



**PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**

## **Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino**

---

Lucas Pilon<sup>1</sup> e Keila Maria Roncato Duarte<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Aluno de Mestrado em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia/APTA – Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa, SP 13460-000

<sup>2</sup>Docente do curso de Mestrado em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia/APTA – Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa, SP 13460-000

\*e-mail:keila@iz.sp.gov.br

---

### **Resumo**

Dentre os vários problemas que acometem a produção leiteira, a mastite (do grego *mastos*) ou mamite (do latim *mammae*) bovina é considerada a doença que causa mais prejuízos, reduzindo em quantidade e qualidade o leite e os derivados lácteos. Nesta revisão abordamos os aspectos de manejo, microrganismos patogênicos, medidas de controle e qualidade do produto e detecção de resíduos de antibiótico no leite e derivados.

**Palavras-chave:** mastite subclínica, microbiologia, leite, antibiótico

### **Detection techniques for antibiotic residues in bovine milk**

### **Abstract**

Mastitis, among several problems of dairy production (from the greek *mastos* or latim – *mammae*) is the disease with most financial damage to the milk

production system, decreasing the milk quality and quantity. In this review we show management aspects, pathogenic microorganisms, control and product quality rates and detection techniques for antibiotic residue in milk and its subproducts.

**Keywords:** subclinic mastitis, microbiology, milk, antibiotic

## **Introdução**

A produção mundial de leite no ano de 2008 foi de 432.483 milhões de litros, e tem uma perspectiva para o ano 2010 de 436.532 milhões de litros, o Brasil neste mesmo ano teve uma produção de 1,67 milhões de litros e a perspectiva para o ano de 2010 é 1,72 milhões de litros, segue abaixo os estados da região sudeste de acordo com sua produção em milhões de litros, no ano de 2008: MG (7.657), ES (419), RJ (476), SP (1.580), Sul (8.628), PR (2.828), SC (2.126), RS (3.315) ([www.milkpoint.com.br/estatísticas](http://www.milkpoint.com.br/estatísticas)), diante destas produções o Brasil ainda enfrenta um sério problema quanto à produção de leite, que é o mercado informal, pois este leite e seus derivados são consumidos sem tratamento térmico, vão parar em mercados, onde são comprados e consumidos pela população, esse mercado informal de leite no ano de 2005, foi de 34% (Reunião Das Câmaras De Leite Da Ocb/Cbcl, 2008).

Dentre os vários problemas que acometem a produção leiteira, a mastite (do grego *mastos*) ou mamite (do latim *mammae*) bovina é considerada a doença que causa mais prejuízos, reduzindo em quantidade e qualidade o leite e os derivados lácteos (Santos, 2003).

A mastite é definida como o processo inflamatório da glândula mamária, essa inflamação leva a uma alteração na composição do leite. Diversas razões podem levar ao aparecimento da mastite, sendo a mais comum, a infecção do úbere por microorganismos (Souto, 2006).

A mastite é considerada a doença que mais onera a produção de leite, acarretando graves prejuízos econômicos aos produtores e à indústria leiteira (Monardes, 1994). Entretanto, muitos produtores ainda não se preocupam com

este problema, talvez por não conhecerem as perdas decorrentes desta enfermidade (Silva, 1996; Costa *et. al.*, 2000). Essa inflamação pode ser originada por alguma falha de gerenciamento como, nutrição, higiene, genética e condições ambientais (Souto, 2006).

Existem duas definições usadas para classificar a mastite que são: mastite clínica e subclínica e essas definições permitem diferenciar o processo inflamatório. A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis no leite como a presença de grumos, fibrina ou secreção purulenta no mesmo e muitas vezes alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor. Dentre os vários métodos de diagnóstico da mastite clínica, o Teste da caneca de fundo escuro ou caneca telada é o mais utilizado, sendo interpretado segundo os diferentes escores observados nos primeiros jatos de leite retirados da glândula mamária, momento antes do início da ordenha, a interpretação realizada da seguinte maneira (Philpot E Nickerson,1991):

- Escore zero, leite normal (ausência de partículas);
- Escore um, leite ligeiramente descolorido com presença de grumos finos e delicados;
- Escore dois, leite com muitos grumos;
- Escore três, secreções não semelhante ao leite, apresentado pús e/ou sangue, e/ou fibrina, ou ainda aspecto viscoso, similar ao colostro (Watanabe, 1999).

Segundo Santos, (2000), as perdas por mastite clínica são as seguintes: 14% para o leite descartado, 8% com custos de reposição, 5% com redução do valor comercial, 5% com medicamentos, 3% com Médico Veterinário e 1% com serviços extras.

A mastite subclínica não apresenta sinais clínicos evidentes, sendo que o leite apresenta aspecto macroscópico normal e não há sinais visíveis de inflamação do úbere, podendo ser detectada somente por provas indiretas com

o leite, (como o "Califórnia Mastitis Test" - CMT), (Blood; Radostits, 1991; Costa *et al.*; 1995), a realização do CMT consiste na comparação do escore de viscosidade da mistura (leite + reagente próprio) e a intensidade do processo inflamatório na glândula mamária. O escore é interpretado sob a forma de escala, da seguinte maneira (escala de 0 a 3, sendo o 0 o escore negativo e 3 o escore máximo de inflamação) (Schalm E Noorlander, 1957), o resultado é interpretado após 20 segundos, através de movimentos giratórios lentos, baseadas na tabela de graduação abaixo. (Tabela 1).

Tabela 1: Interpretação dos resultados obtidos pelo teste CMT.

| Resultados                  | Leitura   |
|-----------------------------|---|
| Negativo                    | A mistura permanece fluida, sem precipitação.         |
| Fracamente positivo (+)     | Apresenta distinta precipitação, sem formação de gel. |
| Distintamente positivo (++) | Apresenta formação gelatinosa.                        |
| Fortemente positivo (+++)   | Apresenta formação gelatinosa e umbelização central.  |

Fonte: Adaptado: Embrapa – Gado de Leite (1984).

As perdas por mastite subclínica podem atingir valores que chegam até a 70% da produção. Nos rebanhos brasileiros, a mastite subclínica atinge entre 20 e 43% das vacas em lactação, provocando uma redução de cerca de 7,69% da produção de leite (900 milhões de litros/ano). Adotando-se medidas de controle da mastite, esta perda poderia cair para 3,1 % (Chapaval; Piekarski, 2000).

Dentre as medidas de controle da mastite, a adequada higiene do úbere é uma das medidas mais importantes na prevenção de novas infecções intramamárias. Como existe relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e a taxa de novas infecções intramamárias, todos os procedimentos para redução da contaminação dos tetos auxiliam no controle da mastite. Dentre os meios de se evitar a infecção intramamária, podemos citar a desinfecção dos tetos antes da ordenha e a desinfecção dos tetos após a ordenha, (Santos, 2000).

O manejo inadequado de drogas no controle de mastite é caracterizado como a principal fonte de antibiótico no leite (Jones, 1999), segundo (Miniussi, 1992), esse problema pode ser corrigido através de informações, sendo estas ministradas por cooperativas e centro de apoio técnico governamental, estas informações podem levar a uma redução nos níveis de antibiótico, deixando de ser motivo de preocupação pública.

De acordo com (Nero, 2007), a presença de resíduos de antibiótico no leite produzido no Brasil pode ser preocupante, e indica a presença de um perigo químico associado ao produto. Essas substâncias são eliminadas pelo leite durante o período de carência, sendo necessário descartá-lo durante esse período, para que tudo isso ocorra de forma correta é necessário a conscientização dos produtores (Hillerton; *et. al.*, 1999; Van Schaik; *et. al.*, 2002).

Os motivos para fazer o controle de resíduos de antibióticos no leite, são porque estes causam reações alérgicas nos consumidores e provocam o surgimento de resistência bacteriana, além de ser um problema econômico, pois interfere nas culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados (Nunes; D' Angelo, 2007).

A presença de antibiótico no leite pode trazer sérios riscos para a saúde, dentre eles incluem os toxicológicos-farmacológicos, microbiológicos e imunopatológicos (Heescher & Suhren, 1993). De acordo com (Booth, 1992), o cloranfenicol pode causar sérios problemas como: anemia aplásica e hipoplásia, granulocitopenias, pois ele age sobre as células da medula óssea,

após o uso terapêutico e profilático, a tetraciclina também pode trazer sérios problemas, pois a sua ligação com o cálcio pode resultar na inibição do desenvolvimento ósseo, dentre esses os dentes, tornando-os descolorados e podendo causar hipoplasia dos dentes decíduos permanentes.

De acordo com Folly & Machado, 2001, onde foi analisada 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 de 1996 a abril de 1997), o Kit utilizado para detectar a presença de resíduos de antibiótico nas amostras foi o "Delvotest P". Para as amostras positivas no "Delvotest" foram realizadas provas para a identificação de resíduos de gentamicina e tetraciclina, para a pesquisa da tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina, utilizou-se o teste do "Tetracycline Snap", e para a detecção da gentamicina utilizou-se o Kit "Cite Probe Gentamicin Test". Os resultados encontrados pelos autores quanto a frequência de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro são apresentados na Tabela 2, das 300 amostras de leite, 13 foram positivas, revelando uma frequência de contaminação de 4,33%. O leite tipo "C" apresentou, de 130 amostras, 6 amostras positivas com uma frequência de 4,61%, enquanto o leite "Integral Fazenda" apresentou, de 170 amostras, 7 positivas com uma frequência de 4,12%.

Os autores concluíram que o leite pasteurizado tipo "C" e "Integral Fazenda", comercializado e consumido na região Norte de Estado do Rio de Janeiro, apresentou contaminação por resíduos de antibióticos, sendo principalmente detectados os antibióticos do grupo  $\beta$  - Lactâmicos e tetraciclina.

Tabela 2 – Frequência da contaminação com resíduos de antibióticos, utilizando-se “BL Snap Test” e “Delvotest P” em diferentes marcas comerciais de leite pasteurizado, região Norte de Estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 1996 a abril de 1997.

| Marca       | Tipo de leite | N. amostras | Positivas | Frequência |
|-------------|---------------|-------------|-----------|------------|
| 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”

Fonte: Folly e Machado, 2001.

Borges *et. al.*, 2000, em seu trabalho analisou 533 amostras de leite pasteurizado integral e padronizado, recebidas pelo Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998, essas amostras eram compostas por 98 marcas comerciais beneficiadas, principalmente por médias e miniusinas.

A técnica utilizada para detectar a presença de resíduos de antibióticos foi baseada na difusão de resíduos de antibióticos em ágar.

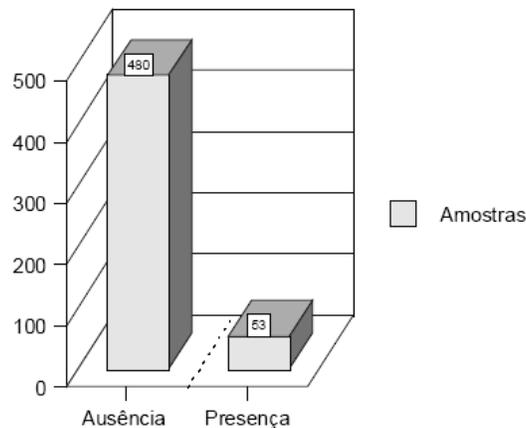
Os resultados encontrados pelos autores foram os seguintes:

Tabela 3 – Frequência de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite pasteurizado integral e padronizado comercializado no Estado de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998. Goiânia-GO.

| Resíduos de antimicrobianos | n.º de amostras | %     |
|-----------------------------|-----------------|-------|
| Ausência                    | 480             | 90,05 |
| Presença                    | 53              | 9,95  |
| Total                       | 533             | 100   |

Fonte: Borges, et. al, 2000.

Figura 1 – Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado integral e padronizado, comercializado no Estado de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998. Goiânia-GO.



Fonte: Borges, et. al, 2000.

Diante do trabalho os autores concluíram que a ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás foi de 9,95%; das 98 marcas comerciais beneficiadas no Estado, 32 (32,65%) foram positivas para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos.

Nero *et. al.*, 2007, trabalhou com duzentas amostras de leite cru, sendo estas coletadas em propriedades leiteiras de quatro Estados do Brasil, assim distribuídas: 47 propriedades na região de Viçosa – MG, sendo 36 com ordenha manual, 9 com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 2 com ordenha mecânica em sistema fechado; 50 propriedades na região de Pelotas – RS, sendo 31 com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 19 com ordenha manual; 63 propriedades na região de Londrina – PR, sendo 9 com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 43 com ordenha manual; e 50 propriedades na região de Botucatu – SP, sendo 14 com ordenha em sistema semi-fechado e 36 com ordenha manual, todas essas amostras foram coletadas dos tanques resfriadores, colocadas em frascos estéreis e congeladas, para posteriormente serem analisadas.

Todas as amostras foram submetidas ao *Charm-test* (Charm Sciences, Inc., USA), este Kit detecta resíduos de  $\beta$  – lactâmicos, sulfonamidas e outros antibióticos (gentamicina, tilosina).

Os resultados encontrados pelos autores são expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru analisadas nas 4 regiões estudadas, utilizando o "*Charm-test*".

| Resultados | Viçosa - MG | Pelotas - RS | Londrina - PR | Botucatu - SP | Total       |
|------------|-------------|--------------|---------------|---------------|-------------|
|            | n (%)       |              |               |               |             |
| Positivo   | 4 (8,5)     | 3 (6,0)      | 13 (20,6)     | 4 (8,0)       | 24 (11,4)   |
| Negativo   | 43 (91,5)   | 47 (94,0)    | 50 (79,4)     | 46 (92,0)     | 186 (88,6)  |
| Total      | 47 (100,0)  | 50 (100,0)   | 63 (100,0)    | 50 (100,0)    | 210 (100,0) |

Fonte: Nero, *et. al.*, 2007.

Os autores chegaram a conclusão de que a presença de resíduos de antibióticos em leite produzido no Brasil pode ser considerada preocupante, e indicam a presença de um perigo químico associado a esse produto. Estudos complementares que determinem exatamente quais são essas substâncias e

suas concentrações são de grande importância para se estabelecerem políticas de segurança alimentar e controle desses resíduos em leite e derivados.

### **Técnicas para detectar resíduos de antimicrobianos no leite.**

Segundo Fagundes 1997 os métodos para detecção de antibióticos no leite mais indicados são os químicos, físicos, biológicos, tecnológicos e adição de corantes.

Na década de 80, foram desenvolvidas muitas técnicas utilizadas para detectar a presença de resíduos de antibiótico no leite. A análise através de placas, no qual utiliza-se um disco ou *swab* estéril posto com contato com o fluido ou tecido suspeito de conter resíduos foi uma das primeiras técnicas a serem desenvolvidas. O *swab* era posicionado na placa de ágar contendo a bactéria sensível ao antibiótico, depois incubado por 8 a 12 horas, conforme o conjunto utilizado.

A técnica de inibição do crescimento microbiano para avaliação através de indicadores colorimétrico – BsDA (*Bacillus stearothermophilus Disk Assay*) – considerados oficiais para a detecção de resíduos de  $\beta$  - lactâmicos no leite.

Surgiram novos métodos analíticos, com base em reações imunológicas / ou enzimáticas, possibilitando uma alternativa prática aos sistemas microbiológicos (Spreer, 1991).

Suas vantagens são:

- Rapidez;
- Simplicidade de execução;
- Menor conhecimento técnico exigido para suas operações;
- Maior especificidade para determinados antibióticos;
- Possibilidade de detecção de outros agentes antimicrobianos e antibióticos.

Segundo Honkanen-Buzalski E Reybroek, 1997, os métodos físico-químicos como cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e

cromatografia á líquida de alta pressão também são utilizadas para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.

O método de inibição microbiana pela presença de resíduos antimicrobianos no leite é o mais utilizado devido ao seu custo e pela capacidade de evidenciar vários antimicrobianos e quimioterápicos (Barbeiro A Signorini, 1996).

O teste de Elisa (*Enzyme linked immunoabsorbant assay*), que é um teste imunoenzimático, também é utilizado para detectar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite, os testes de Elisa envolvem duas etapas básicas, sendo: 1ª. um antígeno e um anticorpo, sendo um conhecido e outro proveniente da amostra a ser analisada, são unidos para reagir, com a formação de imunocomplexos, e na 2ª. a etapa, a detecção da reação é conduzida pela adição de um reagente denominado enzima conjugada. O conjugado pode ser um antígeno e um anticorpo, quimicamente unido a uma enzima, como exemplo a fosfatase alcalina, quando esse conjugado reage com o imunocomplexo forma-se um produto colorido (Mitchell *et. al.*, 1998)

A cromatografia consiste na separação dos componentes de uma mistura através da distribuição entre duas fases que estão em contato íntimo (Collins *et. al.*, 1990).

De acordo com a Portaria nº 8 de 26/06/1984 do serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura publicada no Diário Oficial da União em 11/07/1984 (Brasil, 1984) pelo menos uma vez por semana deve ser realizada obrigatoriamente a pesquisa de inibidores em amostras de leite de pequena mistura (a nível do produtor) pelo método TTC (cloreto 2-3-5-trifenil tetrazólio), método de disco em placas, Delvotest®, ou outro aprovado.

O método TTC, utiliza cultura de *Streptococcus thermophilus* á amostra de leite que é incubada em banho-maria a 37°C durante duas horas, após este período é adicionada 0,3 ml de TTC e incubado por mais 30 minutos na mesma temperatura, as amostras positivas apresentam uma coloração rosa intensa e as positivas branca (Barros E Perches, 1981).

Tabela 5: Exemplos de testes para detecção de resíduos de antibiótico no leite.

| TESTE*  | TIPO   |
|---|--|
| Disco   | inibição microbiana.   |
| <sup>1</sup> BR teste<br>(Brilliant black reduction test)                           | inibição microbiana <i>Bacillus</i><br><i>stearotherophilus</i> var. <i>calidolactis</i> |
| <sup>2</sup> Charm Farm Teste   | inibição microbiana do <i>Bacillus</i><br><i>stearotherophilus</i>                       |
| <sup>3</sup> Delvotest®   | inibição microbiana <i>Bacillus</i><br><i>stearotherophilus</i> var. <i>calidolactis</i> |
| <sup>4</sup> Snap <sup>MT</sup> (Beta-lactâmicos)                                   | imunoenzimático(ELISA)   |
| <sup>5</sup> Snap <sup>MT</sup> (tetraciclina);                                     | imunoenzimático(ELISA)   |
| <sup>6</sup> CITE Probe® gentamicina  | imunoenzimático(ELISA)   |
| <sup>7</sup> CITE®Sulfa-trio (sulfametazina,<br>Sulfatiazol,sulfametoxina)          | imunoenzimático(ELISA)   |
| <sup>8</sup> Lactek (Beta-lactâmicos); (Lactek<br>sulfametazina;Lactek gentamicina) | imunoenzimático(ELISA)   |
| Signal (gentamicina); (Signal<br>sulfametazina;Signal neomicina)                    | imunoenzimático(ELISA)   |
| <sup>9</sup> Penzime®   | Enzimático   |

Fonte: COSTA, 1996

<sup>1</sup> \* BRtest , (Idetek, Inc., Sunnyvale, Calif.)

<sup>2</sup> Charm Farm (Charm Sciences, Inc., Malden, Md.)

<sup>3</sup> Delvotest® ( Gis brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands)

<sup>4,5,6,7</sup> CITE Probe®( IDEXX, Portland, Maine)

<sup>8</sup> LacTek( Idetek, Inc.)

<sup>9</sup> Penzime® (UCB BioproductsSA, Chemin du Foriest, Belgium)

## Conclusão

Os produtores devem ter melhores informações técnicas sobre como tratar seus animais, evitando assim certos tipos de patologias, que possam vir a prejudicar seus animais e até mesmo a população que irá consumir produtos de origem animal. Como exemplo temos a presença de resíduos de antimicrobianos em leite, sendo que estes podem trazer sérios problemas para a população, como diversas patologias, a população também deve contribuir para que possamos ter melhores alimentos, essa contribuição pode ser realizada evitando a compra de produtos no mercado informal.

PILON, L. e DUARTE, K.M.R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 988, 2010.

## Referências Bibliográficas:

BARBEIRO, A., SIGNORINI, F. Antibiotic e sulfamidicini nel latte. *Obiettivi Doc. Vet.*, Bologna, v.17, n.12, p.29-36, 1996.

BARROS, V. R. M., PERCHES, E. M. C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B distribuído ao consumo da grande São Paulo. *Ver. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.36, n.216, p.39-42, 1981.

BORGES, G. T., SANTANA, Â. P., MESQUITA, A. J., MESQUITA, S. Q. P., SILVA, L. A. F., NUNES, V. Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás, *Ciência Animal Brasileira*1(1): 59-63, jan./jun.2000.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M.; *Mastitis In: Veterinary Medicine*. 7 ed. London: Bailliere Tindall, 1991. p.501-559.

BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. J.** v.164, p. 116-128, 2002.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n.8, de 26 jun. 1984. In: *Balde Branco*, São Paulo, v.18, n.238, p.30-35, 1984. [ Ministério da Agricultura, secretária Nacional de Defesa Agropecuária e Secretária de Inspeção de Produto Animal definem normas técnicas e higiênico-sanitárias para a produção de leite tipo "B"].

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 4.ed. Campinas: Unicamp, 1990. 279p. (Série manuais).

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clinica bovina. *Revisão Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.4, p.156-158, 1995.

COSTA, E. O. *et al.* Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. *Napgamma*, São Paulo, Ano III, no. 4, p. 6 – 13, 2000.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P.R.B. *Leite de Qualidade – Manejo Reprodutivo, Nutricional e Sanitário*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, p.15-177, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. *Mastite bovina: causas e conseqüências na produção e qualidade do leite do gado mestiço da microrregião de Juiz de fora – MG*. 3.ed. Coronel Pacheco, MG:Embrapa-CNPGL, 1984. 8 p. (Circular Técnica, 3).

FOOLY, M. M., MACHADO, S. C. A. 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*, Santa Maria, v.31, n.1, p.95-98, 2001.

HEESCHER, W., SUHREN, G. Antibiotics and sulfonamids in milk-significance, evaluation, maximum residue limits (MRLs) and concepts of detection from an international point-of-view. *Kieler Milch Wirts*, Kiel, v.45, n.1 p.43-60, 1993.

HILLERTON, J. E. et al.; Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor test. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 82, n.4, p.704-711, apr.1999.

PILON, L. e DUARTE, K.M.R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 988, 2010.

JONES, G. M. **On-farm tests for drug residues in milk**. Petersburg: Virginia State University, 1999. 6 p.

HONKANEN-BUZALSKI, T., REYBROECK, W. Antimicrobials. In: International Dairy Federation. Monograph on residues and contaminants in milk products. Brussels: International Dairy Federation, 1997. cap.4, p.26-34.

MITCHELL, J. M., GRIFFITHS, M. W., McEWEN, S. A., McNAB, W. B., YEE, J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.61, n.6, p.742-756, 1998.

MONARDES, H. Somatic cell counting and Genetic Improvement of Resistance to Mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. *Anais....*Maringá: UEM, 1994. p. 1-19.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M.; Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*. Campinas, 27(2): 391-393, abr.-jun. 2007.

NUNES, M. T. ; D`Angelino, J. L. . Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**. v. 21, p. 57-61, mar., 2007.

Philpot, W. N. e Nickerson S. C.; Counter attack. Babson Bros, Naperville. 150p. 1991.

Reunião das Câmaras de Leite da OCB/CBCL, na sede da OCB; Alarcon, T.; Estudo sobre o Leite em 2020 aponta alternativas para a cadeia, 04/03/2008 / 12:00.

Ruegg, P. L.; Mastitis Control. *Milking and milk Quality*, n. 405; 8p.; 2001.

RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms – Review. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, v.19, p.47-63, 2003.

Santos, M. V.; Impacto econômico da mastite bovina. *A hora Veterinária*, v.22, n. 131, p. 46-50, 2003.

Santos, M. V.; Mastite causa prejuízos, mas pode ser controlada, julho 2000, retirado do site [www.milkpoint.com.br](http://www.milkpoint.com.br), acessado no dia 13/08/2009.

Silva, D.M. Mastite prevenir ou remediar? *Revista Batavo*, v. 8, n. 53, p. 8-11, 1996.

Souto L. I.; Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil, São Paulo 2006.

Schalm, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation lading to development of California mastitis test. *J. AM. VET. MED. ASSOC.*; Schaumburg. V.130, n.5, p.199-204, 1957.

SPREER, E. *Lactologia industrial*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H.; Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 85, n. 4, p. 782-789, abr.2002.

PILON, L. e DUARTE, K.M.R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 988, 2010.

VEIGA, V. M.; TEIXEIRA, M.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; Controle da mastite dos bovinos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. 1994, 7-p.

Watanabe, E. T.; Avaliação do uso de antibióticos por via intramamária e sistêmica no tratamento de mastite clínica em vacas em lactação e subclínica na interrupção da lactação.; São Paulo, 1999. 121p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, 1999.

[www.milkpoint.com.br/estatística](http://www.milkpoint.com.br/estatística), Produção Brasileira em milhões de Litros, acessado dia 18/03/2010.

[www.milkpoint.com.br/estatística](http://www.milkpoint.com.br/estatística), Produção de Leite – Países selecionados, acessado dia 18/03/2010.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.577-585, 2007.