

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS E MICROBIOLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Comparative analysis between immunoenzyme and microbiological tests for detection of antibiotic residues in milk

Thalyta Marina BENETTI¹
Wanda Moscalewski ABRAHÃO²
Rosiane NICKEL²

SUMÁRIO

Os antibióticos têm sido bastante utilizados nas fazendas leiteiras de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando à cura de mastites, ou, ainda, incorporados à alimentação animal. Tais procedimentos conduzem à presença de resíduos de antibióticos, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública. Este trabalho vem contribuir desenvolvendo análise comparativa entre metodologia imunoenzimática ("SNAP® test"), análise microbiológica pelo sistema reativo "Delvotest®", e pelo método microbiológico de difusão em ágar utilizando discos de papel em 127 amostras de leite pasteurizado e UHT (ultra-alta temperatura), comercializados no Estado do Paraná no ano de 2007. As metodologias apresentaram comportamentos diferentes em relação à presença de resíduos de antibióticos. Conclui-se que entre os métodos analisados, o método "SNAP® test" demonstrou ser o mais sensível, porém, não foi obtida uma correlação com os demais métodos pela significância estatística; sendo necessária a utilização de métodos ultra-sensíveis como a metodologia de cromatografia líquida e espectrometria de massa. Os métodos que utilizam microrganismos como a metodologia convencional (Association of Official Analytical Chemists, 1995 e modificado por Albuquerque *et al.* 1996) e o "Delvotest®" apresentam algumas limitações de uso inerente ao método biológico e pouca especificidade.

Termos para indexação: resíduo de antibiótico, leite, metodologia imunoenzimática, método microbiológico.

1 INTRODUÇÃO

O leite é o mais valioso alimento natural para todos os mamíferos, principalmente lactantes, crianças e animais em desenvolvimento, já que contém todos os princípios nutritivos, e é considerado um alimento completo em nutrientes facilmente assimiláveis, para a maioria dos microrganismos encontrados na natureza (BARROS, 2001). No entanto, a composição química do leite pode ser alterada por uma série de fatores, tais como raça, idade, alimentação do animal, estágio de lactação, ou, ainda, infecções do úbere da vaca (OLIVEIRA e CARUSO, 1984).

Infecções no úbere vão com o leite além dos portões da fazenda. Mudanças na composição do leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e

gordura, e aumento em sódio e cloro) reduzem sua qualidade. Estados mais avançados de infecção resultam em um leite com composição química diferente da normal. A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Pelczar *et al.*, 1996).

Em função desta infecção, os antibióticos têm sido bastante utilizados nas fazendas e até, em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, administrados aos animais por via intravenosa, intramusculares ou injeções subcutâneas, oral na alimentação ou água, no local sobre a pele e por intramamária e infusões intra-uterina, principalmente visando a cura de masti-

1 Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). *thaly_benetti@hotmail.com.

2 Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR).

tes, ou, ainda, incorporados à alimentação animal. Tais procedimentos conduzem à presença de resíduos de antibióticos, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública (MINIUSSI, 1992; KATIANI *et al.*, 2009).

Os riscos à saúde do consumidor são representados, principalmente, pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos ou por carcinogênicos, por alteração no equilíbrio da microbiota intestinal, pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores e, posteriormente, a transferência de multiresistência entre os microrganismos através do plasmídeo. O leite contaminado pode resultar ainda em problemas críticos para a indústria de laticínios, diminuindo ou inibindo a atividade das bactérias responsáveis pelas diversas fermentações desejadas nos diferentes produtos lácteos, como queijo, iogurtes e manteiga, além da presença de sabores indesejáveis reduzirem o valor dos produtos lácteos. Assim, evitar a presença de resíduos de antibiótico é também um aspecto essencial de qualidade para a produção de produtos derivados de leite (COSTA, 1996; KATIANI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2007).

Missiussi (1992) relatou que no Brasil não havia uma política adequada para o controle do uso de medicamentos em longo prazo. No entanto em 2000, foi criado através da Resolução n.º 5 de 24 de janeiro do mesmo ano, o Grupo de Trabalho de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, que visava a implantação de um controle nacional de resíduos. Tendo seu estabelecimento escalonado em 2002, para os principais alimentos de origem animal, dentre eles o leite. Este programa não possui apenas o objetivo de verificar níveis de resíduos de antibiótico no leite, mas também de estimular práticas de controle preventivo no campo e nas indústrias de laticínios, além de testar e validar metodologias, gerando conhecimentos científicos e dados para subsidiar futuras ações de vigilância sanitária (PCRM, 2005).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas diversas metodologias analíticas para a detecção rápida de resíduos de drogas antimicrobianas no leite. Estas técnicas encontram-se disponíveis no mercado, sob a forma de conjuntos de reativos prontos para uso em condições de campo. Os conjuntos foram inicialmente desenvolvidos para utilização em plataformas de recebimento de leite nas usinas, porém, têm sido aplicados, também, em propriedades rurais, para verificar a presença de resíduos no leite armazenado nos tanques ou proveniente de vacas mantidas sob tratamento com antibióticos (ANDREW, 2008).

Dentre as metodologias rápidas disponíveis no mercado sob a forma de kits, que utilizam

metodologias simples e têm baixo custo se comparado com os testes convencionais, sendo estes, testes qualitativos, ou seja, apenas apontam a presença ou ausência do resíduo sem indicar valores, por isso os resultados exigem confirmação, estão a metodologia imunoenzimática "SNAP® test" e Análise microbiológica "Delvotest®"; o primeiro teste apresenta anticorpo específico para detectar um antimicrobiano particular (SNAP® Gentamicina), ou testes que utilizam receptores específicos que detectam uma classe de substâncias antimicrobianas (SNAP® β -lactâmicos, Tetraciclina), enquanto que o segundo teste permite a detecção de resíduos de antibióticos de amplo espectro por verificar a presença de diversas substâncias antibacterianas no leite, tais como: o grupo β -lactâmico, o grupo das Tetraciclinas e as Gentamicinas. O princípio do teste baseia-se na difusão em ágar de substâncias potencialmente inibidoras, sendo neste teste colocada a amostra em contato com o *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 10149) sensível, quando estas estão presentes na amostra de leite, é visualizada a mudança de coloração através do indicador púrpura de bromocresol, enquanto a ausência deste resíduo promove o crescimento bacteriano com produção de ácido, e redução do corante evidenciada pela coloração amarela (BRITO E PORTUGAL, 2003).

Várias são as metodologias recomendadas para a detecção de resíduos de antibióticos no leite, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association* (APHA). Estas envolvem desde técnicas microbiológicas utilizando o *Bacillus stearothermophilus* como indicador oficial de inibição do crescimento microbiano (CORASSIN, 2000), como também outras mais complexas como as de cromatografia; imunoensaio, espectrometria de massa, ressonância e eletroforese em gel de agarose (NASCIMENTO *et al.*, 2001).

Em função do exposto, é evidente que para maior segurança no consumo de leite de boa qualidade, tanto no que diz respeito à manutenção da composição química natural, como também desprovido de substâncias que possam levar a uma série de problemas de saúde, é necessário à inserção de políticas públicas mais efetivas de fiscalização dos alimentos.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma análise comparativa entre metodologia imunoenzimática ("SNAP® test"), análise microbiologia pelo sistema reativo "Delvotest®" e pelo método microbiológico de difusão em ágar utilizando discos de papel em amostras de leite pasteurizado e UHT, comercializados no Estado do Paraná.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 114 amostras de leite tipo pasteurizado e 13 UHT, adquiridas em diferentes

estabelecimentos comerciais do estado Paraná, e produzidas na região Sul do país. As amostras foram coletadas pela Vigilância Sanitária Estadual e analisadas no Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) no período de julho a dezembro de 2007. Para cada amostra recebida, foram realizadas as seguintes metodologias visando à detecção de resíduos de antibióticos no leite:

- 1. Metodologia imunoenzimática "SNAP® test" (Gentamicina, β -lactâmicos e Tetraciclina):** realizada de acordo com instruções do fabricante.
- 2. Análise microbiológica "Delvotest®":** realizada de acordo com instruções do fabricante.
- 3. Método microbiológico de difusão em ágar utilizando discos de papel (Análise microbiológica convencional):** De cada amostra de 1000 mL de leite, foram separados um volume de 2 mL, o qual foi submetido a aquecimento de 80°C por 5 minutos, realizando-se a seguir, o resfriamento em água fria. Para desenvolvimento da cultura, como inóculo inicial, foi utilizado *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 10149), o qual cresceu em meio TSB, por 24 horas a 60°C, produzindo cerca de 100 UFC/mL.

No preparo das placas de Petri, 1 ml desta suspensão foi misturada a 9 mL de Ágar Mueller-Hinton derretido a 50°C e a seguir vertido em placa. Para controle da análise, antes de cada teste as placas foram incubadas durante 1 hora a 60°C. Disco de papel filtros inertes foram impregnados com 20 μ l das amostras de leite a serem analisadas, e a seguir, estes foram colocados sobre a superfície do ágar, inoculando-os com a cultura bacteriana.

Assim, para cada amostra de leite analisada, foram preparados discos impregnados com amostra de leite a ser analisada, e como grupo controle foram colocados discos com amostra de leite sem antibiótico + 0,05 penicilina; e discos com amostra de leite sem antibiótico + 0,05 penicilina + penicilinase.

As análises foram feitas em duplicata e a leitura dos resultados ocorreu após incubação das placas a 60°C durante 24 horas, medindo-se os diâmetros dos halos de inibição. Através deste ensaio foi possível determinar a presença de resíduo de antimicrobianos de maneira geral.

Discos de papel de filtro inertes foram impregnados com diferentes concentrações de penicilina G potássica (10 000 UI/mL em tampão fosfato) e inseridos sobre placas previamente inoculadas com *B. stearothermophilus*. A curva padrão foi elaborada a partir da medida dos halos resultantes da inibição da cultura bacteriana pelo antibiótico. A determinação da concentração de resíduos de penicilina foi estimada a partir da equação de regressão extrapolando-se as medidas em milímetros dos halos de

inibição obtidos, utilizando curva padrão de Penicilina G Potássica (Sigma) (Association of Official Analytical Chemists, 1995 e modificado por Albuquerque *et al.* 1996).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

As três metodologias apresentaram comportamentos diferentes em relação a presença de resíduos de antibióticos. O índice de positividade das amostras para cada teste está demonstrado na Figura 1, assim como, a porcentagem de positividade na Tabela 1, ambas a seguir:

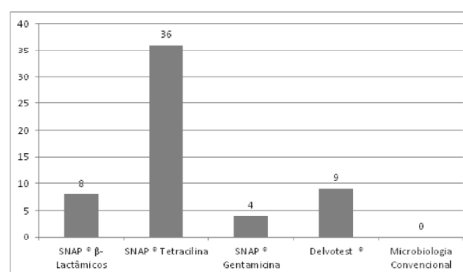


Figura 1 – Resultado das análises de resíduos de antibióticos por diferentes metodologias em amostras de leite comercializadas no estado do Paraná em 2007.

Tabela 1 – Resultados expressos em porcentagem referentes das análises de resíduos de antibióticos por diferentes metodologias.

SNAP® β -lactâmicos	6,30%
SNAP® Tetraciclina	28,30%
SNAP® Gentamicina	3,10%
Delvotest®	7,00%
Microbiologia Convencional	0,00%

Com a utilização do método "Delvotest®" observou-se 9 (7%) do total de amostras positivas. Através deste sistema reagente conforme indicação do fabricante, detectam-se resíduos de antibióticos de amplo espectro, como o grupo β -lactâmico com nível de detecção variando de 2 a 100 ppb, o grupo das Tetraciclina e as Gentamicinas com limite de detecção respectivamente de 800 e 200 ppb (BRITO E PORTUGAL, 2003). Este teste possui o interferente de ser afetado por inibidores naturais do leite, pois não é utilizado nenhum tratamento prévio da amostra para eliminá-los.

O método "SNAP® test" detectou um total de 48 amostras positivas representando 37,7% de positividade, sendo que para o grupo β -lactâmico observou-se 36 (28,3%) positivas, assim como 4 (3,1%) para as Gentamicinas e 8 (6,3%) para o grupo das Tetraciclina.

Os níveis de detecção do teste SNAP® β -lactâmicos variam de 5 a 50ppb, enquanto o grupo das Tetraciclina variam de 20 a 30ppb, já a Gentamicina determinam seu limite em 30ppb (BRITO E PORTUGAL, 2003).

Observou-se através do teste convencional que nenhuma amostra apresentou a presença de halo de inibição de crescimento indicando a ausência de resíduos de antibióticos no limite de detecção deste método. A determinação da curva padrão apresenta-se na Figura 02.

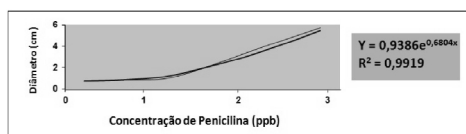


Figura 2 – Curva padrão de inibição de *Bacillus stearothermophilus* a Penicilina G potássica.

Comparando os resultados obtidos através da metodologia convencional com os “Delvotest®” ressalta-se que no primeiro método houve previamente o aquecimento das amostras a 80°C por 5 minutos com a finalidade de eliminar possíveis inibidores naturais do leite enquanto que no “Delvotest®” não ocorreu a indicação de realizar este aquecimento. Mitchell e colaboradores (1998) em estudos anteriormente realizados demonstraram a interferência de inibidores naturais do leite. Desta forma positividade dos resultados pode ser devido à presença dos inibidores naturais do leite que competem pelo mesmo alvo biológico com os antibióticos.

O método microbiológico convencional apresentou total discrepância entre as demais metodologias, enquanto que o “Delvotest®” e o “SNAP® test” apresentaram maior semelhança entre os resultados.

Alguns fatores podem ser considerados para interpretar as diferenças encontradas. Apesar do método “Delvotest®” e da microbiologia convencional obterem o mesmo princípio, isto é, inibição do crescimento bacteriano por meio do *Bacillus stearothermophilus*, a manipulação do teste é diferenciada. Na microbiologia convencional existiu o interferente de ser uma metodologia extremamente complexa e manual, necessitando de várias etapas para a execução sendo que o erro constante e relativo é passível de ocorrer. Por se tratar de método biológico a padronização torna-se difícil e a reprodutibilidade dos resultados pode ser afetada. Enquanto que no “Delvotest®” que é um sistema reagente já padronizado e de fácil manipulação os erros inerentes tanto em relação ao microrganismo e ao manipulador são minimizados devido às poucas etapas de manipulação.

Como mencionado por Carraro (2008), a retirada da amostra de leite da metodologia “Delvotest®”

é subjetiva, pois este sistema é composto por uma seringa com marcação de volume na qual se adapta uma ponteira descartável sem precisão exata da medida de leite. No procedimento de análise que acompanha o sistema reagente, a maneira como deve ser feita à dosagem da amostra não é explicada em detalhes, levando a várias maneiras de interpretação, podendo fazer com que seja utilizado um volume menor do que o necessário. Como consequência, resultados falso-negativos podem ser obtidos, o que contradiz pelo apresentado por Riediker e Stadler (2001), onde estes demonstram que a ausência de reações inespecíficas e sensibilidade contra antimicrobianos, permitindo definir o teste “Delvotest®” como metodologia de triagem, onde amostras positivas devem ser confirmadas e quantificadas pelos métodos confirmatórios como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Comparando os resultados obtidos e os limites de detecção dos métodos utilizados constata-se que o sistema reagente “Delvotest®” em relação ao “SNAP® test” apresentam baixos índices de positividade pela necessidade de altas concentrações de Tetraciclina e Gentamicina para desencadear reação positiva no “Delvotest®, em relação ao grupo β -lactâmicos não há necessidade de altas concentrações destes resíduos para obter resultado positivo. Confirmando desta forma os resultados obtidos no que se refere ao número de amostras positivas para o “Delvotest®”(9) em relação as do “SNAP® β -lactâmicos”(8), onde possivelmente 8 amostras possuíam resíduos de β -lactâmicos e a amostra restante pertenceria provavelmente ao grupo Tetraciclina ou Gentamicina que poderiam ser comprovados através de metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro triploquadropolo. Assim pode se constatar que a metodologia “Delvotest®” não pode ser padronizada como metodologia de triagem devido a necessidade de altos níveis de detecção do grupo Tetraciclina, uma vez que o Ministério da Agricultura preconiza através da Resolução 51 de 2001 (BRASIL, 2001), que o limite máximo aceitável é de 100ppb. Os resultados obtidos constataram a alta frequência de amostras positivas para Tetraciclina sendo este mais um motivo de restringir o uso de um método pouco sensível no uso como triagem da pesquisa de resíduos de antibióticos.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que entre os métodos analisados o método “SNAP® test” demonstrou ser o mais sensível, porém, por não obtermos uma correlação com os demais métodos; haveria a necessidade de utilização de métodos ultra-sensíveis como a metodologia de cromatografia líquida e espectrometria de massa.

Os métodos que utilizam microrganismo como, a metodologia convencional e o “Delvotest®”

apresentam algumas limitações de uso inerente ao método biológico e pouca especificidade.

SUMMARY

Antibiotics have been widely used in dairy farms in an indiscriminate manner, whether for therapeutic purposes, primarily for the cure of mastitis, or incorporated into the feed. Such procedures lead to the presence of antibiotic residues, representing a risk to consumers, and subsequently a serious problem both economically and to public health. This work contributes by developing a comparative analysis between the ELISA methodology ("SNAP@test"), microbiological analysis of the reactive system "Delvotest®" and the microbiological agar diffusion method using paper disks, in 127 samples of pasteurized milk and UHT (ultra-high temperature), marketed in the State of Parana in 2007. The methods showed different behaviors in relation to the presence of antibiotic residues. We concluded that among the methods analyzed, the "SNAP@test" method proved to be the most sensitive; however by not getting a correlation with the other methods, there would be a need to use ultra-sensitive methods such as the method of liquid chromatography and mass spectrometry. The methods that use microorganism as the conventional method (Association of Official Analytical Chemists, 1995 and Albuquerque *et al.* modified, 1996) and the "Delvotest®" present some inherent limitations in the use of the biological method and poor specificity.

Index terms: antibiotic residues, milk, ELISA methodology, microbiological method.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Dairy products**. Washington DC, v. 2, p. 38-45, 1995.

ALBUQUERQUE, L. M. B., MELO, V. M. M., MARTINS, S. C. S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 41, p. 29-32, 1996.

ANDREW, S. M. Antibiotic residue tests for individual cows – an update. **Proc. Annu. Meet. Nat. Mastitis Council**, v. 1, p. 191-201, 2008.

BARROS, G. M. S. *et al.* Pesquisa de resíduos de antibiótico em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Resolução nº 51. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de fevereiro de 2001. Estabelece Diretrizes para Controle de Resíduos em Leite.

BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B; Diagnóstico da qualidde

do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibiótico. **Embrapa Gado de Leite**, EPAMIG, Juiz de Fora, 2003.

CARRARO, C. N. M. *et al.* (2008) **Avaliação do desempenho de três métodos utilizados para detecção de resíduo de antibiótico em leite. Ciência do Leite**. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/avaliacaodo-desempenho.htm>>. Acesso em: 17/10/2010.

CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. Aplicabilidade dos conjuntos para detecção de resíduos de antibióticos no leite em propriedades leiteiras. **Revista O Biólogo**, v. 62, n. 1, 2000.

COSTA, E. O. Resíduos de antibiótico no leite. Um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v. 44, n. 10, p. 15-17, 1996.

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.

KATIANI L., FARRE M., BARCELO D., Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 729- 744, 2009.

LEE J. B., CHUNG H. H., CHUNG Y. H., LEE K. G. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods, **Food Chemistry**, v. 105, p. 1726-1731, 2007.

PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS DO MAPA (PCRM). **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal** – PAMVet 2º Ed. Brasília, março de 2005.

MINIUSSI, J. T. Capítulo n.º 1: Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *In*: CHARLES, T. P., FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. 1º. Edição. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, v.1, n. 2, p. 169-174, 1992.

MITCHELL *et al.*, Antimicrobial Drugs in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 60, p. 742-756, 1998.

NASCIMENTO, G. G. F., MAESTRO, V., CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibiótico no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

OLIVEIRA, A. J., CARUSO, J. G. B. Capítulo n.º 8: Leite: características, composição, química, propriedades, obtenção higiênica, conservação e tratamento. *In*: CAMARGO, R. *et al.* **Tecnologia dos produtos agropecuários**. 2º Edição. São Paulo: NOBEL, p.191-203, 1984.

PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, p. 22-40.

RIEDIKER S., STADLER R. H. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 73, n. 7, p. 1614-1621, 2001.