

Zoetis

# Boletim Técnico

**Bovinos de Leite**

Bovinos de Corte

Equinos

Ovinos

Reprodução

**Sanidade**

Manejo

Genética

Nutrição

**Zoetis**  
**São Paulo, SP**  
**Brasil**

**Número 03**  
**Ano 2013**

## Resíduo de produtos antimicrobianos: Descarte zero x Resíduo zero

### 1. Introdução

Cada vez mais a cadeia produtiva e os consumidores de leite se preocupam com segurança alimentar, principalmente no que se refere à presença de resíduos de medicamentos, como antiparasitários e antimicrobianos. Um exemplo dessa crescente preocupação é o monitoramento diário que os laticínios estão fazendo do leite coletado, utilizando testes rápidos de detecção de antibióticos (como SNAP CHARM, etc). Quando se detectam resíduos de antibióticos no tanque do caminhão, amostras coletadas em cada fornecedor (fazenda) são analisadas para rastreamento da origem do resíduo.

Existem atualmente no mercado produtos como Excenel RTU® (cloridrato de ceftiofur micronizado) e Excede® (ácido livre cristalino de ceftiofur), os quais permitem aos produtores tratar metrites, pneumonias e problemas de cascos sem necessidade de descartar o leite. Portanto, estes produtos são considerados “descarte zero” de leite e é importante que os produtores e consumidores de leite saibam que “descarte zero” e “resíduo zero” são dois conceitos distintos.

### 2. “Descarte zero” ou “resíduo zero” ?

A mastite é a principal doença do gado leiteiro que requer antibioticoterapia e,

portanto, é uma das principais origens de antibióticos no leite. No entanto, deve-se enfatizar que qualquer antibiótico utilizado em vacas por qualquer via de administração (intramamária, muscular, intra-uterina, oral ou pela pele) pode resultar em resíduos no leite, mesmo que seja em concentrações pequenas. Isso ocorre porque os antibióticos são absorvidos pela corrente sanguínea após a sua aplicação e depois podem passar para o leite. Dessa forma, o tratamento intramamário de um único quarto com mastite resulta na passagem do antibiótico via sanguínea para o leite presente nos outros quartos, devendo-se então descartar o leite de todos os quartos dos animais durante o período em que houver a presença de resíduo da droga. Mas se sempre há resíduos, por que alguns produtos são considerados de descarte zero?

O período de carência ou período de retirada do leite para o consumo é aquele período de tempo após a administração da droga até o leite ser permitido para o consumo humano. A duração do período de carência depende de diversos fatores como: dose e esquema de tratamento utilizado, via de administração, produção leiteira do animal e formulação do produto. O final do período de carência ocorre quando os resíduos de antibióticos no leite são menores que LMR estabelecidos.

Para cada molécula, existe um limite máximo de resíduo (LMR) acima do qual existe potencial para causar prejuízos à saúde humana, e abaixo do qual não há problemas à saúde humana, e o período de descarte das drogas é determinado em função do LMR. Se, após a aplicação, as concentrações no leite de uma droga permanecem acima do seu LMR por 47 horas, caindo abaixo do LMR a partir da 48ª hora pós-aplicação, o período de retirada (ou período de carência) no leite dessa droga será de 48 horas. Se, após a aplicação, as concentrações no leite de uma outra droga jamais atingem níveis superiores ao LMR, não há necessidade de descarte do leite - é o que acontece com o Excenel RTU® e Excede®, por exemplo. Portanto, mesmo nos produtos de “descarte zero”, há presença de resíduos após a aplicação, mas esses resíduos estão em níveis abaixo do LMR e, portanto, não representam nenhum risco à saúde humana. O mesmo raciocínio pode ser inferido para uma amostra de leite coletado após 50 horas da aplicação de um produto cujo período de descarte no leite é 48 horas: haverá certamente algum nível de resíduo, mas este leite pode ser consumido sem riscos à saúde humana, uma vez que, a essa altura, a concentração do princípio ativo no leite já estará abaixo do LMR.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pela definição dos princípios ativos a serem monitorados nos alimentos e de seus respectivos LMR. Os LMR de cada princípio ativo são determinados através de rigorosos estudos científicos e recomendados por agentes de altíssima credibilidade, como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Codex Alimentarium (FAO / ONU).

### 3. Métodos de detecção de resíduos de antibióticos no leite

Os testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite podem ser qualitativos, quantitativos ou semi-quantitativos. Resumidamente, os testes qualitativos apresentam resultados positivos ou negativos em função de uma concentração limite pré-determinada para uma droga específica. Por outro lado, os testes quantitativos necessitam de equipamentos e técnicos treinados para a sua execução, sendo normalmente utilizados para a confirmação de uma suspeita previamente identificada em teste qualitativo. Os testes semi-quantitativos apresentam os resultados em termos de faixas de concentração, como por exemplo: negativo, positivo-baixo, positivo-alto.

A maioria dos testes comercialmente disponíveis é do tipo qualitativo, sendo assim classificados como testes de triagem. Podemos conceituar como teste de triagem

um método de detecção que permite, com boa precisão, identificar se determinada droga encontra-se (resultado positivo) ou não (resultado negativo) presente, porém não conseguimos com estes testes determinar a quantidade exata de resíduo de antibiótico presente na amostra analisada. Essa quantificação somente é realizada através de testes quantitativos e que são considerados confirmatórios.

Imagine um leite com resíduo de 50 ppb de ceftiofur. De acordo com a legislação, esta concentração seria considerada dentro dos limites aceitáveis, ou seja, abaixo do LMR para ceftiofur (100 ppb) e próprio para o consumo humano. Utilizando os testes qualitativos como o SNAP, CHARM II e o Delvotest o resultado seria expresso como positivo, uma vez que os testes detectam concentrações abaixo de 100 ppb. A tabela 1 expressa o LMR das principais drogas utilizadas na bovinocultura de leite e o compara aos níveis de detecção dos principais testes qualitativos utilizados como métodos de triagem nas indústrias.

A detecção de concentrações abaixo do LMR pelos testes qualitativos pode ser vantajosa para o consumidor, mas não para os produtores, pois, nas amostras de leite com concentrações destes antimicrobianos permitidas pela legislação, o teste pode apresentar resultado positivo, levando à penalização desse produtor e ao descarte desse leite, quando, na verdade, as concentrações estão dentro dos padrões legais. Esses resultados são considerados falso-violativos, pois o teste detecta a concentração de antimicrobiano existente, mesmo que essa esteja dentro do limite permitido pela legislação, o que não seria uma violação. Os Kits apresentam a grande vantagem de serem rápidos, no entanto, alguns estudos recentes indicam que o uso deste kits para o leite de vacas individuais pode resultar em resultados falso-positivos. A principal explicação para estes resultados errôneos, é a presença de substâncias no leite que podem interferir no teste. Além disso, a maioria dos kits recomenda que o teste seja realizado em leite de tanque e não em amostras individuais de vacas. No caso de identificação de resíduos de antibióticos no leite através de métodos rápidos, deve-se sempre lembrar que estes métodos podem apresentar resultados falso-positivos e a melhor maneira para esclarecer dúvidas sobre a presença ou não de resíduos é através do uso de métodos laboratoriais, que apresentam maior precisão e segurança nos resultados.

Assim, a utilização de testes simplificados e rápidos na detecção de resíduos de antibióticos é de extrema importância para determinar rapidamente o destino de um lote de leite, porém a realização de testes quantitativos

**Tabela 1. Limite Máximo de Resíduo (LMR) e Sensibilidade de Detecção dos principais testes de triagem utilizados no Brasil**

Antibiótico	LMR (ppb) µg/L ou µg/Kg	Kit de detecção (ppb)			
		Delvotest SP	SNAP Duo Beta-Tetra	SNAP Beta ST	Charm II para Beta e Tetra
<b>Beta-lactâmicos</b>					
Ceftiofur	100	25-50	50-80	50-80	30-60
Cefquinoma	20	X	X	X	15-20
Cefalônio	20	5-10	20	20	10-20
Cefapirina	60	4-6	35	35	6-10
Cefazolina	50	X	40	40	12-20
Cefalexina	100	40-60	X	X	10-60
Cefaperazona	50	40	35	35	1-3
Cloxacilina	30	20	6	6	25-35
Didoxacilina	30	10	6	6	20-30
Ampicilina	4	4	4	4	3-4
Amoxicilina	4	2-3	4	4	3-4
Penicilina G	4	1-2	3	3	2-4
<b>Tetraciclina</b>					
Oxitetraciclina	100	250-500	35-50	X	70-100
Tetraciclina	100	250-500	35-50	X	15-20
<b>Macrolídeos</b>					
Eritromicina	40	40-80	X	X	X
Espiramicina	150- 200 (UE)	400-600	X	X	X
<b>Aminoglicosídeos</b>					
Gentamicina	100 (Codex)-200 (UE)*	50	X	X	X
Estreptomicina	200	X	X	X	X
Diidroestreptomicina	200	300-500	X	X	X
Neomicina	500	100-200	X	X	X
<b>Quinolonas/Fluorquinolonas</b>					
Enrofloxacin	100	X	X	X	X
<b>Sulfonamidas</b>					
Sulfadiazina	100	25-50	X	X	X
Sulfametazina	100	25-100	X	X	X
<b>Anfenicóis</b>					
Cloranfenicol	0,3	2500	X	X	X
Florfenicol	.*	X	X	X	X

\* No Brasil não foi especificado

confirmatórios deveria ser realizado a fim de se evitar o descarte de leite próprio para o consumo humano, ou seja, abaixo do LMR.

A Tabela 2 lista os principais testes comercialmente disponíveis para a detecção de resíduos de antibióticos no leite e o princípio em que se baseiam.

**Tabela 2. Testes disponíveis comercialmente para detecção de resíduos de antibióticos no leite e o princípio em que se baseiam**

<b>Inibição do Crescimento microbiano</b>	Teste do disco BR-Test BR Test "Blue Star" BR-Test AS Charm Farm Test Charm inhibition assay Delvotest-P Delvotest-SP
<b>Receptor</b>	Charm Cowside Test Charm I Test Charm II Test
<b>Ligação a proteína</b>	CITE Probe (β-lactâmicos)
<b>ELISA</b>	CITE Probe (tetraciclina, gentamicina) Cite Sulfa Trio EZ-Screen LacTek (β-lactâmicos, gentamicina, sulfametazina) Signal Neomycin Detection Test, Signal ForeSite Gentamicin, Signal Gantamicin, Signal Foresite Sulfamethazine
<b>Enzima</b>	Penzyme IDEXX SNAP Test
<b>Agglutinação em Látex</b>	Spot Test

Fonte: Cullor, 1992

### 3.1 Métodos de detecção de resíduos de antibióticos por inibição de crescimento bacteriano

Os testes de inibição de crescimento bacteriano baseiam-se na incubação de um microrganismo conhecido

(geralmente *Bacillus stearothermophilus*) com uma amostra de leite por várias horas; e, caso haja uma concentração de antibióticos suficiente, o crescimento bacteriano será reduzido ou eliminado. Essa inibição pode ser observada através de um halo de inibição, no caso do método do disco em placas. Nos testes Charm de inibição de crescimento bacteriano, usa-se um indicador de pH – o bromocresol púrpura – para indicar se houve ou não crescimento bacteriano. Quando há a multiplicação bacteriana, há produção de ácido, alterando o pH, mudando a cor do indicador de púrpura para amarelo; o BR-test funciona de modo similar. A ocorrência de mastites geralmente resulta em aumento da permeabilidade vascular e no influxo de substâncias vasculares, como fagócitos, anticorpos e complemento. Boa parte desse sistema de defesa é voltada ao combate dos microrganismos invasores. Se o sistema de defesa do hospedeiro for ativado, é de se esperar que substâncias endógenas inibidoras de crescimento sejam encontradas no leite, tais como lactoferrinas, lisozimas e complemento. Estudos realizados apontam que ao se submeter amostras de leite oriundas de vacas com mastite a testes de inibição de crescimento bacteriano, podem surgir zonas de inibição similares às causadas pela presença de penicilina, indicando resultados falsos-positivos. A principal desvantagem dos testes de inibição do crescimento é que eles não são muito específicos para a identificação do antibiótico presente e são de forma geral qualitativos, apresentando limitações quanto à detecção de alguns antibióticos, além de necessitarem de algumas horas para a sua realização. Por outro lado, a principal vantagem destes testes é o seu baixo custo e facilidade de execução.

#### Delvotest

O Delvotest consiste em um método de difusão que mede a inibição de crescimento de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* em um meio sólido. A amostra de leite é combinada com mistura de nutrientes e bacilos, e então é aquecida por duas horas e meia a 64°C; a mudança na cor ocorre baseada na alteração do pH do meio. A cor amarela indica reação negativa, e a cor púrpura indica reação positiva. O teste controle é feito com leite em pó, livre de substâncias inibidoras. Em um estudo *in vitro*, duas substâncias antibacterianas naturais do leite, a lactoferrina e a lisozima, tiveram efeito inibitório sobre o crescimento de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, o microrganismo utilizado no Delvotest. No colostro e principalmente no leite mastítico, as concentrações dessas substâncias estão aumentadas. Observou-se uma correlação positiva entre o aumento da contagem

de células somáticas, o aumento das concentrações de lisozima/lactoferrina e a ocorrência de falsos-positivos no Delvotest de amostras de leite analisadas, originárias de animais com mastite experimental, sem o uso de antibioticoterapia.

#### IDEXX SNAP

O IDEXX SNAP é um teste enzimático onde o antibiótico é capturado por uma proteína ligante em uma matriz com suporte sólido absorvente localizado em uma unidade plástica moldada. A presença de antibióticos na amostra resulta no desenvolvimento de um spot colorido, que é comparado a um spot controle, este último oriundo de uma concentração conhecida do antibiótico a ser detectado, podendo assim se determinar o nível de antibiótico da amostra. O teste é feito em duas fases de incubação, uma delas em bloco de aquecimento. A comparação entre as cores dos spots pode ser feita visualmente, ou por meio de instrumentos (usando *reflectance*) para fornecer interpretações numéricas dos resultados visuais.

### 4. Resíduos e descarte após tratamento com Excenel® RTU e Excede®

A Zoetis possui em seu portfólio dois produtos com exclusiva tecnologia de produção o Excenel RTU® suspensão estéril de cloridrato de ceftiofur e o Excede® que contém em sua formulação ácido livre cristalino de ceftiofur. Ambos são antibióticos de amplo espectro de ação, pertencente ao grupo das cefalosporinas, ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas produtoras de β-lactamases. São os únicos antibióticos injetáveis a base de ceftiofur aprovados pelo FDA para uso em vacas em lactação.

O grande diferencial de ambos os produtos em bovinos leiteiros lactantes é o período de 0 dias de descarte de leite nas vacas tratadas. Isto foi estabelecido através da condução de rigorosos testes de depleção de resíduos nos tecidos. No caso do Excede® os testes foram realizados em vacas em lactação recebendo uma única aplicação na dosagem de 6,6 mg / kg. Os resíduos de ceftiofur no leite foram mais baixos do que a tolerância (LMR) em qualquer ponto de tempo pós-tratamento. No caso do Excenel RTU® os testes de depleção em resíduos também utilizaram a dosagem em bula de 1mg/Kg por via subcutânea ou intramuscular. A recomendação de "descarte zero" se dá porque o leite dos animais tratados, tanto com Excenel® RTU quanto com Excede®, apresentaram nos testes de depleção de resíduos concentrações de resíduo abaixo do limite máximo

permitido para ceftiofur, que é de 100 ppb. Além dos animais apresentarem individualmente resultados abaixo do LMR após a aplicação de ambos os produtos podemos também ter o chamado "efeito diluição do tanque" o que diminui ainda mais as chances de detecção de resíduos de antibióticos pela diminuição da concentração do princípio ativo.

Imagine uma fazenda com 50 vacas em lactação, produzindo um total de 1000 L/dia e 2 vacas tratadas com Excenel RTU® ou Excede®. Estabelecendo o LMR para o ceftiofur de 100 ppb/μg/L e que os animais após o tratamento terão em seu leite quantidade inferior ao LMR, por exemplo 50 ppb, teremos após a diluição no tanque a concentração de 2 ppb de ceftiofur em 1000 L de leite. Se realizássemos os testes qualitativos nas amostras individuais desses animais tratados, obteríamos resultado positivo, ao passo que no tanque o resultado seria negativo. Lembrando que qualquer alteração em dosagem, modo de aplicação, via de aplicação alteram o período de carência de ambos os produtos. A tabela 3 apresenta dados do período de carência de alguns antimicrobianos da Zoetis.

**Tabela 3. Período de descarte/período de carência dos produtos Zoetis**

Produto Zoetis	Antibiótico	Período de carência
Terramicina®/LA	Oxitetraciclina	96 horas
Clamoxyl®	Amoxicilina	96 horas
Orbenin® Extra Dry Cow	Cloxacilina	46 dias
Flumast®	Espiramicina e Neomicina	96 horas
Spectramast® LC	Cloridrato de ceftiofur	72 horas
Advocin®	Danofloxacina	41 horas
Excede®	Ácido Livre cristalino de ceftiofur	Sem descarte
Excenel RTU®	Ceftiofur	Sem descarte
Excenel®	Ceftiofur	Sem descarte

## 5. Boas Práticas para se evitar resíduos de antibióticos no leite:

- 1) Ler com atenção as instruções contidas nas bulas dos antibióticos e segui-las cuidadosamente. O produtor ou o encarregado pelo rebanho deve conhecer o tipo de medicamento que está sendo aplicado. Para isso, deve ler a bula para observar: a) se o medicamento é licenciado no MAPA, b) o nome comercial e o princípio ativo do medicamento, c) período de descarte do leite, d) o nome do fabricante ou do distribuidor do medicamento, e) as recomendações gerais quanto ao uso e a via de aplicação, f) prazo de validade, g) dosagem recomendada.
- 2) Usar somente medicamentos recomendados para animais. Antibióticos recomendados para medicina humana não devem ser usados para tratamento dos animais, porque não há estudos sobre o período de descarte. Outro motivo é que determinados antibióticos são selecionados somente para tratamento humano, devido à natureza e particularidade das indicações.
- 3) Armazenar todos os medicamentos adequadamente. Ao armazenar os medicamentos, separar aqueles recomendados para os animais não-lactantes dos recomendados para lactantes. Somente administrar nos animais em lactação os medicamentos aprovados para essa condição. Os medicamentos recomendados para tratamento no início do período seco são mais concentrados e não devem ser administrados em vacas em lactação. Observar se há necessidade de estocagem sob refrigeração.
- 4) Administrar adequadamente o medicamento. As aplicações intramamárias necessitam de cuidados para evitar a inoculação de outros microorganismos que podem complicar ainda mais o quadro existente. É necessário limpar a extremidade do teto com algodão embebido em álcool e usar uma cânula estéril, se esta não for fornecida pelo medicamento. Inserir somente dois a três milímetros da cânula no teto. Após a infusão da glândula mamária, recomenda-se fazer a desinfecção do teto por imersão com um desinfetante efetivo. Para evitar novas infecções com patógenos do ambiente, não se deve usar a mesma cânula para tratamento de várias vacas a partir de um frasco de múltiplas doses.
- 5) Marcar e identificar todas as vacas tratadas. Com o aumento do tamanho dos rebanhos e diferentes ordenhadores, há necessidade de identificar todas as vacas tratadas e o período de descarte do leite deve ser de conhecimento de todos. As vacas tratadas devem ser separadas e ordenhadas por último, para

evitar a contaminação do leite total do rebanho. Essa anotações devem incluir o nome ou o número da vaca tratada, data do tratamento, motivo do tratamento, o medicamento usado, período de descarte do leite e quem administrou o tratamento.

- 6) Descartar o leite dos quatro quartos mamários, pois o antibiótico aplicado em um quarto é absorvido pela corrente sanguínea e secretado também no leite dos quartos não-tratados.
- 7) Não aumentar ou alterar a dosagem recomendada, bem como a via de aplicação. O tratamento deve ser administrado de acordo com as recomendações da bula. A aplicação de uma dose dupla não significa dupla-efetividade do antibiótico. Havendo necessidade de aumentar o período de tratamento, procurar informações com o Médico Veterinário responsável pelo descarte do leite. É importante ter um plano para tratamento de mastites.
- 8) Não combinar antibióticos diferentes, a não ser sob recomendação do Médico Veterinário. Determinados antibióticos são antagônicos (têm efeitos contrários), o que interfere com a efetividade deles. Quando se faz combinações, o período de descarte do leite fica alterado.

## 6. Conclusões

O Ministério da Agricultura segue valores determinados por diversos órgãos internacionais como Organização Mundial de Saúde (OMS) e o *Codex Alimentarium* para estabelecer o LMR (Limite máximo de resíduo) de cada princípio ativo utilizado em medicamentos. Alimentos de origem animal com concentrações iguais ou inferiores ao LMR são seguros para o consumo humano.

A indústria veterinária segue padrões estabelecidos pelo MAPA para a determinação do período de carência dos medicamentos. Todo período de carência de um medicamento veterinário é determinado com base no LMR, ou seja, o período de carência de um antibiótico no leite é o tempo necessário para a eliminação do antibiótico no leite, após a última aplicação do medicamento em níveis inferiores ao LMR.

Por sua vez, a indústria captadora de leite pode estabelecer as suas próprias exigências e padrões de qualidade do leite a ser recebido. Na maioria das vezes, as indústrias captadoras utilizam Kits comerciais como método de triagem para a detecção de antibióticos no leite. O grande problema, é que estes testes de triagem utilizados nas indústrias captadoras para a condenação de leite, são testes qualitativos, ou seja, o resultado é positivo ou negativo para a presença de antibióticos. Porém, não sabemos a quantidade exata de antibióticos

em ppb (partes por bilhão) que está presente naquele leite.

Todo teste de triagem é desenvolvido para detectar 50% do LMR, ou seja, no caso da penicilina que possui o LMR de 4 ppb, o teste mesmo começa a dar positivo em uma concentração de 2 ppb o que é seguro para o consumo humano e o leite descartado poderia ser utilizado sem problemas.

Portanto, a fim de se evitar a penalização e surpresas desagradáveis, o produtor, além de seguir todas as boas práticas para se evitar a presença de resíduos de antibiótico acima do LMR, deve saber quais são as exigências e os testes utilizados nas empresas captadoras para as quais ele encaminha o seu leite.

