



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Manhães Folly, Marcio; Costa Alves Machado, Simone da
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, UTILIZANDO-SE MÉTODOS DE INIBIÇÃO
MICROBIANA, ENZIMÁTICO E IMUNO-ENSAIOS NO LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO
NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

Ciência Rural, vol. 31, núm. 1, febrero, 2001, pp. 95-98

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33113581015>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, UTILIZANDO-SE MÉTODOS DE INIBIÇÃO MICROBIANA, ENZIMÁTICO E IMUNO- ENSAIOS NO LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

ANTIBIOTICS RESIDUES DETERMINATION, USING MICROBIAL INHIBITION, PROTEIN- BINDING AND IMMUNOASSAYS METHODS, IN PASTEURIZED MILK COMMERCIALIZED IN THE NORTHERN REGION OF RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL

Marcio Manhães Folly¹ Simone da Costa Alves Machado²

RESUMO

O leite contaminado por resíduos de antimicrobianos é considerado adulterado e impróprio para o consumo, representando riscos à saúde do consumidor, riscos tecnológicos para a indústria de laticínios e rejeição da imagem da empresa pelo consumidor. Com os objetivos de determinar a frequência da contaminação por resíduos de antimicrobianos no leite pasteurizado dos tipos "C" e "Integral Fazenda" comercializado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro foram analisadas 300 amostras de leite pasteurizado tipo "C" (130 amostras) e "Integral Fazenda" (170 amostras) oriundas dessa região, de abril de 1996 a abril de 1997. Foi encontrada uma frequência de 4,33% de contaminação por resíduos de inibidores microbianos no leite, utilizando-se, paralelamente, o método de inibição microbiana "Delvotest P" e o de proteínas ligadoras de penicilinas " β L Snap Test". A utilização isolada do "Delvotest P" revelou uma ocorrência de 3,66% e do " β L Snap Test" uma frequência de 1,66%. Para as amostras "Delvotest P" positiva e " β L Snap Test" negativa, foram utilizados testes para detectar tetraciclinas ("Tetraciclina Snap Test") e gentamicina ("Cite Probe Gentamicin"). Conclui-se que houve contaminação no leite de consumo, por vários tipos de antimicrobianos, na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: leite, resíduos de antimicrobiano, β -lactânicos, tetraciclinas, mastites.

SUMMARY

Milk contamination by antimicrobial residues occurs by prophylactic or therapeutic use of such agents in the treatment of mastitis and other diseases in lactating cows, through supplementary diets in cattle feeding and from fraudulent use in milk preservation. Milk contaminated by antimicrobial residues is

considered adulterated and inappropriate for human consumption, since it represents a health risk for consumers, a threat to the dairy industry and causes a negative image for the contaminated products. Milk contamination is also recognized as a critical indicator of infection and a lack of microbiological quality and the possible presence of pathogenic microorganisms in milk. The objective of this research was to determine the frequency of contamination with antimicrobial residues in pasteurized type "C" and "Integral" milk commercialized in the northern region of Rio de Janeiro State, Brazil. 300 samples of pasteurized type "C" milk (130 samples) and "Integral" milk (170 samples) from the northern region of Rio de Janeiro State were analysed using two rapid tests between April 1996 and April 1997. A contamination frequency of 4,33% with antimicrobial residues in milk was found utilizing parallel methods of microbial inhibition (Delvotest P) and protein-binding (β L Snap Test). The separate utilization of the Delvotest P revealed a frequency of 3,66% and β L Snap Test of 1,66%. It was concluded that the milk in the northern region of Rio de Janeiro State was contaminated.

Key words: milk, antimicrobial residues, β -lactamcs, tetracyclines, mastitis

INTRODUÇÃO

A presença de resíduos de antibióticos representa o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite, devendo ser monitorada na recepção da matéria prima nas plataformas das indústrias de laticínios e constitui um risco potencial à saúde do consumidor. Esta contaminação pode ocorrer através de fontes diretas, pela adulte-

¹Médico Veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, Professor Associado, Laboratório de Sanidade Animal, UENF, 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: folly@uenf.br Autor para correspondência.

²Mestre em Produção Animal.

ração com objetivo de prolongar a vida útil do leite, ou, indiretas, consequência do tratamento indicado pelo veterinário para gado leiteiro. (CULLOR, 1993).

Os riscos à saúde do consumidor são representados, principalmente, pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos, por carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da flora intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores. O leite contaminado por resíduos de antibióticos pode criar, ainda, problemas críticos para a indústria de laticínios, interferindo principalmente nos processos de fermentação, nos quais se utilizam culturas acidoláticas na produção de queijos, iogurtes e manteiga. Assim, evitar a presença de resíduos de antibióticos é também um aspecto essencial de qualidade para produção de produtos derivados do leite (COSTA, 1996).

Vários testes baseados em inibição microbiana, enzimáticos, aglutinação em latex, receptores microbianos, radioimunoensaio, eletroforese, cromatografia gasosa e líquida têm aparecido no mercado (IDF, 1991). De acordo com a sensibilidade dos testes de triagem aprovados pelo "Food and Drug Administration" para a pesquisa de resíduos de antibióticos do grupo β -lactâmicos, a menor concentração detectada para o "Delvotest P" é de 3 ppb para penicilina, 10 ppb para ampicilina, 8 ppb para amoxicilina, 30 ppb para Cloxacilina, 8 ppb para cefapirina e 50 ppb para cefotiofur, enquanto que para "BL Snap Test" as concentrações mínimas detectadas são, respectivamente, de 5 ppb, 10 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 8 ppb, 50 ppb seguindo a mesma ordem de antibióticos citados anteriormente (FDA, 1998). No Brasil, a utilização de métodos rápidos para detecção de resíduos de antibióticos está sendo incorporada entre as análises de rotina para triagem do leite nas grandes indústrias de laticínios. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, determinar a freqüência da contaminação por resíduos de antibióticos no leite tipo "C" e "Integral Fazenda" comercializado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas em 300 amostras, de 14 diferentes marcas comerciais de leite tipo "C" (130 amostras de 6 marcas) e "Integral Fazenda" (170 amostras de 8 marcas) coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais da Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, durante 1 ano (de abril 1996 a abril de 1997), envasadas em

sacos plásticos de 1.000 ml e sendo selecionadas no momento da coleta aquelas com data de fabricação mais recente e com embalagem íntegra. As amostras foram previamente homogeneizadas, coletando-se de cada embalagem uma alíquota de 10 mL da amostra e transferindo-a para um tubo de ensaio estéril devidamente identificado. Paralelamente, mensurou-se o pH das amostras do leite com um peágâmetro digital (Merck, Estados Unidos).

Foram utilizados kits no formato de ampolas do "Delvotest P" (Gist Brocades, Holanda) para as 300 análises das amostras. Os kits são compostos por ampolas plásticas contendo em seu interior um meio de cultura sólido semeado com esporos do microrganismo *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, pastilhas nutritivas de glucose, ponteiras plásticas descartáveis e uma seringa dosadora regulada para 0,1 ml. A seringa dosadora foi substituída neste experimento por uma micropipeta dosadora automática (Eppendorf, EEUU). Utilizou-se um delvoincubador (Gist Brocades, Holanda) próprio para dez ampolas. O período de incubação foi de 2 horas e meia à temperatura de 64°C. Para realizar o teste de pesquisa de β -lactâmicos, foram utilizados kits descartáveis "BL Snap Test" (Idexx Laboratories, EEUU). Os kits são individualizados em envelopes de alumínio lacrados e compostos por um suporte plástico, uma pipeta plástica descartável com uma linha indicadora para alíquota da amostra (45 μ l) e um tubo plástico com tampa, contendo um "pelet" liofilizado do conjugado com as proteínas que ligam os β -lactâmicos. Para incubação das amostras a 45°C \pm 5,0°C, um bloco aquecedor duplo (Idexx Laboratories, EEUU) foi utilizado. Os kits foram mantidos sob refrigeração a \pm 5°C.

Nas amostras negativas no "BL Snap Test" e positivas no "Delvotest", foram realizadas provas adicionais para identificação de resíduos de gentamicina e tetraciclinas. Para a pesquisa de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina, foram utilizados kits do "Tetracycline Snap Test" (Idexx Laboratories, EEUU) e para a detecção gentamicina foram utilizados kits "Cite Probe Gentamicin Test" (Idexx Laboratories, EEUU). Esses testes são imunoensaios competitivos do tipo "Enzime Linked Immunosorbent Assay" (ELISA).

Os protocolos adotados para a realização de todas as provas foram os preconizados pelo fabricante e todas as análises positivas foram retestadas no mesmo dia.

A utilização da amostragem aleatória do experimento teve como objetivo apresentar e avaliar a freqüência da contaminação por resíduos de anti-

bióticos no leite, tendo o aspecto regional como universo amostral, e não tipos de leite e marcas comerciais específicas.

Os resultados do experimento foram aplicados em um modelo e avaliados de acordo com os padrões determinados para a avaliação da significância, pelo *"Establishment of Regulatory Programmes do Codex Alimentarius"* (FAO, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores observados na freqüência de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo na região Norte do Estado do Rio de Janeiro são apresentados na tabela 1 e não apresentaram uniformidade. Entre as 300 amostras de leite, 13 foram positivas, revelando uma freqüência de contaminação de 4,33%. O leite tipo "C" apresentou, de 130 amostras, 6 amostras positivas com uma freqüência de 4,61%, enquanto o leite "Integral Fazenda" apresentou, de 170 amostras, 7 amostras positivas com uma freqüência de 4,12%.

De acordo com o modelo do "Codex Alimentarius" (FAO, 1996), a amostragem utilizada permitiu considerar significativos os resultados encontrados em um nível de segurança de 99%, em uma prevalência pré-definida da contaminação por resíduos de antibióticos no leite de 5% no universo amostral estudado.

A tabela 2 apresenta os resultados isolados obtidos, utilizando o método "Delvotest P" e "BL

Tabela 1 – Freqüência da contaminação com resíduos de antibióticos, utilizando "BL Snap Test" e "Delvotest P" em diferentes marcas comerciais de leite pasteurizado, região Norte do Estado do Rio de Janeiro, no período de abril 1996 a abril de 1997.

Marca	Tipo de leite	N. amostras	Positivas	Freqüência
1	IF	16	-	-
2	IF	22	-	-
3	IF	28	-	-
4	IF	26	2	7,7%
5	IF	11	1	9,1%
6	IF	27	1	3,7%
7	IF	30	2	6,6%
8	IF	10	1	10%
Subtotal	IF	170	7	4,12%
9	C	25	1	4%
10	C	20	3	15%
11	C	23	-	-
13	C	29	1	3,45%
14	C	11	1	9,1%
Subtotal	C	130	6	4,61%
Total geral	C e IF	300	13	4,33%

C- Leite tipo "C"

IF – Leite tipo "Integral Fazenda"

Tabela 2 - Freqüência da contaminação com resíduos de antibióticos, utilizando os métodos "Delvotest P" e "BL Snap Test" separadamente em leite comercializado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 1996 a abril de 1997.

Método	Total (n. amostras)	C (n. amostras)	IF (n. amostras)
Delvotest P	3,66% (11)	3,07% (4)	4,12% (7)
BL Snap Test	1,66% (5)	2,3% (3)	1,17% (2)

C – Leite tipo "C"

IF – Leite tipo "Integral Fazenda"

"Snap Test", sendo demonstrada uma freqüência de 3,66% (11 amostras positivas) e de 1,66% (5 amostras positivas). Como apresentado na tabela 3, das 11 amostras de leite pasteurizado que apresentaram resultados positivos no "Delvotest P", somente 3 foram confirmadas pelo "BL Snap Test" para presença de resíduos de antibióticos do grupo β -lactâmicos, sendo 1 amostra de leite tipo "C" e 2 amostras em leite "Integral Fazenda". As 8 amostras restantes, positivas para o "Delvotest P" e negativas para o "BL Snap Test", foram testadas adicionais para presença de resíduos de tetraciclina e gentamicina; 5 amostras tiveram resultado positivo para tetraciclina, sendo 2 de leite tipo "C" e 3 de leite "Integral Fazenda"; nas 3 amostras restantes, não foi possível identificar os inibidores microbianos. O "BL Snap Test" apresentou em 2 amostras resultados positivos que não foram reproduzidos no "Delvotest P".

O nível de contaminação do leite com resíduos de tetraciclina também foi considerado significativo pelo modelo de análise de dados estipulado pelo Codex Alimentarius (FAO, 1996), podendo ser relacionado com o amplo uso dessas drogas na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, por via parenteral, principalmente em formulações de longa duração em substituição aos β -lactâmicos no tratamento da mastite causada por *Staphylococcus aureus* (FOLLY *et al.*, 1998). Supõe-se que as 5 amostras positivas no "Delvotest P" e confirmadas para presença de tetraciclina pelo "Tetracycline Snap Test" continham uma alta concentração da droga, uma vez que a sensibilidade do "Delvotest P" é 5 vezes maior para tetraciclina (400ppb), em relação à sensibilidade do "Tetracycline Snap Test" e aos níveis de tolerância estabelecidos pela "United States Food and Drug Administration" (FDA, 1998). Para as 2 amostras positivas no "BL Snap test" e negativas no "Delvotest P", podem ser consideradas duas

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos, utilizando-se os métodos “Delvotest” e “BL Snap Test” em leite comercializado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, no período de abril 1996 a abril de 1997.

Métodos	C	IF	Total
“Delvotest” positivo	1	2	3
“BL Snap Test” positivo			
“Delvotest” positivo	3	5	8
“BL Snap” negativo			
“Delvotest” negativo	2	-	2
“BL Snap” positivo			
Total	6	7	13

C – Leite tipo “C”

IF – Leite tipo “Integral Fazenda”

possibilidades: na primeira, a sensibilidade do “Delvotest P” para detecção de ceftiofurano, uma cefalosporina de terceira geração, em leite pasteurizado, difere da sensibilidade do teste em leite cru, sendo incapaz de detectar este princípio ativo, enquanto a sensibilidade do “BL Snap Test” para resíduos de ceftiofurano não é alterada após a pasteurização (FDA, 1998). Na segunda, as 2 amostras de leite tipo “C” poderiam apresentar resíduos de penicilina, sendo a presença do anel β -lactâmico reconhecida pelo “BL Snap Test”, mas que já tivessem perdido sua ação inibitória, impossibilitando sua detecção por métodos microbiológicos. Os resíduos de penicilina presentes no leite armazenado por um período superior a 48 horas, a partir da ordenha, perdem sua ação inibitória e, consequentemente, a capacidade de sua detecção por métodos microbiológicos (COVA, 1984). Sendo o período de tolerância para beneficiamento do leite tipo “C”, desde o momento da ordenha, de 24 horas (RIISPOA, 1962) somado ao tempo para sua distribuição no comércio e coleta das amostras antes da realização das análises, essa hipótese poderia ser considerada a mais provável.

CONCLUSÕES

O leite pasteurizado tipo “C” e “Integral Fazenda”, comercializado e consumido na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, apresentou contaminação por resíduos de antibióticos, sendo principalmente detectados os antibióticos do grupo β -Lactâmicos e tetraciclinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: Um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, v.44, n.10, p.15-17, 1996.
- COVA, W.G. Prática sensitiva de detecção de penicilina no leite. *Higiene Alimentar*, v.34, n.3, p.207-211, 1984.
- CULLOR, J.S. Antibiotic residue test for mammary gland secretion. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.9, n.3, p.609-620, 1993..
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Codex Alimentarius*. Rome, 1996. V.3 : Residues of veterinary drugs in foods : 91p.
- FDA - United States Dep. Health Human Service , Public Health Service. *Milk screening tests: Screening tests available as of January 1998 for detecting drug residues in milk- Only use drugs approved for lactating dairy cows*. Washington, DC, 1998. p.32-38.
- FOLLY, M.M., MOTTA, O.V., MACHADO, S.C.A. *Controle da mamite subclínica no rebanho leiteiro da região Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: L.S.A./C.C.T.A Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1997. 20p. (Boletim Técnico, 4).
- IDF: International Dairy Federation. Detection & confirmation of inhibitors in milk and milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation Bruxelas*, Bélgica, n.258, p.2-81, 1991.
- RIISPOA. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Ministério da Agricultura - Decreto no. 30.691, de 29-3-52, alterado pelo Decreto no. 1.255 de 25-6-62, art. 510 § 8.º, 1962, p.89.