 |
| 2.5.8 Robustez  | 39 |
| 2.5.9 Incerteza de medição  | 39 |
| <b>3.HIPÓTESES</b>  | 40 |
| <b>4.OBJETIVOS</b>  | 40 |
| 4.1 Objetivo geral  | 40 |
| 4.2 Objetivos específicos   | 40 |
| 4.2.1 Avaliar os parâmetros de desempenho para análise das contagens de células somáticas, sendo eles:                      | 40 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.2 Avaliar os parâmetros de desempenho para análise de contagem padrão em placas, sendo eles:.....   | 40        |
| <b>5.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>41</b> |
| 5.1 Análises laboratoriais.....   | 41        |
| 5.2 Procedimentos realizados para determinação dos parâmetros de validação do limite de quantificação para análise da contagem de células somáticas, segundo norma ISO 13366/IDF 148 Parte 2, 2006 .....                            | 42        |
| 5.2.1 Determinação do <i>carry-over</i> .....   | 43        |
| 5.2.2 Metodologia de análise por citometria de fluxo no equipamento Somascope .....   | 44        |
| 5.2.3 Validação analítica.....  | 46        |
| 5.2.3.1 Linearidade.....  | 47        |
| 5.2.3.2 Precisão.....   | 47        |
| 5.2.3.3 Exatidão.....   | 49        |
| 5.2.3.4 Incerteza de medição .....  | 51        |
| 5.2.3.5 Limite de Quantificação.....  | 53        |
| 5.3 Procedimentos realizados para determinação dos parâmetros de validação do limite de quantificação para análise da contagem padrão em placas, segundo normas ISO 16297:2020 (IDF 161:2020) e ISO 21187:2021 (IDF 196:2021) ..... | 54        |
| 5.3.1 Metodologia de análise por citometria de fluxo no equipamento Bactoscan FC ....   | 55        |
| 5.3.2 Validação analítica.....  | 57        |
| <b>6.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>62</b> |
| 6.1 Contagem de Células Somáticas .....   | 62        |
| 6.2 Contagem padrão em placas.....  | 74        |
| <b>7.CONCLUSÃO .....</b>  | <b>85</b> |
| <b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>87</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em nutrientes, tendo em sua composição altos teores de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água, sendo considerado um dos produtos mais completos por seu valor nutricional. É utilizado na dieta humana em todas as faixas etárias. Portanto, conhecer a composição e os padrões de qualidade do leite é necessário, visto que o não cumprimento desses parâmetros de controle pode levar a ingestão de um produto de qualidade indesejável (Silva *et al.*, 2015).

No entanto, devido a sua qualidade intrínseca, há o permanente risco desse produto veicular microrganismos patogênicos ou mesmo passar por adulterações durante seu processamento. Em ambas as circunstâncias, o produto pode ser prejudicial à saúde do consumidor (Evangelista, 2008).

A busca por melhoria na qualidade do leite é um tema muito discutido, pois além de tornar o produto mais seguro para o consumo, aumenta a vida de prateleira e torna o setor laticinista brasileiro mais competitivo frente ao mercado internacional (Leite, 2006).

Parâmetros físico-químicos, microbiológicos e higiênico-sanitários são utilizados para verificação da qualidade do leite, como por exemplo, a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem padrão em placas (CPP). Porém, os problemas relacionados à produtividade e à qualidade do leite cru ainda são frequentes e graves, principalmente devido a riscos sanitários e à excessiva contaminação por microrganismos. O maior problema no Brasil inicia no comprometimento da qualidade ainda na propriedade produtora, quando muitas vezes o leite já é produzido com altas contagens de microrganismos (Evangelista, 2008; Marioto *et al.*, 2020).

Assim, para monitorar essa realidade, é importante que haja constante inspeção da matéria-prima, por meio de análises do leite cru. A responsabilidade desse monitoramento é da indústria laticinista, a qual, realiza diariamente análises na recepção ou a cada carregamento de leite que chega mensalmente, além de coletar amostras nas propriedades rurais e enviar para laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Essas análises são baseadas nos parâmetros físico-químicos, nutricionais, qualidade microbiológica e investigação da presença de resíduos de uso veterinário, definidos em legislação nacional vigente. Os

resultados de qualidade obtidos são fundamentais para o direcionamento das ações nos rebanhos, para melhoria da qualidade da matéria prima, garantindo um melhor rendimento, nas fazendas, nas indústrias e para a oferta de produtos lácteos mais seguros e nutritivos para a população (Ribeiro, 2021).

Perante os desafios decorrentes da diversidade e contínua evolução do setor em questão, os laboratórios da RBQL que promovem as análises do leite cru necessitam demonstrar competência técnica para os ensaios que realizam, assegurando confiabilidade e comparabilidade dos resultados, os quais, podem subsidiar as tomadas de decisão relativas aos aspectos econômicos, de defesa do consumidor e de saúde pública (ABNT, 2017).

Ressalta-se que para a realização das análises previstas pela legislação pertinente, vários métodos analíticos podem ser utilizados em cada uma das determinações exigidas. Esses métodos são comumente divididos em métodos convencionais ou de referência e métodos rápidos, sendo vários desses métodos regulamentados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (Brasil, 2018).

Considerando a demanda por métodos analíticos rápidos e confiáveis, o objetivo do presente estudo foi validar os limites de quantificação (LQ) para análise da contagem células somáticas (CCS) e da contagem padrão em placas (CPP) por citometria de fluxo seguindo o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), assim como as normas relacionadas a cada parâmetro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Qualidade do Leite

O leite é uma substância líquida secretada pelas glândulas mamárias de fêmeas sadias, sendo considerado de boa qualidade quando apresentam composição química, microbiológica, sensorial e contagem de células somáticas que atendam aos parâmetros de qualidade tecnológicos e/ou legais (Paixão *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2019).

A qualidade é o ponto chave para o leite no Brasil e no mundo. Sua busca, por meio de parâmetros microbiológicos e físico-químicos, requer conhecimentos que permitam identificar rapidamente problemas, determinar sua origem e tomar medidas para sua correção (Beloti, 2011). Para isso as boas práticas agropecuárias (BPA) são fundamentais para se obter um leite dentro dos requisitos obrigatórios, assim como a identificação de fraudes e quaisquer outras alterações que comprometam a segurança do produto final ofertado ao consumidor (Sandoval e Ribeiro, 2021).

Os principais elementos que definem a qualidade do leite são: a composição (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, sais minerais e vitaminas), a contagem de células somáticas, a contagem padrão em placas, a ausência de adulterantes (água adicionada ilegalmente, resíduos de inibidores, substâncias químicas e outros), a qualidade sensorial (odor, sabor, aspecto) e a temperatura de refrigeração (Brasil, 2018).

A qualidade do leite produzido pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais os associados ao manejo, à alimentação e ao potencial genético dos rebanhos, ou ainda, aqueles relacionados à coleta, transporte e armazenamento do leite, sendo que a refrigeração reduz a multiplicação microbiana no leite (Martins, *et al.*, 2013).

A sanidade das glândulas mamárias é outro fator decisivo na qualidade do leite. Durante o processo de ordenha a contaminação bacteriana pode ocorrer pelo úbere, pelas mãos do manipulador, pelos equipamentos de ordenha, ou ainda, pelos recipientes mal higienizados utilizados na ordenha. Nesses casos, a contaminação maior é por microrganismos de mastite contagiosa. Essa contaminação pode ocorrer ainda por causa de mastite, que pode ser causada tanto por patógenos contagiosos como por microrganismos ambientais (Jamas *et al.*, 2018).

Para que se minimize a contaminação, cuidados como a higiene do manipulador, higiene de ordenha, tratamento das vacas doentes, limpeza e desinfecção diária de todos os equipamentos utilizados na ordenha são imprescindíveis. Além disso, o resfriamento do leite logo após a ordenha e a manutenção de baixas temperaturas após a coleta granelizada são outras medidas importantes para garantir a qualidade microbiológica do leite. Ou seja, a implementação de boas práticas nas etapas de produção e obtenção do leite é fundamental, chamadas de boas práticas agropecuárias (BPA) (Jamas *et al.*, 2018).

### 2.1.1 Composição

Entende-se por leite sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (Brasil, 2017).

O leite é uma combinação de várias substâncias na água, podendo ser classificado como uma emulsão de glóbulos de gordura dispersos na fase aquosa ou uma suspensão de micelas de caseína, proteínas globulares e lipoproteínas. Além disso, contém em solução lactose, proteínas hidrossolúveis, minerais e outros compostos (Vidal e Netto, 2018). A composição média do leite é de 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais. Do total de sólidos, 3,9% correspondem a gordura, 3,2% a proteína, 4,6% a lactose e 0,90% aos minerais e vitaminas (Quadro 1) (Harding, 1995). A determinação da composição centesimal do leite é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros produtos (Leite, 2006).

Quadro 1: Composição centesimal média do leite de vaca

| <b>Constituinte</b>         | <b>Teor (%)</b> |
|-----------------------------|-----------------|
| <b>Água</b>                 | 87,4            |
| <b>Gordura</b>              | 3,9             |
| <b>Proteína</b>             | 3,2             |
| <b>Lactose</b>              | 4,6             |
| <b>Sólidos Totais</b>       | 12,6            |
| <b>Minerais e vitaminas</b> | 0,9             |

Fonte: Adaptado de Harding (1995)

A gordura é o componente do leite que apresenta maior variabilidade. Esta variação pode ser observada, inclusive, entre vacas da mesma raça. A variabilidade dentro das raças é alta para o componente gordura, seguido pelo teor de sólidos não gordurosos, proteína e lactose (Nickerson, 1995). De acordo com Silva (2019) os dias em lactação, intervalo entre ordenhas, entre outros fatores das vacas também alteram a composição do leite.

O percentual de sólidos não gordurosos também pode variar em função do tipo de alimentação fornecida aos animais (Oliveira *et al.*, 1999). A dieta tem efeito marcante principalmente no teor de gordura do leite (Bondan, 2015; Oliveira, 2017). Segundo Vitalltech (2017), a proteína do leite é aumentada quando também é fornecida uma dieta com maior porcentagem de proteína. Kozerski *et al* (2017) concluíram que a dieta é a principal estratégia que o produtor pode usar para melhorar a composição do leite, respondendo por até 50% da variação dos teores de proteína e gordura.

Outro fator que altera a composição do leite é a estação do ano. No verão, há um maior volume de leite produzido, com menor porcentagem de gordura (no inverno acontece o contrário) (Ribeiro, 2021).

Já o conteúdo de lactose no leite é relativamente constante, porém o leite proveniente de vacas infectadas por microrganismos causadores de mastite e o colostro apresentam baixos teores de lactose (Kitchen, 1981).

O leite também é uma excelente fonte de vitaminas e sais minerais. Dentre os minerais e sais, destacam-se os bicarbonatos, os cloretos e os citratos de cálcio, magnésio, potássio e sódio. Dentre as vitaminas, destacam-se as lipossolúveis (A, D, E e K) e as hidrossolúveis (vitaminas do complexo B, C e ácido fólico) (Varnam e Sutherland, 1994).

### 2.1.2 Contagem de células somáticas

As células somáticas compreendem células brancas ou leucócitos, presentes no leite em resposta a danos do tecido, além de células epiteliais de descamação, resultado de um processo natural de reposição de células dentro da glândula mamária, ou ainda, de lesão física. Trata-se de um processo inflamatório da glândula mamária, podendo ser de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e/ou

infecçiosa (Philpot e Nickerson, 2002; Brito, 2021). A saúde dos animais a serem ordenhados pode afetar diretamente o produto. Desta forma, a CCS é utilizada como ferramenta para avaliação e monitoramento da saúde do úbere e qualidade do leite (Müller, 2002).

A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica, considerando-se a forma de apresentação. Entretanto, a forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos é a subclínica. Nesta, não há alterações visíveis no leite e no úbere. Para sua detecção é imprescindível a realização de testes para evidenciar a infecção ou a comprovação do aumento do número de células somáticas (Brito *et al.*, 2002; Langoni, 2013). É uma doença de caráter complexo e multifatorial envolvendo diversos patógenos, o ambiente e fatores inerentes ao animal. Estima-se que 90% seja de origem bacteriana, sendo *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* os principais agentes relacionados à mastite contagiosa (Lopes *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016). Além de causar prejuízos econômicos para produtores de leite e indústrias, os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite podem causar doenças no homem, como intoxicação estafilocócica, listeriose, campilobacteriose entre outras (Philpot e Nickerson, 2002).

Como resultado da resposta inflamatória durante a mastite são observadas intensas mudanças nas concentrações tanto dos principais componentes como proteína, gordura e lactose, quanto dos componentes encontrados em menores níveis no leite (minerais e enzimas). É importante considerar que há aumento da permeabilidade vascular, o que contribui para a passagem de elementos do sangue para o leite. Para as indústrias, a ocorrência de tais alterações significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos produtos lácteos (Kitchen, 1981; Fonseca, 2005; Leite, 2006; Evangelista, 2008).

Em outros casos foi observada a redução dos teores de proteína e da lactose e aumento do teor de gordura. Este aumento da concentração de gordura pode ter sido ocasionado pela diminuição da produção de leite devido à infecção da glândula mamária (Silva *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2016).

Em um estudo conduzido por Zimermann e Araújo (2017) para verificar os principais agentes causadores de mastite bovina, e sua susceptibilidade aos antimicrobianos a partir de amostras de leite no município de Campo Mourão (PR) foram encontrados *Staphylococcus* spp. (58,97%), *Streptococcus* spp. (33,33%),

*Enterococcus* ssp. (12,82 %), *Bacillus* spp. (10,25%), *Corynebacterium* spp. (10,25%), *Escherichia coli* (12%), *Yersinia* spp. (2,56%), e *Klebsiela* spp. (2,56%).

### 2.1.3 Contagem padrão em placas

Ainda nos alvéolos, em situação normal, o leite é considerado praticamente estéril. Entretanto, ao ser ordenhado, o leite pode se contaminar por um pequeno e bem definido número de microrganismos, provenientes dos canais lactíferos, da cisterna da glândula e do canal do teto (IDF, 1980; Fonseca e Santos, 2000). Em caso de ordenha higiênica e de animais sadios o leite pode atingir uma carga bacteriana baixa, entre 500 a 1000 UFC/mL. Depois de secretado, o leite pode ser contaminado por microrganismos na glândula mamária ou a partir da superfície do úbere e tetos, de equipamentos e utensílios de ordenha mal higienizados. Quando o leite é coletado e armazenado em tanques de expansão, a temperatura assim como o tempo de armazenamento e transporte são fatores importantes para a qualidade, uma vez que estão diretamente relacionados com a multiplicação dos microrganismos presentes no leite, afetando, conseqüentemente, a contagem bacteriana. A higiene dos equipamentos, o manejo de lavagem da ordenha, a qualidade da água e a higiene do úbere do animal também são estratégicos para manter os microrganismos em níveis baixos (Fonseca e Santos, 2000; Gigante, 2004; Guerreiro *et al.*, 2005; Evangelista, 2008).

A contagem bacteriana do leite tem influência no processamento tecnológico e pode ser problema em relação à saúde pública. Tecnicamente, diversos prejuízos devido à alta contagem bacteriana, tem sido enumerados. Entre eles, destacam-se os problemas com acidificação e coagulação, gelificação, sabor amargo, aumento da viscosidade, coagulação sem acidificação, alteração de cor, produção de sabores e odores variados. Estas alterações causam redução da vida de prateleira e diminuição do rendimento industrial (Gigante, 2004).

Além dos problemas de qualidade citados, as condições inadequadas de manejo na ordenha, no armazenamento e no transporte do leite podem acarretar risco à saúde pública, devido à ação de bactérias patogênicas, especialmente quando o leite é consumido cru. Entre as principais bactérias que podem ser veiculadas pelo leite, citam-se *Listeria* spp, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp, *Mycobacterium*, entre outras (Brito, 1999).

De acordo com a *International Standard 4833* (2003), a técnica de contagem padrão em placas, consiste na enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis, após incubação das placas à  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas  $\pm$  3 horas em meio ágar padrão para contagem (plate count ágar - PCA). É realizada a incubação das placas invertidas e após o tempo supracitado, a enumeração das unidades formadoras de colônias. Nesse método, portanto, contam-se colônias e não bactérias e na maioria das vezes, uma colônia é formada por várias bactérias.

Um exemplo seria uma amostra analisada pelo equipamento com uma contagem bacteriana individual (CBI) de 90.000 bactérias/mL, enquanto na contagem padrão em placas o resultado seria de aproximadamente 30.000 UFC/mL. Fica claro, portanto, que a CBI sempre será superior a UFC. De acordo com a legislação adota-se CPP (UFC/mL) para se definir os padrões de qualidade do leite.

Entretanto, todos os demais métodos para contagem bacteriana do leite devem ser comparados à contagem padrão em placas por ser este o método de referência e os resultados obtidos devem ser expressos em UFC/mL, atendendo às determinações da Instrução Normativa nº 76 (Brasil, 2018).

Para atender a demanda exigida pelo MAPA, a análise de contagem bacteriana total em leite cru é realizada pela metodologia conhecida como citometria de fluxo. Essa técnica consiste na adição de brometo de etídio ao leite, para que o DNA e RNA das bactérias sejam corados.

Os laboratórios da RBQL do MAPA realizam a determinação da contagem padrão em placas (CPP) através de equipamentos de citometria de fluxo e os resultados são originalmente expressos em contagem bacteriana individual (CBI). Como a Instrução Normativa nº 76 utiliza contagens como UFC/mL, os resultados em CBI dos equipamentos precisam ser convertidos para Unidade Formadora de Colônia (UFC).

No ano de 2004, a IDF publicou a IDF-196 (ISO 21187). Esta norma define como deve ser elaborada a equação para transformar os resultados de CBI para UFC. Basicamente a norma define que cada laboratório deve desenvolver a sua equação de transformação. Para isso, amostras de leite devem ser analisadas pelo equipamento e ao mesmo tempo através da contagem padrão em placas. Assim, é possível criar uma relação entre CBI e UFC e chegar à equação de transformação.



## 2.2 Aspectos legais quanto a contagem de células somáticas, contagem padrão em placas e composição do leite cru refrigerado

O setor de leite no Brasil tem passado por perceptíveis mudanças desde a publicação da Instrução Normativa Nº 51 em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e atualmente com a entrada em vigência das Instruções Normativas 76 e 77 do MAPA, em 2018, que preconizam o monitoramento constante dos parâmetros de qualidade.

Assim, um dos fatos mais importantes para o setor leiteiro nos últimos anos foi a criação dessas diretrizes, que determinam variáveis de avaliação da qualidade do leite cru refrigerado. De acordo com essas determinações, análises de composição (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos), contagem padrão em placas e contagem de células somáticas de todo o leite cru produzido no país e processado em estabelecimentos sob fiscalização, deverão ser realizadas mensalmente em laboratórios credenciados pelo próprio MAPA.

Visando atender à demanda por essas análises, foi criada pela Instrução Normativa Nº 37, de 18/04/2002 a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), composta por um conjunto de laboratórios distribuídos em áreas geográficas de abrangência estratégica, com a finalidade de monitorar e contribuir para o aperfeiçoamento da qualidade do leite cru no Brasil (Brasil, 2002). Os laboratórios integrantes da RBQL contam com equipamentos eletrônicos modernos para análises rápidas e precisas para atender as exigências legais. Ainda, é parte da RBQL um laboratório de referência, localizado em Minas Gerais no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – LFDA/MAPA. Essas análises devem ser feitas com frequência mínima de uma vez por mês. Ademais, o MAPA pode, também, colher amostras de leite cru, desde a propriedade rural até o estabelecimento processador, para realização de análises fiscais pontuais.

A Instrução Normativa nº 76, publicada em 26 de novembro de 2018, institui o Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características de qualidade que deve apresentar o leite cru refrigerado. As Tabelas 1 e 2 apresentam os requisitos físico-químicos e microbiológicos assim como a contagem de células somáticas estabelecidos para esse produto, respectivamente (Brasil, 2018).

Tabela 1: Requisitos físicos e químicos estabelecidos para leite cru refrigerado segundo a Instrução Normativa nº 76, de 2018, do MAPA.

| Requisitos (g/100g)    | Limites        |
|------------------------|----------------|
| Gordura                | Mínimo de 3,0  |
| Proteína total         | Mínimo de 2,9  |
| Lactose anidra         | Mínimo de 4,3  |
| Sólidos não gordurosos | Mínimo de 8,4  |
| Sólidos totais         | Mínimo de 11,4 |

Fonte: Adaptado de Brasil (2018)

Tabela 2: Requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas estabelecidos para leite cru refrigerado segundo a Instrução Normativa nº 76, de 2018, do MAPA.

| *Requisitos  | Médias Geométricas Trimestrais |
|--------------|--------------------------------|
| CPP (UFC/mL) | Máximo de 300.000              |
| CCS (CS/mL)  | Máximo de 500.000              |

CPP: Contagem Padrão em Placas; UFC: Unidades formadoras de colônia;

CCS: Contagem de Células Somáticas; CS: Células somáticas

\*Índice medido por propriedade rural ou por tanque comunitário

Fonte: Adaptado de Brasil (2018)

A legislação nacional (Brasil, 2018) estabelece o limite de contagem bacteriana total em UFC/mL, medida que estima a contagem bacteriana do leite a partir da enumeração de bactérias mesófilas, e não a contagem bacteriana individual (CBI). Sendo assim, os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo são transformados estatisticamente, aplicando-se uma equação de correlação entre os métodos. A conversão da contagem bacteriana individual (CBI) em contagem padrão em placas (CPP) ocorre por meio de um modelo matemático específico, desenvolvido a partir de vários pares de valores de contagens bacterianas individuais e respectivos valores de contagem padrão em placas (Brasil, 2016). Esta equação é elaborada conjuntamente entre o MAPA e os laboratórios pertencentes a RBQL. Para formular a equação são compilados os dados de comparação dos resultados extraídos dos equipamentos de análise e aqueles oriundos das análises pelo método de referência, assim como dados avaliados pelos critérios de regiões, mesorregiões e estações do ano. Atualmente (2022), são empregadas duas equações, uma relacionada a região Sul do país e a outra às regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, sendo o uso desta equação autorizada somente aos laboratórios pertencentes a RBQL.

A contagem padrão em placas (CPP) constitui critério para vinculação e exclusão da captação de leite de determinados produtores. Propriedades rurais que apresentarem por três meses consecutivos resultados de média geométrica fora do padrão estabelecido para contagem padrão em placas (CPP) (300.000 UFC/mL), terão a coleta de leite interrompida pelo estabelecimento. Para o restabelecimento dessa coleta, deverá ser identificada a causa do desvio, adotadas ações corretivas e um resultado de análise de CPP que atenda à exigência legal, de acordo com a IN 76 de 2018 (Brasil, 2018).

De acordo com o relatório técnico “Evolução da qualidade do leite no Brasil: amostras de leite cru avaliadas pela RBQL entre 2013 e 2020”, criado pelo Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), percebe-se a evolução positiva da qualidade do leite no Brasil, principalmente para o parâmetro CPP. Foram avaliados resultados do leite cru refrigerado entregue a 1.260 estabelecimentos sob o Serviço da Inspeção Federal (SIF). Os dados consolidados com as médias geométricas nacionais das amostras analisadas para CPP e CCS estão apresentados na Figura 1. As Figuras 2 e 3 apresentam a composição centesimal com a média aritmética para cada parâmetro (Brasil, 2021).

Figura 1: Médias geométricas das amostras de leite cru refrigerado para CPP x 1.000 UFC/mL e CCS x 1.000 cél/mL no Brasil, entre 2013 e 2020.

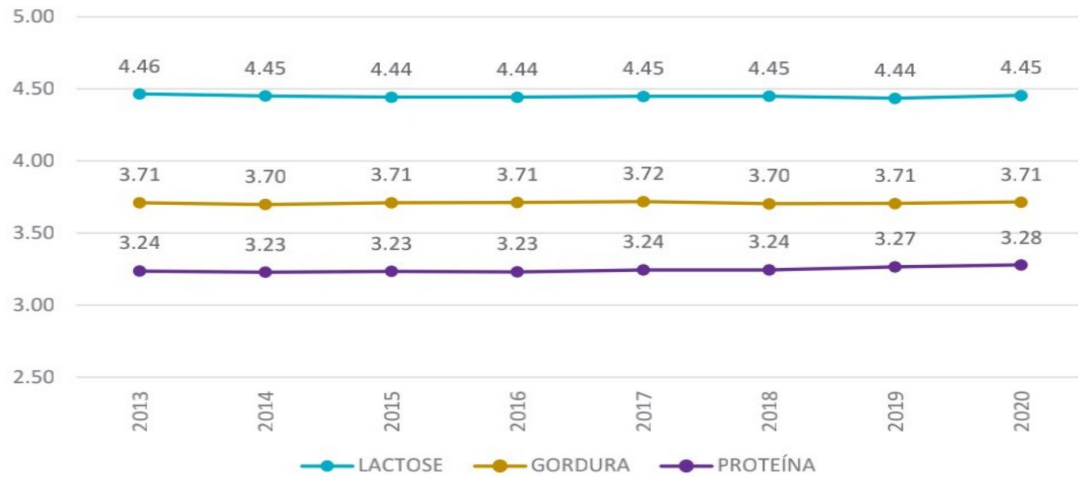


CPP: Contagem padrão em placas

CCS: Contagem de células somáticas

Fonte: Relatório Técnico, Brasil (2021).

Figura 2: Médias aritméticas nacionais de Lactose (g/100g), Gordura (g/100g) e Proteína (g/100g) das amostras de leite cru refrigerado analisadas por ano na RBQL, entre 2013 e 2020.



Fonte: Relatório Técnico, Brasil (2021).

Figura 3: Médias aritméticas nacionais de Sólidos Totais (g/100g) e Sólidos Não Gordurosos (g/100g) das amostras de leite cru refrigerado analisadas por ano na RBQL, entre 2013 e 2020.



ST: Sólidos totais

SNG: Sólidos não gordurosos

Fonte: Relatório Técnico, Brasil (2021).

### 2.3 Método de Análise dos parâmetros de contagem de células somáticas e contagem padrão em placas em laboratórios da RBQL

Toda a RBQL utiliza o mesmo método de análise dos parâmetros de qualidade do leite recomendados pelo MAPA. Para análise de CCS e CPP a metodologia utilizada é a citometria de fluxo, de acordo com a Instrução Normativa nº 77, de 2018, do MAPA.

No entanto, vale ressaltar que para a realização das análises laboratoriais, há a necessidade de uso de conservantes para preservar as amostras de leite cru no Brasil, em razão das grandes distâncias existentes entre as fazendas produtoras e os laboratórios credenciados. A adição do conservante bronopol às amostras destinadas às análises de CCS e de composição do leite é recomendada desde a coleta. O bronopol, composto de 2-bromo-2-nitro-1, 3 – propanodiol, natamicina e indicador de pH, é considerado bactericida (Kroger, 1985; Bertrand, 1996). Nas amostras destinadas à CPP, o azidiol, por ser bacteriostático, tem sido usado com sucesso na conservação de amostras de leite cru refrigerado. O azidiol tem os compostos ativos azida sódica e cloranfenicol (Brasil, 2002; Leite, 2006).

Os testes empregados para avaliar a qualidade do leite *in natura* compreendem o escopo analítico dos laboratórios pertencentes a RBQL, e dentre os parâmetros analisados está a determinação eletrônica da CCS e CPP pelo método de citometria de fluxo, visando à análise de rotina da qualidade do leite cru. Os equipamentos comumente empregados em laboratórios de controle da qualidade do leite baseiam-se na mensuração de pulsos eletrônicos após a emissão de fluorescência a partir da incidência de uma fonte de radiação laser em um marcador intercalado no material genético (celular ou bacteriano, dependendo do objeto da análise). O leite com o corante é injetado num capilar acoplado a um sistema óptico que recebe, constantemente, um feixe de laser. A intensidade e a altura dos pulsos de fluorescência são gravadas e usadas como parâmetros seletivos. Os pulsos selecionados são, então, traduzidos em contagens (Delta, 2007; Ribeiro *et al.*, 2018).

## 2.4 Métodos de ensaio qualitativos e quantitativos

Os métodos de ensaio podem ser classificados em quantitativos e qualitativos. Métodos quantitativos são definidos como aqueles que determinam a quantidade de um analito em uma amostra em valores numéricos de uma unidade de medida apropriada. Já os métodos qualitativos são aqueles que permitem a identificação do analito com base em suas propriedades físicas, químicas e biológicas (Cárdenas & Valcárcel, 2005).

O desenvolvimento de técnicas e de métodos confiáveis para a identificação e quantificação de componentes em matrizes complexas relacionadas à segurança alimentar, como cromatografia, espectrometria de massa e espectrofotometria, são ferramentas que envolvem investimentos altos e requerem analistas capacitados. Ainda, na rotina dos laboratórios, muitas vezes, torna-se inviável o processamento de milhares de amostras por métodos convencionais (Cárdenas & Valcárcel, 2005), sendo adotada uma primeira etapa para determinação da presença de um ou mais analitos, que são os métodos de triagens e uma segunda etapa que envolve a estimativa do nível de concentração dos mesmos que são os métodos de confirmação e quantificação. De acordo com o exposto, os métodos qualitativos têm sido comumente empregados para triagens antes da confirmação e quantificação, devido ao tempo e custo analítico reduzidos (Trullols *et al.*, 2005).

## 2.5 Validação de métodos de ensaio

A busca por metodologias analíticas que sejam confiáveis, comparáveis e reproduzíveis em ampla escala tem sido alvo de pesquisas constantes nos ramos da química analítica quantitativa e qualitativa assim como as análises microbiológicas (Chellini *et al.*, 2015). Para que uma metodologia analítica de identificação ou mesmo quantificação seja difundida como parâmetro de determinação para qualidade e certeza de resultados ela deve passar por um sistema de testes e verificações denominado validação (Swartz; Ira, 2018).

A validação de um método consiste em demonstrar que o mesmo é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa das substâncias de interesse. A validação deve garantir, por meio de

estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (La Roca *et al.*, 2007).

Estrategicamente, com o intuito de garantir a prestação de serviços com qualidade diante de uma demanda crescente, o MAPA, por meio da Instrução Normativa nº 57, de 11/12/2013, estabelece que laboratórios da RBQL credenciados devem possuir certificado de acreditação na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 emitido pela CGCRE/INMETRO em todo o escopo de análise. A norma ISO/IEC 17025:2017 é a norma internacional que trata dos requisitos para implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração (Brasil, 2013; ABNT, 2017).

Segundo a norma ISO/IEC 17025:2017, validar um método é confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Validação de metodologias analíticas é o primeiro passo para a garantia da qualidade em um laboratório. A garantia da qualidade analítica é o conjunto completo das medidas que um laboratório deve assegurar, a fim de conseguir dados de alta qualidade. Além do uso da validação e/ou das metodologias padronizadas, há outras medidas de controle da qualidade interna que devem ser seguidas, como: uso de materiais de referência, calibração de equipamentos, controle de documentos, participação em ensaios de proficiência e acreditação a um organismo internacional, normalmente NBR ISO/IEC 17025 (Taverniers; Loose; Bockstaele, 2004). É fundamental que os laboratórios disponham de meios, critérios e objetivos para comprovar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam, conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (ABNT, 2017).

Para orientar a validação, os órgãos ou agências responsáveis elaboram diretrizes que devem ser seguidas pelos laboratórios e analistas quando na execução de metodologias próprias de uso analítico (Coelho, *et al.*, 2018). Sendo assim, tais diretrizes, previamente estudadas e verificadas rotineiramente, quando adotadas pelos laboratórios fornecem a garantia de que os dados por eles produzidos são corroborados pelas próprias técnicas propostas e que carregam a confiabilidade da certificação estabelecida (Novaes *et al.*, 2017).

Os processos de validação se subdividem em duas classes principais denominadas validação no laboratório e validação completa. A primeira consiste em etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo ou para verificar um método existente, que consiste em técnicas de apuração da metodologia, levando-se em consideração os inúmeros dados coletados no mesmo laboratório, com o mesmo equipamento, analistas e condições repetidas do meio. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as etapas de validação, sem verificar a reprodutibilidade (Candioti *et al.*, 2014).

A validação completa consiste na verificação do método em diferentes laboratórios que integram uma rede análoga de determinação na qual o método de verificação será o mesmo, mas as condições laboratoriais, analistas e equipamentos serão distintos. Envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (Benevides *et al.*, 2014). De acordo com Ribani *et al.* (2004), a consolidação do método se dá quando a validação no laboratório e a completa reproduzem resultados consonantes.

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (2020), depois de cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante elaborar o procedimento operacional de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambiguidade.

No Brasil, os órgãos reguladores responsáveis pela validação de metodologias analíticas são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mais voltada para o ramo alimentício e farmacêutico e o INMETRO. O documento orientativo sugerido pelo INMETRO para validação de métodos é o DOQ-CGCRE-008 de 09 de junho de 2020 (INMETRO, 2020).

Documentos como o guia publicado pela EURACHEM (EURACHEM, 1998), a diretiva da União Europeia “*Commission Decision 2002/657/EC*” que estabelece



Regulamentos sobre Desempenho de Métodos e Interpretação de Resultados e o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC International*, *International Standards Organization – ISO* e *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*, são importantes referências internacionais que tratam da validação de métodos de ensaio (Gondim *et al.*, 2011).

Os parâmetros de desempenho para o procedimento apropriado de validação dependerão das condições do laboratório, do método utilizado, do tipo de amostra, dos componentes do mensurando, da calibração dos equipamentos e da disponibilidade de materiais de referência certificados. Devem estar claramente descritos no procedimento e relatório de validação e devem incluir, quando aplicável, os parâmetros apresentados no Quadro 2 (INMETRO, 2020).

Quadro 2: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio, segundo documento orientativo DOQ-CGCRE-008 de 09 de junho de 2020.

| Parâmetros   | Tipo de ensaio |              |
|--|----------------|--------------|
|  | Qualitativo    | Quantitativo |
| Seletividade   | ✓              | ✓            |
| Linearidade / faixa de trabalho / faixa linear de trabalho / sensibilidade |                | ✓            |
| Limite de detecção   | ✓              | ✓            |
| Limite de quantificação  |                | ✓            |
| Tendência / recuperação  |                | ✓            |
| Precisão   |                | ✓            |
| Robustez   | ( * )          | ( * )        |

(\*) parâmetro opcional

Fonte: INMETRO, 2020

Os parâmetros de desempenho dos métodos validados, conforme avaliados para uso pretendido, devem ser pertinentes e consistentes com os requisitos especificados. Essas características podem incluir, mas não estão limitadas a faixa de medição, exatidão de medição, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade do método, linearidade, repetibilidade ou reprodutibilidade, robustez e incerteza de medição dos resultados, a qual não está contemplada no Quadro 2, mas quando usada, demonstra maior integração dos outros parâmetros avaliados (ABNT, 2017).

Pelas disposições vigentes, o processo de validação passa por uma série de ensaios que incluem, dentre outros, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão, robustez e

outros parâmetros estatísticos de análise descritiva como a própria avaliação da incerteza de medição (INMETRO, 2020).

### 2.5.1 Seletividade

O parâmetro seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias, para a variável de resposta trabalhada, obtendo assim a relação de impurezas e interferentes que possam gerar identificações falsas no método estudado. Esse parâmetro deve ser continuamente verificado no decorrer dos testes para os demais parâmetros (Iammarino *et al.*, 2017; Goes Junior *et al.*, 2019).

Em diversas técnicas analíticas, a seletividade pode ser estabelecida pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições, deve-se proceder a análise seguida por outras técnicas comprobatórias. Outra maneira de avaliar a seletividade envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo (EMEA, 1995; Brito *et al.*, 2003).

### 2.5.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

A faixa de trabalho corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro selecionam a faixa de trabalho, baseada no nível de concentração do analito que desejam estudar e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear (EMEA, 1995; Brito *et al.*, 2003).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. (Leite, 2008; Ribani *et al.*, 2004).

### 2.5.3 Linearidade – sensibilidade (inclinação da curva)

A linearidade busca identificar um comportamento diretamente proporcional entre a variável medida e uma resposta dentro de um intervalo determinado (Barros *et al.*, 2002). Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (avaliado pelo teste “t” de *Student*), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um e coeficiente angular diferente de zero (Durand *et al.*, 2016; Leite, 2008).

### 2.5.4 Limite de detecção (LD)

O Limite de detecção indica o menor valor de uma variável (concentração) que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado para os limites de exatidão e precisão exigidos pelo método. Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual é o menor valor de concentração do analito ou propriedade que pode ser detectado pelo método (Santos *et al.*, 2014; Huber, 1998).

Quando métodos novos são desenvolvidos ou modificados para análise de traços, frequentemente LD é definido em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Entretanto, sendo o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método ou para comparação de instrumentos. Entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam a realidade. O LD pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (Amarante *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2003).

O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas

do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado (Huber, 1998).

#### 2.5.5 Limite de quantificação (LQ)

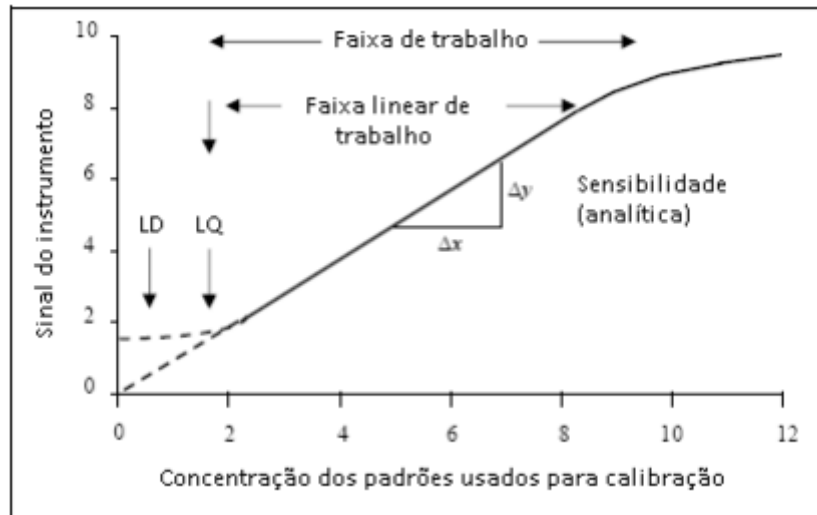
O LQ é um procedimento analítico individual definido como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (ICH, 2005). Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (Brito *et al.*, 2003). O limite de quantificação é importante para métodos quantitativos (INMETRO, 2020).

Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser quantificado.

Em trabalhos de validação de metodologia analítica o LD e o LQ são comumente obtidos com base nos parâmetros da curva analítica ou na razão sinal e ruído gerados nos equipamentos eletrônicos (Santos, 2018).

Na Figura 4, está representado o LQ, assim como outros parâmetros de desempenho em um exemplo típico de uma curva analítica.

Figura 4: Exemplo típico de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “Faixa de trabalho”, “Faixa Linear de Trabalho”, “Sensibilidade”, “Limite de Detecção (LD)” e “Limite de Quantificação (LQ)”.



Fonte: Eurachem Guide (2014)

### 2.5.6 Tendência/recuperação

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A exatidão é avaliada numericamente através da tendência (INMETRO, 2020).

A exatidão, definida como a concordância entre o valor do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação. Os quatro métodos principais, propostos para o estudo da exatidão, são baseados no uso de material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos. Os MRC, quando disponíveis, são os materiais de controle preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado (Brito, *et al.*, 2003).

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado. Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração, sendo que menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados, aumentando o limite de confiança (Amarante *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2003).

### 2.5.7 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Sendo usualmente expresso como desvio-padrão, variância e/ou coeficiente de variação (CV) de diversas médias (Ribani *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2003).

As formas mais comuns de expressar a precisão são através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. A precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, dentre outros. A reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios (interlaboratorial), mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias (Brito *et al.*, 2003).

A repetibilidade busca verificar a concordância dos valores coletados para uma metodologia obtidos nas mesmas condições de laboratório, equipamento, operadores, entre outras variáveis que possam influenciar o método, enquanto a reprodutibilidade busca concordância dos resultados obtidos para a mesma amostra e método, mas em condições distintas como equipamentos de mesmo princípio, porém diferentes analistas e laboratórios distintos (Chawla *et al.*, 2016; Santos, 2018). Ambos os parâmetros devem encontrar seus limites de divergência dentro dos resultados aceitáveis segundo a metodologia de validação seguida (Aguiar Júnior *et al.*, 2018).

### 2.5.8 Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado o resultado de análise, sob pequenas e conhecidas variações, e prover indicação da sua dependência durante o uso normal (Brito *et al.*, 2003).

A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são examinados simultaneamente, os efeitos de alterações em diferentes variáveis do método (Brito *et al.*, 2003).

Os testes de robustez, se aplicam para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório (Brito *et al.*, 2003).

Pequenas variações são impossíveis de serem excluídas dos testes estando presentes tanto na repetibilidade quanto na reprodutibilidade, gerando os erros aleatórios (Aguar Júnior *et al.*, 2018). Como forma de relativizar essas divergências, o parâmetro robustez mede a sensibilidade do método analítico frente a essas variações (Legrand *et al.*, 2018).

Uma boa robustez indica que o método se mantém confiável e exato frente às oscilações. Nos testes de validação, a robustez é avaliada por meio de uma pequena variação de parâmetros conhecidos, sendo então verificada a sua influência na resposta (Iammarino *et al.*, 2017).

### 2.5.9 Incerteza de medição

A incerteza de um resultado pode provir de muitas fontes possíveis, incluindo exemplos tais como amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (Ellison, Rosslein e Williams, 2012).

### 3.HIPÓTESES

A validação dos limites de quantificação para análise da contagem de células somáticas (CCS) e da contagem padrão em placas (CPP) baseadas na citometria de fluxo torna os resultados confiáveis e adequados à finalidade pretendida.

### 4.OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Validar os limites de quantificação para análise de contagem de células somáticas e de contagem padrão em placas baseados na citometria de fluxo seguindo normas internas.

#### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Avaliar os parâmetros de desempenho para análise das contagens de células somáticas, sendo eles:

- Linearidade,
- Precisão através da repetibilidade do método,
- Exatidão avaliada pelo uso de Material de Referência Certificado (MRC),
- Comparação de métodos,
- Avaliação da incerteza de medição,
- Parâmetros estatísticos descritivos,
- Limite de Quantificação (LQ).

4.2.2 Avaliar os parâmetros de desempenho para análise de contagem padrão em placas, sendo eles:

- Linearidade,



- Precisão através da repetibilidade e reprodutibilidade do método,
- Exatidão avaliada pelo uso de material de referência e programa de ensaio de proficiência (PEP),
- Parâmetros estatísticos descritivos,
- Limite de Quantificação (LQ).

## 5.MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Análises laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), credenciado pelo (MAPA) (Portaria SDA nº 334, de 12 de setembro de 2014) e acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (CRL 1008), no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG e em laboratório terceirizado acreditado também pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017.

As amostras de leite foram obtidas de tanques de refrigeração, após agitação prévia na Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé – MG. O leite foi coletado em latões de 10 litros, adicionado de conservante bronopol e enviado imediatamente para o LabUFMG, para a elaboração da amostra piloto usada na rotina do laboratório para as análises de contagem de células somáticas e de composição do leite cru refrigerado. Também foram usadas amostras de leite com contagens variadas de padrão em placas, enviadas por estabelecimentos de laticínios da região de Sete Lagoas e Pará de Minas. Parte dessas amostragens foram fracionadas e distribuídas em frascos estéreis de 40 mL contendo o conservante azidiol, outra parte em frascos de 40 mL, estéreis sem conservante. As amostras foram conservadas em câmara fria em temperatura de 1,8 °C a 6,5 °C, por um período de no máximo 168 horas, ligada a gerador e com temperatura controlada por *data logger* calibrado.

Adicionalmente foram selecionadas amostras de rotina do laboratório, que seriam descartadas após análise, assim como, resultados dos programas de ensaio

de proficiência (PEP) e amostras controle do próprio fornecedor do equipamento de citometria de fluxo.

5.2 Procedimentos realizados para determinação dos parâmetros de validação do limite de quantificação para análise da contagem de células somáticas, segundo norma ISO 13366/IDF 148 Parte 2, 2006

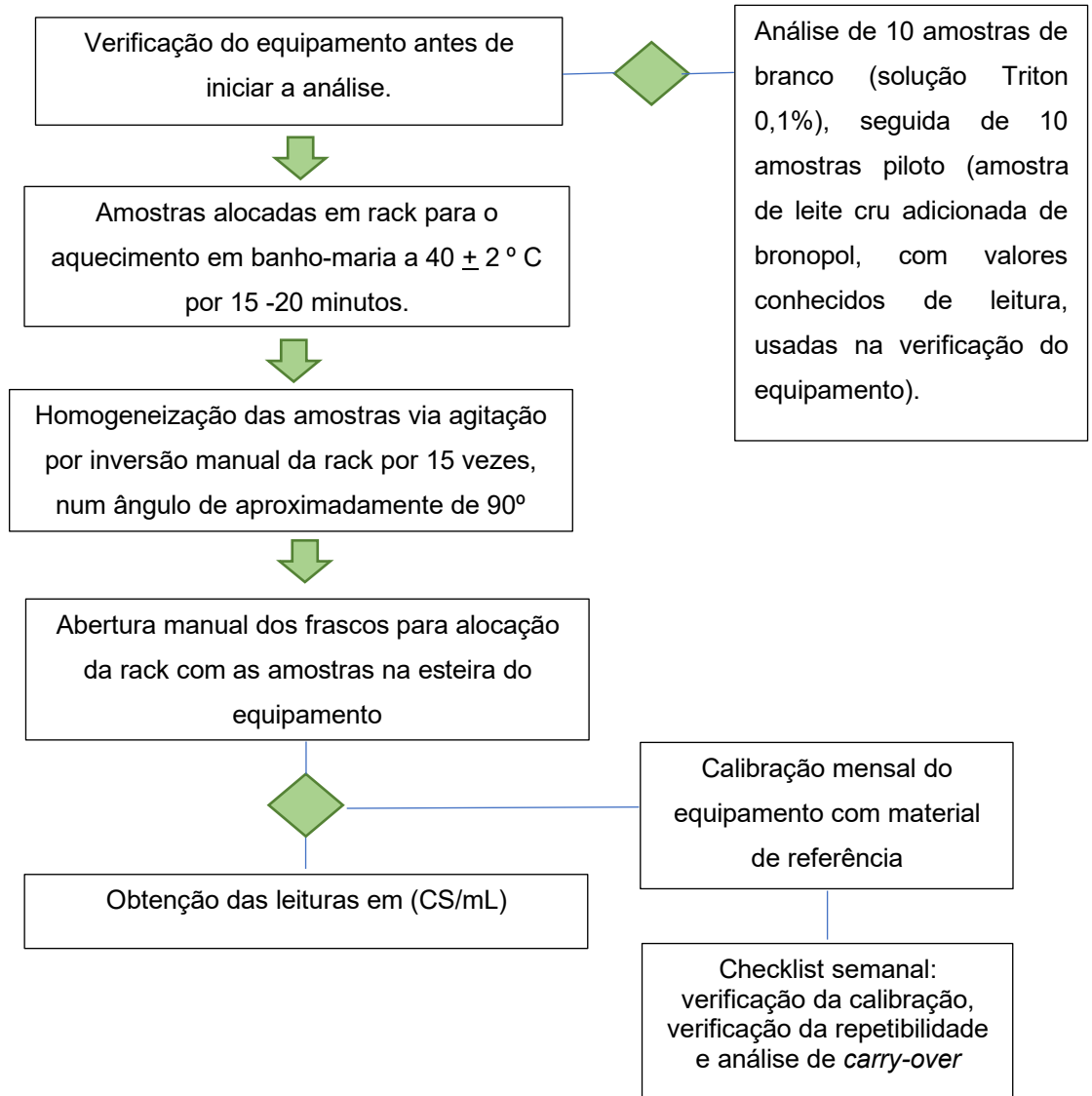
A validação experimental da contagem de células somáticas do leite foi realizada no LabUFMG por meio do citômetro de fluxo do equipamento Combiscope<sup>TM</sup> FTIR (Somscope; Delta Instruments, Drachten, Holanda), com capacidade analítica de até 300 amostras/hora (Figura 5), seguindo as diretrizes da ISO 13366/IDF 148 Parte 2, 2006, conforme fluxograma representado pela Figura 6.

Figura 5: Equipamento Combiscope<sup>TM</sup> FTIR, composto pelo citômetro de fluxo, por meio do equipamento integrado Somscope (Delta Instruments, Drachten, Holanda).



Fonte: Delta (2007)

Figura 6: Fluxograma para a metodologia de análise da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo, no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG seguindo as diretrizes da ISO 13366/IDF 148 Parte 2, 2006.



### 5.2.1 Determinação do *carry-over*

De acordo com o item 9.2 da norma ISO 13366/IDF 148 Part 2, 2006, uma alíquota da amostra anterior pode afetar o resultado da próxima amostra. Este efeito chamado “carry-over” deve ser checado por meio da mensuração de pelo menos cinco sequências de uma amostra teste com uma contagem de células somáticas de pelo menos 750.000 por mililitro, seguido de duas amostras de branco. O cálculo para esse efeito é expresso em percentagem, usando a equação:

$$CO = \frac{(\Sigma B_1 - \Sigma B_2)}{(\Sigma M - \Sigma B_2)} \times 100 \%$$

Onde

$B_1$  é o valor numérico da leitura para a primeira amostra em branco;

$B_2$  é o valor numérico da leitura para a segunda amostra em branco;

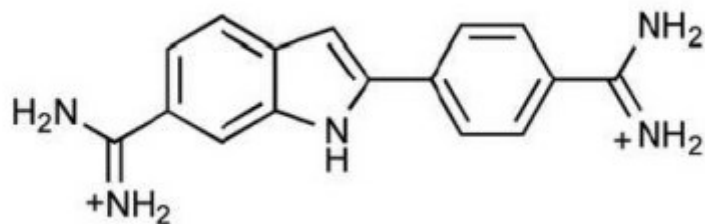
$M$  é o valor numérico da leitura para amostra teste.

O efeito carry-over resultante deve ser menos de 2%.

### 5.2.2 Metodologia de análise por citometria de fluxo no equipamento Somascope

Para a análise no equipamento Somascope por citometria de fluxo, uma alíquota da amostra, pré-aquecida a  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 a 20 minutos em banho-maria verificado por termômetro calibrado RBC, é aspirada para o interior do equipamento e conduzida a uma seringa contendo o corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se liga ao DNA das células. O DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um marcador fluorescente sintético, muito utilizado para marcar células vivas e DNA em experimentos de microscopia de fluorescência (Eriksson *et al.*, 1993). Na Figura 7, tem-se a estrutura do DAPI, que possui uma carga positiva em cada uma das suas extremidades, ou seja, é um cátion divalente.

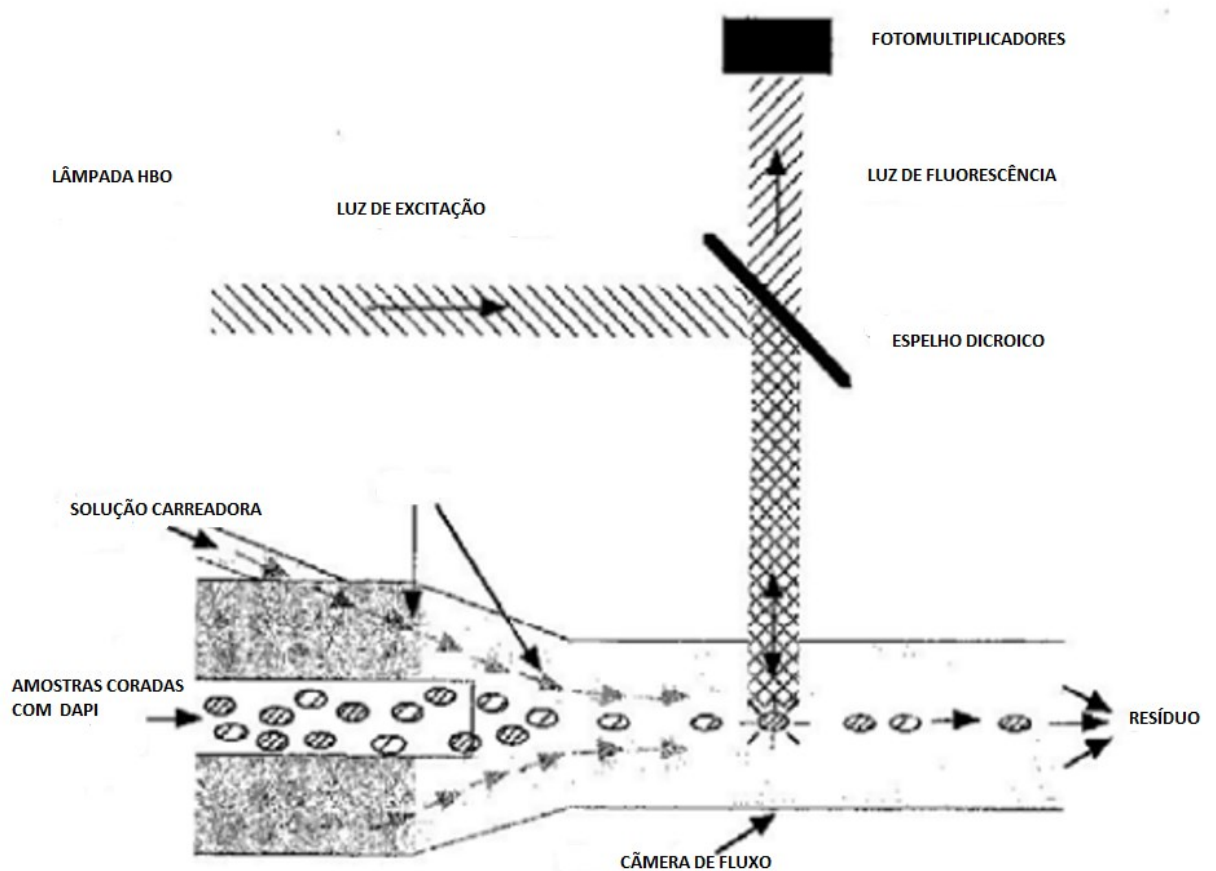
Figura 7: Estrutura química de um cátion de DAPI



Fonte: Eriksson, 1993

Após a inserção do corante DAPI, 50  $\mu\text{L}$  da amostra são conduzidos por um fluido para o citometro de fluxo, onde recebem incidência de raio laser. A luz fluorescente emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda adequado é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Figura 8).

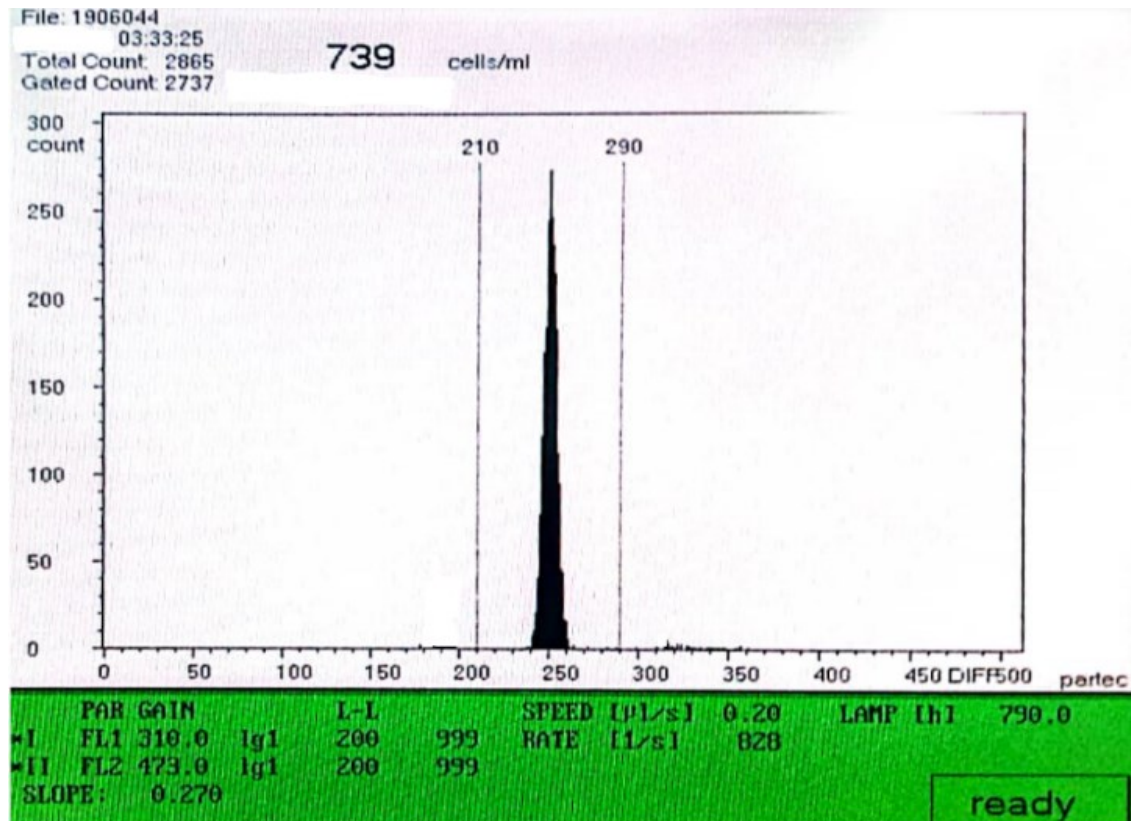
Figura 8: Esquema do princípio da citometria de fluxo aplicada à análise da contagem de células somáticas



Fonte: Adaptado de Delta, 2007

O histograma resultante representado pela Figura 9 representa o número de células no eixo vertical e o tamanho das células no eixo horizontal (Delta, 2007).

Figura 9: Exemplo de histograma, extraído do visor do equipamento Somascope, representando o número de células somáticas no eixo vertical e o tamanho das células no eixo horizontal.



Fonte: A autora (2022)

### 5.2.3 Validação analítica

Para validação analítica foram determinados os parâmetros adotados pelo regulamentador no âmbito nacional, INMETRO, como a linearidade, precisão, exatidão, avaliação da incerteza de medição, limite de quantificação (LQ) e parâmetros estatísticos descritivos.

### 5.2.3.1 Linearidade

A linearidade foi estabelecida seguindo o item 6.2.2 da ISO 13366-2:2006. Foram analisadas em quadruplicatas três amostras de referência oriundas do LFDA – MG com contagens de células somáticas conhecidas, uma amostra piloto e uma amostra branco (Solução de Triton 0,1%). Em seguida, foi calculada a média de cada amostra.

Para o resultado, aplicou-se a regressão linear com os valores esperados por amostra no eixo x e os valores medidos por amostra no eixo y. Usou-se a equação de regressão linear:

$$y = a + bx$$

Onde:

y = resposta medida

x = concentração

a = coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x = 0)

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade)

### 5.2.3.2 Precisão

A determinação da precisão foi confirmada pela verificação da repetibilidade da amostra controle utilizada na rotina do LabUFMG (amostra piloto), a qual refere-se à realização do método analítico dentro do mesmo laboratório em um curto período, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. De acordo com o item 9.6 da ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2), uma conferência de repetibilidade deve ser feita ao início de cada dia de trabalho seguindo as instruções do fabricante. Quando um elevado número de amostras for analisado rotineiramente com equipamento de alta capacidade, recomenda-se executar determinações de 10 réplicas em uma amostra piloto (amostra de leite cru adicionada de bronopol, com valores conhecidos de leitura, usadas na verificação do equipamento) ao início. Adicionalmente, recomenda-se

testar 20 amostras individuais diferentes duas vezes em sucessivos grupos em intervalos regulares, como por exemplo cerca de uma vez por semana.

Além da verificação da repetibilidade pela amostra controle, também foi realizada a verificação da mesma pelo método de 20 determinações da amostra de leite cru com bronopol, com contagens variadas analisadas em duplicata. De acordo com o item 9.6 da norma ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2), o desvio padrão relativo de repetibilidade deve ser calculado de acordo com a norma ISO 8196-2 - IDF 128-2, seguindo a equação:

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{2q} \sum_{i=1}^q W_i^2}$$

Onde:

$S_r$ : Desvio padrão da repetibilidade

$W$ : Diferença absoluta

$q$ : número de amostras

A diferença absoluta entre dois resultados de teste de amostras individuais independentes ( $r$ ), obtida usando o mesmo método em material teste idêntico no mesmo laboratório pelo mesmo operador usando o mesmo equipamento dentro de um curto intervalo de tempo, não deve ultrapassar 5% dos casos.

O Quadro 3 apresenta os critérios para avaliação da repetibilidade da contagem de células somáticas, o desvio padrão encontrado e a diferença absoluta entre as amostras individuais ( $r$ ).



Quadro 3: Critérios de repetibilidade avaliados, de acordo com o item 11.1 da norma ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2).

| Referência ISO 13366-2:2006 |     |                    |
|-----------------------------|-----|--------------------|
| CRITÉRIO                    |     |                    |
| CCSX1000/mL                 | Sr% | r<br>(CCSX1000/mL) |
| <=150                       | 6   | 25                 |
| 151 a 300                   | 5   | 42                 |
| 301 a 450                   | 4   | 50                 |
| 451 a 750                   | 3   | 63                 |
| 751 a 1500                  | 3   | 126                |

Sr%: Desvio padrão em percentual da repetibilidade

r: Diferença absoluta entre amostras individuais independentes

Fonte: ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2)

### 5.2.3.3 Exatidão

A exatidão que representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, foi avaliada após calibração do equipamento Somascope através do desvio padrão do material de referência certificado contendo 3 níveis de células somáticas. Para essa avaliação, os valores obtidos pelo laboratório, como a média e o desvio padrão amostral, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Um modo de avaliar a exatidão é por meio do cálculo do erro relativo (ER), expresso em percentagem conforme a equação (INMETRO, 2020):

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100$$

Onde:

X<sub>lab</sub>: valor obtido ou média aritmética de valores obtidos experimentalmente

X<sub>v</sub>: valor admitido como verdadeiro (valor certificado do MRC)

Ou ainda pelo cálculo do índice Z, segundo a equação:

$$Z = \frac{|X_{lab} - X_v|}{s}$$

Onde:

X<sub>lab</sub>: valor obtido ou média aritmética de valores obtidos experimentalmente

X<sub>v</sub>: valor admitido como verdadeiro (valor certificado do MRC)

s: unidade de desvio (incerteza do MRC)

A avaliação dos resultados do índice Z é realizada de acordo com a seguinte escala:  $|Z| \leq 2$  = satisfatório;  $2 < |Z| \leq 3$  = questionável;  $|Z| > 3$  = insatisfatório (INMETRO, 2020).

A exatidão também foi verificada através da correlação entre os métodos de microscopia direta (Marshall, 1992), que é o método de referência (ISO 13366-1:2008) e o método de citometria de fluxo. A correlação de métodos consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método a ser validado com os resultados conseguidos por meio de um método de referência validado. O objetivo é estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, avaliar a exatidão do método em processo de validação com o de referência.

Os resultados do índice Z do programa interlaboratorial para contagem de células somáticas em matriz de leite cru adicionado de bronopol, promovido pelo MAPA entre os laboratórios da RBQL, foram utilizados para essa correlação, pois para a designação de valor ao material empregado, a avaliação da estabilidade ao transporte, a avaliação da estabilidade à data de execução do programa de ensaio de proficiência (PEP) e a análise da porção amostral pelos laboratórios participantes, sob gestão da instituição provedora, segue o método de ensaio de microscopia direta (ISO 13366-1:2008). Segundo Ponçano (2005), a qualidade de um resultado laboratorial está vinculada ao atendimento de requisitos de normas da qualidade voltadas ao reconhecimento e à acreditação de laboratórios.

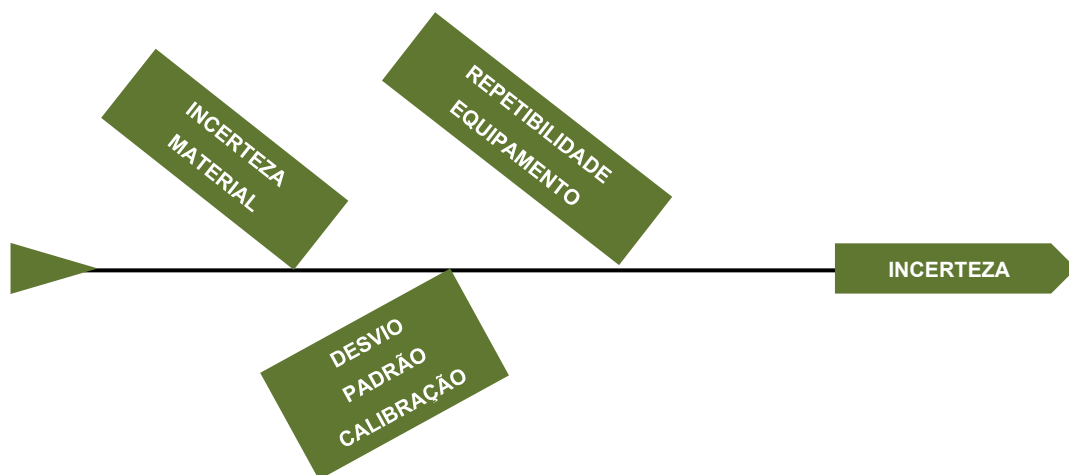
A norma ABNT NBR ISO/IEC 17043 faz distinção entre o uso de comparações interlaboratoriais para ensaios de proficiência para a determinação do desempenho do laboratório, e para outros propósitos tais como: estabelecer a eficácia e a comparabilidade de novos métodos de ensaio ou de medição, acompanhar métodos estabelecidos e determinar as características de desempenho de um método. Para a avaliação dos resultados das comparações interlaboratoriais, são utilizadas ferramentas estatísticas, como por exemplo, o score Z. Nos processos de comparação interlaboratorial, caso não se alcance as condições satisfatórias, deve

ser efetuado um plano de ações corretivas para verificar as causas e reavaliar o ensaio (INMETRO, 2020).

#### 5.2.3.4 Incerteza de medição

Os resultados expressos pela de incerteza de contagem de células somáticas do LabUFMG, foram utilizados na validação. Para o cálculo de incerteza de medição do ensaio de CCS, observado pelo diagrama de Ishikawa, apresentado na Figura 10, as fontes para compor a mesma foram a incerteza do material de referência, o desvio padrão obtido após calibração do equipamento para as leituras de baixa, média e alta contagem e a repetibilidade declarada pelo fabricante do equipamento.

Figura 10: Diagrama de Ishikawa para análise das fontes de incerteza da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo, no LabUFMG.



Fonte: A Autora (2022)

As incertezas classificadas como do tipo A são aquelas oriundas de medidas estatísticas. As incertezas do tipo B, por sua vez, têm como fonte informações conhecidas previamente sobre a medição. As componentes da incerteza foram decompostas em desvios-padrão que, posteriormente, foram reunidas na forma de incerteza combinada. Os graus de liberdade da incerteza combinada foram calculados

com base na equação de Welch-Satterthwaite, levando em consideração os graus de liberdade de cada componente da incerteza.

$$\frac{u_c^4}{v_{ef}} = \frac{u_1^4}{v_1} + \frac{u_2^4}{v_2} + \dots + \frac{u_n^4}{v_n}$$

sendo:

$u_c$  é a incerteza padrão combinada;  $u_1, u_2, \dots,$

$u_n$  são as incertezas padrão de cada uma das “n” fontes de incerteza;

$v_1, v_2, \dots, v_n$  são os números de graus de liberdade de cada uma das “n” fontes de incerteza;

$v_{ef}$  é o número de graus de liberdade efetivo associado à incerteza padrão combinada

Para graus de liberdade tendendo ao infinito, entra-se com o valor de 10 milhões para o cálculo dos graus de liberdade na planilha.

A incerteza expandida foi calculada por meio da multiplicação do fator de abrangência  $k$  pelo número de graus de liberdade efetivo calculado, a 95% de probabilidade:

$$U_{95\%} = k_{95\%} \times u_c$$

sendo:

$u_c$  a incerteza padrão combinada;

$k_{95\%}$  o fator de abrangência para o nível de confiança de 95%;

$U_{95\%}$  a incerteza expandida para o nível de confiança 95%.

A incerteza expandida do resultado da análise não deve exceder o limite máximo de incerteza estabelecido por legislação ou norma específica. Conforme orientações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Brasil, 2011), a incerteza padrão combinada relativa não deve exceder em mais de um terço os valores das faixas de precisão (valores de reprodutibilidade intralaboratorial – Quadro 4) para CCS de acordo com o estabelecido na norma ISO 13366-2 / IDF 148-2. Deve ser calculada pela equação:

$$uc = \frac{uc(\text{Concentração analito})}{\text{Concentração analito}} \leq (1 + 1/3) \times CV$$

Onde,  $u_c$  – incerteza padrão combinada; Concentração analito – concentração do analito na amostra de ensaio analisada; CV – coeficiente de variação ou desvio padrão relativo.

Quadro 4: Valores das faixas de precisão, representada pela reprodutibilidade intralaboratorial para CCS estabelecidas na norma ISO 13366-2 / IDF 148-2.

| Referência ISO 13366-2:2006 |            |                          |
|-----------------------------|------------|--------------------------|
| CRITÉRIO                    |            |                          |
| CCSX1000/mL                 | Sr intra % | r intra<br>(CCSX1000/mL) |
| <=150                       | 7          | 29                       |
| 151 a 300                   | 6          | 50                       |
| 301 a 450                   | 5          | 63                       |
| 451 a 750                   | 4          | 84                       |
| 751 a 1500                  | 4          | 168                      |

Sr intra %: Desvio padrão relativo em percentual da diferença absoluta entre dois resultados de amostras testes individuais independentes

r intra: Diferença absoluta entre dois resultados de amostras testes individuais independentes

Fonte: ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2)

#### 5.2.3.5 Limite de Quantificação

Seguindo orientações do INMETRO, o LQ foi calculado por meio da estimativa, a partir da curva analítica, do resultado do coeficiente angular que é a inclinação da curva analítica (b), construída na avaliação da linearidade e do resultado do desvio padrão encontrado da análise de 30 amostras de branco em duplicata, realizada no equipamento Somascope. A equação utilizada foi:

$$LQ = 10 s / b$$

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

5.3 Procedimentos realizados para determinação dos parâmetros de validação do limite de quantificação para análise da contagem padrão em placas, segundo normas ISO 16297:2020 (IDF 161:2020) e ISO 21187:2021 (IDF 196:2021)

Toda a validação do limite de quantificação para análise da contagem padrão em placas baseou-se sobretudo na norma ISO 16297:2020 (IDF 161:2020) Milk - Bacterial count - Protocol for the evaluation of alternative methods.

Esta norma fornece diretrizes para a análise utilizando métodos instrumentais alternativos para contagem bacteriana total do leite cru de animais de diferentes espécies, como o método de citometria de fluxo.

A transformação dos dados brutos é necessária para a aproximação da normalidade, geralmente uma transformação logarítmica. A transformação mais apropriada pode ser verificada por meio da comparação de histogramas. Todas as análises estatísticas são realizadas a partir dos dados transformados, a menos que especificado de outra forma, e apenas os resultados finais são re-transformados.

A norma internacional ISO 21187:2021 (IDF 196:2021) Milk - Quantitative determination of bacteriological quality - Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results fornece diretrizes para o estabelecimento de uma conversão entre os resultados de um método de rotina e um método padrão e sua verificação para a determinação quantitativa da qualidade bacteriológica.

A contagem padrão em placas de leite é o método referenciado pela *International Dairy Federation* (IDF) e pela *American Public Health Association* (APHA) para a contagem bacteriana total no leite cru, que estima o número de microrganismos aeróbios mesófilos presentes. Este método é baseado na capacidade de multiplicação dos microrganismos presentes na amostra formando colônias visíveis macroscopicamente que poderão ser contadas em UFC (APHA, 1992).

### 5.3.1 Metodologia de análise por citometria de fluxo no equipamento Bactoscan FC

A contagem bacteriana foi efetuada em equipamento eletrônico BactoScan FC (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca) (Figura 11). É um equipamento totalmente automatizado, que tem por princípio a citometria de fluxo para a rápida contagem bacteriana individual (CBI) em leite cru, com capacidade analítica de até 150 amostras/hora.

Figura 11: Equipamento BactoScan FC da Foss Electric A/S, para análise de CBI/ $\mu\text{L}$  em leite cru, por meio da metodologia de citometria de fluxo.



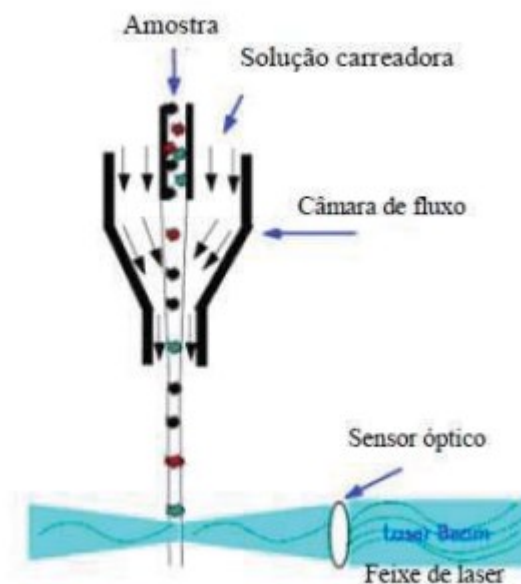
Fonte: Foss Electric A/S (2022)

Neste equipamento, uma alíquota da amostra é aspirada e depositada em um carrossel, onde é aquecida a 50°C. Durante a rotação deste carrossel, a amostra entra em contato com uma solução de incubação composta de um tampão, uma enzima proteolítica e um marcador fluorescente de DNA (Brometo de etídeo). Esta solução é adicionada para solubilizar os glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar as bactérias e corar o DNA/RNA. Os aglomerados microbianos são separados em

microrganismos individuais. Durante o período de incubação, o brometo de etídio, se liga rápida e seletivamente ao ácido nucléico microbiano. Após o período de incubação, parte da mistura é transferida para a citometria de fluxo, onde ocorre o alinhamento dos microrganismos em um tubo capilar e exposição a um feixe de luz gerado por um laser, que resulta na emissão de um sinal de fluorescência do material genético corado com brometo de etídeo, sendo este sinal coletado por receptores ópticos, filtrado e captado por um fotomultiplicador. O dispositivo eletrônico conta os pulsos e os exibe em um diagrama de análise de altura de pulso no monitor do computador (Broutin, 2004; Leite, 2006; FOSS, 2016). Os pulsos são então transformados em contagem bacteriana individual (Broutin, 2004).

A Figura 12 apresenta o esquema do percurso da amostra no fluxo laminar (*flow cell*) em equipamento de citometria de fluxo.

Figura 12: Percurso da amostra no fluxo laminar (*flow cell*) em equipamento de citometria de fluxo.



Fonte: Adaptado de Castro (2007).

A contagem bacteriana realizada pelo equipamento é expressa em contagem individual de bactérias por mililitro (CBI/ $\mu\text{L}$ ), ou seja, número de bactérias em cada mL de leite (CBI/ $\mu\text{L}$  de leite).



A citometria de fluxo expressa os resultados de forma distinta do método de referência, não sendo correta a comparação. É necessário que as análises sejam feitas em ambos os métodos, com as mesmas amostras, para se desenvolver uma correlação entre as metodologias, levando-se em conta os aspectos que diferem os seus princípios de contagem (Evangelista, 2008).

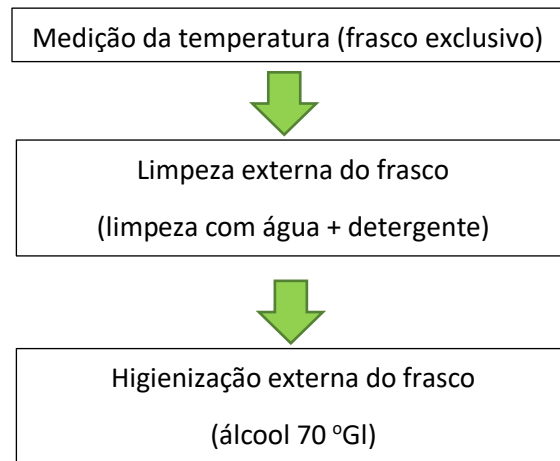
### 5.3.2 Validação analítica

Para a validação do limite de quantificação da análise de contagem padrão em placas realizou-se a correlação entre dois métodos analíticos: contagem bacteriana em placas (amostras enviadas a um laboratório terceirizado, também acreditado na norma ISO 17025:2017) e citometria de fluxo, amostras analisadas no LabUFMG nos equipamentos Bactoscan FC.

No caso da exatidão, a mesma foi avaliada através da amostra de BCS (Bacterial Control Sample - amostra liofilizada com contagem expressa em certificado de análise – fornecedor FOSS) e PCS (Particle Control Sample - amostra sintética com resultado expresso em certificado de análise – fornecedor FOSS). Já a precisão foi definida através da repetibilidade da amostra piloto.

Para a correlação entre dois métodos, foram utilizados três litros de leite cru refrigerado, obtidos na região metropolitana de Belo Horizonte e envasados em seis frascos estéreis de 500 mL, em único envio. Para a recepção das amostras pelo laboratório, seguiu-se o procedimento descrito na Figura 13.

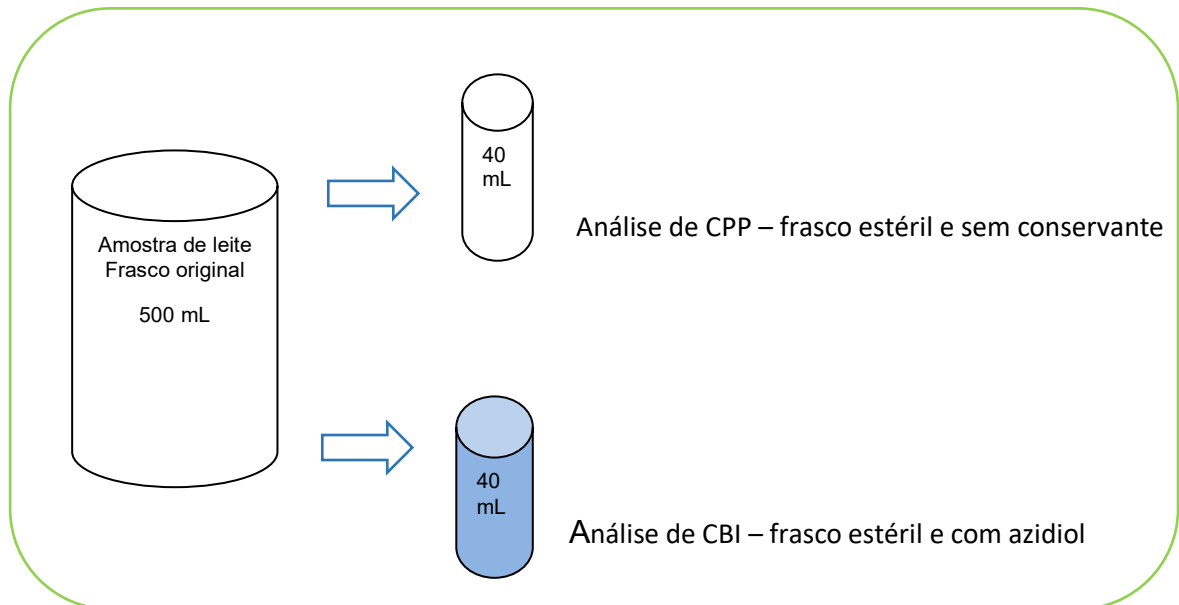
Figura 13: Fluxograma de procedimento adotado na recepção das amostras de leite cru refrigerado, no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite - LabUFMG para a execução das análises.



Fonte: A Autora (2022)

Após o recebimento da amostra de leite, houve a formação das amostras derivadas (sem conservante) e amostras equivalentes (com adição do conservante azidiol) em cabine de fluxo laminar no laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG. O procedimento foi homogeneização por meio de 15 movimentos circulares vigorosos do frasco original de 500 mL contendo a amostra de leite. Imediatamente após a homogeneização da amostra, alíquotas foram acondicionadas em frascos plásticos estéreis de 40 mL conforme descrito na Figura 14.

Figura 14: Fluxograma da formação das amostras derivadas (alíquotas) sem conservante azidiol para análise de CPP/ $\mu\text{L}$  e equivalentes contendo o conservante azidiol, para análise de CBI/ $\mu\text{L}$  para serem analisadas pela metodologia de referência por contagem padrão em placas e por citometria de fluxo, respectivamente.



Fonte: A autora (2022)

Para a obtenção de contagens bacterianas em valores baixos e altos, foram selecionadas amostras de produtores em análise de rotina, resultando num total de dez amostras, que posteriormente foram novamente analisadas em triplicata, no LabUFMG seguindo o mesmo procedimento das amostras equivalentes para avaliação da linearidade.

Após a amostragem, no laboratório LabUFMG, a análise de CBI/mL das amostras equivalentes, foi realizada por meio do equipamento BactoScan FC (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca). O referido equipamento opera pelo método de citometria de fluxo, conforme diretrizes da “ISO 21187/IDF 196 – Milk: Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results”.

Para análise, foi utilizado software do próprio equipamento, onde mediante a identificação do conjunto e da quantidade de amostras, este permite que réplicas imediatamente subsequentes de cada amostra sejam analisadas em um mesmo lote.

Antes de se proceder com as análises, houve a determinação citométrica de solução líquida concentrada alcalina de base surfactante (15 vezes), PCS (três vezes), BCS (duas vezes) e amostra piloto (amostra de leite cru adicionada de azidiol, com valores conhecidos de leitura, usadas na verificação do equipamento) do LabUFMG (10 vezes) e, novamente, solução líquida concentrada alcalina de base surfactante (cinco vezes). Após a verificação das checagens do equipamento, o mesmo apresentava-se apto para as análises do experimento, uma vez que todos os parâmetros avaliados foram satisfatórios.

Já as amostras para análise de CPP foram encaminhadas a laboratório terceirizado para serem analisadas seguindo a metodologia de referência de contagem padrão em placa (CPP/ $\mu$ L) em até 72 horas.

Realizou-se o teste de linearidade, que é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado. A relação entre as leituras do instrumento e os valores esperados deve ser linear dentro da faixa de contagens bacterianas em questão.

Para demonstrar a linearidade, foram analisadas 12 amostras em triplicata no equipamento Bactoscan FC, com diferentes contagens bacterianas como descrito na ISO 16297:2020, sendo dez amostras de produtores com contagens conhecidas, ou seja, amostra que foram analisadas anteriormente, uma amostra piloto do LabUFMG utilizada na rotina e uma amostra de branco (solução líquida concentrada alcalina de base surfactante).

Para a obtenção da curva analítica, aplicou-se a regressão linear com os valores esperados por amostra no eixo x e os valores medidos por amostra no eixo y. Usou-se a equação de regressão linear:

$$y = a + bx$$

Onde:

y = resposta medida

x = concentração

a = coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x = 0)

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade)

Para o parâmetro da precisão, a repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas. Para a repetibilidade foram analisadas, em duplicata, 50 amostras com contagens superiores a 3.000.000 CBI/mL, no equipamento Bactoscan FC.

De acordo com norma ISO 16297:2020, para contagem bacteriana total no leite cru, os limites de aceitabilidade para o desvio padrão da repetibilidade, são 0,09  $\log_{10}$  unidades para níveis de contaminações maiores ou igual a  $2 \times 10^4$  UFC/mL e 0,12  $\log_{10}$  para níveis de contaminações menores ou igual a  $2 \times 10^4$  UFC/mL.

Para análise da reprodutibilidade foram analisadas em duplicata, 15 amostras pilotos nos equipamentos Bactoscan, FOSS 01 – CBT 03 e FOSS 02 – CBT 04. De acordo com a norma ISO 16297:2020 o limite de aceitabilidade para o desvio padrão da reprodutibilidade deve ser menor que 0,16  $\log_{10}$ .

Para a verificação da exatidão foi utilizada a comparação de métodos entre os resultados de contagem bacterianas obtidos no equipamento de citometria de fluxo Bactoscan FC e os resultados de CPP pelo método de referência e os resultados das análises de BCS e PCS. Foram analisadas em triplicadas amostra de BCS (Limite: 1747 – 2363 CBI/ $\mu$ l) e PCS (LIMITE: 1500 – 3000 CBI/ $\mu$ l) no equipamento Bactoscan FC.

Além das amostras de referência, também foram avaliados os resultados das amostras analisadas no equipamento Bactoscan FC, por meio do Programa de Ensaio de Proficiência executada pelo MAPA- LFDA.

Para determinar o limite de quantificação (LQ) foram analisadas dez amostras de branco (solução líquida concentrada alcalina de base surfactante, pertencente ao kit de soluções da própria FOSS). Os resultados das análises foram usados para compor a média dos valores do sinal do branco e o desvio padrão do sinal do branco, como adotado pela metodologia da ISO 16297:2020, por meio da equação:

$$LQ = \bar{x} + ns$$

Onde:  $\bar{x}$  = Média do sinal do branco; s = desvio padrão do sinal do branco; n = número de réplicas.

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) propõe o valor “10” como valor padrão da equação do LQ. (Massart, 1997).

## 6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Contagem de Células Somáticas

A linearidade foi estabelecida mediante a curva analítica obtida por meio da medição, em quadruplicata, de três amostras de material de referência certificado, uma amostra piloto e uma amostra branco (solução Triton 0,1%), no equipamento Somascope por citometria de fluxo, como descrito na norma ISO 13366:2006. A Tabela 3 apresenta os valores obtidos após análise.

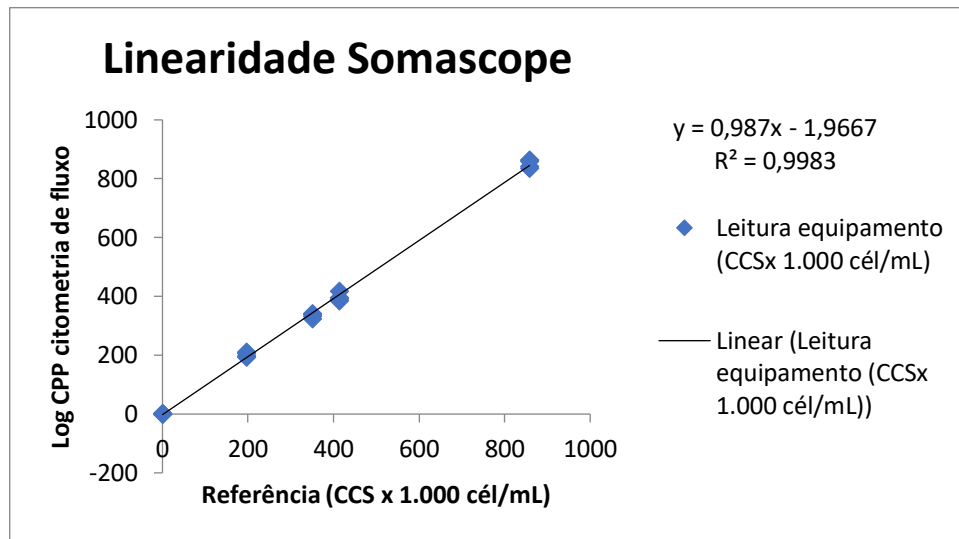
Tabela 3: Valores de CCS (x 1.000 cél/mL) obtidos após análise em quadruplicata no equipamento Somascope por citometria de fluxo, como descrito na norma ISO 13366:2006.

| Amostra               | Referência<br>(CCS x<br>1.000<br>cél/mL) | Réplica 1<br>(CCS x<br>1.000<br>cél/mL) | Réplica 2<br>(CCS x<br>1.000<br>cél/mL) | Réplica 3<br>(CCS x<br>1.000<br>cél/mL) | Réplica 4<br>(CCS x<br>1.000<br>cél/mL) | Desvio<br>padrão |
|-----------------------|--|---|---|---|---|------------------|
| <b>Branco</b>         | 0  | 0                                       | 2                                       | 1                                       | 0                                       | 0,96             |
| <b>Amostra piloto</b> | 351                                      | 341                                     | 325                                     | 339                                     | 333                                     | 7,19             |
| <b>MRC 1</b>          | 197                                      | 212                                     | 193                                     | 197                                     | 207                                     | 8,77             |
| <b>MRC 2</b>          | 413                                      | 417                                     | 385                                     | 395                                     | 392                                     | 13,82            |
| <b>MRC 3</b>          | 858                                      | 860                                     | 865                                     | 842                                     | 836                                     | 13,94            |

MRC = Material de referência certificado

A Figura 15 apresenta o gráfico dos valores de CCS considerados como referência em função das leituras determinadas no equipamento Somascope por citometria de fluxo. Obteve-se para o coeficiente de determinação,  $R^2$ , o valor de 0,9983, ou seja, 99,83% dos dados de concentração de células somáticas são preditos pela equação linear  $y = 0,987x - 1,9667$ . A resposta do equipamento Somascope por citometria de fluxo foi linear à concentração de contagem de células somáticas na faixa avaliada de 0 a 858 CCS/mL.

Figura 15: Linearidade apresentada pelos valores de contagens de células somáticas obtidos entre os valores de referência e os obtidos pela citometria de fluxo.



De acordo com os dados obtidos para a verificação da repetibilidade, o método mostrou-se preciso, pois o desvio padrão percentual (SR%) calculado foi de 2,75 para a média global das réplicas de 866 (CS x 1000 /ml). De acordo com o estabelecido no Quadro 3 em material e métodos, o valor de 866 está entre 750 e 1500, logo o desvio padrão percentual encontrado deve estar abaixo de 3. Além da diferença absoluta entre amostras individuais terem apresentado todas conforme. Por exemplo, para os valores de média igual a 865 o critério de aceitabilidade deve ser menor que a interpolação da diferença absoluta dos valores de 63 e 126 (r), pois o valor de 865 está entre 750 e 1500 e como resultado tem-se o limite da diferença absoluta igual a 73. Como a diferença entre a réplica 1 e réplica 2 foi igual a 38, o mesmo apresenta-se conforme, pois ficou abaixo de r igual a 73.

A Tabela 4 representa os resultados obtidos para o cálculo do desvio padrão relativo, seguindo a equação expressa na norma ISO 8196-2|IDF 128-2, os critérios de aceitabilidade e a diferença absoluta entre amostras individuais, que deve ser menor que 5% de acordo com a norma ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2), ou seja, de 20 amostras analisadas apenas uma amostra pode ficar fora do critério estabelecido que é o limite absoluto da diferença para apresentar conforme o teste.

Tabela 4: Resultados obtidos para o cálculo do desvio padrão relativo (Sr%), critérios de aceitabilidade e diferença absoluta entre amostras individuais, segundo normas ISO 8196-2 (IDF 128-2) e ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2).

| Amostra             | Réplica 1     | Réplica 2 | Média | 2 - 1 | r   |
|---------------------|---------------|-----------|-------|-------|-----|
| 1                   | 884           | 846       | 865   | 38    | 73  |
| 2                   | 1485          | 1435      | 1460  | 50    | 123 |
| 3                   | 972           | 917       | 945   | 55    | 79  |
| 4                   | 489           | 481       | 485   | 8     | 51  |
| 5                   | 1435          | 1439      | 1437  | 4     | 120 |
| 6                   | 694           | 710       | 702   | 16    | 61  |
| 7                   | 918           | 863       | 891   | 55    | 75  |
| 8                   | 1418          | 1489      | 1454  | 71    | 122 |
| 9                   | 680           | 668       | 674   | 12    | 60  |
| 10                  | 375           | 378       | 377   | 3     | 46  |
| 11                  | 461           | 470       | 466   | 9     | 51  |
| 12                  | 527           | 520       | 524   | 7     | 53  |
| 13                  | 749           | 746       | 748   | 3     | 63  |
| 14                  | 1436          | 1380      | 1408  | 56    | 118 |
| 15                  | 837           | 815       | 826   | 22    | 69  |
| 16                  | 182           | 185       | 184   | 3     | 29  |
| 17                  | 1424          | 1424      | 1424  | 0     | 120 |
| 18                  | 1307          | 1300      | 1304  | 7     | 110 |
| 19                  | 431           | 439       | 435   | 8     | 49  |
| 20                  | 745           | 687       | 716   | 58    | 62  |
| <b>Média global</b> | <b>866,02</b> |           |       |       |     |
| <b>Sr%</b>          | <b>2,75</b>   |           |       |       |     |
| <b>r</b>            | <b>0</b>      |           |       |       |     |

r = diferença absoluta entre amostras individuais independentes

Para a verificação da exatidão, foi utilizado o resultado de calibração do equipamento Somascope com material de referência do MAPA, a comparação de métodos pelo resultado do ensaio de proficiência e a incerteza de contagem de células somáticas.

Na avaliação da tendência, os valores obtidos pelo laboratório, como a média e o desvio padrão amostral, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para essa comparação, foram utilizados os critérios de erro relativo, uso do índice Z e uso da carta controle. A Tabela 5 apresenta os valores da calibração do equipamento Somascope, com três níveis de contagem de células somáticas do material de referência. Os erros relativos calculados para cada contagem, de acordo com a ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2) deve ser menor que 2%,



os valores encontrados foram 1,77 %, - 1,45% e – 0,23 % para as contagens de 200, 395 e 855 respectivamente. Os valores dos desvios padrão foram utilizados para compor o cálculo das incertezas de medição para contagens de células somáticas. Os índices Z para todos os níveis, foram satisfatórios de acordo com os critérios da escala de pontuação, pois foram  $\leq 2$ .

Tabela 5: Dados para avaliação da exatidão do método de citometria de fluxo para contagem de células somáticas, obtidos a partir da calibração do equipamento Somascope utilizando 3 níveis do material de referência certificado, fornecido pelo LFDA/MAPA.

| Amostra | MR 1 | MR 2 | REFERÊNCIA | INCERTEZA | S   | R     | LAS | LAI | LCS | LCI | IZI  | ER    |
|---------|------|------|------------|-----------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| Nível 1 | 200  | 201  | 197        | 2         | 0,7 | 200,5 | 213 | 181 | 217 | 177 | 1,75 | 1,77  |
| Nível 2 | 395  | 419  | 413        | 16        | 17  | 407   | 446 | 380 | 454 | 372 | 0,37 | -1,45 |
| Nível 3 | 855  | 857  | 858        | 4         | 1,4 | 856   | 927 | 789 | 944 | 772 | 0,50 | -0,23 |

MR: Material de Referência

\*S: Desvio padrão

R: Linha central média

LAS: Limite alerta superior

LAI: limite alerta inferior

LCS: Limite controle superior

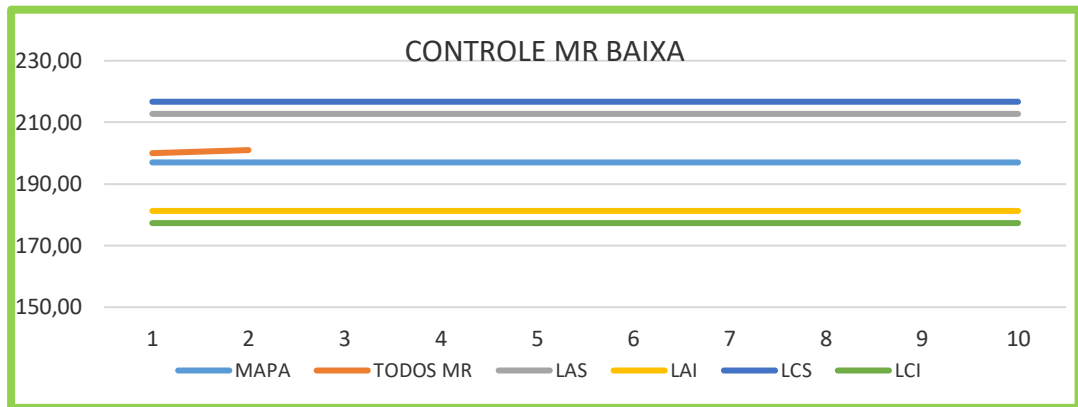
LCI: Limite controle inferior

Z: Escore

ER: Erro relativo

Ainda com os dados da calibração, expostos na Tabela 5, cartas controles foram criadas para cada nível do material de referência, conforme Figuras 16, 17 e 18. Os três níveis do material de referência analisados, ficaram entre os limites de aceitabilidade.

Figura 16: Carta controle representando o nível 1 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.



MR: Material de referência

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária – linha de referência

TODOS MR: Leitura Material de Referência

LAS: Limite de alerta superior

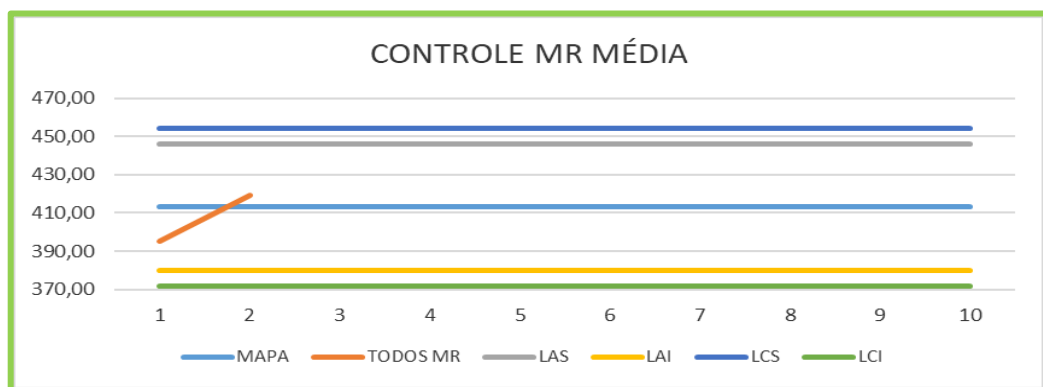
LAI: Limite de alerta inferior

LCS: Limite de controle superior

LCI: Limite de controle inferior

Fonte: A autora (2020)

Figura 17: Carta controle representando o nível 2 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.



MR: Material de referência

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária – linha de referência

TODOS MR: Leitura Material de Referência

LAS: Limite de alerta superior

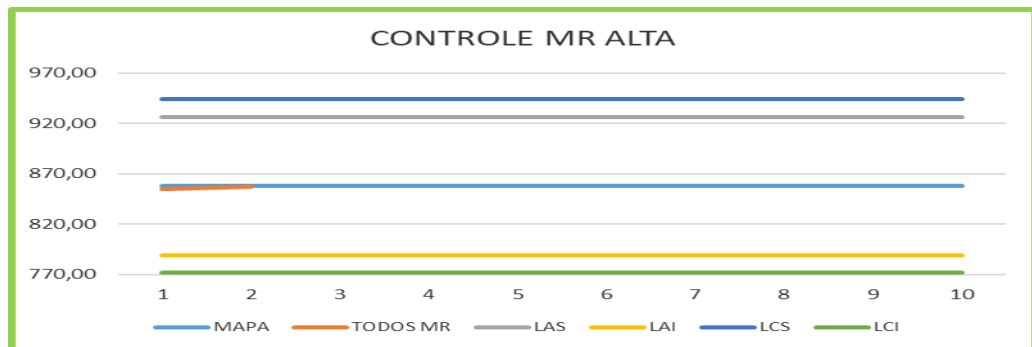
LAI: Limite de alerta inferior

LCS: Limite de controle superior

LCI: Limite de controle inferior

Fonte: A autora (2020)

Figura 18: Carta controle representando o nível 3 do material de referência, entre os limites de aceitabilidade no eixo y e o número de análises no eixo x.



MR: Material de referência

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária – linha de referência

TODOS MR: Leitura Material de Referência

LAS: Limite de alerta superior

LAI: Limite de alerta inferior

LCS: Limite de controle superior

LCI: Limite de controle inferior

Fonte: A autora (2020)

Para realizar a comparação do método de citometria de fluxo para CCS pelo equipamento Somascope, foi utilizado o método de microscopia direta. Os resultados de três programas de ensaio de proficiência realizados pelo MAPA entre os laboratórios da RBQL foram utilizados para essa comparação.

Os ensaios foram realizados com leite cru refrigerado adicionado de bronopol, obtido de tanques de propriedades rurais e/ou de animais individuais e considerou-se a possibilidade de mistura para obter a ordem de grandeza desejada, cuja variação se limita aos intervalos normais para o tipo de matriz. Para cada ensaio, dois frascos de amostras de 40 mL enviados pelo MAPA foram analisados em duplicata.

Dentre os parâmetros estatísticos avaliados em cada ensaio, os valores designados para cada material e o Z escore foram usados para a verificação dos resultados na comparação de métodos.

O Quadro 5 apresenta os critérios de julgamento ao Z escore de acordo com o MAPA e a Tabela 6 os resultados das determinações de CCS pelo método de citometria de fluxo.

Quadro 5: Critérios de julgamento relativos ao Z escore para avaliação dos programas de ensaio de proficiência realizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária entre os laboratórios da RBQL para o ensaio de contagem de células somáticas.

| Critério                    | Conclusão      |
|-----------------------------|----------------|
| $Z \geq 3,0$                | Ação corretiva |
| $3,0 > Z$ ou $Z \geq 2,0$   | Atenção        |
| $2,0 > Z$ ou $Z > -2,0$     | Conformidade   |
| $-3,0 < Z$ ou $Z \leq -2,0$ | Atenção        |
| $Z \leq -3,0$               | Ação corretiva |

Fonte: MAPA (2021)

Tabela 6: Valores do material de referência, (método da microscopia direta) e os resultados das determinações de CCS pelo método de citometria de fluxo, dos três ensaios avaliados para a comparação de métodos.

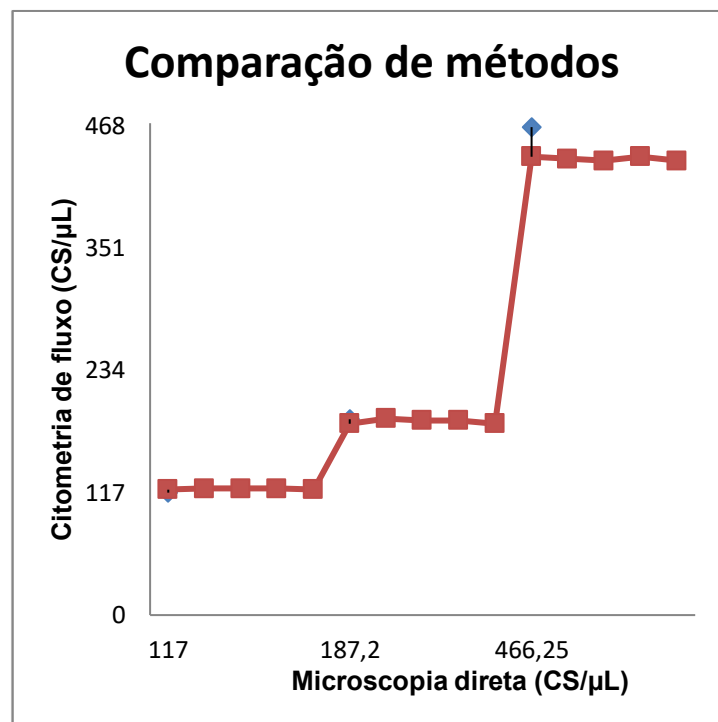
| Ensaio | Material referência<br>(CS/ $\mu$ l) | Média dos resultados<br>(CS/ $\mu$ l) | Z escore |
|--------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------|
| 1      | 117                                  | 120                                   | - 0,46   |
| 2      | 187,2                                | 183                                   | - 0,41   |
| 3      | 466,25                               | 434                                   | - 1,24   |

A análise dos dados expostos na Tabela 6 permite verificar que os resultados das avaliações de CCS realizadas pelo método de citometria de fluxo nos três ensaios com os materiais de referências, determinados pelo método de microscopia direta, foram considerados conformes, tendo em vista que ficaram dentro dos critérios de julgamento do Z escore.

Anthonisen *et al* (2009) avaliaram o desempenho do Laboratório da Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado no Programa Interlaboratorial para contagem de células somáticas em matriz de leite cru adicionado de bronopol, seguindo os parâmetros estatísticos dos valores designados para cada material de referência e os critérios de julgamento do Z escore, em que obtiveram resultados satisfatórios.

A Figura 19 representa os valores designados para cada material de referência e os valores determinados na avaliação dos três ensaios de proficiência estudados, demonstrando a comparação entre os métodos, sobre as mesmas amostras em faixas distintas de concentração de células somáticas. Pode-se observar o comportamento linear das metodologias utilizadas, e conseqüentemente o grau de exatidão entre estas, representado pela alta correlação entre as técnicas.

Figura 19: Teor de células somáticas (CS/ $\mu$ L) determinadas por citometria de fluxo nos três ensaios de proficiências avaliados em comparação ao método de microscopia direta, em faixas distintas de concentração.



Fonte: A autora (2022)

Em estudo similar de comparação de métodos, Evangelista (2008) verificou a alta correlação da técnica de microscopia direta com a técnica de citometria de fluxo,

assim como Silveira *et al* (2005), ao analisar amostras de leite de vacas individuais e de tanque de resfriamento, onde não verificou diferença estatisticamente significativa, nas contagens de células somáticas obtidas pelo método de microscopia direta com as contagens obtidas pelo equipamento eletrônico por citometria de fluxo.

A avaliação da incerteza de medição compreendeu a identificação das fontes de incerteza que foram a incerteza do material de referência certificado, o desvio padrão após calibração utilizando o material de referência e o desvio padrão da amostra piloto. Para a validação foram utilizados os dados das fontes de incerteza das leituras de baixa, média e alta contagem do material de referência certificado. As tabelas 7, 8, 9 e 10, apresentam os resultados após calibração do equipamento usando os padrões de baixa, média e alta contagem de células somáticas e as incertezas de medição expandidas calculadas em um nível de confiança de 95%, que foram 2,08 CS/ $\mu$ L para o padrão de 197 CS/ $\mu$ L; 21,39 CS/ $\mu$ L para o padrão de 413 CS/ $\mu$ L e 5,73 CS/ $\mu$ L para o padrão de 858 CS/ $\mu$ L. Os resultados corrigidos da análise de contagem de células somáticas em leite cru foram de  $200,5 \pm 2,08$  CS/ $\mu$ L da amostra de contagem baixa;  $407 \pm 21,39$  CS/ $\mu$ L da amostra de contagem média e  $856 \pm 5,73$  CS/ $\mu$ L da amostra de contagem alta.

Tabela 7: Determinações dos resultados após calibração do equipamento Somascope usando os padrões de baixa, média e alta contagem de células somáticas em leite cru, para compor o cálculo da incerteza de medição.

| Amostra | REFERÊNCIA | INCERTEZA - MR | S   | Resultado de análise |
|---------|------------|----------------|-----|----------------------|
| Baixa   | 197        | 2              | 0,7 | 200,5                |
| Média   | 413        | 16             | 17  | 407                  |
| Alta    | 858        | 4              | 1,4 | 856                  |

MR: Material de Referência

S: Desvio padrão após calibração

Tabela 8: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de baixa contagem (197 CS/ $\mu$ L).

| Símbolo | Componente da incerteza                      |           |
|---------|--|-----------|
|         | Fonte  | Valor (%) |
| Ua      | Incerteza material de referência certificado | 2         |
| Ua      | Calibração material de referência            | 0,7       |
| Ub      | Amostra piloto                               | 0,06      |
| Uc      | Incerteza combinada                          | 1,04      |
| U       | Incerteza expandida                          | 2,08      |

Ua: Incerteza padrão do material de referência certificado

Ua: Incerteza padrão pós calibração com uso do material de referência certificado

Ub: Incerteza padrão da amostra piloto

Uc: Incerteza padrão combinada

U: Incerteza expandida

Tabela 9: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de média contagem (413 CS/ $\mu$ L).

| Símbolo | Componente da incerteza                      |           |
|---------|--|-----------|
|         | Fonte  | Valor (%) |
| Ua      | Incerteza material de referência certificado | 16        |
| Ua      | Calibração material de referência            | 17        |
| Ub      | Amostra piloto                               | 0,06      |
| Uc      | Incerteza combinada                          | 10,61     |
| U       | Incerteza expandida                          | 21,39     |

Ua: Incerteza padrão do material de referência certificado

Ua: Incerteza padrão pós calibração com uso do material de referência certificado

Ub: Incerteza padrão da amostra piloto

Uc: Incerteza padrão combinada

U: Incerteza expandida

Tabela 10: Resultados da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo do padrão de alta contagem (858 CS/ $\mu$ L).

| Símbolo | Componente da incerteza                      |           |
|---------|--|-----------|
|         | Fonte  | Valor (%) |
| Ua      | Incerteza material de referência certificado | 4         |
| Ua      | Calibração material de referência            | 4,9       |
| Ub      | Amostra piloto                               | 0,03      |
| Uc      | Incerteza combinada                          | 2,83      |
| U       | Incerteza expandida                          | 5,73      |

Ua: Incerteza padrão do material de referência certificado

Ua: Incerteza padrão pós calibração com uso do material de referência certificado

Ub: Incerteza padrão da amostra piloto

Uc: Incerteza padrão combinada

U: Incerteza expandida

Uma vez que o desvio-padrão relativo máximo permitido para CCS na norma ISO 13366-2 / IDF 148-2 (ISO, 2006), conforme critérios de decisão à precisão sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial é de 7% para níveis de CCS de até 150 CS/ $\mu$ L, o limite máximo de incerteza padrão combinada relativa deve ser 9,33%. Considerando que o valor estimado para a incerteza padrão combinada foi de 2,08 % para o padrão de baixa contagem de células somática e 5,73 % para o de contagem alta, ambos com valores inferiores ao critério de decisão. Já para o padrão de média contagem o valor encontrado da incerteza de medição foi de 21,39 %, porém a incerteza de medição do material de referência para compor o cálculo foi de 16 %. A calibração realizada confirma esse valor, pois o resultado encontrado foi de 17%.

Valgas *et al* (2015) usaram como fonte de incerteza para compor o cálculo da incerteza de medição da contagem de células somáticas em leite cru por citometria de fluxo, os parâmetros da curva de calibração, uso de material de referência e a reprodutibilidade intralaboratorial com amostras piloto. A estimativa de incerteza expandida encontrada para o para o ensaio de CCS foi de 8,27% para o padrão avaliado de 505,40 CS/ $\mu$ L, amostra piloto de 263,42 CS/ $\mu$ L e valores da curva de calibração de 139 CS/ $\mu$ L. Concluíram que este valor representa uma estimativa



bastante realista das condições de rotina da análise, uma vez que engloba a dispersão de dados para materiais de referência e aquele obtido pelo estudo.

Para o cálculo do limite de quantificação, foram analisadas 30 amostras de branco em duplicata (solução Triton 0,1%) distribuídas em frasco estéril de 40 mL, no equipamento Somascope. O desvio padrão determinado foi de 0,12, conforme observado na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados das 30 amostras de branco analisadas em duplicata no equipamento Somascope por citometria de fluxo para determinação do desvio padrão.

| Amostra       | Réplica 1<br>(CCS x 1.000 cél/mL) | Réplica 2<br>(CCS x 1.000 cél/mL) |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1             | 0                                 | 0                                 |
| 2             | 0                                 | 0                                 |
| 3             | 0                                 | 0                                 |
| 4             | 0                                 | 0                                 |
| 5             | 0                                 | 0                                 |
| 6             | 0                                 | 0                                 |
| 7             | 0                                 | 0                                 |
| 8             | 0                                 | 0                                 |
| 9             | 0                                 | 0                                 |
| 10            | 1                                 | 0                                 |
| 11            | 0                                 | 0                                 |
| 12            | 0                                 | 0                                 |
| 13            | 0                                 | 0                                 |
| 14            | 0                                 | 0                                 |
| 15            | 0                                 | 0                                 |
| 16            | 0                                 | 0                                 |
| 17            | 0                                 | 0                                 |
| 18            | 0                                 | 0                                 |
| 19            | 0                                 | 0                                 |
| 20            | 0                                 | 0                                 |
| 21            | 0                                 | 0                                 |
| 22            | 0                                 | 0                                 |
| 23            | 0                                 | 0                                 |
| 24            | 0                                 | 0                                 |
| 25            | 0                                 | 0                                 |
| 26            | 0                                 | 0                                 |
| 27            | 0                                 | 0                                 |
| 28            | 0                                 | 0                                 |
| 29            | 0                                 | 0                                 |
| 30            | 0                                 | 0                                 |
| Desvio padrão |                                   | 0,12                              |

A determinação do valor de LQ para células somáticas por citometria de fluxo no equipamento Somascope, originou-se do resultado do coeficiente angular da curva analítica apresentada na avaliação da linearidade de 0,987 e o desvio padrão do branco de 0,12 CS/mL. Relacionando os valores na equação  $LQ = 10 s / b$ , obteve-se

o limite de quantificação em termos de concentração de CCS x 1.000 cél/mL igual a 1,22. O que equivale a 1 célula x 1000/mL.

## 6.2 Contagem padrão em placas

A linearidade foi estabelecida mediante a curva analítica obtida por meio da medição, em triplicata, de uma amostra de branco, uma amostra piloto e 10 amostras com contagem previamente conhecidas, usadas como referência, no equipamento Bactoscan FC FOSS 02 – CBT04, como descrito na norma ISO 16297:2013. A Tabela 12 apresenta os valores obtidos após análise.

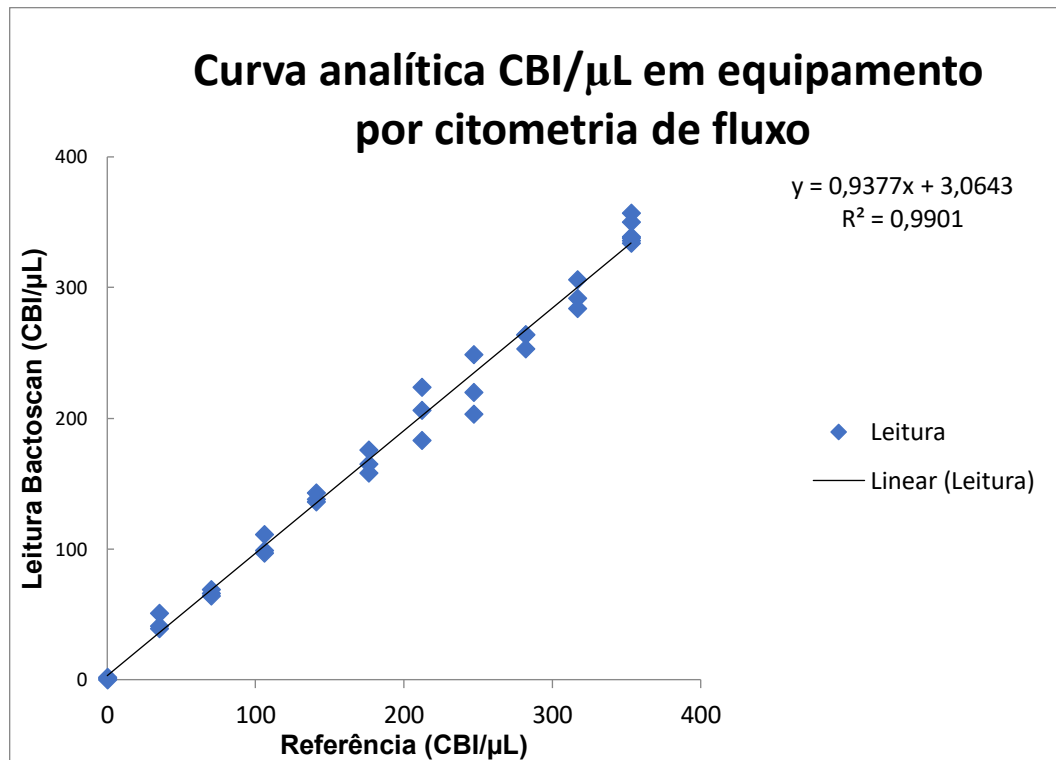
Tabela 12: Valores de CBI/ $\mu$ L obtidos após análise em triplicata no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo de amostras de branco e amostras com contagens variadas.

| Amostra | Referência<br>(CBI/ $\mu$ L) | Réplica 1<br>(CBI/ $\mu$ L) | Réplica 2<br>(CBI/ $\mu$ L) | Réplica 3<br>(CBI/ $\mu$ L) |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1       | 0                            | 1                           | 2                           | 0                           |
| 2       | 35                           | 41                          | 51                          | 39                          |
| 3       | 70                           | 69                          | 64                          | 66                          |
| 4       | 106                          | 111                         | 99                          | 97                          |
| 5       | 141                          | 143                         | 136                         | 138                         |
| 6       | 176                          | 165                         | 158                         | 176                         |
| 7       | 212                          | 183                         | 206                         | 224                         |
| 8       | 247                          | 249                         | 203                         | 220                         |
| 9       | 282                          | 264                         | 253                         | 264                         |
| 10      | 317                          | 306                         | 284                         | 292                         |
| 11      | 353                          | 339                         | 336                         | 357                         |
| 12      | 353                          | 338                         | 350                         | 334                         |

A Figura 20 apresenta o gráfico dos valores considerados como referência em CBI/ $\mu$ L em função das leituras também em CBI/ $\mu$ L determinadas no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo. Obteve-se para o coeficiente de determinação,  $R^2$ , o valor de 0,9901, ou seja, 99,01% dos dados de concentração de CBI/ $\mu$ L são preditos pela equação linear  $y = 0,9377x + 3,0643$ . A resposta do equipamento Bactoscan por

citometria de fluxo foi linear à concentração de contagem bacteriana na faixa avaliada de 0 a 353 CBI/ $\mu$ L.

Figura 20: Curva analítica (CBI/ $\mu$ L) obtida por meio de 12 determinações de amostras em diferentes concentrações, em triplicata, no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo.



Para a precisão foi realizado o teste de repetibilidade, onde foram analisadas 50 amostras em duplicata com contagens médias de 3.690 CBI/ $\mu$ L obtidas de misturas de amostras (pools) anteriormente analisadas no LabUFMG. A análise ocorreu no equipamento FOSS 02 – CBT 04. Os dados obtidos após análise assim como o desvio padrão calculado, apresentam-se na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados obtidos na análise em duplicata de amostras com contagem bacteriana média de 3.690 CBI/ $\mu$ L no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo, assim como o desvio padrão da média.

| Amostra                         | Réplica 1<br>(CBI/ $\mu$ L) | Réplica 2<br>(CBI/ $\mu$ L) |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1                               | 2947                        | 3267                        |
| 2                               | 3420                        | 3548                        |
| 3                               | 3571                        | 3591                        |
| 4                               | 3671                        | 3677                        |
| 5                               | 3673                        | 3631                        |
| 6                               | 3569                        | 3748                        |
| 7                               | 3617                        | 3807                        |
| 8                               | 3617                        | 3792                        |
| 9                               | 3732                        | 3351                        |
| 10                              | 3836                        | 3679                        |
| 11                              | 3439                        | 3613                        |
| 12                              | 3528                        | 3609                        |
| 13                              | 3629                        | 3637                        |
| 14                              | 3638                        | 3515                        |
| 15                              | 3461                        | 3483                        |
| 16                              | 3526                        | 3592                        |
| 17                              | 3623                        | 3487                        |
| 18                              | 3570                        | 3497                        |
| 19                              | 3480                        | 3637                        |
| 20                              | 3560                        | 3458                        |
| 21                              | 3750                        | 3572                        |
| 22                              | 3594                        | 3581                        |
| 23                              | 3739                        | 3879                        |
| 24                              | 3622                        | 3656                        |
| 25                              | 3664                        | 3686                        |
| 26                              | 3620                        | 3627                        |
| 27                              | 3769                        | 3757                        |
| 28                              | 3602                        | 3820                        |
| 29                              | 3716                        | 3583                        |
| 30                              | 3653                        | 3741                        |
| 31                              | 3521                        | 3629                        |
| 32                              | 3512                        | 3532                        |
| 33                              | 3588                        | 3664                        |
| 34                              | 3519                        | 3622                        |
| 35                              | 3565                        | 3632                        |
| 36                              | 3876                        | 3683                        |
| 37                              | 3701                        | 3907                        |
| 38                              | 3706                        | 3624                        |
| 39                              | 3706                        | 3588                        |
| 40                              | 3873                        | 3787                        |
| 41                              | 3763                        | 3812                        |
| 42                              | 3917                        | 3917                        |
| 43                              | 3907                        | 4035                        |
| 44                              | 3734                        | 3875                        |
| 45                              | 3960                        | 3835                        |
| 46                              | 4055                        | 3986                        |
| 47                              | 4118                        | 3941                        |
| 48                              | 3950                        | 4024                        |
| 49                              | 4103                        | 4113                        |
| 50                              | 4204                        | 4135                        |
| Média (CBI/ $\mu$ L)            | 3690                        |                             |
| Média (UFC/ $\mu$ L)            | 1198                        |                             |
| Média Log <sub>10</sub>         | 3,55                        |                             |
| Desvio padrão Log <sub>10</sub> | 0,022                       |                             |

O desvio padrão de 0,022 Log<sub>10</sub> encontrado na repetibilidade avaliada na determinação de 50 amostras com média de 1.198 UFC/μL é menor que o critério de avaliação 0,09 Log<sub>10</sub> para amostras maiores que 2 x 10<sup>4</sup> UFC/mL (20 UFC/μL), como declarado na norma ISO 16297:2020, o que confirma a precisão do método de citometria de fluxo.

Outra forma de avaliar a precisão foi através da reprodutibilidade entre os resultados avaliados nos equipamentos Bactoscan FOSS 01 – CBT03 e FOSS 02 – CBT04, por citometria de fluxo. Foram analisadas 15 amostras piloto em duplicata em ambos os equipamentos e determinado o desvio padrão em Log<sub>10</sub>. A Tabela 14 apresenta os valores da média dos resultados das amostras piloto analisadas em duplicata, assim como a transformação dos valores em Log<sub>10</sub> e o desvio padrão encontrado.

Tabela 14: Resultados em CBI/mL e em  $\text{Log}_{10}$  das médias das amostras piloto analisadas em duplicata, nos equipamentos Bactoscan FOSS 01 – CBT03 e FOSS 02 – CBT04 por citometria de fluxo para avaliação da reprodutibilidade.

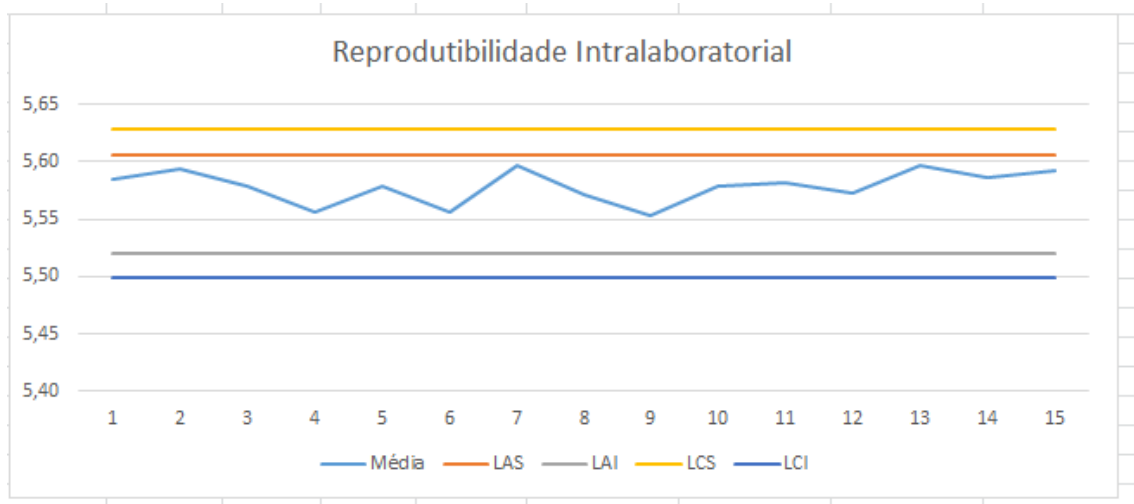
| Amostra Piloto              | FOSS 01 – CBT03<br>(CBI/mL) | FOSS 01 – CBT03<br>( $\text{Log}_{10}$ ) | FOSS 02 – CBT04<br>(CBI/mL) | FOSS 02 – CBT04<br>( $\text{Log}_{10}$ ) |
|-----------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|--|
| 1                           | 384500                      | 5,58                                     | 361000                      | 5,56                                     |
| 2                           | 393000                      | 5,59                                     | 354500                      | 5,55                                     |
| 3                           | 379000                      | 5,58                                     | 371000                      | 5,57                                     |
| 4                           | 360000                      | 5,56                                     | 371500                      | 5,57                                     |
| 5                           | 379000                      | 5,58                                     | 356000                      | 5,55                                     |
| 6                           | 360500                      | 5,56                                     | 348500                      | 5,54                                     |
| 7                           | 394500                      | 5,60                                     | 346000                      | 5,54                                     |
| 8                           | 372500                      | 5,57                                     | 332500                      | 5,52                                     |
| 9                           | 358000                      | 5,55                                     | 345500                      | 5,54                                     |
| 10                          | 379500                      | 5,58                                     | 371000                      | 5,57                                     |
| 11                          | 382000                      | 5,58                                     | 339000                      | 5,53                                     |
| 12                          | 374000                      | 5,57                                     | 338000                      | 5,53                                     |
| 13                          | 395000                      | 5,60                                     | 349500                      | 5,54                                     |
| 14                          | 386000                      | 5,59                                     | 345500                      | 5,54                                     |
| 15                          | 390500                      | 5,59                                     | 366000                      | 5,56                                     |
| Média ( $\text{Log}_{10}$ ) |                             | 5,56                                     |                             |  |
| Desvio padrão               |                             | 0,02                                     |                             |  |

O valor encontrado do desvio padrão de 0,02 para a avaliação da reprodutibilidade confirma, novamente, a precisão, uma vez que o critério estabelecido na ISO 16297:2020 deve ser menor que 0,16.

A Figura 21 demonstra essa precisão por meio de carta controle da reprodutibilidade entre os equipamentos Bactoscan por citometria de fluxo, onde a

média dos valores entre os equipamentos encontrou-se sempre entre os limites de alerta inferior (LAI) e limites de alerta superior (LAS).

Figura 21: Carta controle adquirida do resultado da reprodutibilidade intralaboratorial entre os equipamentos Bactoscan por citometria de fluxo.



Média: Média entre os resultados encontrados pelos equipamentos

LAS: Limite de alerta superior

LAI: Limite de alerta inferior

LCS: Limite de controle superior

LCI: Limite de controle inferior

**Fonte:** A Autora (2022)

Para a validação da exatidão foi utilizado a comparação de métodos entre os resultados do equipamento de citometria de fluxo FOSS e análises de CPP enviadas ao laboratório terceirizado e o resultado das análises de BCS e PCS. Foram analisadas 32 amostras, sendo elas, as derivadas alíquotas sem o conservante azidiol pelo método de referência, enviadas ao laboratório terceirizado e aquelas equivalentes com azidiol analisadas no equipamento Bactoscan FC - FOSS02- CBT04 pelo método de citometria de fluxo.

Os resultados expressos na Tabela 15, foram convertidos em  $\text{Log}_{10}$  para a comparação de métodos.

Tabela 15: Resultados em Log<sub>10</sub> dos resultados gerados pelo método de referência CPP e os resultados gerados no equipamento Bactoscan FC – FOSS02- CBT04, por citometria de fluxo, também em Log<sub>10</sub>.

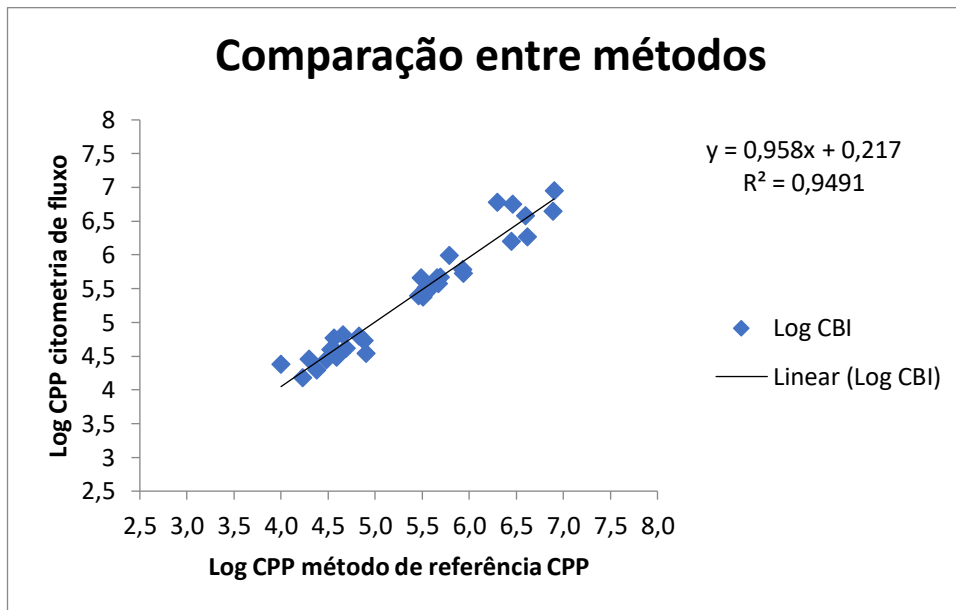
| Amostra | Método de referência<br>(Log10) | Citometria de fluxo<br>(Log10) |
|---------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1       | 4,53                            | 4,60                           |
| 2       | 4,56                            | 4,60                           |
| 3       | 4,48                            | 4,45                           |
| 4       | 4,38                            | 4,30                           |
| 5       | 5,94                            | 5,73                           |
| 6       | 6,89                            | 6,65                           |
| 7       | 5,54                            | 5,52                           |
| 8       | 4,90                            | 4,54                           |
| 9       | 4,30                            | 4,46                           |
| 10      | 5,58                            | 5,49                           |
| 11      | 5,51                            | 5,38                           |
| 12      | 5,69                            | 5,67                           |
| 13      | 4,00                            | 4,38                           |
| 14      | 6,60                            | 6,58                           |
| 15      | 4,69                            | 4,62                           |
| 16      | 6,46                            | 6,75                           |
| 17      | 6,90                            | 6,95                           |
| 18      | 4,56                            | 4,77                           |
| 19      | 5,79                            | 5,99                           |
| 20      | 4,66                            | 4,82                           |
| 21      | 4,23                            | 4,18                           |
| 22      | 5,93                            | 5,79                           |
| 23      | 4,59                            | 4,49                           |
| 24      | 6,45                            | 6,20                           |
| 25      | 6,62                            | 6,27                           |
| 26      | 6,30                            | 6,78                           |
| 27      | 4,83                            | 4,80                           |
| 28      | 5,49                            | 5,66                           |
| 29      | 5,66                            | 5,66                           |
| 30      | 5,46                            | 5,40                           |
| 31      | 5,67                            | 5,58                           |
| 32      | 4,88                            | 4,73                           |

A Figura 22 representa a comparação entre os métodos, sobre as mesmas amostras em faixas de concentrações distintas do método de referência CPP versus



o método de citometria de fluxo. Pode-se observar o comportamento linear das metodologias utilizadas e o grau de correlação  $R^2$  entre as mesmas com valor de 0,95 e conseqüentemente o grau de exatidão entre essas.

Figura 22: Comparação entre os métodos de referência e o método de citometria de fluxo para análise de CPP, representados pela curva linear.



No estudo de Jatobá (2009), a correlação estimada entre os métodos de citometria de fluxo e o método de referência foi de 0,98, o que representa um alto grau de associação entre as duas metodologias, valor superior ao encontrado por Tomaska *et al.* (2006), que estimou valor de 0,87 entre as duas metodologias. Em revisão, Broutin (2004) relatou que valores de correlação entre os métodos de referência e o de citometria de fluxo, verificados em trabalhos desenvolvidos em outros países, variaram entre 0,90% e 0,98%.

De acordo com Evangelista (2008), as contagens bacterianas de leite cru e pasteurizado, obtidas pelo método de referência e por citometria de fluxo foram estatisticamente similares com resultados expressos em UFC/mL.

A Tabela 16 representa os valores de referência das amostras de BCS e PCS e os valores obtidos após análise pelo método de citometria de fluxo no equipamento Bactoscan FC. Observa-se que a diferença média entre as determinações e os valores de referência apresentam-se dentro da faixa esperada. Para os valores limites de BCS de 1747 a 2363 (CBI/ $\mu$ L), a média do equipamento foi 2051 (CBI/ $\mu$ L) e para os limites

de PCS de 1500 a 3000 (CBI/ $\mu$ L) e lido no equipamento média de 2383 (CBI/ $\mu$ L), confirmando a exatidão do método.

Tabela 16: Valores de referência de BCS e PCS e as médias de leitura obtidas no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo.

| BCS<br>LIMITE: 1747 – 2363 (CBI/ $\mu$ L) | PCS<br>LIMITE: 1500 – 3000 (CBI/ $\mu$ L) |
|---|---|
| 2036                                      | 2360                                      |
| 2060                                      | 2393                                      |
| 2024                                      | 2354                                      |
| 2104                                      | 2414                                      |
| 2037                                      | 2347                                      |
| 2042                                      | 2433                                      |
| MÉDIA: 2051                               | MÉDIA: 2383                               |

BCS: Amostra controle de bactéria liofilizada

PCS: Amostra controle sintética

Além de amostras de referência, têm-se também as amostras do Programa de Ensaio de Proficiência executado pelo MAPA- LFDA. Para o ensaio, o valor designado como verdadeiro foi de 1,789 Log CBI/microlitro e o valor obtido no equipamento Bactoscan FC pelo método de citometria de fluxo média de 1,77 Log CBI/ $\mu$ L, erro de medição de -0,017 e escore z' de -0,38.

Dentre os parâmetros estatísticos avaliados no ensaio, o valor designado para o material e o Z escore foram usados para a verificação dos resultados na comparação de métodos.

O Quadro 6 apresenta os critérios de julgamento ao Z escore de acordo com o MAPA e a Tabela 17 os resultados das determinações de Log CBI/  $\mu$ L pelo método de citometria de fluxo.

Quadro 6: Critérios de julgamento relativos ao Z escore para avaliação dos programas de ensaio de proficiência realizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária entre os laboratórios da RBQL.

| Critério                    | Conclusão      |
|-----------------------------|----------------|
| $Z \geq 3,0$                | Ação corretiva |
| $3,0 > Z$ ou $Z \geq 2,0$   | Atenção        |
| $2,0 > Z$ ou $Z > -2,0$     | Conformidade   |
| $-3,0 < Z$ ou $Z \leq -2,0$ | Atenção        |
| $Z \leq -3,0$               | Ação corretiva |

Fonte: MAPA (2021)

Tabela 17: Resultados obtidos no ensaio de proficiência realizado pelo MAPA, no equipamento Bactoscan por citometria de fluxo.

| Ensaio | Material referência<br>Log CBI/ $\mu$ L | Média dos resultados<br>Log CBI/ $\mu$ L | Erro de<br>medição | Z escore |
|--------|---|--|--------------------|----------|
| 1      | 1,789                                   | 1,771                                    | -0,0174798         | - 0,38   |

Os resultados obtidos, como a média de 1,771 Log CBI/  $\mu$ L, com erro de apenas -0,017 e Z escore de -0,38, dentro da faixa do critério de  $2,0 > Z$  ou  $Z > -2,0$ , indicam resultados de conformidade para o ensaio realizado, confirmando mais uma vez a exatidão do método.

Para o cálculo do limite de quantificação usando a equação  $\bar{x} + ns$ , metodologia adotada da norma ISO 16297:2020, foram usados os dados apresentados na Tabela 18 de dez análises de amostra branco.

Tabela 18: Valores de amostra branco determinados no equipamento Bactoscan, por citometria de fluxo, já convertidos para UFC/mL e a estatística descritiva.

| Amostra                     | Leitura<br>UFC/mL |
|-----------------------------|-------------------|
| 1                           | 0,00              |
| 2                           | 0,00              |
| 3                           | 0,31              |
| 4                           | 0,00              |
| 5                           | 0,00              |
| 6                           | 0,00              |
| 7                           | 0,00              |
| 8                           | 0,00              |
| 9                           | 0,00              |
| 10                          | 0,00              |
| Média ( $\bar{x}$ )         | 0,031             |
| Desvio padrão (s)           | 0,0980306         |
| Variância da amostra        | 0,00961           |
| Intervalo                   | 0,31              |
| Mínimo                      | 0,00              |
| Máximo                      | 0,31              |
| Soma                        | 0,31              |
| Contagem (n)                | 10                |
| Nível de confiança (95,0 %) |                   |

Aplicando os valores da média da amostra branco ( $\bar{x}$ ) igual a 0,031, desvio padrão de 0,098, em 10 réplicas, na equação para o cálculo, o valor encontrado do limite de quantificação foi de 1,01. O que equivale a 1 UFC x 1000/mL.

## 7.CONCLUSÃO

A validação é essencial para averiguar se os métodos propostos atendem aos objetivos a que se destinam e as normas reguladoras ou exigências de órgãos de fiscalização, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados.

Os intervalos de 0 a 858 CCS/mL de contagem de células somáticas e de 0 a 353 CBI/ $\mu$ L de contagem bacteriana individual avaliados mostraram-se lineares e consonantes com os indicados pela metodologia, para os coeficientes de correlação, 99,83% e 99,01% respectivamente, bem ajustados.

A precisão avaliada pela repetibilidade dos métodos analíticos em estudo apresentou tanto para contagem de células somáticas quanto para contagem bacteriana, desvios padrão inseridos no limite de aceitabilidade determinados pelas normas que regulamentam a validação. A precisão avaliada através da reprodutibilidade, também se mostrou dentro dos parâmetros fixados.

A exatidão do método foi confirmada através dos valores dos erros relativos do material de referência dos níveis de baixa, média e alta contagem, além dos valores do Z score para contagem de células somáticas e através dos resultados médios das amostras controles liofilizada e sintética para o parâmetro contagem bacteriana.

Estes valores também estão em consonância aos valores reportados na literatura para metodologias similares. Para avaliação da comparação de métodos, confirmando ainda a exatidão, foi feito o uso do resultado dos ensaios de proficiências, sendo o z score avaliado tanto para contagem de células somáticas quanto para contagem bacteriana

As incertezas de medição expandidas calculadas para contagem de células somáticas em um nível de confiança de 95%, ficaram de acordo com aquelas apresentadas em trabalhos similares.

Os limites de quantificação para contagem de células somáticas e contagem bacteriana analisados por citometria de fluxo foram de 1,22 e 1,01 o que equivalem a 1 célula x 1000/mL e 1 UFC/ $\mu$ L respectivamente, consonantes aos observados nas normas de referência.

Dessa forma, pode-se concluir que a validação é um processo que deve ser corretamente elaborado, atendendo aos critérios de qualidade, além de necessitar de materiais adequados e equipamentos calibrados, de forma que se conheça os erros atrelados ao resultado para que se possa realizar uma interpretação confiável e coerente dos dados obtidos.

Após a verificação de todos os parâmetros de desempenho proposto nos objetivos do presente trabalho, principalmente a precisão e exatidão, é possível atestar a respeito da confiabilidade do limite de quantificação encontrado para os analitos contagem bacteriana em UFC/ $\mu$ L e a contagem de células somáticas em CS/mL, além de confirmar a adequação ao método de citometria de fluxo.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ISO - International Standard Organization. ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT; 2017.

AGUIAR JÚNIOR, C.A.S.; SILVA, N.; SOARES, D.F.; FARIA, A.M. Solid-phase extraction of pesticide residues from surface water using a lab-made lower-retention sorbent. **Química Nova**, v.41, n.6, p.641-647, 2018.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; CALDAS, E. P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R.; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisa**, v.12, p.116-131, 2001.

ANTHONISEN, D.; RIBEIRO, M. E. R. Ensaio de proficiência interlaboratorial para contagem de células somáticas em leite. Pelotas – RS: Embrapa Clima Temperado, 2009, 3p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analysis of AOAC International. AOAC International, Arlington, 2009.

APHA. Associação Public Health. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16º ed. Washington: APHA, 1992.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M.F.; ARAÚJO, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica- Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v.25, n.5, p.856- 865, 2002.

BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; SILVA, L. C. C. et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Set/Out, n. 382, v. 66, p. 27-33, 2011.

BENEVIDES, C.M.J.; BEZERRA, M.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J. B. HSSPME/ GC-MS analysis of VOC and multivariate techniques applied to the discrimination of Brazilian varieties of mango. **American Journal of Analytical Chemistry**, v.5, n.3, p.157-164, 2014.

BONDAN, C. Variações na qualidade composicional do leite no Rio Grande do Sul. **II Simpósio Nacional da Vaca Leiteira**. Anais, 2015. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 63-93.

BERTRAND, J. A. Influence of shipping container, preservative, and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.1, p. 145-148, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de set. de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 20 setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 16, de 17 de maio de 2013. Estabelece os requisitos específicos para credenciamento e funcionamento dos Laboratórios de Resíduos e Contaminantes em Alimentos, integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 20 de maio de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37 de 18 de abril de 2002. Institui a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com o objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios, nos termos fixados pela Secretaria de Defesa Agropecuária deste Ministério. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 18 de abril de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57 de 11/12/2013. Estabelece os critérios e requisitos para o credenciamento e monitoramento de laboratórios pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, na forma da presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7 de 04/05/2016. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de identidade e Qualidade do Leite



Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru refrigerado e seu transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 04 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). IN: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 30 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 59 de 06 de novembro de 2019. Altera instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 07 de novembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.; Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS). Relatório técnico: **Evolução da qualidade do leite no Brasil: amostras de leite cru avaliadas pela RBQL entre 2013 e 2020**. Brasília/DF. MAPA, 2021.

BRITO, M. A. V. P. **Conceitos básicos de qualidade e sanidade do gado leiteiro**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de leite, 1999. 5p.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. **Como reconhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, n.70, 8p, 2002.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Eco Toxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

BRITO, J.R.F. **Embrapa: Células somáticas no leite**. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/qualidade-higienica/celulas-somaticas](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/qualidade-higienica/celulas-somaticas)> Acesso em: 17 de dezembro 2022.

BROUTIN, P. Contagem Individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O Compromisso da Qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo/RS: UPF Editora, 2004.

CANDIOTI, L.V.; ZAN, M.M.; CAMARA, M.S.; GOICOECHEA, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v.124, p.123-138, 2014.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477-487, 2005.

CASTRO, J.F. **Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2007.

CHAWLA, S.; PATEL, H.K.; VAGHELA, K.M.; PATHAN, F.K.; GOR, H.N.; PATEL, A.R.; SHAH, P.G. Development and validation of multiresidue analytical method in cotton and groundnut oil for 87 pesticides using low temperature and dispersive cleanup on gas chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, n. 408, p.983-997, 2016.

CHELLINI, P.R.; LAGES, E.B.; FRANCO, P.H.C.; NOGUEIRA, F.H.A.; CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v.98, p.1234-1239, 2015.

COELHO, E.R.C.; LEAL, W.P.; SOUZA, K.B.D.; ROZÁRIO, A.D.; ANTUNES, P.W.P. Development and validation of analytical method for analysis of 2, 4-D, 2, 4-DCP and 2,4, 5-T for monitoring of public water supply. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.23, p. 1043-1051, 2018.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. 1º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

DELTA INSTRUMENTS. An Advanced Instruments Company. *LactoScope FTIR user's guide*. Milk and Liquid Dairy Product Analyzer. Netherlands: **Delta Instruments**, 2007. 138p.

DURAND, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. From green chemistry tonature: the versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, v.120, p.119-123, 2016.

EC - European Commission. Commission decision 2002/657/ EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/ EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official **Journal of the European Communities**, L221/8, 2002.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. EURACHEM/CITAC Guide. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measuremet**. 3<sup>a</sup> edição. 2012.

EMA – European Medicines Agency. **Validation of analytical methods: definitions and terminology**. London: ICH (ICH Harmonised Tripartite guideline – CPMP/ICH/381/95), p.5, 1995.

ERIKSSON, S.; KIM, S. K.; KUBISTA, M.; NORDEN. B. “Binding of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT regions of DNA: evidence for an allosteric conformational change”. **Biochemistry**, v.32, n.12, p. 2987 - 2998, 1993.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. **Teddington: LGC**; p.61, 1998.

EVANGELISTA, D. T. **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FOSS. Central Milk testing. Disponível em: <  
<https://www.fossanalytics.com/en/products/bactoscan>> Acesso: 17 dez. 2022.

FONSECA, C. S. P. **Qualidade do lite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais**. 2005. 62 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O Compromisso da Qualidade do Leite no Brasil**. Passo fundo: Editora UPF, 2004, v. 1, p. 235-254.

GOES JUNIOR, E.J.A.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. D. Validation of a spectro photometric method for quantification of acetyl salicylic acid in pharmaceutical formulations: a proposal of experimental activity for instrumental analysis. **Química Nova**, v.42, p.99-104, 2019.

GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S. V. C. Tendências em validação de métodos de ensaio qualitativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.4, p.433-447, 2011.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

HARDING, F. Milk Quality. **New York: Blackie Academic & Professional**, 1995. 165 p.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, p.96-105, 1998.

IAMMARINO, M.; MARINO, R.; ALBENZIO, M. Howmeaty? Detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, p.851-863, 2017.

IDF. International IDF Standard 120:1980. Milk - **Factors influencing the bacteriological quality of raw milk**. Brussels,1980. 4 p. (Bulletin, 120).

IDF. International IDF Standard 148-2:2006. Milk – **Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. 2006.

IDF. International IDF Standard 148-1:2008. Milk – **Enumeration of somatic cells – Part 1: Microscopic method (Reference method)**. 2008.

IDF. International IDF Standard 161:2020. Milk – **Bacterial count – Protocol for the evaluation of alternative methods**. 2020.

IDF. International IDF Standard 196:2021. Milk – **Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results**. 2021.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008: Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. Rio de Janeiro, junho de 2020. 30 p. Revisão nº 09.

ISO. International Standard 4833-1:2013. **Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony-count at 30 °C by the pour plate technique**. 2013.

JAMAS, L. T.; SALINA, A.; ROSSI, R.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 573 - 578, 2018.

JATOBÁ, R. B. **Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactocount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. 48p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progress of dairy science: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n.1, p. 167-188, 1981.

KOZERSKI, N.D.; MORAES, G.J.; NIWA, M.V.G.; COSTA, M.C.M.; MATA, D.G.; BORGES, A.D.; LEAL, E.S.; ÍTAVO, L.C.V. Aspectos que influenciam a qualidade do leite. **Anais da X Mostra Científica FAMEZ/ UFMS**, p. 220 – 227, 2017. Campo Grande: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

KROGER, M. Milk sample preservation. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.783, 1985.

LANGONI, H. et al. Prototese mamária. Um problema nos rebanhos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 4, p. 552-566, 2013b.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. 23 Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.4, p.177- 180, 2007.

LEGRAND, P.; DESDION, A.; BOCCADIFUOCO, G.; WOJCICLI, D.A. et al. Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.155, p.298-305, 2018.

LEITE, M. O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. ampl. Atual. Campinas, SP: Átomo, 2008. 357 p.

LIMA, B. L. et al. Contagem celular somática nos grandes constituintes do leite. **PUBVET**, v.10, n.8, p.604-607, 2016.

LOPES, B. C., MANZI, M. P., LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de microorganismos da classe mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n.1, 2018.

MARIOTO, L. R. M.; CASSOROTTO, G.; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2020.

MARSHAL, R.T. **Standard methods for examination of dairy products**. Baltimore. American Public Health Association. 546 p., 1992.

MARTINS, M.L.; CARVALHAES, J.F.; SANTOS, L.J.; MENDES, N.S.; MARTINS, E. M. F.; MOREIRA, G. I. P. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG: um estudo de caso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n. 392, p. 24-32, 2013.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. 2002. Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá : **UEM/CCA/DZO – NUPEL**, 2002. 212P.

NICKERSON, S. C. Milk production: factors affecting milk composition. In: HARDING, F. **Milk Quality**. London: Blackie academic & Professional, 1995. Cap.2, p.3-23.

NOVAES, C.G.; YAMAKI, R.T.; DE PAULA, V.F.; NASCIMENTO J.B.B.; BARRETO, J.A.; VALASQUES, G.S.; BEZERRA, M.A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v.9, p.1184-1215, 2017.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p. 10-16, 1999.

OLIVEIRA, G. C. et al. Perfil microbiológico de Streptococcus spp. como agentes causadores de mastites clínicas em diversas regiões do Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 74-74, 2016.

OLIVEIRA, A.C. **Produtividade e qualidade do leite das vacas influenciadas pela raça e pela a dieta fornecida no cocho em propriedades do planalto norte - SC**. 2017, 41 p. Monografia (Graduação em Zootecnia). Centro de ciências agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

PAIXÃO, M. G.; LOPES, M. A.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v. 61, n. 5, p.612 -621, 2014.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Ed. Milkbizz, 2002. 188 p.

PONÇANO, V. M. L. **Competência laboratorial e ensaios de proficiência: avanços e desafios**. São Paulo: Centro de Metrologia em Química – Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, 2005. 7 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, L. F. Fatores determinantes para a qualidade do leite e derivados. 1ª edição, Monte Carmelo, MG: UniFucamp. **FUCAMP**, 2021. 110 p.

RIBEIRO, D.C.S.Z., TAVARES, W.L.F., LEITE, M.O., CERQUEIRA, M.O.P., LIMA, J.S., FERREIRA, L.F., FEIJÓ, F.A.C., HADDAD, J.P., FONSECA, L.M. Adulterants

interference on Fourier Transform Infrared analysis of raw milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.5, p.1649-1654, 2018.

SANDOVAL, V.L.; RIBEIRO, L.F. Qualidade do leite: sua influência no processamento, requisitos obrigatórios e sua importância para o produto final - **GETEC**, v.10, n.28, p.41-49/2021

SANTOS, L.G.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; CABRAL, D.L.V.; AMORIM, E.L.C. Validação de metodologia analítica para determinação de taninos pelo método de difusão radial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.881-885, 2014.

SANTOS, L.M.G. Avaliação das impurezas elementares do medicamento captopril comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, 2018.

SILVA, S.F. **Composição e qualidade do leite no alto Paranaíba de Minas Gerais**. 2019. 38 p. Dissertação (mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, P. A.; SILVA, J. C.; COELHO, P. O.; SOUZA JÚNIOR, E. Qualidade do leite UHT comercializado em Campos Gerais, MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.13, n.2, p. 415-426, 2015.

SILVA, V.N. et al. Correlação entre a contagem de células somáticas e composição química no leite cru resfriado em propriedades do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n.3, p.165-172, 2014.

SILVEIRA, T.M.L.; FONSECA, L.M.; LAGO, T. B. N.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e de análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.128-132, 2005.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J.; HEESCHEN, W. relative detection of pure cultures by various methods relating to macrocolony counts as reference method. **Milchwissenschaft**, v.47, n.4, 1992.

SWARTZ, M.E. & IRA S.K. Analytical Method Development and Validation. **CRC Press**, 2018.



TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory, II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-550, 2004

TOMASKA, M.; SUHREN, G.; HANUS, O. The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality of raw sheep's milk in Slovakia. **Lait**. V.86, p. 127-140, 2006.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I; RIUS, F. X.; HUGUET, J. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 516-524, 2005.

VALGAS, R. A.; TORRES, D. P. **Estimativa de incerteza de medição em ensaio de contagem de células somáticas por citometria de fluxo em leite bovino cru**. Pelotas – RS: Embrapa Clima Temperado, 2015, 26 p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and milk products: Technology, Chemistry and Microbiology**. London: Chapman & Hall, 1994. Cap. 1, p. 1-41.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga-SP. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) 2018.

VITALL TECH DO BRASIL. **Influência da nutrição em gado leiteiro na qualidade do leite**. Universidade Federal de Lavras. Publicado em 16 de agosto de 2017. Disponível em: <https://vitalltechdobrasil.com.br/noticia/influencia-da-nutricao-em-gado-leiteiro-na-qualidade-do-leite/#:~:text=A%20dieta%20deve%20conter%20no,de%20leite%20de%20melhor%20qualidade> . Acesso em 17/12/2022.

ZIMERMANN, K. F.; ARAUJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017.