



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Uso de ceftiofur em vacas leiteiras e sua excreção no leite

Maira Cristina¹, Roberta Torres de Melo^{1,2}, Eliane Pereira Mendonça^{1,2}, Letícia Ríspoli Coelho^{1,2}, Daise Aparecida Rossi^{1,2}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal e Aplicada (LABIO- UFU) – Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

Resumo

A presença de resíduos de antibióticos em leite pode ter efeitos adversos para a saúde pública, além de prejuízos à indústria de laticínios. O objetivo desse estudo foi verificar a positividade de amostras de leite após administração intramuscular do antibiótico ceftiofur, na dose de 1 a 2 mg/kg, recomendada pelo fabricante. Seis fêmeas em lactação, divididas em dois grupos, de baixa e alta produtividade, receberam tratamento intramuscular com o antibiótico na dose especificada. Foram realizadas análises no leite ordenhado nos períodos de 12 e 24 horas após a administração do medicamento, utilizando os kits SNAP®-Idexx e CHARM®-Charm Sciences Inc. O leite resultante da ordenha após 12 horas foi positivo para as todas as fêmeas; e na ordenha após 24 horas não foi encontrado resíduo do antibiótico em nenhuma delas. Os resultados apontam que, apesar da indicação do medicamento não determinar um período de carência para o consumo do leite de animais tratados, houve

positividade no leite 12 horas após a administração da droga. Isso mostra a necessidade de padronização entre os métodos de detecção de resíduos no leite e a legislação brasileira, assim como estipular períodos de carência para os medicamentos veterinários e aumentar a fiscalização dos produtos oferecidos no mercado.

Palavras-chave: Resíduos de antibióticos; Kits para detecção; Saúde pública.

Use of ceftiofur in lactating cows and their milk excretion

Abstract

The presence of antibiotic residues in milk can have adverse effects on public health, and damage to the dairy industry. The aim of this study was to verify the positivity of samples of milk after intramuscular administration of the antibiotic ceftiofur in dose 1-2 mg / kg recommended by the manufacturer. Six lactating females, divided into two groups, high and low productivity, received intramuscular treatment with the antibiotic at the specified dose. Were analyzed the expressed milk after a period of 12 and 24 hours after drug administration, using the SNAP®-Idexx kits and CHARM®-Charm Sciences Inc. The milk obtained from milking after 12 hours was positive for all females, and 24 hours after milking was not found antibiotic residue in any of them. The results indicate that, despite appointee of the drug did not determine a grace period for consumption of milk from animals treated showed a positive reaction in milk 12 hours after administration. This shows the need for standardization among the methods for detecting residues in milk and the Brazilian legislation, as well as provides grace periods for veterinary medicines and increase the oversight of products offered on the market.

Keywords: Antibiotic residues; kits for detection; Public Health

1. Introdução

A presença de resíduos de antibióticos no leite resulta da aplicação de diferentes substâncias no efetivo leiteiro, para a prevenção ou tratamento de doenças, com destaque para infecções da glândula mamária e as doenças do trato reprodutivo. A presença desses resíduos é um fator de desclassificação, uma vez que torna a matéria-prima inadequada para o uso na indústria e para o consumo humano, já que não há tratamento tecnológico que consiga inativar tais substâncias (SANTOS, 2003).

Os riscos à saúde impostos pela presença de resíduos de antibióticos nos alimentos podem ser classificados em microbiológicos (favorecimento de resistência de microrganismos) e riscos imunopatológicos como as alergias (HARDING, 1993). As reações alérgicas são frequentemente associadas aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilina), que podem desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis (COSTA, 2002). De acordo com a World Health Organization (2001), em países desenvolvidos, 60% das infecções hospitalares são causadas por microrganismos resistentes a diversos antibióticos.

Entre os fatores responsabilizados pela disseminação do fenômeno da resistência bacteriana está o uso indiscriminado de antibióticos, tanto em medicina humana quanto veterinária. Apesar disso, esse fenômeno é possível de ser controlado, principalmente através do desenvolvimento de programas de vigilância epidemiológica em saúde humana e animal. A aplicação de métodos sistemáticos de detecção de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal é uma medida básica que deve ser adotada (WHO, 2001).

Para garantir amostras livres de resíduos de drogas, muitos métodos têm sido usados: como o método de inibição microbiológica, métodos imunológicos, métodos enzimáticos, cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão (KANG; KONDO, 2001).

Vários protocolos de análise são aprovados para detecção de resíduos de antibióticos no leite. Os diferentes métodos podem ser classificados de acordo

com seu modo de ação: inibição de crescimento bacteriano, imunológicos, cromatografia líquida e a gás e testes enzimáticos (CORASSIM, OLIVEIRA, 2003).

Ceftiofur é a terceira geração do antibiótico cefalosporina. A forma usada em medicina veterinária, incluindo aplicação em vacas em lactação, é o sal sódico ou o hidróclorato, de forma intramuscular. É um antibiótico aprovado para tratamento de doenças respiratórias, metrites e problemas de casco em gado bovino de corte e de leite. Para fêmeas leiteiras, o produto é aprovado para administração intramuscular ou subcutânea somente (EMEA, 2002).

Smith et al. (2004) afirmam que quando a droga é utilizada dentro da especificação, a concentração no leite não excede aos limites toleráveis legais. Porém, e somente, com o uso em tratamentos de mastite por infusão intramamária, ou seja, de forma não contemplada nas indicações contidas na bula, pode ocorrer resíduo no leite acima do tolerado.

Considerando as dúvidas e prejuízos decorrentes da administração de ceftiofur em fêmeas lactentes, objetivou-se com este estudo verificar a positividade de amostras de leite após administração intramuscular desse antibiótico utilizando os kits comerciais disponíveis.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta das amostras

O estudo consistiu na administração intramuscular de ceftiofur (uso veterinário), na dose recomendada pelo fabricante, que é de 1 a 2mg/kg de peso corporal. A droga foi administrada em seis fêmeas lactentes de um mesmo plantel, que comprovadamente não estavam utilizando medicamentos e tinham acesso ao mesmo tipo de alimento. Estes animais foram devidamente identificados e separados em dois grupos de acordo com a produtividade: três fêmeas de baixa e três de alta produção de leite, sendo a média dos dois grupos sete kg/leite/dia (baixa) e 17 kg/leite/dia (alta).

Após a ordenha, foi coletada amostra para realização da análise de presença de antibióticos. Os tempos de coleta foram de 12 e 24 horas após a administração do medicamento para os dois grupos de animais.

O leite foi transportado ao laboratório de uma indústria de laticínios em uma caixa com gelo. O tempo decorrente entre a coleta e análise foi inferior a duas horas em todas as coletas.

2.2 Análise de resíduos de antibióticos betalactâmicos

Foram utilizados dois kits específicos para determinação de resíduos de antibióticos betalactâmicos: SNAP®-Idexx e CHARM®-Charm Sciences. Conforme manual dos fabricantes, esses kits possuem sensibilidade para detectar 5,9ppb e 50ppb de ceftiofur em leite, respectivamente.

O leite proveniente das ordenhas dos seis animais foi analisado diretamente (sem diluição) e após diluição 1:1 e 1:10, utilizando como diluente leite reconhecidamente isento de antibióticos. As diluições permitiram o ajuste da sensibilidade dos testes SNAP® de 5,9ppb (original constante na bula), em 11,8ppb e 59ppb; no CHARM®, as sensibilidades foram 50ppb (original), 100ppb e 500ppb, respectivamente, na amostra original e nas diluições 1:1 e 1:10.

As análises foram realizadas conforme instrução dos fabricantes. Para análise do kit SNAP®-Idexx, 450µL da amostra homogeneizada foi adicionada ao tubo plástico com o *pellet* contendo os anticorpos e enzimas, e homogeneizados. O tubo foi adicionado ao bloco aquecedor a 45±5° C por 5 minutos. Após esse período, a mistura foi adicionada ao dispositivo, e este acionado quando atingia a área da amostra. A leitura foi realizada após 4 minutos e o resultado considerado positivo sempre que a coloração da amostra era mais clara que o controle.

Para análise no kit CHARM® foi colocado o dispositivo na chapa aquecedora a 55° C. Com o auxílio de micropipeta foi adicionado lentamente 300µL de leite na "ranhura" lateral à tira branca do dispositivo, evitando o transbordamento. A leitura foi realizada após 8 minutos e o resultado

considerado positivo sempre que a coloração da linha "T" (teste) da amostra era mais clara que o controle.

3. Resultados e Discussão

As análises realizadas com os testes SNAP® após o período de 12 horas, apresentaram resultados positivos, tanto no leite puro (sem diluição) quanto para as diluições nas proporções 1:1 e 1:10. Para o kit CHARM®, os resultados foram os mesmos, com exceção das amostras da diluição 1:10 (correspondente a 500ppb), que apresentou resultado negativo. Esta diferença era esperada, pois os dois testes possuem limites de detecção diferentes.

O resultado encontrado indica que o leite proveniente da primeira ordenha após administração do ceftiofur (12 horas), continha resíduos do medicamento maiores que 100 ppb, que é o limite máximo tolerado pela legislação brasileira (ANVISA, 2009). A concentração da droga encontrada no leite foi inferior a 500ppb, de acordo com o teste aplicado. O volume de leite produzido pelos animais não influenciou nos resultados obtidos, pois foram iguais nos dois grupos, de alta e baixa produção.

Todas as análises realizadas no leite ordenhado após 24 horas da administração da droga, independente da produção do animal ou diluição utilizada, mostraram resultados negativos para resíduos de beta-lactâmicos (Tabela 1). Considerando a sensibilidade dos testes utilizados, a concentração no leite foi menor que 5,9 ppb em todas as amostras, ou seja, dentro do limite permitido pela legislação.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Owens et al. (1990), que encontraram resíduos de ceftiofur no leite de animais tratados após 10 horas da aplicação, mas não após 24 horas. Os autores utilizaram no estudo testes de inibição bacteriana, e concluíram que a aplicação desse medicamento resulta em picos altos no soro sanguíneo e no leite nas primeiras horas após administração, porém, a excreção é também rápida. No caso do uso intramamário, o período de excreção no leite foi significativamente alto.

Tabela 1 – Resultados obtidos para presença/ausência de resíduos de antibióticos em dois kits comerciais em leite de animais submetidos a tratamento intramuscular com ceftiofur.

Diluição	SNAP®			CHARM®		
	Direto	1:1	1:10	Direto	1:1	1:10
Sensibilidade	5,9	11,8	59	50	100	500
Grupo 1 (baixa produção)						
1ª ordenha (12hr)	+	+	+	+	+	-
2ª ordenha (24hr)	-	-	-	-	-	-
Grupo 2 (alta produção)						
1ª ordenha (12hr)	+	+	+	+	+	-
2ª ordenha (24hr)	-	-	-	-	-	-

(+) – Resultado positivo; (-) – Resultado Negativo.

O Comitê Europeu (EMEA, 2002) publicou um documento sobre o uso de ceftiofur em animais leiteiros, mas com tratamento intramamário. Em vacas leiteiras foi observado que após 12 horas do tratamento, 70% da dose administrada estava presente no sangue e no leite, mas que, após 96 horas, os níveis no leite estavam menores que 100ppb, ou seja, em uma concentração considerada segura para o consumo humano.

Apesar da Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 2002) instruir a obrigatoriedade de realização de testes no leite produzido, vários trabalhos ainda demonstram a presença de resíduos em alimentos de origem animal. Esta realidade também é constatada em pesquisas realizadas em outros países.

Em estudos de Carlos et al. (2004) foram avaliados leites do tipo C do município de Campos dos Goyatases, RJ, com uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e em apenas sete (32,56%) das 43 amostras de leite não foram detectados resíduos de antibacterianos. Folly e Machado (2001) detectaram resíduos de antibióticos com o uso de métodos de inibição microbiana, enzimática e imuno ensaios no leite pasteurizado na região norte do Estado do Rio de Janeiro. Os autores analisaram 300 amostras de leite e

encontraram 13 delas positivas, revelando uma frequência de contaminação de 4,33%.

Nero et al. (2007) realizaram um estudo em quatro regiões leiteiras no Brasil e verificaram a presença de antibióticos em 24 das 210 amostras coletadas nos tanques de expansão das propriedades rurais. As análises foram realizadas com o kit CHARM®. Os autores atribuíram a positividade à falta de instruções aos produtores rurais, ao fato que alguns antibacterianos utilizados em fêmeas lactentes não apresentarem período de carência ou introdução fraudulenta, uma vez que os resíduos inibem o crescimento bacteriano, camuflando a má qualidade do leite.

A ocorrência de resíduos de antibiótico em 96 amostras de leite pasteurizado de seis diferentes marcas adquiridas em estabelecimentos comerciais de Piracicaba, SP foram analisadas por Nascimento et al.(2001). O método utilizado foi o de inibição do crescimento bacteriano, com 50% das amostras apresentando resultados positivos. Esse alto índice de positividade pode ser consequência da fiscalização ineficiente ou problemas na padronização e especificidade do método de análises utilizado.

Para que o consumidor tenha segurança na ingestão de produtos livres de resíduos, é importante uma fiscalização mais efetiva desses alimentos principalmente o leite, que é bastante consumido. Além de causar prejuízos às indústrias, principalmente as que fabricam produtos lácteos fermentados, a ingestão de resíduos de antimicrobianos pode trazer vários prejuízos à saúde da população.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que além do controle dos resíduos de medicamentos no leite, eles devem ser testados com relação ao período de carência. Não há um prazo determinado de carência para o antibiótico ceftiofur, mas de acordo com os testes realizados com os kits CHARM® e SNAP®, após 12 horas da aplicação da droga nos animais, os leites ainda apresentaram resíduos acima dos limites permitidos.

Os testes utilizados para as análises do presente estudo são semi-quantitativos, ou seja, indicam se uma droga ou grupo está presente em

concentrações acima ou abaixo de uma determinada sensibilidade informada. Classificados como métodos imuno enzimáticos, apesar de aprovados pela legislação, são considerados como triagem. Pela rapidez nos resultados e facilidade de uso são os mais utilizados pelas indústrias de laticínios. Quando é necessário conhecer qual droga específica contaminou o leite em determinada concentração, devem ser empregados testes de caráter quantitativo como o HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) ou outro aprovado pela legislação (BRASIL, 2000).

O Limite Máximo de Resíduo (LMR) em $\mu\text{g/L}$ do antibiótico ceftiofur tolerado pela legislação brasileira é de 100 ppb (ANVISA, 2009), e os testes disponíveis no mercado possuem um limite de detecção inferior. Nos casos dos testes CHARM® e SNAP®, os limites de detecção são de 50 ppb e 5.9 ppb, respectivamente. Essa diferença entre o limite e a sensibilidade dos testes gera impasses e discussões entre indústria e produtores, uma vez que se detectada a presença de resíduos no leite recebido este deve ser descartado, pois não servirá como matéria-prima para a produção de derivados.

No caso específico do ceftiofur, os resultados desse estudo indicam que nas primeiras horas após a administração da droga, a concentração no leite é acima de 500ppb, ou seja, muito maior que a permitida. De outro lado, o leite da próxima ordenha (24 horas de tratamento) apresenta concentrações inferiores a 5,9ppb e, portanto, a menor sensibilidade dos testes não apresenta erro de uso no caso desta droga. Com isso, após o uso desse medicamento, é necessário um período de carência de pelo menos 24 horas para garantir a segurança do alimento produzido.

CONCLUSÃO

A análise dos dados permitiu concluir que no período de até 12 horas após a aplicação do antibiótico ceftiofur foi observada positividade para resíduos de antibióticos em ambos os kits, indicando que as informações contidas no medicamento devem ser revisadas, pois afirma que não há período

CRISTINA, M. et al. Uso de ceftiofur em vacas leiteiras e sua excreção no leite. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 33, Ed. 138, Art. 937, 2010.

de carência. Após 24 horas da administração da droga os resultados foram negativos para ambos os testes.

Considerando os limites de detecção dos testes utilizados, a concentração da droga no leite ordenhado após 12 horas da administração do ceftiofur, era maior que 100ppb e menor que 500ppb. Após 24 horas, a concentração era menor que 5,9ppb. Os resultados demonstram que se não houver fiscalização eficiente, o leite pode chegar ao consumidor contaminado por resíduos de antibacterianos.

REFERÊNCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet)** Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades) Junho, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº. 51, de 18/09/2002. **Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.** 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33 de 15/04/2000. **Regulamento técnico sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos em Farmácias e seus anexos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 abr. 2000.

CARLOS, L. de A., CORDEIRO, C.A.M., FOLLY, M.M., MARTINS, M.L.L. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo C comercializado no município de Campos de Goyatazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.123, p.57-61, 2004.

CORASSIM, C.H. OLIVEIRA, C.A.F. **Aplicabilidade dos conjuntos para detecção de resíduos de antibiótico no leite em propriedades leiteiras.** Faculdade de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 1999.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap 42, p.443-455.

EMEA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Veterinary Medicinal Products. **Summary Report**, p.1-3, 2002.

FOLLY, M.M., MACHADO, S. da C.A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaio no leite pasteurizado

CRISTINA, M. et al. Uso de ceftiofur em vacas leiteiras e sua excreção no leite. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 33, Ed. 138, Art. 937, 2010.

comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.1, 2001.

HARDING, F. Antibiotic testing in the United Kinddom, past and future. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 283, n. 61, 1993.

KANG, J. H.; KONDO, F. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1-5, 2001.

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

NERO, L.A., MATTOS, M.R., BERLOTI, V., BARROS, M.A.F., FRANCO, B.D.G.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, 2007.

OWENS, W.E.; XIANG, Z.Y.; RAY, C.H.; NICKERSON, S.C. Determination of Milk and mammary tissue concentrations of ceftiofur after instrammary and intramuscular therapy. **Journal of Dairy Science**, p. 3449-3456, 1990.

SANTOS, M.V. Antibióticos: como não deixar resíduos no leite. **Balde Branco**, n.460, p.54-57, 2003.

SMITH, F.W., GEHRING, R., RIVIERE, J., et al. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. **JAVMA**. v. 224, p. 1827-1830, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO collaborating centre for drug statistics methodology. Guidelines for DDD. 2ª edição. Oslo, WHO-Oslo, 1993 apud CASTRO, C. G.S.O. **Estudos de utilização de medicamentos, noções básicas**. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2001, p. 56-7.