

Capítulo 08 - Viabilidade do uso de métodos rápidos para detecção de resíduos de antibióticos em leite em um Programa Nacional de Monitoramento

.....

Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes¹

A ciência da dimensão da exposição da população a resíduos de drogas veterinárias, veiculadas pela ingestão de alimentos de origem animal, é de vital importância para nortear as ações de controle sanitário visando à proteção do consumidor.

Foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde em 2000, o Grupo de Trabalho de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos. Esse Grupo recomendou a implantação do Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo, o PAMVet.

Este programa visa avaliar a qualidade dos principais produtos de origem animal expostos ao consumo (leite, carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado e mel de abelha). Na primeira etapa de atividades o monitoramento dos resíduos de medicamentos veterinários está sendo realizado no leite bovino UHT (*ultra high temperature*) e em pó colhido nas capitais dos estados das Regiões Sul e Sudeste, por ser essa matriz a mais consumida (60%) pela população.

A análise de resíduos em alimentos, especialmente quando o número de possíveis contaminantes dentro de uma classe de compostos é muito elevado, é uma tarefa difícil e dispendiosa. Para um programa efetivo de monitoramento, os métodos instrumentais cromatográficos clássicos atualmente usados sofrem limitações ligadas a aspectos técnicos e ao alto custo, que estão associados a vários fatores: (I) são técnicas sofisticadas, onerosas e lentas, que usam equipamentos que requerem constante manutenção e dependem de laboratórios especializados e pessoal altamente qualificado; (II) existe um grande número de drogas veterinárias e aditivos para ração animal registrados para uso e comercialização. Em função do acima exposto, existe hoje uma grande necessidade de aumentar-se a capacidade analítica, devido ao crescimento da demanda,

¹ Tecnologista sênior do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (MS)- Depto de Química- tel.: (21) 25984290 fax: (21) 22900915 e E-mail: christin@incqs.fiocruz.br.

especialmente de métodos que sejam simples, de baixo custo, de resposta rápida e adequados ao uso no campo. Tais métodos, no mínimo, podem ser usados para detectar amostras possivelmente positivas, facilitando grandemente o trabalho de análise instrumental.

Métodos rápidos são metodologias simples e de baixo custo em comparação com as técnicas físico-químicas tradicionais. Estão disponíveis comercialmente na forma de kits, e tem a vantagem de permitir a análise de um maior número de amostras em um menor tempo e sem as etapas de purificação e *clean-up* da amostra. Como são métodos qualitativos, exigem confirmação e quantificação. Porém, sua sensibilidade e acurácia permitem selecionar as amostras potencialmente positivas, o que contribui para diminuir consideravelmente o número de amostras que seguirão para a confirmação.

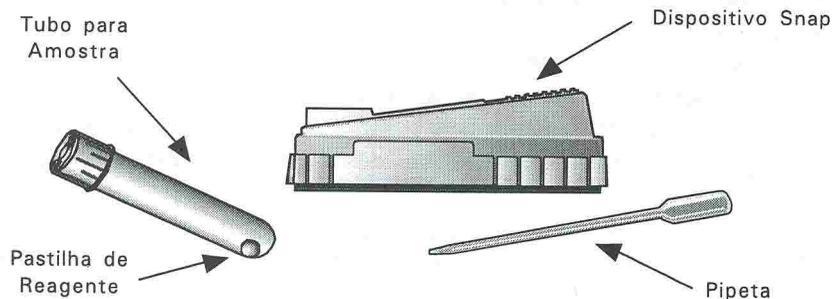
Requisitos analíticos para a escolha dos kits

1. Limite de detecção abaixo do LMR (Limite Máximo de Resíduos);
2. Aprovação pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), com certificado;
3. Prazo de validade suficiente para testes e análises com o *kit*;
4. Repetibilidade;
5. Detectar na amostra uma classe de tóxicos, com sensibilidade ajustável às necessidades do monitoramento;
6. Ser rápido nas respostas, confiável e reprodutível;
7. Apresentar baixos custos;
8. Dependem de equipamentos básicos que podem ser usados em pequenos laboratórios.

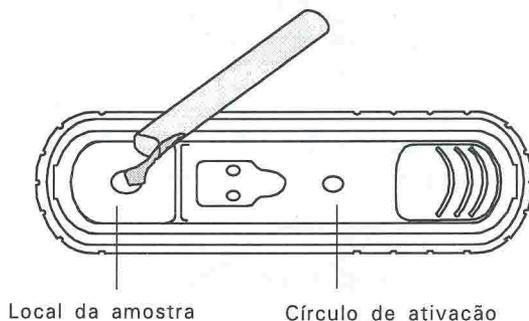
Kits selecionados:

- Para tetraciclina: *Kit* SNAP TET (IDEXX)

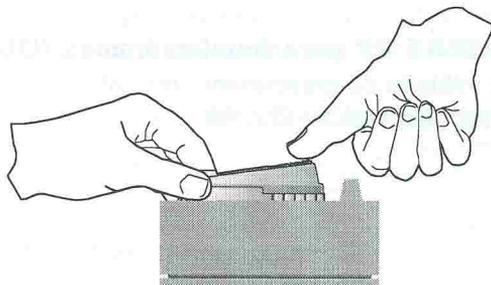
O teste SNAP para detecção de tetraciclina é um imunoensaio do tipo ELISA. É utilizado para detectar rapidamente resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina no leite.



1. Ligue o bloco aquecedor 10 minutos antes do teste.
2. Adicione a amostra no tubo de prova com a pastilha de reativo.
3. Coloque o dispositivo SNAP e o tubo de prova no bloco aquecedor por 10 minutos.
4. Despeje a amostra na Cavidade da Amostra do dispositivo SNAP.

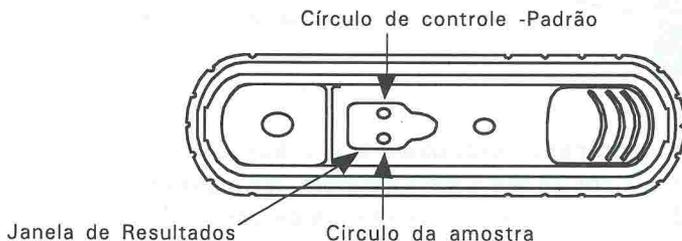


5. Ative o dispositivo (apertando a extremidade oposta do local onde foi despejada a amostra) somente após o fluxo de leite da amostra atingir o Círculo de Ativação.



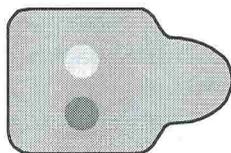
6. Deixe o dispositivo no bloco por mais sete minutos.
7. Retire o dispositivo e leia o resultado.

Leitura dos resultados:



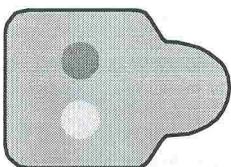
Os resultados serão negativos:

- a amostra for igual ou mais escura que o controle.



Os resultados serão positivos:

- a amostra é mais clara que o controle.

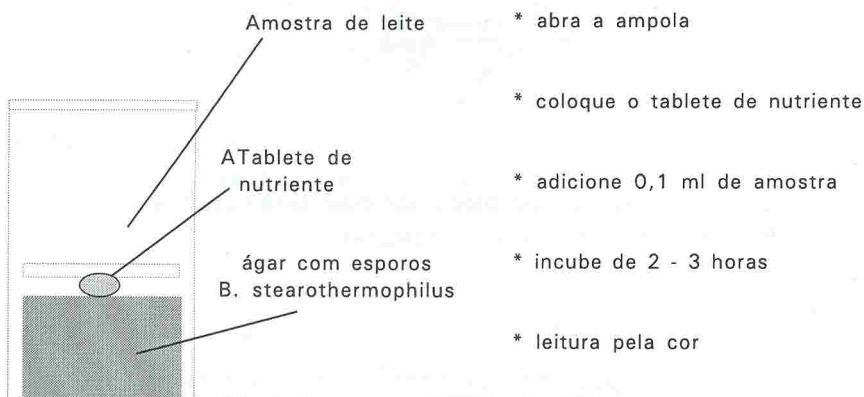


Obs.: O *kit* SNAP BL (betalactâmico) tem o mesmo procedimento

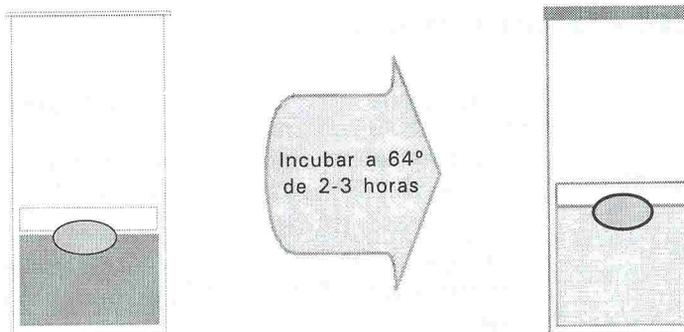
II - Kit DELVOTEST SP para betalactâmicos (DSM Foods)

Princípio do *kit*: inibição do crescimento microbiano.

Tempo de análise: cerca de três horas.



Os esporos germinados produzem ácido. Em ausência de antibióticos, esse ácido modifica a cor do meio para amarelo. Na presença de antibióticos, não há germinação, não ocorrendo a mudança de cor.



III- Kit Ridascreen FAST Sulphametazine (R-Biopharm AG)

Princípio do kit: Ensaio imunoenzimático competitivo para a análise quantitativa da sulfametazina em leite, grão e ração, baseia-se na reação antígeno-anticorpo.

Tempo de análise: 25 minutos.

Kit para 43 análises. Aprovado pelo FDA e AOAC.

Conteúdo do kit: 1 placa com 48 poços cobertos com anticorpo contra Sulfametazina, 5 padrões de Sulfametazina concentrados, conjugado, anticorpo anti- Sulfametazina, substrato/ cromógeno da enzima, solução de parada e tampão.

IV- Kit Charm SL BL/ MRL BL (Charm Sciences)

Princípio do kit: Ensaio imunoenzimático. Detecta o grupo dos betalactâmicos: amoxicilina, ampicilina, penicilina G, ceftiofur e cephalirina

Tempo de análise: 8 min

Kit para 100 análises. Aprovado pelo FDA e AOAC.

Acessórios: micropipetas descartáveis (300 mL), dispositivos enzimáticos e padrão de 5 ppb de penicilina G/ bloco aquecedor.

Avaliação dos *Kits* testados

Kit	Vantagens	Desvantagens
SNAP TET/ BL (IDEXX)	Específico para as respectivas classes: tetraciclina e betalactâmicos; rápido (10 min); limite de detecção abaixo do LMR (recomendação CODEX) p/ as tetraciclina.	Limite de detecção igual ao LMR (recomendação CODEX) p/ as penicilina; amostras de leite em pó não são totalmente absorvidas pelo dispositivo SNAP.
SNAP TET/ BL (IDEXX)	Específico para as respectivas classes: tetraciclina e betalactâmicos; rápido (10 min); limite de detecção abaixo do LMR (recomendação CODEX) p/ as tetraciclina.	Limite de detecção igual ao LMR (recomendação CODEX) p/ as penicilina; amostras de leite em pó não são totalmente absorvidas pelo dispositivo SNAP.
Delvotest SP (DSM foods)	Possibilita teste confirmatório com a enzima penicilinase para os betalactâmicos e com ácido p-aminobenzóico para as sulfonamidas (diminuindo a ocorrência de resultados falso-positivos).	Teste com a duração de 3 h; não é específico.
Charm SL BL/ MRL BL test e ROSA SMZ test (Charm Sciences)	Teste rápido (9 min); específico para as respectivas classes: betalactâmicos e sulfametazina; possui 2 versões de teste para os betalactâmicos que atendem aos LMRs da UE (MRL) e FDA (SL- safe level).	O kit ROSA só atende a uma droga da classe das sulfonamidas: sulfametazina.
Ridascreen FAST Sulfamethazin (R-biopharm AG)	Teste quantitativo e específico para sulfametazina.	É necessário um espectrofotômetro para microplaca ELISA; atende apenas a uma droga da classe das sulfonamidas: sulfametazina.

Referências Bibliográficas

BISHOP, J. R.; SENYK, G. F.; DUNKAN, S. E. Detection of antibiotic/drug residues in milk and dairy products in: MARSHAL, R. T. Ed. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 347-394.

HARIK-KHAN, R.; MOATS, W. A. Identification and measurement of b-lactam antibiotic residues in milk: integration of screening *kits* with liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 78, n. 4, p. 978-986, 1995.

MANUAL do *Kit* Delvotest SP[®] mini-Gist Brocades.

Sites de referências:

www.charm.com

www.r-biopharm.com

www.dsm.com

<http://www.aoac.org/testkits/TKDATA4.HTM>

www.fda.gov

www.anvisa.gov.br

www.idexx.com