



Avaliação da estabilidade da solução tampão de glicerina fosfatada como meio de transporte viral

Maria Constanza Rodriguez^{1,2}

Mara Eliza Gasino Joineau¹

Suelly Madeleine Santos de Lucca³

Rosiane Tallevi³

Sue Ellen de Souza³

Gisele Barbosa³

Angélica Vieira da Silva Bertoncello Souza³

Walter de Carvalho Ribeirete⁴

Resumo: O prazo de estabilidade de uma solução é o tempo no qual suas características essenciais são mantidas segundo padrões pré-estabelecidos por órgãos regulatórios. Além da composição físico-química, embalagem, armazenamento e exposição à luz interferem na estabilidade. A Febre Aftosa apresenta impacto econômico significativo na agropecuária e o seu diagnóstico preciso depende de procedimentos pré-analíticos como coleta e transporte de material. O transporte de amostras de epitélio ou fluido vesicular é realizado em solução tampão de glicerina fosfatada e pouco se sabe sobre o prazo de estabilidade deste meio de transporte, normalmente utiliza-se 12 meses com base na manutenção do pH. Este estudo foi conduzido durante 24 meses, com o objetivo de avaliar pH, através do teste estatístico unifatorial ANOVA ($p < 0,05$), esterilidade e funcionalidade biológica do meio usado na suspeição de Febre Aftosa e doenças diferenciais. A solução manteve o pH, esterilidade e funcionalidade biológica ao longo dos 24 meses pós-produção. O prazo sugerido para utilização deste meio é de 18 meses, mantendo-se uma margem de segurança de seis meses. A ampliação do prazo de utilização otimiza recursos dos laboratórios oficiais relacionados a gastos com embalagens, produção e transporte, bem como minimiza resíduos descartados, levando em conta questões ambientais.

Palavras-chave: Solução tampão de glicerina fosfatada; Meio de transporte; Doenças vesiculares; Estabilidade; Febre aftosa.

¹ Rua Jaime Balão, 575 (Câmpus I da Universidade Federal do Paraná, UFPR) Bairro Hugo Lange, Curitiba – PR, Brasil. CEP: 80.040-340. Fiscal de Defesa Agropecuária, Laboratório de Virologia Animal do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME), Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar); mariaconstanza@adapar.pr.gov.br; mgasino@adapar.pr.gov.br.

² Avenida Iguaçú, 333. Bairro Rebouças, Curitiba-PR, Brasil. CEP: 80.230-020. Professora de Pós-Graduação da Faculdade Pequeno Príncipe (FPP). mariaconstanza@adapar.pr.gov.br.

³ Rua Jaime Balão, 575 (Campos I da Universidade Federal do Paraná, UFPR) Bairro Hugo Lange, Curitiba – PR, Brasil. CEP: 80.040-340, técnico de laboratório Auxiliar de Fiscalização. Laboratório de Preparo de Meios e Soluções do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME), Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar). suellylucca@adapar.pr.gov.br; rtallevi@adapar.pr.gov.br; suesouza@adapar.pr.gov.br e gisele.barbosa@adapar.pr.gov.br; angelica.souza@adapar.pr.gov.br.

⁴ Rua dos Funcionários, 1559. Bairro Cabral, Curitiba-PR, Brasil. CEP: 80,035-050. Fiscal de Defesa Agropecuária, coordenador do Programa Estadual de Erradicação da Febre Aftosa, Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar); ribeirete@adapar.pr.gov.br.

Abstract: Shelf stability is the period of time in which a solution maintains its desirable characteristics demanded by regulatory agencies. Besides its chemical and physical properties, packaging, storage and light exposure, can affect stability. Foot and Mouth Disease (FMD) has a significant economic impact in animal husbandry and accurate diagnosis depends on pre-analytical procedures as collection and shipment of clinical specimens. Epithelial samples and vesicular fluid should be suspended in phosphate buffered saline/glycerol transport medium. There is little information regarding the shelf life of this medium, and usually 12 months are used based on pH value measurements. We conducted a 24 months study to evaluate pH using the statistical method one-way ANOVA ($p < 0,05$), sterility and biological functionality of the viral transport medium used to submit FMD and other vesicular diseases. Solution pH, sterility and biological functionality were preserved up to 24 months after its preparation. We suggest an expiration date of 18 months for this viral transport medium, with a six months safety margin. The extended time can optimize Official Laboratories resources associated with the production, packaging and shipping, besides reducing waste, to meet environmental concerns.

Keywords: Phosphate buffered saline/glycerol; Transport medium; Vesicular disease; Stability; Foot and mouth disease.

Introdução

A Febre Aftosa (FA) é uma doença infecciosa altamente contagiosa, algumas vezes fatal, que acomete animais de produção como bovinos, bubalinos, suínos, caprinos, ovinos entre outros bi-ungulados e que apresenta impacto econômico significativo (HERENDA et al., 2000; ORGANIZAÇÃO DE SAÚDE ANIMAL/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Esta doença está presente em extensas áreas ao redor do mundo e faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2020). Uma série de doenças erosivas ou vesiculares deve ser considerada no diagnóstico diferencial de FA, a diarreia viral bovina, doença das mucosas, rinotraqueíte infecciosa bovina, meningoencefalite, febre catarral maligna, língua azul, mamilite herpética bovina, peste bovina, estomatite papular, estomatite vesicular, exantema vesicular e doença vesicular do suíno (RIET-CORREIA et al., 1996; HERENDA et al., 2000).

O diagnóstico preliminar da FA baseia-se nos sinais clínicos, mas a confirmação depende de métodos laboratoriais, essenciais para o controle da doença. A grande maioria dos métodos diagnósticos requer a disponibilidade de instalações propícias, pessoal altamente treinado, reagentes estáveis, múltiplos passos para a manipulação das amostras e manejo da logística associada à coleta e transporte (OEM et al., 2009). A principal solução utilizada no

Brasil e no mundo para conservação durante o transporte de amostras de epitélio ou fluido vesicular na suspeição de doenças vesiculares ou erosivas é a solução tampão de glicerina fosfatada, conhecida no Brasil como líquido de “Vallée” (KITCHING; DONALDSON, 1987; HERENDA et al., 2000; CENTRO PAN-AMERICANO DE FEBRE AFTOSA, 2010; BRASIL, 2017). Pelo menos 1 g de epitélio ou fluido vesicular deve ser coletado preferencialmente da língua, mucosa da boca ou pés, de vesículas não rompidas ou das bordas das rompidas e a amostra submersa nesta solução (BEER, 1999).

O líquido de “Vallée” é composto por quantidades iguais de glicerina e tampão fosfato em torno de 0,04 M, e com pH entre 7,2 e 7,6, o que é importante pois o vírus da FA é extremamente lábil e o tamponamento é crítico para o sucesso da coleta da amostra (KITCHING; DONALDSON, 1987). Este vírus deixa de ser infectante em pH menor que 6,0 e maior que 9,0 (HERENDA et al., 2000). Segundo o plano de ação para Febre Aftosa (BRASIL, 2017) e o manual veterinário de colheita e envio de amostras do PANAF-TOSA-OPAS/OMS (CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, 2010), a solução tampão de glicerina fosfatada deve apresentar pH entre 7,4 e 7,8 e as amostras após imersas neste líquido devem ser enviadas ao laboratório de diagnóstico sob refrigeração em até 48 horas (BRASIL, 2017). A glicerina tem demonstrado ser um bom conservante para o agente da FA, os vírus inoculados em monocamadas de células e estocados a 20 °C negativos após adição de 50 % de glicerina, apresentaram viabilidade superior a 1 ano (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2009). As Organizações Nacionais e Internacionais não fornecem orientações referentes ao número de meses após a fabricação da solução tampão de glicerina fosfatada para o limite de sua utilização. Segundo o manual operacional para Febre Aftosa do Departamento de Agricultura, Alimentos e Vida Marinha da Irlanda (IRLANDA, 2003), o prazo normalmente utilizado para a solução tampão de glicerina fosfatada após sua fabricação é de 12 meses, devendo esta ter seu pH monitorado semestralmente.

Há metodologias desenvolvidas a fim de avaliar o tempo de validade para meios de crescimento bacterianos e fúngicos, porém para meios de conservação viral, o mesmo não ocorre. Os protocolos de validação para meios de crescimento bacteriano estão baseados na alteração do pH, teste de promoção de crescimento, ausência de contaminação e avaliação visual da aparência física do meio (BASU; PAL; DESAI, 2005; CHOUDHARY, 2013; CHOI; ROGERS, 2015; ULISSE et al., 2006). Em relação aos meios de transporte viral, há vários artigos referentes a coleta, transporte e armazenamento de espécimes (WILSON, 1996; FORMAN; VALSAMAKIS, 2011) porém não avaliam o tempo de validade destes meios. Os

meios de transporte viral têm função de conservação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008), para avaliar o crescimento viral são necessários outros testes complementares que envolvem cultivo celular, tendo em vista que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios (QUINN et al., 2011; KNIPE; HOWLEY, 2013; FLINT et al., 2015). A Norma M40-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) foi a primeira a desenvolver um sistema de controle de qualidade dos meios de transporte microbiológicos, apesar de não apresentar uma metodologia para avaliação do tempo de validade destes meios de transporte viral, traz informações de determinação de eficiência, como por exemplo, o teste chamado de “recovery stability”, que avalia a estabilidade de recuperação de vírus ou bactérias inoculando cepas padrão em cultivo celular (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2019). A avaliação da viabilidade viral de diferentes famílias como Picornaviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Togaviridae e Orthomyxoviridae, em diferentes meios de transporte já foi acessada através do efeito citopático positivo em isolamento viral (JOHNSON, 1990). A técnica de isolamento viral é considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico laboratorial de doenças virais (LELAND; GINOCCHIO, 2007).

Para evitar o descarte de milhares de insumos vencidos que apresentam funcionalidade comprovada através de testes, o U.S. Food and Drug Administration (FDA) mantém um programa de extensão do prazo de validade de produtos biológicos como vacinas, meios, soluções, antibióticos e outros medicamentos humanos, desde 1986 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). O United States Department of Agriculture (USDA) também estende o prazo de validade de produtos usados para diagnóstico na medicina veterinária desde que substanciado por testes de validação que demonstrem que o produto mantém os mesmos requisitos mínimos necessários iniciais (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020).

A produção anual de líquido de “Vallée” é realizada normalmente por laboratórios oficiais vinculados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esta produção é bastante laboriosa e demanda recursos como mão-de-obra, reagentes e transporte. Além disso há uma necessidade em minimizar desperdícios e resíduos produzidos pela questão de contaminação ambiental. Não há dados bibliográficos relativos a estudos conduzidos por outros autores neste tópico. Sendo assim o objetivo deste estudo, foi avaliar a estabilidade da solução tampão de glicerina fosfatada através da verificação visual, aferição do pH, teste de esterilidade e funcionalidade biológica ao longo de vinte e quatro meses pós-produção, a fim de auxiliar na definição do prazo para utilização do líquido de “Vallée”.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME) da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar), acreditado junto a Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE/INMETRO) na Norma da ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2017 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017). Os equipamentos utilizados no presente trabalho passaram por uma rigorosa manutenção e calibração dentro dos padrões da Rede Brasileira de Calibração (RBC). Verificações diárias da temperatura foram realizadas nos refrigeradores, câmaras frias, freezers, incubadoras e banhos-maria para controle acurado da temperatura. A temperatura ambiente interna do laboratório foi controlada em $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, verificada e registrada diariamente. Foi realizada a verificação intermediária do pHmetro, calibrado RBC, com soluções tampão certificadas pH 4,01 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil), pH 6,86 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil) e pH 10,01 (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos estes procedimentos foram registrados e arquivados pelo Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) do laboratório.

Produção do líquido de “Vallée”

Quatro lotes de líquido de “Vallée” foram produzidos no Laboratório de Preparo de Meios e Soluções em 2, 3 e 4 de abril de 2018 (L_1 , L_2 e L_3) e em 16 de maio de 2020 (L_4), seguindo as instruções do “Manual veterinário de toma y envío de muestras: manual técnico”, parte da cooperação técnica MAPA/OPS/PANAFTOSA - OPS/OMS (CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, 2017).

Uma solução de tampão fosfato $0,03\text{ mol L}^{-1}$ foi preparada com 1,8 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) da marca Biotec (Biotec, Curitiba, PR, Brasil) e 2,3 g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4) da marca Alphatec (Alphatec, Lima, Perú) em 1.000 mL de água purificada (Elga, High Wycombe, RU). Adicionaram-se 4 mL de solução de vermelho de fenol à 1 % (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e então esta solução foi autoclavada em autoclave vertical (Phoenix Luferco, Araraquara, SP, Brasil) à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos (15 psi), o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} (NaOH) para 7,8 em pHmetro digital de bancada (Digimed DM20, São Paulo, SP, Brasil). O mesmo volume de 1000 mL de glicerina (Realtek, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi autoclavado à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos (15 psi) e então adicionado à solução com mais 1mL/L de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} (NaOH) misturando as vigorosamente, ainda quentes em torno de 50°C . Uma alíquota foi retirada da solução para mensuração e

confirmação do pH 7,8 em pHmetro digital de bancada (Digimed DM20, São Paulo, SP, Brasil) após a esterilização da solução. A escolha do ajuste do pH no limite superior se deve ao fato da tendência da solução a acidificar seu pH e não alcalinizar. Um volume final de 2 litros foi preparado para cada lote e posteriormente separado em alíquotas de 25 mL acondicionadas em tubos plásticos (tipo Falcon) de 50 mL.

Etiquetagem, Embalagem e Armazenamento

Foram separadas 3 alíquotas de 25 mL para cada lote L₁ (L_{1.1}, L_{1.2}, L_{1.3}), lote L₂ (L_{2.1}, L_{2.2}, L_{2.3}), lote L₃ (L_{3.1}, L_{3.2}, L_{3.3}) e lote L₄ (L_{4.1}, L_{4.2}, L_{4.3}), sendo que os lotes L₁, L₂ e L₃ foram produzidos em 2018 e o lote L₄ produzido em 2020. A fabricação e o armazenamento dos lotes de líquido de “Vallée” foram realizados de forma a reproduzir as condições reais nas quais o meio de transporte é preparado para encaminhamento às Unidades Regionais e Locais de Sanidade Agropecuária (URS e ULSAs). Os tubos de cada lote foram identificados por etiquetas adesivas com o nome da solução, número do lote, número da alíquota e data de sua produção. Imediatamente após a identificação das alíquotas, estas foram armazenadas em câmara fria (Indrel, Londrina, PR, Brasil) à temperatura 5 °C ± 3 °C.

Parâmetros de Avaliação da Estabilidade e períodos de observação da solução testada

A estabilidade da solução testada no presente trabalho foi verificada através do teste de esterilidade, avaliação visual, aferição do pH em pHmetro e funcionalidade biológica para avaliar a capacidade de manutenção da estabilidade viral. A verificação do parâmetro pH foi conduzida após o prazo de doze meses a partir da produção da solução, 04/2019 (T₀). Foram realizadas verificações em 30/05/19 (T₁), 11/06/19 (T₂), 17/07/19 (T₃), 21/08/19 (T₄), 20/09/19 (T₅), 30/10/19 (T₆), 29/11/19 (T₇), 26/12/19 (T₈), 20/01/20 (T₉), 20/02/20 (T₁₀), 20/03/20 (T₁₁) e 20/04/20 (T₁₂). Ao final da última verificação (T₁₂) foi conduzido o teste de esterilidade e funcionalidade biológica.

Aferição do pH

Nos tempos de verificação (T₁ a T₁₂), foi realizada a aferição do pH para cada alíquota do lote L₁ (L_{1.1}, L_{1.2}, L_{1.3}), lote L₂ (L_{2.1}, L_{2.2}, L_{2.3}) e lote L₃ (L_{3.1}, L_{3.2}, L_{3.3}) utilizando o pHmetro digital de bancada (Digimed DM-20), temperatura ambiente 22 °C ± 2 °C. Foi realizada também a avaliação visual do pH, por três analistas distintos em cada tempo de verificação (T₁ a T₁₂), para detecção de alteração de coloração, turbidez e precipitação. Para a avaliação do pH pela



coloração foi considerado: pH ácido= amarelo, pH alcalino= vinho e pH adequado= rosa avermelhado.

Funcionalidade Biológica/ Isolamento Viral

A funcionalidade biológica, testada através da capacidade de manutenção da estabilidade viral na solução, foi realizada por meio da inoculação de um vírus causador de doença vesicular/erosiva no líquido de “Vallée” ao final da última verificação (T₁₂), para posterior isolamento e titulação do vírus (JOHNSON, 1990).

Uma alíquota de cada lote (L_{1.1}, L_{2.1} e L_{3.1}) e três alíquotas do novo lote (L_{4.1}, L_{4.2} e L_{4.3}), foram inoculadas com uma suspensão de herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1 cepa Los Angeles) em meio essencial mínimo MEM (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na dose de trabalho, *Tissue Culture Infectious Dose 50 percent* (TCID₅₀) e colocadas sob refrigeração em temperatura de 5 °C ± 3 °C por 72 horas. O mesmo procedimento foi realizado em duas alíquotas controle (I₁ e I₂), inoculando em MEM em vez de Líquido de Vallée, porém colocadas em ultrafreezer à 80 °C negativos por 72 horas.

Para a titulação viral, os lotes, L_{1.1}, L_{2.1}, L_{3.1}, L_{4.1}, L_{4.2} e L_{4.3}, e as duas alíquotas controle sem líquido de “Vallée” (I₁ e I₂), foram diluídas em série, na base logarítmica 10, a partir da diluição 10⁻¹ até 10⁻⁸, utilizando-se MEM. Um volume de 50 µL de cada uma destas diluições seriadas foi então inoculado em uma placa de microtitulação, em poliestireno de fundo chato com 96 cavidades (TPP, Zollstrasse, Suíça), com 100 µL de uma suspensão de 15 - 30.000 células/mL de células *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK, ATCC- CCL22), preparadas com MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA) e 10 % soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, CA, EUA), totalizando duas colunas da placa para cada diluição, duplicata R1 e R2. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ (Revco Elite II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante sete dias e o efeito citopático (ECP) verificado diariamente em microscópio invertido Axyovert 40 CFL (Zeiss, Heidelberg, Germany) no aumento de 400x e 600x. Uma coluna da placa de poliestireno de 96 poços, 8 replicatas, foi deixada sem a inoculação viral para controle de crescimento celular e outra coluna foi inoculada com o líquido de “Vallée” sem inóculo viral para controle de citotoxicidade. O teste foi validado quando as células das cavidades destinadas ao controle de células e controle de citotoxicidade permaneceram intactas. O título viral foi calculado utilizando-se o método de Spearman e Karber (SPEARMAN, 1908; KARBBER, 1931).

Teste de Esterilidade

Ao final, na última verificação (T₁₂), foi realizado o teste de esterilidade das alíquotas dos lotes avaliando-se da seguinte forma:

As alíquotas L_{1,2}, L_{2,2} e L_{3,2}, tubos plásticos (tipo Falcon) fechados, foram incubadas a 21 °C ± 1 °C por 48 horas e as alíquotas L_{1,3}, L_{2,3} e L_{3,3} foram incubadas a 37 °C ± 2 °C por 48 horas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Totalizando 2 tubos testados por lote em duas temperaturas diferentes.

Análise Estatística

Foi realizada a análise de variância unifatorial (ANOVA One-Way – *Analysis of Variance*) e o teste de Fisher a 5 % de probabilidade para a comparação do pH dentro e entre os lotes utilizando-se o programa estatístico Minitab (Minitab, *software* 18).

Critérios de Aceitação

pH

O valor do pH de cada lote de solução deveria ficar no intervalo de tolerância típico de 7,4 - 7,8 determinado pelo Plano de Ação da Febre Aftosa do MAPA, 2017. A avaliação visual da solução deveria coincidir entre os três técnicos avaliadores, resultando em ausência de turbidez, precipitação e sem alteração na coloração, “pH adequado= rosa avermelhado”.

Funcionalidade Biológica/ Isolamento Viral

A alíquota de cada lote (L_{1,1}, L_{2,1} e L_{3,1}) e três alíquotas do lote novo (L_{4,1}, L_{4,2} e L_{4,3}) inoculadas com o vírus deveriam apresentar efeito citopático similar entre os lotes antigos (L₁, L₂ e L₃) e o lote novo (L₄) indicando que a integridade viral não foi afetada pelo ano de produção do meio de conservação e transporte viral, líquido de “Vallée”. Os títulos dos vírus das alíquotas dos lotes de 2018 deveriam ser superiores ou iguais ao das alíquotas do lote de 2020 e os inóculos em MEM I₁ e I₂ deveriam manter seu título próximo ao original de 9,4 Log₁₀ TCID₅₀/mL.

Esterilidade

As duas alíquotas de cada lote (L_{1,2}, L_{2,2} e L_{3,2}, L_{1,3}, L_{2,3} e L_{3,3}) deveriam resultar em “ausência de contaminação bacteriana” após incubação a 21 °C ± 1 °C e 37 °C ± 2 °C por 48 horas em condições de aerobiose.

Análise Estatística

A análise de variância unifatorial (ANOVA One-Way – *Analysis of Variance*) e a comparação dentro e entre os lotes pelo Teste de Fisher a 5% de probabilidade deveriam demonstrar não haver diferença estatisticamente significativa entre as alíquotas de cada lote L₁ (L_{1.1}, L_{1.2}, L_{1.3}), lote L₂ (L_{2.1}, L_{2.2}, L_{2.3}) e lote L₃ (L_{3.1}, L_{3.2}, L_{3.3}) e entre os lotes (L₁, L₂ e L₃).

Resultados

pH

Todos os lotes de solução tampão de glicerina fosfatada (L₁, L₂ e L₃) apresentaram variações no valor do pH, porém permaneceram dentro do intervalo do limite de tolerância de 7,4 - 7,8 ao longo dos 12 meses avaliados após o primeiro tempo de verificação (T₁) como pode ser observado na Tabela 1, variação de 7,45 a 7,69. A última calibração do pHmetro apresentou os seguintes valores de erro e incerteza para as três soluções tampão certificadas: pH 4,01±0,005 com incerteza de 0,009, pH 6,86±0,001 com incerteza de 0,011 e pH 10,01 ±0,009 com incerteza de 0,018. Somando o erro com a incerteza das soluções de pH 4,01; pH 6,86 e pH 10,01 os valores totais foram 0,014; 0,012 e 0,027, respectivamente. Considerando o maior valor combinado do erro e da incerteza encontrado, de 0,027, as soluções apresentaram variação máxima de 7,423 a 7,717, dentro do intervalo do limite de tolerância de 7,4 - 7,8 ao longo dos 12 meses avaliados.

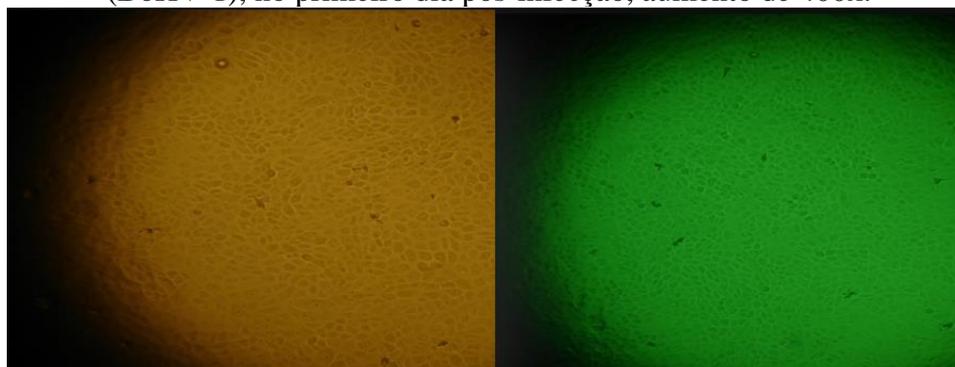
Na avaliação visual do pH (pH ácido= amarelo, pH alcalino= vinho e pH adequado= rosa avermelhado) realizada pelos três analistas, obteve-se o mesmo resultado por alíquota do lote L₁ (L_{1.1}, L_{1.2}, L_{1.3}), lote L₂ (L_{2.1}, L_{2.2}, L_{2.3}) e lote L₃ (L_{3.1}, L_{3.2}, L_{3.3}) para todos os analistas, sendo todos , pH adequado= rosa avermelhado. Não houve presença de turbidez, precipitação ou alteração de coloração.

Estabilidade de Recuperação/ Isolamento Viral

O isolamento viral realizado para o teste de funcionalidade biológica com a suspensão do herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1 cepa Los Angeles) em meio essencial mínimo MEM na dose de trabalho apresentou efeito citopático para todas as alíquotas testadas após 48 horas da inoculação. As alíquotas (L_{1.1}, L_{2.1}, L_{3.1}, L_{4.1}, L_{4.2} e L_{4.3}) não apresentaram efeito citopático nas primeiras 24 horas pós-inoculação (Figura 1), o ECP foi observado posteriormente (Figura 2), entre 2 a 7 dias pós-inoculação para todos os Lotes de líquido de “Vallée” testados. O título do

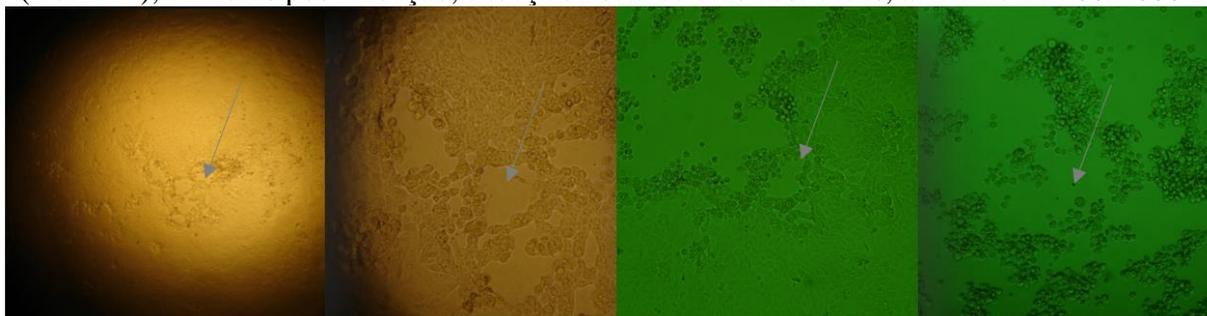
vírus variou entre 7,8 e 8,17 log₁₀ TCID₅₀/mL para os lotes de 2018 (L_{1.1}, L_{2.1} e L_{3.1}), e entre 6,3 e 6,4 log₁₀ TCID₅₀/mL para as alíquotas de 2020 (L_{4.1}, L_{4.2} e L_{4.3}). O título dos inóculos MEM I₁ e I₂ foi de 9,42 e 9,48 log₁₀ TCID₅₀/mL, Tabela 2. Os controles de células e de citotoxicidade não apresentaram nenhuma alteração em cada um dos 8 inóculos utilizados.

Figura 1: Células MDBK sem efeito citopático (ECP) pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), no primeiro dia pós-infecção, aumento de 400x.



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 2: Efeito citopático em células MDBK infectadas pelo herpesvírus bovino tipo (BoHV-1), 72 horas pós-infecção, cabeça da seta células destruídas, aumento de 400x-600x.



Fonte: Elaborado pelos autores

Esterilidade

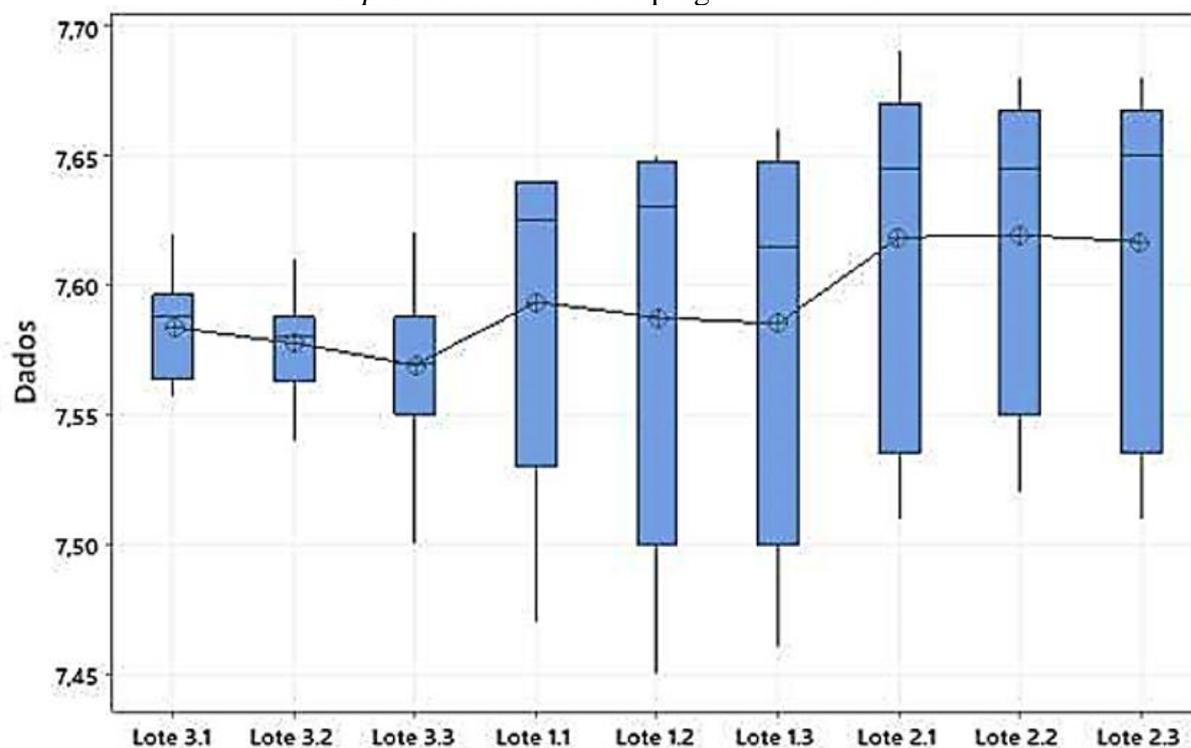
Todas as seis alíquotas dos lotes de solução tampão de glicerina fosfatada L_{1.2}, L_{2.2}, L_{3.2}, L_{1.3}, L_{2.3} e L_{3.3} apresentaram ausência de crescimento bacteriano para ambos os pontos de controle 21 °C ± 1 °C e 36 °C ± 1 °C por 48 horas em condições de aerobiose.

Análise Estatística

A análise de variância dos lotes 1, 2 e 3 resultou em “p” de 0,956; 0,995 e 0,637, respectivamente, ou seja, maior que 0,05, demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as alíquotas de líquido de “Vallée” dentro de cada lote. A análise de variância entre os lotes resultou no valor de “p” de 0,235, também maior que 0,05;

sem diferença estatisticamente significativa entre os três lotes de líquido de “Vallée” (L_1 , L_2 e L_3). O valor de “F” foi de 0,04; 0,00 e 0,46 para as alíquotas dos lotes 1, 2 e 3 respectivamente. Como o “F” calculado foi menor que o tabelado de 3,29, não houve diferença estatisticamente significativa do pH entre as alíquotas dentro dos lotes para um intervalo de confiança (IC) de 95 %. O valor de “F” na comparação entre os três lotes foi de 1,34; sendo o valor tabelado de 2,03. Como o “F” calculado foi menor que o tabelado, não houve diferença estatisticamente significativa do pH entre os lotes (L_1 , L_2 e L_3) para um IC de 95 %. A variação do pH dos lotes foi de 7,45 a 7,70 ao longo dos 24 meses testados (Figura 3).

Figura 3: Variação do pH entre as alíquotas dos três lotes, gráfico do tipo *Boxplot* obtido através do programa Minitab



Fonte: Elaborado pelos autores

As médias dos valores de pH dentro do lote L_1 ($L_{1.1}$, $L_{1.2}$, $L_{1.3}$), lote L_2 ($L_{2.1}$, $L_{2.2}$, $L_{2.3}$) e lote L_3 ($L_{3.1}$, $L_{3.2}$, $L_{3.3}$) e entre os lotes (L_1 , L_2 e L_3) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Fisher à 95 % de confiança.

Discussão

Estudos da estabilidade do pH foram realizados por outros autores para avaliação da estabilidade e prazo de validade de meios de cultura bacteriana (BASU; PAL; DESAI, 2005; ULISSE *et al.*, 2006; CHOI; ROGERS, 2015). Nossos resultados demonstraram que o líquido de “Vallée” conserva seu pH por um período de até 24 meses pós-produção, diferença considerável observada entre o período de doze meses que é utilizado e o período de estabilidade da solução encontrado experimentalmente no presente estudo.

A avaliação visual de soluções líquidas é usada para estimar a qualidade de meios e soluções preparados em laboratórios de diagnóstico (BASU; PAL; DESAI, 2005; CHOUDHARY, 2013; CHOI; ROGERS, 2015). Alterações no aspecto do líquido como turbidez podem indicar contaminação e a precipitação, presença de substância insolúvel (SPEROTTO, 2014). O vermelho de fenol é utilizado como indicador de pH há décadas e o meio pode variar de cor desde amarelo a vinho de acordo com o aumento do pH, ácido a básico (HELD, 2018). A coloração esperada para que o líquido de “Vallée” apresente o pH adequado é rosa avermelhada. Todas as alíquotas foram avaliadas pelos três analistas como sem presença de turbidez, ausência de precipitação e coloração rosa avermelhada. A avaliação visual do pH considerando- pH ácido= amarelo, pH alcalino= vinho e pH adequado= rosa avermelhado - além da aferição do pH pelo pHmetro, é importante tendo em vista que o meio de transporte permanece armazenado em refrigeradores nas Unidades Regionais e Locais de Sanidade Agropecuária (URS e ULSAs) e a avaliação nestes locais é feita de forma visual. É importante certificar-se que alterações de pH poderão ser detectadas. O treinamento contínuo de fiscais e auxiliares de fiscalização agropecuária (FDA e AFDA) entre outros profissionais envolvidos é fundamental para que estes estejam atentos a alterações visuais do pH dos meios armazenados e, caso encontrem diferenças, requisitem novos lotes de líquido de “Vallée”.

O teste de esterilidade é indicado pelo *Center of Disease Control* (CDC) para avaliação de meios de transporte para SARS-CoV-2 e outros vírus. O procedimento operacional padrão (POP) para o teste de esterilidade de meios de transporte viral acondicionados em tubos, inclui a incubação *overnight* à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e posterior análise visual de contaminação (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Ulisse *et al.* (2006) realizaram o teste de esterilidade para meios de crescimento bacteriano através da incubação dos tubos em duas temperaturas de controle $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 48 horas. Nossos resultados do teste

de esterilidade dos tubos com meio de transporte viral resultaram em “ausência de contaminação bacteriana” para incubação em $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Testes de crescimento com utilização de cepas controle foram realizados para comparar lotes de meios de cultura bacteriana dentro e fora do prazo de validade (Ulisses *et al.*, 2006). Os vírus requerem a utilização de técnicas de cultivo celular para viabilizar o seu crescimento (QUINN *et al.*, 2011; KNIPE; HOWLEY, 2013; FLINT *et al.*, 2015), por isso para avaliar a funcionalidade de um meio de transporte, é necessário fazer o teste do isolamento e/ou titulação viral comparativo, seja para espécies virais ou meios de transporte distintos (JOHNSON, 1990). O isolamento viral realizado para o teste de funcionalidade biológica, com o vírus causador de doença vesicular/erosiva (BoHV-1 cepa Los Angeles), apresentou efeito citopático para todas as alíquotas testadas, o que demonstrou a manutenção da viabilidade viral. Os vírus mantiveram sua infectividade nas células MDBK quando conservados nos lotes produzidos há dois anos ($L_{1.1}$, $L_{2.1}$, $L_{3.1}$) e no lote produzido no mês de sua inoculação, $L_{4.1}$, $L_{4.2}$ e $L_{4.3}$. Estes resultados sugerem não haver diferenças capazes de interferir na estabilidade viral na solução tampão de glicerina fosfatada, conservada sob refrigeração após dois anos de sua fabricação. A avaliação biológica funcional do líquido de “Vallée” realizada através da comparação do título do vírus BoHV-1 inoculado nos diferentes lotes de 2018 e 2020, demonstrou que o título do vírus foi mais alto nos lotes de 2018 em comparação ao lote de 2020; 8,02 versus 6,35 log₁₀ TCID₅₀/mL. Este título maior pode ter ocorrido devido ao pH do lote novo estar mais alto do que o de 2018, sendo próximo a 7,8. KITCHING; DONALDSON (1987) no manual de coleta e transporte de espécimes para investigação de vírus vesicular da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), indicam a utilização do pH do meio de transporte entre 7,2 e 7,6, valor inferior ao indicado pelo plano de ação para Febre Aftosa (BRASIL, 2017) e manual veterinário de colheita e envio de amostras do PANAFETOSA-OPAS/OMS (CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, 2010) que é de 7,4 a 7,8. O ajuste do pH para em torno de 7,6 pode ser indicado para a preservação dos vírus nas amostras com suspeita de doença vesicular, porém mais estudos precisam ser realizados com outros vírus. O vírus utilizado no presente estudo é um herpesvírus, portanto, envelopado enquanto o vírus da Febre Aftosa é um picornavírus, não envelopado. Além disso, estas famílias diferem em tipo de ácido nucléico, DNA versus RNA, apresentam ciclos de infecção distintos e muitas outras características que podem influenciar nestes resultados.

Com base na estabilidade do pH do líquido de “Vallée” observada neste trabalho, sugerimos um prazo de utilização de 18 meses, mantendo uma margem de segurança de 6 meses

de forma que estes materiais mantenham sua funcionalidade para integridade viral. O monitoramento semestral do pH dos lotes deve ser mantido nos laboratórios que os produzem, assim como a avaliação visual nos locais de armazenamento. Outros estudos também encontraram períodos de estabilidade divergentes aos utilizados. Um estudo com placas de meio para crescimento bacteriano conservadas a vácuo e mantidas em temperatura ambiente, demonstrou a manutenção da aparência, textura e crescimento bacteriano por até 24 meses (CHOI; ROGERS, 2015). Ulisse *et al.* (2006) encontraram discrepância entre os prazos de validade testados para doze meios de cultura bacteriana, tendo sido reportada uma diferença considerável entre o prazo de validade estipulado e o obtido experimentalmente, podendo estes meios ser utilizados por mais tempo.

A utilização deste meio de transporte por até 18 meses é apropriada para atender os requerimentos operacionais de estruturas laborais complexas como dos laboratórios oficiais, mantendo as características essenciais para o transporte correto de amostras com suspeição de síndrome vesicular durante a fase pré-analítica do processo. A adoção da margem de segurança de seis meses representa um fator adicional de garantia com o propósito de assegurar a eficiência da solução de erros que podem ocorrer durante a estocagem e preservação deste meio de transporte viral. Além disso, há uma preocupação crescente em minimizar resíduos por questões ambientais. Esse novo conceito ainda precisa ser mais difundido entre os laboratórios agropecuários, pois, muitos deles, apesar dos esforços para atender com qualidade, continuam negligenciando a questão do desperdício e gerando uma quantidade crescente de resíduos, o que implica não somente na perda de matérias-primas, mas também custos adicionais para o seu gerenciamento adequado. Estudos futuros com utilização de tecidos epiteliais suspeitos de doenças vesiculares ou erosivas neste meio de transporte seriam de grande valia para a complementação da avaliação biológica da funcionalidade destas amostras acondicionadas nestas soluções.

Conclusão

A análise dos parâmetros selecionados para a avaliação do prazo de estabilidade do líquido de “Vallée” demonstrou a manutenção do valor do pH entre 7,4 e 7,8 e da esterilidade deste meio de transporte ao longo dos 24 meses testados. A comparação das soluções fabricadas em 2018 com a fabricada em 2020 demonstrou que os vírus conseguiram manter a sua integridade de partículas independente do tempo de produção do meio de transporte viral no

qual foram acondicionados. O prazo sugerido para a utilização deste meio é de 18 meses, mantendo-se uma margem de segurança de seis meses.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com recursos do Governo do Estado do Paraná, mão de obra, bens de consumo e bens permanentes.

Tabela 1: Valores de pH aferidos para as alíquotas dos três lotes nos respectivos períodos de observação (T₁ a T₁₂).

Tempo de Aferição do pH	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Valor do pH			Valor do pH			Valor do pH		
	L _{1.1}	L _{1.2}	L _{1.3}	L _{2.1}	L _{2.2}	L _{2.3}	L _{3.1}	L _{3.2}	L _{3.3}
T ₁	7,63	7,64	7,64	7,67	7,67	7,65	7,57	7,57	7,55
T ₂	7,63	7,63	7,62	7,67	7,66	7,67	7,62	7,61	7,61
T ₃	7,62	7,63	7,61	7,64	7,65	7,64	7,59	7,58	7,50
T ₄	7,62	7,63	7,61	7,64	7,64	7,65	7,60	7,61	7,62
T ₅	7,64	7,62	7,62	7,65	7,64	7,66	7,60	7,58	7,58
T ₆	7,64	7,65	7,65	7,69	7,68	7,66	7,58	7,58	7,58
T ₇	7,64	7,65	7,66	7,67	7,67	7,68	7,56	7,54	7,56
T ₈	7,64	7,65	7,65	7,67	7,66	7,67	7,59	7,58	7,59
T ₉	7,47	7,45	7,46	7,51	7,52	7,51	7,59	7,59	7,57
T ₁₀	7,53	7,5	7,5	7,55	7,55	7,55	7,56	7,56	7,55
T ₁₁	7,53	7,5	7,5	7,53	7,55	7,53	7,57	7,58	7,57
T ₁₂	7,53	7,5	7,5	7,53	7,54	7,53	7,56	7,55	7,55

Fonte: Elaborado pelos autores

Tabela 2: Título viral obtido para o BoHV-1 por alíquota de cada lote de líquido de “Vallée” em duplicata e do inóculo em MEM.

Data	Título BoHV-1 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL							
	Lote 1 (L ₁)	Lote 2 (L ₂)	Lote 3 (L ₃)	Lote 4 (L ₄)			Inóculo 1 MEM (I ₁)	Inóculo 2 MEM (I ₂)
	L _{1.1}	L _{2.1}	L _{3.1}	L _{4.1}	L _{4.2}	L _{4.3}	I ₁	I ₂
29/05/2020	7,8	8,1	8,17	6,4	6,36	6,3	9,48	9,42

Legenda: Dose infectante para 50 % dos tecidos celulares (TCID₅₀/ml).

Fonte: Elaborado pelos autores



Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017**. *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

BASU, S.; PAL, A.; DESAI, P.K. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Ranchi, v. 23, n. 3, p. 159-163, 2005.

BEER. J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 2 Volumes. Editora Roca: São Paulo, 1999. 380 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Ação para a Febre Aftosa**, Brasília, DF: MAPA, 2017. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/plano-de-acao-para-febre-aftosa-1.pdf/view>>. Acesso em 09 de maio de 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **SOP#: DSR-052-02: Preparation of viral transport medium**. Atlanta, GA: CDC, 2019. Disponível em <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>>. Acesso em 19 de maio de 2020.

CHOUDHARY, A. Validation Protocol to Determine the Shelf Life of Prepared Microbiological Media. **Pharmaceutical Guidelines**, Índia, abril de 2013. Disponível em <<https://www.pharmaguideline.com/2013/04/validation-protocol-to-determine-shelf.html#gsc.tab=0>>. Acesso em 17 de maio de 2020.

CHOI, Y.W.; ROGERS, V.J. Shelf-Life assessment of agar plates vacuum-sealed in nylon/polyethylene packaging flushed with nitrogen. **Journal of Microbiology & Experimentation**, Budapest, v. 2, n. 7, p. 221-225, 2015.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Standard, M40-A2: Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard**. Pennsylvania, NY: CLSI, 2019. Disponível em <clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m40/>. Acesso em 20 de maio de 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Expiration Dating Extension**. Washington, DC: FDA, 2020. Disponível em <<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/expiration-dating-extension>>. Acesso em 18 de maio de 2020.

FLINT, J.; RACANIELLO, V.R.; RALL, G.F.; SKALKA, A.M; ENQUIST, L.W. **Principles of Virology**. 4. ed. Washington, D.C: ASM: Press. 2015. 1060 p.



Maria Constanza Rodriguez, Mara Eliza Gasino Joineau, Suelly Madeleine Santos de Lucca, Rosiane Tallevi, Sue Ellen de Souza, Gisele Barbosa, Angélica Vieira da Silva Bertoncello Souza e Walter de Carvalho Ribeirete

FORMAN, M.S.; VALSAMAKIS, A. Specimen Collection, Transport, and Processing: Virology. *In*: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.F; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D.W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington D.C.: ASM Press, 2011. v. 2. cap. 76, p.1276-1288.

HELD, P. Using the Cytation 5 Cell Imaging Microplate Reader to Monitor Cell Culture Status. **Biotek Agilent**. 22 de março de 2018. Disponível em <<https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/>>. Acesso em 19 de maio de 2020.

HERENDA, D. Manual on meat inspection for developing countries. *In*: CHAMBERS, P.G., ETTRIQUI, A.; SENEVIRATNA, P.; DA SILVA, T.J.P. **FAO Animal Production and Health: Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2 ed.: Rome: Ed. FAO, 2000, paper 119. Disponível em < <http://www.fao.org/3/t0756e/T0756E00.htm> >. Acesso em 14 de maio de 2020.

IRLANDA. Department of Agriculture, Food and the Marine. **Contingency Plan: Foot and Mouth Disease Operations Manual**. Dublin, DO: DAFM 2003. Disponível em <<https://www.agriculture.gov.ie/media/migration/animalhealthwelfare/diseasecontrols/footandmouthdisease/footandmouthdiseaseoperationsmanual/chapter2veterinarylaboratoryservice/Chapter2.pdf>>. Acesso em 12 de maio de 2020.

JOHNSON, F.B. Transport of Viral Specimens. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 2, p. 120-131, 1990.

KARBER, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. **Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, Leipzig, v. 162, p. 480-487, 1931.

KITCHING, R.P.; DONALDSON, A.I. Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, Paris, v. 6, n. 1, p. 263-272, 1987.

KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6. ed. Lippicott Willians & Wilkins, 2013. 2582 p.

LELAND, D.S.; GINOCCHIO, C.C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 1, p. 49-78, 2007.

WILSON, L.M. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY UPDATES. General Principles of Specimen Collection and Transport. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, n. 5, p. 766-777, 1996.

MINITAB Inc. Statistical Software Data Analysis Software. Version 18, 2020.

CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA. **Manual veterinário de colheita e envio de amostras**: Manual técnico. Rio de Janeiro, RJ: PANAFOSA-OPAS/OMS (Org.), 2010. Disponível em < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/33893> >. Acesso em 10 de maio de 2020.



Maria Constanza Rodriguez, Mara Eliza Gasino Joineau, Suelly Madeleine Santos de Lucca, Rosiane Tallevi, Sue Ellen de Souza, Gisele Barbosa, Angélica Vieira da Silva Bertoncello Souza e Walter de Carvalho Ribeirete

CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA. **Manual veterinário de toma y envío de muestras:** Manual técnico. Rio de Janeiro, RJ: PANAFTOSA-OPAS/OMS (Org.), 2017. Disponível em <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/34527>>. Acesso em 10 de março de 2018.

OEM, J.K.; FERRIS, N.P.; LEE, K.N. et al. Simple and Rapid Lateral-Flow Assay for the Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, 2009, v. 16, n. 11, p. 1660–1664, 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Código sanitário para los animales terrestres.** Paris, FR: OIE, 2009. Disponível em <https://www.oie.int/eng/A_FMD2012/docs/2.01.05_FMD.pdf>. Acesso em 05 de maio de 2020.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. OIE. **Código sanitário para los animales terrestres.** 8a. edición. Paris: Organización Mundial de Sanidad Animal, v.1, 2018. 1833 p.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Código sanitário para los animales terrestres:** OIE-Listed Diseases, infections and infestations. Paris, FR: OIE, 2020. Disponível em <<https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>>. Acesso em 05 de maio de 2020.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary microbiology and microbial disease.** 2. ed. Willey-Blackwell, 2011. 926 p.

RIET-CORREIA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com Febre Aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.

SPEARMAN, C. The method of “right and wrong” cases (Constant Stimuli) without Gauss’s Formulae. **British Journal of Psychology**, Letchworth Eng, v. 2, p.227-42, 1908.

SPEROTTO, R.A. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana.** Editora Univates: Lajeado, 2014. 329 p.

ULISSE, S.; PECCIO, A.; ORSINI, G.; DI EMIDIO, B. A study of the shelf-life of critical culture media. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 42, n. 3, p. 237-247, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Animal and Health Inspection Service:** Electronic Code of Federal Regulations e-CFR. Extension of expiration date for a serial or subserial. Des Moines, IA: USDA 2020. Disponível em <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=66ada163dbbe46aa89ff32961e6bb680&mc=true&node=pt9.1.114&rgn=div5#se9.1.114_114>. Acesso em 21 de maio de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regional Office for South-East Asia:** Guidelines on Establishment of Virology Laboratory in Developing Countries. Gandhi Marg, ND: WHO, 2008. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205181/B4249.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 15 de maio de 2020.