

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**Avaliação do Charm® Cow Side II Test e  
Charm® Blue Yellow II Test para a  
detecção de resíduos de antimicrobianos em leite**

**Arianna Drumond Lage**

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária da UFMG  
2010



**ARIANNA DRUMOND LAGE**

**Avaliação do Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test para a  
detecção de resíduos de antimicrobianos em leite**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária da UFMG  
2010

L174a Lage, Arianna Drumond, 1984-  
Avaliação do Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test para a  
detecção de resíduos de antimicrobianos em leite / Arianna Drumond Lage. – 2010.  
44 p.: il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Resíduos de antibióticos –  
Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada em 06 de Julho de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Orientadora

  
Dr. Maria José de Sena

  
Prof. Marcelo Resende de Souza

  
Dr. Luiz Simeão do Carmo



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar a minha vida e de meus familiares.

Ao meu anjo da guarda Menadel, pela proteção e por me guiar pelos caminhos certos.

Ao meu pai, Antônio de Pádua, pelo amor, carinho, suporte, incentivos e conselhos. Obrigada por acreditar em mim, apoiar os meus sonhos e me buscar na Escola de Veterinária sempre que eu precisava ficar até tarde.

À minha mãe, Azize, pelo amor, carinho e, principalmente, pela paciência de assistir aos meus ensaios da apresentação da defesa exaustivamente, opinando e criticando sempre que necessário.

Às minhas irmãs, Apoema e Aretusa, pela paciência, apoio, amor, carinho e incentivo em seguir em frente diante das dificuldades.

Ao meu cunhado Fred, pelo carinho e por testar meus conhecimentos sempre que me encontrava, me perguntando por que o leite é branco, por que estava com nata, por que a vaca mugia e outras dúvidas de extrema importância!

À minha orientadora Mônica Cerqueira, pela amizade, apoio, orientação e por acreditar em minha capacidade de superar os desafios e alcançar os objetivos aparentemente impossíveis.

Aos professores do DTIPOA, Cláudia, Marcelo, Mônica Leite, Wagner, Leorges, Afonso, Renaldo e Silvana, pelos ensinamentos, momentos de descontração e apoio.

A todos os funcionários do DTIPOA, em especial à Maura, Taynara e Marco Antônio, pela ajuda essencial ao meu experimento e pelos ensinamentos valiosos.

Aos funcionários e técnicos do LabUFMG, pelo carinho e educação com que sempre me trataram e pela paciência e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Aos funcionários do Colegiado da Pós Graduação em Ciência Animal pela simpatia e por todo o auxílio.

Aos amigos Marli, Naiara, Luiz Paulo, Renata e Gislaine, por todo o apoio durante o experimento e pelas palavras de incentivo diante das dificuldades. Sem a ajuda de vocês, eu não teria conseguido!

Aos amigos da Pós-Graduação, Adriano, Fernanda, Camila, Bianca, Débora, Leonardo Ribeiro e todos os outros, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às amigas Teane, Nath, Raquel Léo, Raquel Neves e Priscilla, pelo carinho, amizade e pelos momentos de alegria.

Aos professores da banca, Maria José, Marcelo e Luiz Simeão, por aceitarem meu convite e pelas valiosas e importantes sugestões.

Aos funcionários da Hexis, em especial ao Guilherme, Antônio Carlos, Vinícius e Eduardo, por acreditarem no projeto e dar todo o suporte necessário.

Aos funcionários da Charm Sciences nos Estados Unidos, pelo apoio técnico durante a realização do experimento.



*“Obstáculos são aquelas coisas terríveis que você vê quando tira os olhos do seu objetivo.”*

Henry Ford

---

## SUMÁRIO

---

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1	Produção de leite, resíduos de antimicrobianos e suas consequências .....	13
2.2	Antimicrobianos .....	15
2.3	Legislação brasileira .....	16
2.4	Resíduos de antimicrobianos no leite: panorama brasileiro .....	17
2.5	Deteção de antimicrobianos no leite .....	18
2.5.1	Método de inibição microbiana .....	19
2.5.2	Tetraciclinas no leite .....	20
2.6	Produto orgânico .....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1	Avaliação dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test ...	21
3.2	Obtenção do leite orgânico .....	24
3.3	Preparo das soluções .....	24
3.4	Controles analíticos .....	24
3.5	Kit Charm® Cow Side II Test .....	24
3.6	Kit Charm® Blue Yellow II Test .....	25
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
5.1	Qualidade do leite utilizado no experimento .....	25
5.2	Avaliação da eficiência dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test na deteção de resíduos de antimicrobianos no leite .....	25
5.3	Comparação dos resultados entre os kits por grupos de antimicrobianos .....	29
5.4	Comparação dos resultados entre os kits pelo teste de McNemar .....	31
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

---

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Persistência de eliminação de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração utilizada .....	14
Tabela 2 - Resultados médios da qualidade do leite utilizado no experimento em comparação com a qualidade estabelecida pela legislação brasileira .....	25
Tabela 3 - Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste Charm® Cow Side II .....	27
Tabela 4 - Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste Charm® Blue Yellow II .....	28
Tabela 5 - Comparação entre os resultados de resíduos de antimicrobianos entre os kits de acordo com o teste de McNemar .....	31

---

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Porcentagem de detecção dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test no nível 1 (Charm® Sciences Inc.) .....	30
Figura 2 - Porcentagem de detecção dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test no nível 2 (LMR) .....	30

---

---

**LISTA DE QUADROS**

---

Quadro 1 -	Programa de Controle de Resíduos em Leite (PCRL/2000) .....	17
Quadro 2 -	Testes para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite .....	19
Quadro 3 -	Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações para avaliação do Charm® Cow Side II Test .....	22
Quadro 4 -	Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações para avaliação do Charm® Blue Yellow II Test .....	23

---

---

**LISTA DE ANEXOS**

---

Anexo 1 -	Manual de instruções do kit Charm® Cow Side II Test .....	39
Anexo 2 -	Cartão de referência para leitura visual de resultados do kit Charm® Cow Side II Test .....	41
Anexo 3 -	Manual de instruções do kit Charm® Blue Yellow II Test .....	42
Anexo 4 -	Cartão de referência para leitura visual de resultados do kit Charm® Blue Yellow II Test .....	44

---

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

---

AUP	Autorização para Uso de Produto
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCAR	Canadian Committee on Antibiotic Resistance
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEE	Comunidade Econômica Europeia
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	World Organization for Animal Health
PABA	Ácido para-aminobenzoico
PCRL	Programa de Controle de Resíduos em Leite
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal

---

## RESUMO

A cadeia produtiva do leite representa um importante segmento no agronegócio brasileiro. Por isso, é necessário que haja rigoroso controle de qualidade em todas as etapas de produção, incluindo o uso de antimicrobianos nos animais, que podem gerar resíduos no leite, causando prejuízos ao produtor, à indústria e à saúde do consumidor. Foram avaliados dois kits de inibição microbiana (Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test) para a detecção de resíduos de antimicrobianos em diferentes concentrações no leite. Avaliou-se também a capacidade de ambos em detectar o grupo das tetraciclinas em uma concentração menor daquela considerada na legislação brasileira. Amostras de leite foram inoculadas com soluções-padrão de 23 diferentes antimicrobianos e uma solução com metabólitos de um dos antimicrobianos (ceftiofur), em duas diferentes concentrações: o limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Nível 1) e o limite máximo de resíduos (LMR) (Nível 2) estabelecido pela legislação. Ambos os kits foram eficientes na detecção da maioria dos antimicrobianos testados nas duas concentrações, inclusive de metabólitos de ceftiofur. É necessário rever a informação do fabricante do kit Charm® Cow Side II Test quanto à detecção dos resíduos de oxacilina, penicilina G, das sulfonamidas e espiramicina e do kit Charm® Blue Yellow II Test quanto à detecção de eritromicina, cloxacilina, sulfadiazina, tilosina e penicilina G no leite. Os dois kits detectaram resíduos de tetraciclinas atendendo o LMR previsto na legislação brasileira e podem ser utilizados com segurança para o monitoramento destes resíduos no leite.

Palavras-chave: leite, antimicrobianos, resíduos, inibição microbiana

## ABSTRACT

The milk supply chain is an important stage in Brazilian agribusiness. Therefore, it is necessary to have strict quality control at all stages of production, including the use of antimicrobials in animals, which may generate residues in milk, causing damages to producer, industries and consumer health. Two kits based on microbial inhibition (Charm® Cow Side II Test and Charm® Blue Yellow II Test) for detection of antimicrobial residues in milk in different concentrations were evaluated. The ability of both to detect the tetracycline group in a lower concentration of that considered by Brazilian law was also evaluated. Milk samples were inoculated with standard solutions of 23 different antimicrobial agents and metabolites with a solution of one of antimicrobials (ceftiofur) in two different concentrations: the lower limit of detection stated by the manufacturer (Level 1) and the maximum residue limit (MRL) (Level 2) established by the legislation. Both kits were effective in detecting most of antimicrobials tested in two concentrations, including metabolites of ceftiofur. It is necessary to review information from the manufacturer of the kit Charm® Cow Side II Test for the detection of residues of oxacillin, penicillin G, spiramycin, and sulfonamides and Charm® Blue Yellow II Test on the detection of erythromycin, cloxacillin, sulfadiazine, tylosin, and penicillin G in milk. Both kits detected residues of tetracyclines given the MRLs required by the Brazilian law and can be safely used for monitoring these drugs in milk.

Keywords: milk, antimicrobials, residues, microbial inhibition

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado uma promessa no agronegócio mundial. Sua extensão territorial e a grande oferta de terras para produções agrícolas e pecuárias aliadas à sua imagem positiva no cenário internacional são ingredientes para um futuro promissor.

A cadeia produtiva do leite representa um importante segmento no agronegócio brasileiro e o Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite. Além de sua importância na economia do País, a produção de leite é relevante no aspecto social, uma vez que gera inúmeros empregos não somente no meio rural, mas também na indústria que processa o leite e seus derivados. Frente a estes fatores, o aumento da produção leiteira, seguindo um rigoroso controle de qualidade, é um dos principais objetivos dos produtores rurais e das indústrias de laticínios.

No entanto, diversos aspectos precisam ser melhorados no que concerne ao controle de qualidade na produção. Um deles diz respeito ao uso dos antimicrobianos em vacas leiteiras, atitude que pode gerar resíduos no leite, causando prejuízos ao produtor, à indústria e, muitas vezes, à saúde do consumidor.

Para que tantos prejuízos sejam evitados, algumas empresas desenvolveram testes rápidos e eficazes para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite. Há vários tipos de métodos com princípios distintos no mercado, tais como microbiológicos, enzimáticos e cromatográficos, com vantagens e desvantagens diferentes para cada um. Fica a critério de a indústria avaliar qual método é mais adequado para atender a sua demanda.

Considerando-se os testes microbiológicos, o mercado oferece algumas opções, mas é característica unânime de tais produtos não

detectarem o grupo das tetraciclina no leite em concentrações iguais ou menores ao mínimo permitido pela legislação brasileira. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar dois kits de inibição microbiana para a detecção de resíduos de antimicrobianos em diferentes concentrações no leite quanto à legislação vigente e ao limite de detecção do fabricante e avaliar a capacidade de ambos em detectar o grupo das tetraciclina, assim como o ceftiofur e seus metabólitos, em uma concentração menor daquela considerada na legislação brasileira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção de leite, resíduos de antimicrobianos e suas consequências

A produção leiteira no Brasil vem crescendo a cada ano. O País apresentou um crescimento médio na produção de 3,15% entre 1990 e 2007, taxa anual superior ao crescimento médio mundial (1,0%) (Produtos..., 2008). Para o ano de 2008, um estudo da FAO (Food..., 2008) estimava 8% de aumento na produção leiteira em relação a 2007, chegando a 31,2 bilhões de litros de leite. Essa expansão é resultado da reestruturação do setor, com consequente aumento de produtividade. Nas últimas duas décadas, o País passou de importador líquido de produtos lácteos para exportador líquido. A participação brasileira na produção mundial de leite aumentou de 3,1% para 4,5% (Produtos..., 2008).

O País ainda não é um grande exportador de lácteos, mas possui potencial produtivo real, com possibilidade de expansão das exportações. O resultado positivo da balança comercial de lácteos entre 2004 e 2008 aponta ganho em competitividade da pecuária de leite brasileira e das empresas do setor. No entanto, há restrições impostas ao comércio dos produtos brasileiros pelas exigências do mercado internacional quanto à qualidade e segurança alimentar. Dentre as barreiras ao comércio internacional,

destacam-se as técnicas e sanitárias, cada vez mais utilizadas como instrumento balizador ao comércio de produtos lácteos. Alcançar os padrões internacionais de qualidade e cumprir as exigências dos países importadores são ações que a cadeia do leite deve desenvolver para abrir novos mercados (Pereira *et al.*, 2009). Dentre as barreiras sanitárias impostas para a exportação de produtos lácteos, os resíduos de antimicrobianos em leite têm se tornado um desafio.

Os antimicrobianos deixam resíduos no leite através da circulação sanguínea no animal. O leite é sintetizado no úbere da vaca, que é composto por quatro glândulas mamárias. Essas glândulas possuem alvéolos secretores, sendo cada alvéolo circundado por vasos sanguíneos. Objetivando preservar sempre a saúde da vaca e a manutenção da sua capacidade produtiva, é comum o tratamento de doenças com a administração de antimicrobianos. Esses medicamentos são absorvidos pela corrente sanguínea, sendo excretados principalmente pelos rins. No entanto, muitos desses medicamentos também são excretados no leite. O animal tratado que esteja em lactação deve ser separado na hora da ordenha, por um determinado período, para que seu leite seja descartado por conter resíduos do

antimicrobiano. Também, quando há somente uma glândula mamária em tratamento por mastite, todo o leite deve ser descartado. Como há intensa circulação de sangue no úbere, o antimicrobiano aplicado em um quarto é absorvido pela corrente sanguínea, sendo excretado no leite de todos os quartos (Brito e Brito, 2001). Esses resíduos ocorrem no leite após o tratamento de vacas em lactação por problemas reprodutivos, respiratórios ou quaisquer outros problemas infecciosos. Podem decorrer também de tratamento no período seco para controle da mastite e ordenha acidental das vacas secas (Brito, 2005).

Os antimicrobianos são administrados aos animais pelas vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, infusão intramamária e intrauterina, oral ou topicamente na pele. Todas essas rotas podem deixar resíduos nos alimentos de origem animal, como leite, carne e ovos (Mitchell *et al.*, 1998). A persistência de resíduos de antimicrobianos no leite varia com a droga e depende de vários fatores, como dose, via de administração, excipiente utilizado, dentre outros (Costa, 1996). A Tabela 1 mostra as principais vias de administração dos medicamentos e o tempo de eliminação médio no leite.

Tabela 1. Persistência de eliminação de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração utilizada

Via de administração	Persistência média (horas)
Oral	86
Intramuscular	72 a 96
Intravenosa	44
Intrauterina	31
Intramamária	48 a 144

Fonte: Costa (1996)

Esses resíduos no leite não representam apenas prejuízos para a exportação, mas também para a indústria e, principalmente,

para a saúde do consumidor. No caso da indústria, a presença de traços de antimicrobianos pode tornar o leite



impróprio para a produção de alguns produtos, como leites fermentados e queijos. As culturas lácteas utilizadas para a fabricação desses derivados são sensíveis a determinados níveis de antimicrobianos, ocasionando consideráveis perdas econômicas para a indústria processadora (Brito, 2005). O tratamento térmico, como a pasteurização, tem pouco efeito sobre a concentração de resíduos de antimicrobianos no leite e não deve ser considerada como fator de controle desse problema (Santos e Fonseca, 2007).

Quanto à saúde humana, podem ocorrer reações alérgicas ou tóxicas em indivíduos que ingerem o leite com resíduos de antimicrobianos (Brito, 2005). Muitas drogas possuem potencial para causar reações imunoalérgicas, mas os antimicrobianos são, atualmente, considerados os principais responsáveis por tais reações (Dewdney *et al.*, 1991), que podem até mesmo desencadear choque anafilático em indivíduos particularmente sensíveis (Costa, 1996).

## 2.2 Antimicrobianos

Segundo o CCAR (*Canadian Committee on Antibiotic Resistance*), os antimicrobianos englobam os antibióticos e agentes sintéticos que possuem um efeito antimicrobiano. Originalmente, os antibióticos são substâncias naturais produzidas por certos micro-organismos que destroem ou inibem o crescimento de outros micro-organismos. Atualmente, em sua maioria, os antibióticos são semi-sintéticos, produzidos em culturas microbianas em grande escala e depois transformados por processos químicos. Considerando o mecanismo de ação, os antimicrobianos dividem-se em dois grupos: um que inclui aqueles que atuam na membrana ou parede celular, tornando a célula vulnerável às forças osmóticas; outro que atua de forma mais profunda na célula, bloqueando a síntese protéica de diversas

formas e prejudicando o metabolismo bacteriano (Auto *et al.*, 2008).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem como característica o anel  $\beta$ -lactâmico, variando a forma como esse anel é estabilizado. A penicilina é o beta-lactâmico mais conhecido, sendo que a penicilina G foi o primeiro antimicrobiano descoberto, obtido por fermentação a partir do *Penicillium chrysogenum* e permanecendo eficaz frente a inúmeras infecções até hoje. A partir do momento em que se descobriu o seu núcleo central, uma série de derivados foi obtida em laboratório, constituindo o grupo das penicilinas semi-sintéticas. As cefalosporinas fazem parte do grupo de beta-lactâmicos e são antimicrobianos bactericidas, inibindo a síntese da parede celular, similarmente às penicilinas (Tavares, 2007). Alguns antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos são: amoxicilina, ampicilina, cefacetil, cefazolina, ceftiofur, cefapirina, cloxacilina, dicloxacilina e oxacilina.

O ceftiofur é uma cefalosporina de terceira geração, considerada pela OIE (World..., 2007) como droga de grande importância na medicina veterinária. Quando administrado, o ceftiofur origina rapidamente o metabólito ativo desfuroilceftiofur, que conserva a estrutura da beta-lactama (Giguère, 2006).

As sulfonamidas são derivadas da para-aminobenzenosulfonamida (sulfanilamida). A maioria é relativamente insolúvel em água, mas seus sais de sódio são facilmente solúveis. As sulfonamidas agem inibindo competitivamente a enzima bacteriana dihidropteroato-sintase, responsável pela incorporação do ácido para-aminobenzoico (PABA) em ácido dihidropteroico, precursor imediato do ácido fólico. As células de mamíferos necessitam de ácido fólico pré-formado e não são afetadas pelas sulfonamidas (Brunton *et al.*, 2008). Sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina

e dapsona são exemplos de antimicrobianos dessa classe.

A dapsona foi proibida em toda a União Europeia para uso em animais de produção de acordo com o Regulamento (CEE) nº 2377/90 (União..., 1990). Essa droga pode causar sérios efeitos colaterais em humanos, como o quadro de hemólise dose-dependente, que pode levar à anemia hemolítica, e meta-hemoglobinemia. Anormalidades na formação de glóbulos brancos, incluindo anemia aplásica, são raros, mas são responsáveis pela maioria das mortes causadas pelo uso da dapsona (Hadjigeorgiou *et al.*, 2009).

O trimetoprim é um composto sintético que inibe a diidrofolato redutase, penúltima etapa da síntese do tetraidrofolato, que é a forma ativa do ácido fólico. Possui atividade sinérgica com algumas sulfonamidas e essa combinação é ativa (e, muitas vezes, bactericida) contra muitos cocos Gram positivo e bastonetes Gram negativo (Robbers, 1997).

Os antimicrobianos macrolídeos (eritromicina, espiramicina e tilosina) são agentes bacteriostáticos que inibem a síntese protéica por ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S de organismos sensíveis (Brunton *et al.*, 2008). No entanto, alguns macrolídeos, como a eritromicina, podem ser bactericidas quando em altas concentrações ou quando atuam contra um agente extremamente sensível (Plumb, 1999).

Os aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina) são bactericidas, ao contrário da maioria dos inibidores da síntese de proteína microbiana, que é bacteriostática. A ação depende da concentração da droga, mas a atividade bactericida residual persiste mesmo após a concentração sérica ficar abaixo da concentração inibitória mínima (Brunton *et al.*, 2008).

As lincosamidas (pirilmicina e clindamicina) agem ligando-se à subunidade 50S dos ribossomos do RNA de bactérias suscetíveis, interferindo na síntese protéica. Elas são ativas, principalmente, contra bactérias Gram positivo, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. xylosum*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis* e *Enterococcus faecalis* (Plumb, 1999).

As tetraciclinas (oxitetraciclina e tetraciclina) são antimicrobianos bacteriostáticos que atuam inibindo a síntese da proteína microbiana, sendo ativas tanto contra bactérias Gram negativo quanto Gram positivo. A inibição da síntese protéica ocorre pela ligação ao ribossomo 30S das bactérias, impedindo o acesso do RNAt aminoacil ao receptor do complexo RNAm-ribossomo (Brunton *et al.*, 2008).

### 2.3 Legislação brasileira

A ingestão diária aceitável (IDA) de substâncias farmacologicamente ativas é uma estimativa da quantidade de resíduo que pode ser ingerida diariamente por toda a vida sem representar risco à saúde do consumidor. Os dados da IDA são estabelecidos com base em dados toxicológicos, farmacológicos ou microbiológicos: o menor valor será considerado. Os limites máximos de resíduos (LMR) baseiam-se nos valores obtidos da IDA. Uma vez que os LMR forem fixados, torna-se necessário determinar o tempo de descarte do leite para cada medicamento veterinário, para que então o produto tenha sua comercialização autorizada, de forma que os resíduos provenientes da sua utilização não ultrapassem o valor do LMR estabelecido (Position..., 2002).

No Brasil, os LMR dos produtos de origem animal são definidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, descrito na

Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (Quadro 1) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA). As drogas não descritas no PNCR quanto ao LMR seguem as recomendações do *Codex Alimentarius*.

Quadro 1. Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL/2000

ANTIMICROBIANOS	MÉTODO ANALÍTICO	LQ/MIC (µg/kg)	LMR/NA* (µg/kg)	AMOSTRAS	LABORATÓRIO			
Penicilina	ELISA CLAE-UV	NE	4	200	LARA/RS LARA/MG			
Estreptomicina		NE	200					
Tetraciclina (a)		NE	100					
Eritromicina		NE	40					
Neomicina		NE	500					
Oxitetraciclina (a)		NE	100					
Clortetraciclina (a)		NE	100					
Ampicilina		NE	4					
Amoxicilina		NE	4					
Ceftiofur		NE	100					
Sulfametazina(b)		ELISA	10			100	100	LARA/RS LARA/MG LARA/SP
Sulfadimetoxina(b)		CCD – DST	10					
Sulfatiazol(b)	CLAE – UV	NE						
Cloranfenicol	ELISA CLAE – UV	5 (i)	5* (ii)	100	LARA/MG LARA/RS LARA/SP			

i) Para aquelas substâncias que possuem LMR igual a ZERO ou aquelas sem LMR estabelecidos, o Nível de Ação é igual ao Limite de Detecção do método de confirmação.  
(ii) Para drogas proibidas não se estabelece LMR.  
(\*) NA - Nível de ação  
ELISA – Enzimaimunoensaio  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CCD- Cromatografia por Camada Delgada  
DST - Densitometria

LQ - Limite de Quantificação  
NE - Não estabelecido  
LMR - Limite Máximo de Resíduo  
MIC - Concentração Mínima Inibitória  
(a) Somatório de todas as Tetraciclina  
(b) Somatório de todas as Sulfonamidas  
DCE - Detector por Captura de Elétrons  
UV - Detector Ultra Violeta  
DF - Detector por Fluorescência

Com a Resolução nº 02, de 12 de julho de 2002 (Brasil, 2002a), o MAPA criou o Comitê Técnico Consultivo, responsável pela avaliação dos kits analíticos destinados à detecção de micro-organismos, resíduos de drogas, medicamentos ou outras substâncias, no processo de Autorização de Uso de Produtos (AUP). Para que fossem comercializados no País, os kits deveriam passar antes pela aprovação do governo. No entanto, tal resolução foi revogada em 2007, fazendo com que os kits possam ser vendidos livremente (Brasil, 2007).

A Instrução Normativa nº 51/2002 do MAPA (Brasil, 2002b) considera, como um dos requisitos de qualidade do leite cru, a ausência de resíduos de antimicrobianos e de outros agentes inibidores do crescimento microbiano. Portanto, torna-se necessário o uso de testes sensíveis que sejam capazes de detectar tais resíduos no leite de forma rápida e de baixo custo.

#### 2.4 Resíduos de antimicrobianos no leite: panorama brasileiro

Há inúmeros trabalhos demonstrando a realidade brasileira quanto aos resíduos de

antimicrobianos em leite. Em um artigo publicado em 1998, Lopes *et al.* testaram 178 amostras de leite pasteurizado de diferentes marcas comerciais em Campinas (SP) utilizando o Delvotest P de acordo com as recomendações do fabricante. O resultado mostrou que 14 amostras apresentaram resíduos de antimicrobianos, o que representa 7,9% do total coletado.

Borges *et al.* (2000) verificaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite pasteurizado integral e padronizado produzidos no Estado de Goiás. A técnica utilizada baseava-se na difusão do resíduo de antimicrobiano em ágar, tendo o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus stearothermophilus* como micro-organismos-teste. Foram analisadas 533 amostras de leite pasteurizado integral e padronizado, compostas por 98 marcas comerciais. Destas, 32 (32,65%) apresentaram resíduos de antimicrobianos.

Nascimento *et al.* (2001) avaliaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 96 amostras de leite pasteurizado comercializado em Piracicaba (SP). A metodologia utilizada foi a de disco de papel filtro em meio de cultura contendo *Bacillus stearothermophilus*. Observou-se que 50% das amostras de leite apresentaram resultados positivos.

Lopes *et al.* (2002) fizeram uma pesquisa em 80 propriedades leiteiras na região de Curitiba (PR) e detectaram resíduos de antimicrobianos em 75% das amostras de leite das fazendas pesquisadas. Além disso, foi aplicado um questionário aos produtores, que mostrou a penicilina associada como o antimicrobiano mais utilizado (24,7%), seguida de aminoglicosídeo associado, oxitetraciclina e pirlimicina.

Porto *et al.* (2002) analisaram 10.464 amostras de leite cru produzido no Rio Grande do Sul, utilizando o Snap Test. Do total de amostras analisadas, 121 (1,16%) apresentaram resultados positivos para resíduos de antimicrobianos beta-lactâmicos.

Utilizando o Delvotest SP, Leme (2005) pesquisou a presença de resíduos de antimicrobianos de uso veterinário em 1500 amostras de leite na cidade de São Paulo (SP), sendo 900 amostras de leite pasteurizado integral e 600 de leite integral tipo longa vida ou UAT. O resultado mostrou que 10 amostras (0,67% do total), sendo seis de leite pasteurizado e quatro de leite UAT, apresentaram resíduos de antimicrobianos.

Nero *et al.* (2007) avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos em leite com o kit Charm-test. Foram testadas 210 amostras de leite cru coletadas em quatro regiões do País: Viçosa (MG), Pelotas (RS), Londrina (PR) e Botucatu (SP). Detectaram-se resíduos em 24 amostras, ou seja, em 11,4% do total coletado.

Bando *et al.* (2009), utilizando ensaio imunoenzimático, verificaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 151 amostras de leite pasteurizado comercial no Estado do Paraná. Os resultados mostraram que 59 (41,3%) do total de amostras continham tais resíduos.

## 2.5 Detecção de antimicrobianos no leite

Existem vários métodos para detectar resíduos de antimicrobianos no leite (Quadro 2). Esses métodos incluem inibição microbiana, métodos imunológicos, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e ensaios enzimáticos (Cullor, 1992).

Quadro 2. Testes para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite

TESTE	PRINCÍPIO DO TESTE
Teste de disco BR-Test <sup>1</sup> BR-Test Blue Star <sup>1</sup> Br-Test AS <sup>1</sup> Charm Farm Test <sup>2</sup> Charm Inhibition Assay <sup>2</sup> Delvotest-P <sup>3</sup> Delvotest-SP <sup>3</sup> COPAN ATK P&S Microplate <sup>4</sup> COPAN ATK P&S Single <sup>4</sup> Charm Cowside II Test <sup>2</sup> Charm Blue Yellow II Test <sup>2</sup>	Inibição do crescimento microbiano
Charm Cowside Test <sup>2</sup> Charm I Test <sup>2</sup> Charm II Test <sup>2</sup>	Ensaio de receptor
CITE Probe ( $\beta$ -lactâmicos) <sup>5</sup>	Ligação Protéica
CITE Probe (Tetraciclina) <sup>5</sup> CITE Probe (Gentamicina) <sup>5</sup> Cite Sulfa Trio <sup>5</sup> LacTek ( $\beta$ -lactâmicos) <sup>6</sup> LacTek (Gentamicina) <sup>6</sup> LacTek (Sulfametazina) <sup>6</sup> Signal Neomicina Detection Test <sup>7</sup> Signal Foresite Gentamicina <sup>7</sup> Signal Gentamicina <sup>7</sup> Signal Foresite Sulfametazina <sup>7</sup> Snap ( $\beta$ -lactâmicos) <sup>9</sup> Snap (Tetraciclina) <sup>9</sup> Charm MRL BL/TET <sup>2</sup>	ELISA
Penzyme <sup>8</sup> Método de bioluminescência <sup>10</sup>	Enzima

Fonte: Adaptado de Cullor (1992), Costa (1996) e Tenório (2007)

<sup>1</sup>BR- Test® – Idetek Inc., Sunnyvale, California, USA

<sup>2</sup>Charm Test® – Charm Sciences Inc., Malden, Md, USA

<sup>3</sup>Delvotest® - Gist-Brocades Food Ingredients Inc., King of Prussia, Pa, USA

<sup>4</sup>Copan® ATK P e S Microplate e Single – Copan, Italia

<sup>5</sup>CITE Probe® - IDEXX Laboratories Inc., Portland, Maine, USA

<sup>6</sup>LacTec® – Idetek Inc., Sunnyvale, California, USA

<sup>7</sup>Signal® – Signal ForeSite

<sup>8</sup>Penzyme® - UCB-Bioproducs S.A., Chemin du Foriest, Belgium

<sup>9</sup>SNAP® – IDEXX Laboratories Inc., Portland, Maine, USA

<sup>10</sup>Método de bioluminescência (ATP) – Biosys S.A., Compiègne, France

### 2.5.1 Método de inibição microbiana

O método de inibição microbiana apresenta-se na forma de kit com uma cultura padrão de um micro-organismo teste (por exemplo,

*Bacillus stearothermophilus*), um meio de cultura (ágar) e um indicador de pH. Após a inoculação da amostra de leite a ser testada, o kit é incubado por um período, geralmente de três horas. Se o leite não contiver

resíduos ou apresentá-los em concentrações abaixo do limite de detecção do método, o micro-organismo teste se multiplicará, o pH do meio diminuirá, e o meio mudará de cor. A presença da substância inibitória é indicada por zonas de inibição (teste de disco) ou por manutenção da cor original do kit (Cullor, 1993).

Deve-se levar em consideração que esses testes estão sujeitos a resultados falso-positivos pelo efeito de substâncias inibitórias naturais encontradas no leite, como lisozima, lactoferrina, dentre outras (Mitchell *et al.*, 1998). No entanto, pode-se aquecer a amostra de leite antes do teste para inativar tais inibidores (Cullor, 1993).

Os testes atuais são, em sua maioria, formados por ampolas (monotestes) ou sob a forma de placas. Eles não requerem muitos equipamentos de laboratório, exceto banheira ou estufas. Para evitar diferenças subjetivas na interpretação visual e possibilitar leituras mais objetivas, algumas empresas têm leitores que fazem medições fotométricas do comprimento de onda ou usam um comprimento de onda padrão em leitor de ELISA (Navrátilová, 2008).

Entre os métodos de inibição microbiana disponíveis no mercado brasileiro, destacam-se os kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test. Esses kits baseiam-se no crescimento de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, com consequente produção de ácido no meio e alteração do pH, que é detectada pela alteração da cor do meio de azul para amarelo, evidenciado pelo indicador púrpura de bromocresol. Quando há presença de antimicrobianos, o micro-organismo não consegue crescer, não ocorre a produção do ácido e a cor do meio não se altera, permanecendo azul.

Com a evolução dos testes, aumenta-se a sensibilidade dos métodos existentes no mercado. Por isso, é recomendado que

reavaliações periódicas quanto ao tempo de descarte e limite tolerável de resíduos dos antimicrobianos no leite sejam feitas (Jensen, 1995).

### 2.5.2 Tetraciclina no leite

Os métodos de inibição do crescimento microbiano encontrados no mercado são falhos para a detecção de resíduos de tetraciclina em leite em concentrações estabelecidas pela legislação brasileira (LMR). Hotta (2003) testou diferentes kits para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite e observou que os métodos imunoenzimáticos (Snap tetraciclina) e de receptores (Charm SL tetraciclina) detectaram os resíduos de tetraciclina na concentração de 100 ppb, que é o limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação brasileira. No entanto, os kits baseados no método de inibição microbiana (Delvotest SP, COPAN ATK P&S Single e COPAN ATK P&S Microplate) não detectaram os resíduos nessa concentração. Da mesma forma, Tenório (2007) realizou um estudo com os testes de inibição microbiana COPAN Microplate e COPAN Single e observou que a sensibilidade de ambos foi baixa na concentração do LMR e na concentração indicada pelo fabricante (100 ppb para o COPAN Microplate e 150 ppb para o COPAN Single).

## 2.6 Produto orgânico

De acordo com o artigo 2º da Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, considera-se produto da agricultura orgânica ou produto orgânico, seja ele *in natura* ou processado, aquele obtido em sistema orgânico de produção agropecuária ou oriundo de processo extrativista sustentável e não prejudicial ao ecossistema local. O Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal (Brasil, 2008) traz os princípios e normas

sobre aspectos de manejo, nutrição e saúde animal que devem ser seguidos para que um produto receba a denominação de orgânico.

Os objetivos desse trabalho foram testar dois kits de detecção de resíduos de antimicrobianos baseados no método de inibição microbiana em leite inoculado experimentalmente com diferentes concentrações de vários grupos de antimicrobianos, especialmente de tetraciclinas, ceftiofur e seus metabólitos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Avaliação dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test**

Os procedimentos de avaliação dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue-Yellow II Test seguiram as recomendações prescritas na Guia para validação de métodos EURACHEM (EURACHEM, 1998). As análises feitas seguiram as recomendações e cuidados do fabricante, descritos no manual de ambos os kits (Anexos 1 e 3). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar sob condições assépticas e com material esterilizado no Laboratório de Microbiologia

do Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte/MG.

Amostras de leite cru foram inoculadas com soluções-padrão de 23 diferentes antimicrobianos e uma solução com metabólitos de um dos antimicrobianos (ceftiofur), em duas diferentes concentrações. Essas soluções foram preparadas em solvente compatível com o kit, seguindo recomendações internacionais (International..., 1999). Os níveis de adição consideraram o limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Nível 1) e o limite máximo de resíduos (LMR) (Nível 2) estabelecido pela Instrução Normativa nº 42 de 1999 (Brasil, 1999). Para os antimicrobianos que não possuem limite estabelecido no País, limites legais estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ou por legislação da União Europeia foram adotados.

Os quadros 3 e 4 mostram a relação de antimicrobianos e as respectivas concentrações estabelecidas para cada kit testado, bem como o limite legal adotado.

Quadro 3. Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações para avaliação do Charm® Cow Side II Test

Antimicrobiano	Concentrações (ppb)	
	Nível 1 (Charm®)	Nível 2 (Legislação)
Cefazolina	6	50**
Cefapirina	8	60**
Pirlimicina	25	100***
Cefacetril	10	125**
Cloxacilina	10	30**
Dicloxacilina	5	30**
Oxacilina	5	30**
Penicilina G	2	4*
Tetraciclina	50	100*
Oxitetraciclina	75	100*
Ceftiofur	50	100*
Metabólitos do Ceftiofur	50	100*
Gentamicina	75	100**
Neomicina	100	500*
Ampicilina	3	4*
Amoxicilina	3	4*
Eritromicina	75	40*
Sulfadiazina	40	100**
Sulfadimetoxina	25	100*
Sulfametazina	75	100*
Tilosina	20	50**
Dapsona	1	0**
Trimetoprim	200	50**
Espiramicina	300	200**/**

Nível 1= Limite de detecção declarado pelo fabricante (Charm® Sciences Inc.);

Nível 2= Limite máximo de resíduos – LMR: \* IN42 (Brasil, 1999); \*\* Regulamento (UE) n° 37/2010 (União..., 2010); \*\*\* *Codex Alimentarius* – 32nd Session of the *Codex Alimentarius* Commission (Compendium..., 2009)



Quadro 4. Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações para avaliação do Charm® Blue Yellow II Test

Antimicrobiano	Concentrações (ppb)	
	Nível 1 (Charm®)	Nível 2 (Legislação)
Cefazolina	6	50**
Cefapirina	4	60**
Pirlimicina	50	100***
Cefacetril	10	125**
Cloxacilina	10	30**
Dicloxacilina	10	30**
Oxacilina	8	30**
Penicilina G	2	4*
Tetraciclina	75	100*
Oxitetraciclina	75	100*
Ceftiofur	50	100*
Metabólitos do Ceftiofur	50	100*
Gentamicina	75	100**
Neomicina	75	500*
Ampicilina	2	4*
Amoxicilina	2	4*
Eritromicina	100	40*
Sulfadiazina	80	100**
Sulfadimetoxina	50	100*
Sulfametazina	75	100*
Tilosina	20	50**
Dapsona	1	0**
Trimetoprim	200	50**
Espiramicina	400	200**/**

Nível 1= Limite de detecção declarado pelo fabricante (Charm® Sciences Inc.);

Nível 2= Limite máximo de resíduos – LMR: \* IN42 (Brasil, 1999); \*\* Regulamento (UE) n° 37/2010 (União..., 2010); \*\*\* *Codex Alimentarius* – 32nd Session of the *Codex Alimentarius* Commission (Compendium..., 2009)

### 3.2 Obtenção do leite orgânico

O leite cru orgânico utilizado foi coletado na Fazenda Salvaterra, especializada na produção de leite, café e outros produtos orgânicos, localizada em Juiz de Fora/ MG, a 272 km de Belo Horizonte. A fazenda possui duas certificações de qualidade orgânica, sendo uma pela Minas Orgânica – Associação Mineira para Certificação de Produtos Orgânicos, e a outra pela BCS Öko-Garantie, empresa alemã com filial no Brasil.

Foram coletados sete litros de leite para o experimento (International..., 1995a). Em seguida, este leite foi refrigerado e acondicionado em caixa isotérmica até a chegada ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte/ MG. Duas alíquotas do leite (40 mL do leite) foram coletadas, acondicionadas em frascos contendo os conservantes azidiol para análise de CBT (contagem bacteriana total) e bronopol para análises de CCS (contagem de células somáticas) e de composição do leite, e enviadas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG). A CBT foi realizada em equipamento eletrônico (IBC Bactocount/ Bentley Instruments<sup>®</sup>) segundo IDF (International..., 1991), e a CCS segundo IDF (International..., 1995b), determinada pelo princípio de citometria de fluxo. A composição do leite (determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e total foram realizadas em equipamento eletrônico Bentley Combisystem 2300/ Bentley Instruments<sup>®</sup>, segundo IDF (International..., 2000) por absorção de comprimento de onda no infravermelho médio. O restante do leite foi mantido sob refrigeração a 4°C e utilizado na preparação das soluções dos diferentes antimicrobianos.

### 3.3 Preparo das soluções

As soluções-padrão foram preparadas conforme recomendação do fabricante. As amostras de leite foram homogeneizadas 25 vezes, por inversão, antes do uso (Standard..., 1992). Primeiro, os antimicrobianos foram diluídos com uma determinada quantidade de solvente (Solução- padrão 1) em tubos de ensaio esterilizados, identificados e homogeneizados dez vezes por movimentos de inversão. Em seguida, foram agitados em aparelho Phoenix AP56 por 30 segundos. Essas soluções foram, então, novamente diluídas (Soluções-padrão 2) com o mesmo solvente ou com outro, de acordo com as recomendações do fabricante, e agitadas por 30 segundos em aparelho Phoenix AP56. De cada solução-padrão 2, era retirada uma alíquota e esta era adicionada a 100 mL de leite. Esse leite era, então, homogeneizado por inversão 25 vezes antes da transferência para os kits.

### 3.4 Controles analíticos

Durante o experimento, controles periódicos da temperatura dos banhos-marias, análises de amostras de leite isento de resíduos de antimicrobianos (branco) e determinação da acidez titulável (°D) do leite (Brasil, 2006) utilizados foram realizados.

### 3.5 Kit Charm<sup>®</sup> Cow Side II Test

Aproximadamente 30 minutos antes da realização do teste, os banhos-marias foram ligados e mantidos a 64°C ± 2°C. Após a preparação das concentrações, 100 µL de cada diluição foram transferidos, com auxílio da pipeta que acompanha o teste, para a ampola contendo a cultura- padrão de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* até completar 30 testes. Em seguida, todas as ampolas foram colocadas em banho-maria por três horas. Após esse tempo, a leitura foi feita visualmente, observando-se se houve alteração na coloração (azul/roxo – positivo;

amarelo – negativo) (Anexo 2). No decorrer do experimento, também foi realizada leitura de amostras de leite isentas de antimicrobianos (branco), consideradas controle.

### 3.6 Kit Charm® Blue Yellow II Test

Aproximadamente 30 minutos antes da realização do teste, os banhos-marias foram ligados e mantidos a  $64^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após a preparação das concentrações, 50  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram transferidos, com auxílio de pipeta automática, para o “poço” contendo a cultura-padrão de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, até completar 30 testes. Em seguida, todos os “poços” foram colocados na placa e esta foi colocada em banho-maria por três horas. Após esse tempo, a leitura foi feita visualmente, observando-se se houve alteração na coloração (azul/roxo – positivo; amarelo – negativo) (Anexo 4). No decorrer do experimento, também foi realizada leitura de amostras de leite isentas de

antimicrobianos (branco), consideradas controle.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas neste experimento foram submetidas à análise estatística descritiva, segundo Sampaio (2002) e à estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de McNemar (Siegel e Castellan, 1988).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Qualidade do leite utilizado no experimento

Os resultados médios da qualidade do leite utilizado demonstram falhas na obtenção higiênica ou na limpeza dos equipamentos de ordenha e/ou tanque refrigerador pela elevada CBT. Apesar da alta CBT, a acidez titulável do leite apresentou-se dentro dos padrões legais estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 2002b), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados médios da qualidade do leite utilizado no experimento em comparação com a qualidade estabelecida pela legislação brasileira

Parâmetros	Instrução Normativa n° 51/2002	Resultados encontrados
CBT (log UFC/mL)	5,8	6,2
CCS (log cels/mL)	5,8	5,8
GORDURA (%)	3,0	3,14
PROTEÍNA (%)	2,9	3,25
LACTOSE (%)	4,3 (RIISPOA)	4,43
ESD (%)	8,4	8,63
EST (%)	11,4	11,77
ACIDEZ TITULÁVEL (°D)	14 a 18	16

### 5.2 Avaliação da eficiência do Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite

Os kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test foram avaliados quanto à detecção de vários antimicrobianos em

duas concentrações. Foi verificado que estes testes foram capazes de detectar a presença da maioria dos antimicrobianos nas concentrações mínimas declaradas pelo fabricante (Nível 1) e na concentração permitida pela legislação (LMR-Nível 2), conforme as Tabelas 3 e 4.

Como pode ser observado na Tabela 3, o kit Charm® Cow Side II Test detectou quase todos os antimicrobianos no nível declarado pelo fabricante, excetuando-se oxacilina, penicilina G, sulfadiazina, sulfadimetoxina e dapsona, para os quais as sensibilidades foram de 16,67%; 60,00%; 63,34%; 76,67% e 43,34%, respectivamente. Recomenda-se que o limite de detecção mínimo para tais drogas, declarado no manual do teste, seja revisto, uma vez que o fabricante declara o limite de detecção em concentração expressa em um intervalo de amplitude. Desta forma, na concentração testada, ou seja, no limite inferior deste intervalo, os resultados de sensibilidade para estas drogas não foram muito altos.

Quanto à detecção das tetraciclinas, ambos os kits apresentaram resultados satisfatórios. Esse é um grande diferencial, pois os testes de detecção de resíduos de antimicrobianos baseados em inibição microbiana não são capazes de detectar as tetraciclinas em

limites inferiores ao LMR. Le Breton *et al.* (2007) testaram dois kits com esse mesmo princípio (Delvotest SP-NT e Copan Milk Test) e observaram que nenhum dos testes foi capaz de detectar as tetraciclinas abaixo da concentração do LMR (100 ppb). Tenório (2007) testou os kits COPAN Single e Microplate e verificou que ambos os testes não detectaram os antimicrobianos do grupo das tetraciclinas no limite de detecção declarado pelo fabricante. Stead *et al.* (2008) testaram o kit Delvotest SP-NT e observaram que, para o grupo das tetraciclinas, o teste não detecta o limite declarado pelo fabricante, que é acima do LMR (100ppb).

Os kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test foram eficientes na detecção do ceftiofur e seus metabólitos no limite inferior de detecção declarado pelo fabricante. O mesmo resultado foi encontrado por Stead *et al.* (2008) quanto ao Delvotest SP-NT.

Tabela 3. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste Charm® Cow Side II

Antimicrobiano	Positivo			Negativo		
	Nível	N/30	%	Nível	N/30	%
Cefazolina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cefapirina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Pirlimicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cefacetil	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cloxacilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Dicloxacilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Oxacilina	N1	5	16,67	N1	25	83,33
	N2	18	60	N2	12	40
Penicilina G	N1	18	60	N1	12	40
	N2	30	100	N2	0	0
Tetraciclina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	29	96,67	N2	1	3,33
Oxitetraciclina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	28*	100	N2	0	0
Ceftiofur	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Metab. do Ceftiofur	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Gentamicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Neomicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Ampicilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Amoxicilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Eritromicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	6	20	N2	24	80
Sulfadiazina	N1	19	63,34	N1	11	36,66
	N2	30	100	N2	0	0
Sulfadimetoxina	N1	23	76,67	N1	7	23,33
	N2	30	100	N2	0	0
Sulfametazina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Tilosina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Dapsona	N1	13	43,33	N1	17	56,67
	N2	---	---	N2	---	---
Trimetoprim	N1	30	100	N1	0	0
	N2	12	40	N2	18	60
Espiramicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0

Nível 1: Limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Charm® Sciences Inc.); Nível 2: LMR (Brasil, 1999; Compendium..., 2009 e União..., 2010)

Tabela 4. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste Charm® Blue Yellow II

Antimicrobiano	Positivo			Negativo		
	Nível	N/30	%	Nível	N/30	%
Cefazolina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cefapirina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Pirlimicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cefacetril	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Cloxacilina	N1	14	46,67	N1	16	53,33
	N2	28	93,33	N2	2	6,67
Dicloxacilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Oxacilina	N1	29	96,67	N1	1	3,33
	N2	29	96,67	N2	1	3,33
Penicilina G	N1	0	0	N1	30	100
	N2	15	50	N2	15	50
Tetraciclina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Oxitetraciclina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	28	93,33	N2	2	6,67
Ceftiofur	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Metab. do Ceftiofur	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Gentamicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Neomicina	N1	28	93,33	N1	2	6,67
	N2	30	100	N2	0	0
Ampicilina	N1	28	93,33	N1	2	6,67
	N2	30	100	N2	0	0
Amoxicilina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	30	100	N2	0	0
Eritromicina	N1	24	80	N1	6	20
	N2	0	0	N2	30	100
Sulfadiazina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	28	93,33	N2	2	6,67
Sulfadimetoxina	N1	10	33,33	N1	20	66,67
	N2	30	100	N2	0	0
Sulfametazina	N1	27	90	N1	3	10
	N2	30	100	N2	0	0
Tilosina	N1	1	3,33	N1	29	96,67
	N2	30	100	N2	0	0
Dapsona	N1	30	100	N1	0	0
	N2	---	---	N2	---	---
Trimetoprim	N1	30	100	N1	0	0
	N2	6	20	N2	24	80
Espiramicina	N1	30	100	N1	0	0
	N2	1	3,33	N2	29	96,67

Nível 1: Limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Charm® Sciences Inc.); Nível 2: LMR (Brasil, 1999; Compendium..., 2009 e União..., 2010)

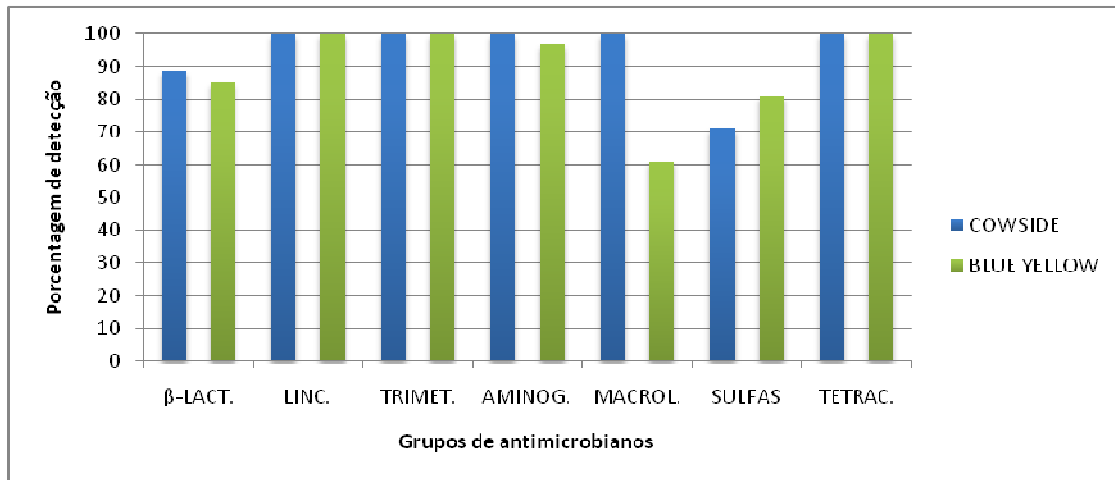
Na Tabela 3, com relação ao LMR, a oxacilina foi detectada somente em 60% das amostras testadas. Isso preocupa, uma vez que esta droga é classificada como muito importante para uso na veterinária, especialmente em bovinos, segundo a OIE (World..., 2007). Portanto, o nível de detecção da oxacilina pelo Charm® Cow Side II Test deve ser revisto. A eritromicina e o trimetoprim também apresentaram resultados baixos de detecção na concentração do LMR (20% e 40%, respectivamente). No entanto, esse resultado era esperado, pois o limite de detecção do kit é acima do LMR. Uma surpresa no resultado foi a detecção da espiramicina, pois o seu limite de detecção divulgado no manual do produto está acima do LMR e a sensibilidade do teste foi de 97% para o nível 2 avaliado.

Na Tabela 4, avaliando-se o Charm® Blue Yellow II Test em relação ao nível 1, praticamente todos os antimicrobianos foram detectados. O índice de detecção da eritromicina ficou abaixo do esperado, 80%. Cloxacilina, sulfadimetoxina e tilosina obtiveram 46,67%, 33,33% e 3,33% de detecção, respectivamente. No caso da penicilina G, verificou-se resultado negativo para todas as amostras. Em todos esses

casos, o limite mínimo de detecção considerado no manual do kit deve ser revisto. Quando se analisa o nível 2, que é o LMR, somente a penicilina G apresentou resultado não satisfatório, com apenas 50% de detecção. Eritromicina, trimetoprim e espiramicina também apresentaram baixa porcentagem de detecção, o que já era esperado, pois o teste é violativo para essas drogas, apresentando nível de detecção acima do permitido pela legislação.

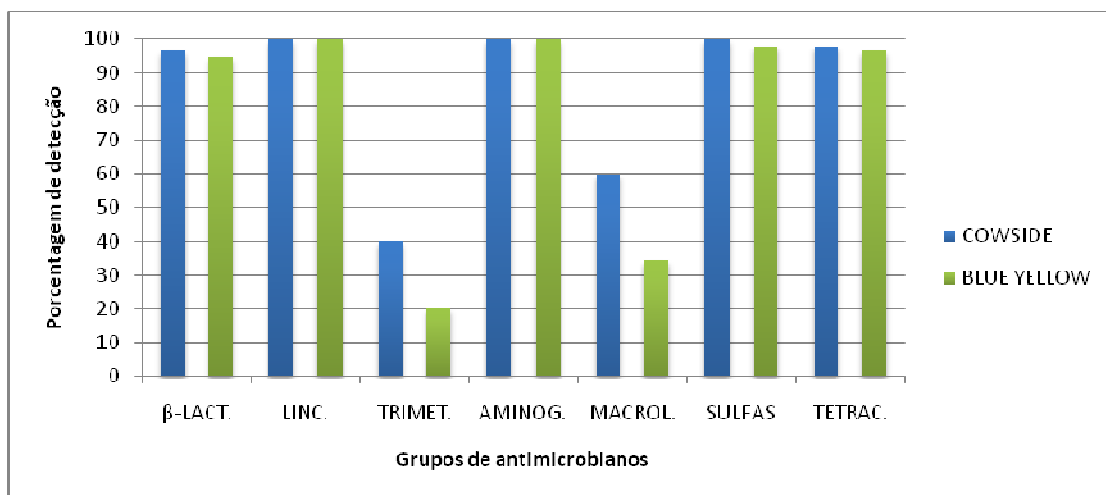
### **5.3 Comparação dos resultados entre os kits por grupos de antimicrobianos**

A Figura 1 mostra a comparação entre os kits por grupo de antimicrobianos em relação ao nível 1. Observa-se que os kits se comportaram de maneira matematicamente semelhante em quase todos os grupos, sendo o Charm® Cow Side II Test ligeiramente melhor que o Charm® Blue Yellow II Test. As maiores diferenças ficaram evidentes no grupo dos macrolídeos (eritromicina, tilosina e espiramicina), em que o Charm® Cow Side II Test apresentou maior porcentagem de detecção e no grupo das sulfas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina e dapsona), em que o Charm® Blue Yellow II Test foi capaz de detectar maior número de amostras positivas.



β-Lact.: beta-lactâmicos; Linc.: Lincosamidas; Trimet.: Trimetoprim; Aminog.: Aminoglicosídeos; Macrol.: Macrolídeos; Sulfas: Sulfonamidas; Tetrac.: Tetracilinas.

Figura 1. Percentagem de detecção dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test no nível 1 (Charm® Sciences Inc.).



β-Lact.: beta-lactâmicos; Linc.: Lincosamidas; Trimet.: Trimetoprim; Aminog.: Aminoglicosídeos; Macrol.: Macrolídeos; Sulfas: Sulfonamidas; Tetrac.: Tetracilinas.

Figura 2. Percentagem de detecção dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test no nível 2 (LMR).

A Figura 2 mostra a comparação entre os kits por grupo de antimicrobianos em relação ao nível 2 (LMR). Novamente, os dois testes apresentaram resultados matematicamente semelhantes, com exceção do grupo dos macrolídeos e do trimetoprim, sendo que o Charm® Cow Side II Test apresentou melhor percentagem de detecção.

Porém, deve-se lembrar que tanto o trimetoprim quanto as drogas do grupo dos macrolídeos testadas apresentam o limite de detecção acima do permitido pela legislação (excetuando-se a tilosina). Portanto, esse resultado já era esperado e foi, portanto, coerente com a informação do fabricante do kit.



#### 5.4 Comparação dos resultados entre os kits pelo teste de McNemar

Para a maioria dos antimicrobianos testados nas duas concentrações, os resultados foram matematicamente ou estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Este dado é importante, pois

sinaliza que ambos os kits estão aptos para detectar estes antimicrobianos de forma similar. No entanto, a detecção de alguns antimicrobianos (oxacilina, sulfadimetoxina - Nível 1 e trimetoprim - Nível 2) pelos dois kits foi diferente estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre os resultados de resíduos de antimicrobianos entre os kits de acordo com o teste de McNemar

Antimicrobiano	Nível	Resultados positivos		Valor de P
		Charm® Cow Side II Test	Charm® Blue Yellow II Test	
Cefazolina*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Cefapirina*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Pirlimicina*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Cefacetil*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Cloxacilina	N1	30	14	
	N2	30	28	
Dicloxacilina*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Oxacilina	N1	5	29	$P \leq 0,05$
	N2	18	29	$P \leq 0,05$
Penicilina G	N1	18	0	
	N2	30	15	
Tetraciclina	N1*	30	30	
	N2	29	30	
Oxitetraciclina	N1*	30	30	
	N2	28**	28	
Ceftiofur*	N1	30	30	
	N2	30	30	
Metab. do Ceftiofur*	N1	30	30	
	N2	30	30	

N1: concentração mínima de resíduos de antimicrobianos detectada pelo teste, segundo o fabricante (Charm® Sciences Inc.); N2: LMR

\*resultados matematicamente iguais

\*\* em um total de 28 amostras, pois dois resultados foram inválidos na leitura visual

Tabela 5. Comparação entre os resultados de resíduos de antimicrobianos entre os kits de acordo com o teste de McNemar (cont.)

Antimicrobiano	Nível	Resultados positivos		Valor de P
		Charm® Cow Side II Test	Charm® Blue Yellow II Test	
<b>Gentamicina*</b>	N1	30	30	
	N2	30	30	
<b>Neomicina</b>	N1	30	28	
	N2*	30	30	
<b>Ampicilina</b>	N1	30	28	
	N2*	30	30	
<b>Amoxicilina*</b>	N1	30	30	
	N2	30	30	
<b>Eritromicina</b>	N1	30	24	
	N2	6	0	
<b>Sulfadiazina</b>	N1	19	30	
	N2	30	28	
<b>Sulfadimetoxina</b>	N1	23	10	$P \leq 0,05$
	N2*	30	30	
<b>Sulfametazina</b>	N1	30	27	
	N2*	30	30	
<b>Tilosina</b>	N1	30	1	
	N2*	30	30	
<b>Dapsona</b>	N1	13	30	
	N2	---	---	
<b>Trimetoprim</b>	N1*	30	30	
	N2	12	6	$P \geq 0,05$
<b>Espiramicina</b>	N1*	30	30	
	N2	30	1	

N1: concentração mínima de resíduos de antimicrobianos detectada pelo teste, segundo o fabricante (Charm® Sciences Inc.); N2: LMR

\*resultados matematicamente iguais

A detecção de resíduos da cefazolina, cefapirina, cefacetil, pirlimicina, dicloxacilina, ceftiofur, metabólitos do ceftiofur, gentamicina e amoxicilina pelos dois kits foi matematicamente igual. Da mesma forma, para o nível 1, a detecção dos resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, trimetoprim e espiramicina pelos dois kits foi idêntica matematicamente, o que ocorreu também para o nível 2 das seguintes drogas: neomicina, sulfadimetoxina, sulfametazina e tilosina. Para alguns antimicrobianos, como cloxacilina, tetraciclina e oxitetraciclina

(nível 2), houve pequena diferença na detecção de amostras positivas.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) na detecção da oxacilina pelos dois kits, em ambos os níveis. O Charm® Blue Yellow II Test foi capaz de detectar os resíduos da droga em ambos os níveis, enquanto o Charm® Cow Side II Test detectou uma quantidade mínima de amostras com resíduos no nível 1 e um pouco mais da metade das amostras no nível 2. A detecção de resíduos da sulfadimetoxina (Nível 1), também diferiu

estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os testes, sendo o Charm® Cow Side II Test melhor avaliado. Quanto ao trimetoprim, apesar dos resultados diferirem matematicamente, pode-se dizer que os testes não diferiram estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

Os kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test foram eficientes na detecção da maioria dos antimicrobianos testados nas duas concentrações, inclusive de metabólitos de antimicrobianos.

É necessário rever a informação do fabricante do kit Charm® Cow Side II Test quanto à detecção dos resíduos de oxacilina, penicilina G, das sulfonamidas e espiramicina e do kit Charm® Blue Yellow II Test quanto à detecção de eritromicina, cloxacilina, sulfadiazina, tilosina e penicilina G no leite.

Os dois kits detectaram, com eficiência, resíduos de tetraciclina atendendo o limite máximo de resíduos (LMR) previsto na legislação brasileira e podem ser utilizados com segurança para o monitoramento destes resíduos no leite. Da mesma forma, ambos os kits detectam resíduos de ceftiofur e de seus metabólitos, sendo eficientes também neste caso.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes avaliados neste experimento são qualitativos, sendo capazes de estabelecer se há ou não antimicrobianos no leite testado, não informando qual o composto detectado e qual a sua concentração quando utilizados para monitoramento de leite. Além disso, ambos os testes detectam, em sua maioria, os antimicrobianos em concentrações menores que o limite máximo permitido na legislação. Assim, resultado positivo não significa necessariamente violação da lei ou risco para o consumidor. Da mesma forma, resultado negativo não indica ausência

completa de resíduos, uma vez que o leite pode conter antimicrobianos não detectáveis pelos kits.

O uso de tais testes deve ser feito com cuidado, seguindo-se rigorosamente as recomendações do fabricante. A detecção de resíduos abaixo dos limites do LMR indica resultado positivo, o que levaria ao descarte do leite, sem saber se a concentração presente está violando ou não o LMR. No entanto, para os testes de triagem serem considerados eficazes e aprovados pelos organismos internacionais, eles têm de detectar concentrações abaixo dos limites legais estabelecidos como seguros para a saúde pública. O ideal é que amostras positivas para os testes de triagem sejam submetidas a métodos de confirmação, capazes de quantificar os resíduos presentes nas amostras testadas.

Durante a realização deste trabalho foi possível perceber a facilidade de manipulação dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test, não havendo necessidade de muito investimento e nem de mão de obra muito especializada.

Há, no entanto, algumas ressalvas a serem feitas. Com relação ao Charm® Cow Side II Test, a separação das ampolas é ligeiramente trabalhosa, pois o alumínio que as reveste não se rompe com facilidade. A leitura visual deixa a desejar, uma vez que gera dúvidas em relação ao resultado.

O Charm® Blue Yellow II Test tem leitura mais fácil, pois as cores se destacam. No entanto, somente o uso de um leitor eletrônico daria certeza do resultado observado. As leituras visuais são, em geral, subjetivas. Todos os testes que dão respostas baseadas em coloração deveriam vir acompanhados de um leitor eletrônico que daria maior credibilidade aos resultados encontrados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTO, H.F.; CONSTANT, J.M.C.;  
CONSTANT, A.B.L. *Antibióticos e  
quimioterápicos*. 5. ed. Maceió: UFAL.  
2008. 373 p.

BANDO, E.; OLIVEIRA, R.C.;  
FERREIRA, G.M.Z. *et al.* Occurrence of  
antimicrobial residues in pasteurized milk  
commercialized in the state of Paraná,  
Brazil. *Journal of Food Protection*, v.72,  
n.3. p. 911-914, 2009.

BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.;  
MESQUITA, A.J. *et al.* Ocorrência de  
resíduos de antibióticos em leite  
pasteurizado integral e padronizado  
produzido e comercializado no Estado de  
Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1,  
p. 59-63, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Instrução  
Normativa nº 42, de 20 de dezembro de  
1999. Plano Nacional de Controle de  
Resíduos em Produtos de Origem Animal -  
PNCR. *Diário Oficial da União*, Brasília, 22  
de dezembro de 1999. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 02,  
de 12 de julho de 2002(a). Criação do  
Comitê Técnico Consultivo para proceder à  
avaliação dos kits analíticos destinados à  
detecção de microrganismos, resíduos de  
drogas, medicamentos ou outras substâncias,  
no processo de Autorização de Uso de  
Produtos AUP. *Diário Oficial da União*,  
Brasília, 15 de julho de 2002. Seção 2, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Instrução

Normativa nº 51, de 18 de setembro de  
2002(b). 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 Regulamento Técnico da  
Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu  
Transporte a Granel. *Diário Oficial da  
União*, Brasília, 20 de setembro de 2002.  
Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.831, de  
23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a  
agricultura orgânica e dá outras  
providências. *Diário Oficial da União*,  
Brasília, 24 de dezembro de 2003. Seção 1,  
p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Instrução  
Normativa nº 68, de 12 de dezembro de  
2006. Oficializa os Métodos Analíticos  
Oficiais Físico-Químicos, para Controle de  
Leite e Produtos Lácteos, em conformidade  
com o anexo desta Instrução Normativa,  
determinando que sejam utilizados nos  
Laboratórios Nacionais Agropecuários.  
*Diário Oficial da União*, Brasília, 14 de  
dezembro de 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 02,  
de 22 de fevereiro de 2007. Revoga a  
Resolução nº 1, de 7 de fevereiro de 2002 e  
a Resolução nº 02 de 12 de julho de 2002.  
*Diário Oficial da União*, Brasília, 23 de  
fevereiro de 2007. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento. Instrução  
Normativa nº 64, de 18 de dezembro de  
2008. Aprova o Regulamento Técnico para

os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de dezembro de 2008. Seção 1, p. 21.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L., HOLANDA JR. E.V. Produção de leite e sociedade: Uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 3. cap. p. 61-74.

BRITO, M. A. V. P. *Resíduos de antimicrobianos no leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 20 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 60).

BRUNTON, L.L.; PARKER, K.L.; BLUMENTHAL D.K. *et al. Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 1.ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2008, 1230 p.

CANADIAN Committee on Antibiotic Resistance - CCAR. *Glossary*. Disponível em: <http://www.ccar-ccra.com/english/agrifood-glossary-e.shtml>. Acesso: em 5 de junho de 2010.

COMPENDIUM of methods of analysis identified as suitable to support Codex MRLs. In: *Codex Alimentarius*. 32<sup>nd</sup> Session of the *Codex Alimentarius* Commission. 2009. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>. Acesso em: 03 de junho de 2010.

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

CULLOR, J.S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work? *Veterinary Medicine*, v.87, n.12, p. 1235-1241, 1992.

CULLOR, J.S. Antibiotic residue tests for mammary gland secretions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.9, n.3, p. 609-620, 1993.

DEWDNEY, J.M.; MAES, L.; RAYNAUD, J.P. *et al.* Risk assessment of antibiotic residues of  $\beta$ -lactams and macrolides in food products with regard to their immune-allergic potential. *Food Chemical Toxicology*, v.29, n.7, p. 477-483, 1991.

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. United Kingdom: LGC. 1998. 61 p.

FOOD Outlook : Global Market Analysis. *Food and Agriculture Organization*, novembro de 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm#32>. Acesso em: 22 de maio de 2010.

GIGUÈRE, S. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Ames: Wiley-Blackwell, 2006, 626 p.

HADJIGEORGIOU, M.; PAPACHRYSTOMOU, Ch.; THEODOROU, Z. *et al.* Determination of dapsone in meat and milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.637, n.1, p. 220-224, 2009.

HOTTA, J.M. *Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção*. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. *IDF Standard 100B*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1991. 3 f.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk and milk products – Guidance on sampling. *IDF Standard 50 C*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1995a. 25 f.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk – Enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1995b. 8 f.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Guidance for the standardized evaluation of microbial inhibitor tests. *IDF Standard 183*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1999.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. *IDF Standard 141C*. Bruxelas: International Dairy Federation, 2000. 15 f.

JENSEN, R.G. Contaminants in bovine milk. In: \_\_\_\_\_. *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995. Cap. 11, p. 887-901.

LE BRETON, M.H.; SAVOY-PERROUD, M.C.; DISERENS, J.M. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Analytica Chimica Acta*, v.586, n.1, p. 280-283, 2007.

LEME, F.B.P. *Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de diferentes tipos de leite comercializados no município de São Paulo*. 2005. 103f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

LOPES, L.T.; GANDARA, A.L.N.; CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibiótico em leite comercializado na cidade de Campinas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.52, n. 301, p. 64-67, 1998.

LOPES, M.O.; CARRARO, C. N. M.; VEIGA, D.R. *et al.* Levantamento do uso e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba-PR. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.57, n.32, p. 233-235, 2002.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A. *et al.* Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection*, v.61, n.6, p. 742-756, 1998.

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

NAVRÁTILOVÁ, P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. *Czech Journal of Food Science*, v.26, n.6, p. 393-401, 2008.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p. 391-393, 2007.

PEREIRA, P.C.; SOARES, C.F.; SILVA, O.M. Barreiras tarifárias e não- tarifárias às exportações de produtos lácteos do Brasil. In: BELLINI, J.L. *Comércio Internacional de Lácteos*. 2. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. Cap. 9, p. 132-152.

PLUMB, D.C. *Veterinary Drug Handbook*. 3. ed. Iowa: Iowa State Press, 1999, 750 p.

PORTO, C.R.; ANSELMO, M.S.; TIMM, C.D. *et al.* Ocorrência de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos no leite cru entregue à indústria na região sudeste do Rio Grande do Sul. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.57, n.327, p. 313-316, 2002.

POSITION paper on the establishment of MRL's for milk considering the daily intake by children. *Committee for veterinary medicinal products*. 2002. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/press/pp/039102en.pdf>. Acesso em: 12 de junho de 2010.

PRODUTOS do agronegócio: exportações, importações mundiais e inserção brasileira. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. Brasília,

2008. 136 p. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos\\_portal/produtos\\_do\\_agronegocio\\_web.pdf](http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/produtos_do_agronegocio_web.pdf). Acesso em: 23 de março de 2010.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. Baltimore: Editorial Premier, 1997, 372 p.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002, 265 p.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri: Editora Manole, 2007, 314 p.

SIEGEL, S; CASTELLAN Jr., N. J. *Nonparametric statistics*. 2. ed. New York: Mc Graw Hill, 1988, 399 p.

STEAD, S.L.; ASHWIN, H.; RICHMOND, S.F. *et al.* Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal*, v.18, n.1, p. 3-11, 2008.

STANDARD methods for the examination of dairy products. 19.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. 546 p.

TAVARES, W. *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007, 585 p.

TENÓRIO, C.G.M.S.C. *Avaliação da eficiência do Teste COPAN (Microplate e*

*Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. 2007. 59 f.*  
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.


UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho, de 26 de junho de 1990. Prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial nº L 224*, 18 de agosto de 1990, p.1-8.


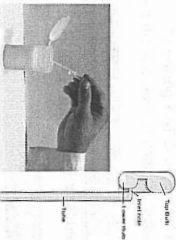



UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão, de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que diz respeito aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial nº L 15/1*, 20 de janeiro de 2010, p.1-72.

WORLD Assembly of the Delegates of the OIE, 2007, Paris. *75<sup>th</sup> General Session of the OIE International Committee – Resolution XXVIII: List of antimicrobials of veterinary importance*. Paris: Office International des Epizooties (OIE), 2007. 9p.






<b>Training</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Equipment setup and use is simple and can be self-taught from the manual.</li> <li>For questions contact your local representative or Charm Sciences at +1.978.687.9200 or <a href="mailto:support@chcharm.com">support@chcharm.com</a>.</li> </ul>	
<b>Reagents and Storage</b>	
<b>CowSide II Test Vials</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Store refrigerated. Store vials upright. <b>Do not freeze.</b></li> </ul>	
<b>Negative Control</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Use a known negative raw or ultra-pasteurized cow milk sample for negative control.</li> <li>While in use, hold on ice or refrigerated for up to 3 days.</li> <li>Zero Control Standard may be purchased separately for use as a negative control.</li> </ul>	
<b>4 and 5 ppb Penicillin G Standards</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>4 ppb and 5 ppb Penicillin G Standard may be purchased separately for use as a positive control appropriate to EU, CODEX or US regulatory levels.</li> <li>Store dry standard refrigerated. As directed on the label, reconstitute with negative control (known negative) raw or ultra-pasteurized milk (10.0 ml for 4 ppb standard and 8.0 ml for 5 ppb standard). Shake reconstituted standard well. Allow to stand refrigerated or on ice for 15 minutes before use. While in use, standard may be held refrigerated or on ice for up to 48 hours.</li> <li>To store reconstituted positive control standard, place approximately 0.5 ml of standard in a test tube or minivial, stopper and freeze within 6 hours of reconstitution. Frozen aliquots may be stored for up to 2 months at -15°C or below. Thaw frozen standards with lukewarm tap water. Shake well before using and check that milk has not precipitated. Thawed standards are stable for 24 hours refrigerated. Do not refreeze thawed standards.</li> </ul>	
<b>Sample and Test Information</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>For raw or ultra-pasteurized (UHT, ultra-high temperature) cow milk. For individual cow samples, avoid foremilk and pool milk from all 4 quarters. Test milk at 0 to 15°C or cool to 0 to 7°C and test within 5 days of milking. Freeze samples at -15°C or below for longer storage. Thaw with lukewarm water and shake samples well before testing. Noticeable precipitation from frozen/thawed milk indicates poor quality sample for testing.</li> <li>Abnormal milk may yield incorrect results due to natural inhibitory substances. Milk with high somatic cells, colostrum and/or bacterial levels may interfere with test performance.</li> </ul>	
<b>Procedure – CowSide II</b>	
<b>Preparation</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Plug in dry well incubator (Charm® CowSide Incubator, Charm Inctronic 1, Digital Incubator Block, or Delvotest® P/SP ampoule block heater) with temperature set at 64±2°C.</li> <li>Allow temperature to stabilize. Use of Delvotest® Block may require slightly longer incubation time than listed on reagent label.</li> </ol>	
	Step 1 <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Cut or tear off individual test vials</b> (one vial per test sample).</li> </ul>

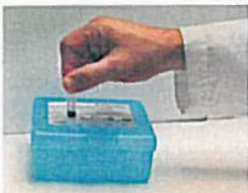
	Step 2 <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Place vial in holes in box. Pierce foil seal</b> with pipet tip or pointed end of unused vial.</li> </ul>
	Step 3 <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Shake milk sample and withdraw 100 µl of milk</b> (at 0 to 15°C) using unused poly-pipet. Hold poly-pipet vertically as shown and squeeze top bulb. Insert tube in sample (approximately 1 cm below foam/bubbles to avoid air bubbles) and release bulb slowly. Stop releasing bulb when sample starts to overflow into lower bulb. Remove tube from milk sample.</li> <li>First time users: The 100 µl poly-pipet is a single-use disposable pipet to deliver 100 µl. Do not reuse poly-pipets.</li> </ul>
	Step 4 <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Dispense 100 µl milk sample to purple agar at bottom of vial</b> by slowly squeezing top bulb of poly-pipet (excess sample should remain in lower bulb). Transfer vial to incubator (Charm CowSide Incubator, Charm Inctronic 1, Digital Incubator Block, or Delvotest P/SP ampoule block heater).</li> <li>First time users: A negative control should also be tested to check CowSide II Test operation. Test 100 µl of milk known to be antibiotic free in another vial.</li> </ul>
	Step 5 <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Set timer for time specified on kit label for raw or ultra-pasteurized milk and incubate.</b> (Note: Incubation time printed on kit label is approximately 3 hours.)</li> <li>After incubation, negative control should be a negative color as shown in <b>Interpretation</b> section. If not, incubate up to an additional 15 minutes. After incubation, remove vials and interpret results. See <b>Interpretation</b>.</li> </ul>
<b>Interpretation</b> <p>Interpret results within 30 minutes of removing tests from incubator. Observe color on the bottom of tubes (the lower 2/3 of agar). Read results under cool white fluorescent light. Compare agar color to Interpretation card provided with test kit. The color results are stable for 16 hours if left in incubator after automatic shut off.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>NEGATIVE</b> - Yellow or yellow/green colors are negative. Report as "Not Found".</li> <li><b>CAUTION</b> - Blue/green colors are initial <b>positive</b>. Sample should be retested. See <b>Retest of Initial Positive</b>.</li> <li><b>POSITIVE</b> - Blue/purple colors are initial <b>positive</b>. Sample should be retested. See <b>Retest of Initial Positive</b>.</li> </ul>


ANEXO 2 – Cartão de referência para leitura visual de resultados do kit Charm®  
Cow Side II Test


Refer to Current Operator's Manual for Complete Test Procedure

**CowSide® II**  
test

①   
Cut or tear off individual test vial for each sample.




②   
Pierce foil seal using pipet tip or pointed end of another test vial.

③   
Shake milk sample and use Poly-Pipet to withdraw 100 µl for testing.

④   
Add sample to agar at bottom of test vial.

⑤ Incubate at 64 ± 2 °C for time noted on box label.

⑥ Remove vial from incubator and read results using the reference card.

NEGATIVE	CAUTION	POSITIVE
		

**CHARM**  
SCIENCES INC

[www.charm.com](http://www.charm.com)

Charm Sciences, Inc.  
659 Andover Street, Lawrence, MA  
01843-1032, USA  
Tel: +1.978.687.9200 | Fax: +1.978.687.9216

© Copyright 2009 Charm Sciences, Inc. CowSide Test is a registered trademark of Charm Sciences, Inc.  
MRK-134-001 0709

# ANEXO 3 – Manual de instruções do kit Charm® Blue Yellow II Test

## BlueYellowII

**Operator's Manual:**  
**Charm® Blue Yellow II Test for Beta-lactams and Other Antimicrobial Drugs in Milk**

### Kit Information

**Introduction**  
The Charm® Blue Yellow II Test detects antibiotics in raw commingled and ultra-pasteurized cow milk. Bacteria, cultured in a vial with milk, generate acid and turn a pH indicator from purple to yellow. Milk samples that prevent a color change are considered positive for antibiotics.

**Kit Contents and Materials Needed**

Supplier with Kits	Disposables	Equipment
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 Plates (192 Wells)</li> <li>• Color Chart</li> <li>• Clear Sealing Tape</li> <li>• 4 ppb Penicillin G Standard</li> <li>• Operator's Manual</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 µl Pipet Tips</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Air Incubator</li> <li>• 50 µl Pipette</li> <li>• Scissors</li> <li>• Timer</li> </ul>

For details and ordering information, see **Order Codes and Kit Contents**.

**Sensitivity and Selectivity**  
**Selectivity** - Antimicrobial drug-free samples yield 90% negative results with 95% confidence.  
**Table 1. Sensitivity** - Detected antimicrobial drugs in µg/kg or ppb (parts per billion) compared to EU MRL (Maximum Residue Limit). Antimicrobial drugs listed are representative of their respective drug families. Other drugs will be detected at different levels.

Antimicrobial Drug	Concentration for Positive* (µg/kg or ppb)	Antimicrobial Drug	Concentration for Positive* (µg/kg or ppb)	EU MRL (µg/kg or ppb)
Amoxicillin	2 to 3	Penicillin G	2 to 3	4
Ampicillin	2 to 3	Oxytetracycline	75 to 100	100
Cefadixil	10 to 15	Tetracycline	75 to 100	100
Cefalexin	60 to 100	Genamycin	75 to 100	100
Cefazolin	10 to 15	Neomycin	75 to 150	500
Cefepime	6 to 10	Dapsone	1 to 2	0
Cefquinome	20 to 30	Sulfadiazine	80 to 100	100
Ceftiofur & Metabolites <sup>†</sup>	40 to 60	Sulfadimethoxine	50 to 75	100
Cefuroxime	50 to 100	Sulfamethazine (Sulfadimidine)	75 to 125	100
Cephapirin	20 to 25	Trimethoprim	200 to 300	50
Cloxacillin	4 to 6	Erythromycin	100 to 150	40
Dicloxacillin	10 to 20	Prilamycin	50 to 100	100
Oxacillin	10 to 20	Spiramycin	400 to 500	200
	8 to 10	Tylosin	20 to 30	30

<sup>†</sup> Positive 90% of the time with 95% confidence.  
<sup>‡</sup> Concentrations listed are total parent and metabolites. The concentration for positive for parent ceftiofur only is 10 – 20 µg/kg.

**Storage**  
Store the Plates (wells) and Positive Control Standard refrigerated (defined as 0 to 7°C or 0 to 44°F for US CERTIFIED IBS). See **Reagents and Storage** for details.

**CHARM**  
SCIENCES INC

**Charm Sciences, Inc.**  
659 Andover Street, Lowell, Massachusetts, 01843-1032, USA  
Tel: +1 978 687 9200 | Fax: +1 978 687 9216 | Email: info@charm.com | www.charm.com  
© Copyright 2010 Charm Sciences Inc. Charm is a registered trademark of Charm Sciences Inc.

**Step 7**

After incubation, remove wells from incubator and observe color in comparison to reference colors. Negative control should be negative, otherwise incubate up to an additional 15 minutes. See **Interpretation**.

Allow wells to cool to room temperature (approximately 5 minutes). Read results under cool white fluorescent light up to 15 minutes after removal from incubator. Observe color of clear agar layer (bottom 1/2 to 1/3 of well). Refer to color chart.

- Yellow or yellow/green colors are negative.
- Blue/purple colors are positive. See **Test of Initial Positives – Procedure**.
- "Caution" colored samples should be interpreted as positives. See **Test of Initial Positives – Procedure**.

**Interpretation**

BLUE YELLOW II TEST RESULT	Reference Color
NEGATIVE	
CAUTION	
POSITIVE	

**Test of Initial Positive – Procedure**

- In a test tube, heat 500 ± 100 µl initial positive milk sample to 82 to 100°C for 3 minutes.
- Cool to 0 to 15°C and shake well.
- Run heated sample in duplicate along with a negative control, 4 ppb penicillin G standard, and unheated sample as milk sample in **Procedure**.
- The negative control must be negative and the 4 ppb penicillin G standard must be positive.
- If sample is positive after heat treatment, sample is a "Blue Yellow II Test positive." If sample is negative after heat treatment, sample may contain a non-antibiotic (heat sensitive) inhibitor.

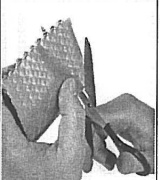
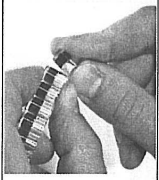
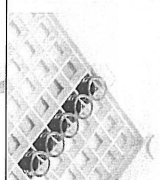
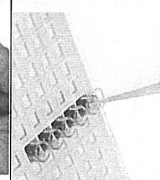
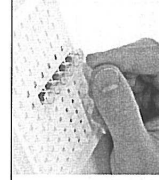

**Order Codes and Kit Contents**

KITS	NOT SUPPLIED WITH KIT
<b>MI-BY-II-192K:</b>	<b>TIMER-WB (Timer)</b>
• (2) Plates (192 Wells)	<b>PIP-50UL (50 µl Pipette)</b>
• (24) Multwell Clear Sealing Tape Strips	<b>100-ULT-X1 or 100-ULT-X5 (50 µl Pipet Tips)</b>
• (1) 4 ppb Penicillin G Standard*	<b>ZCS-1 or ZCS-10 (Zero Control Standard)</b>
• Color Chart	
• Operator's Manual	
* (MI-BY-II-192NSK does not include Positive Standard)	

**Warranty Information**

Charm Sciences, Inc. (Charm) warrants each reagent product, including but not limited to test kits, to be free from defects in materials and workmanship and to be free from normal, proper and intended usage, until the expiration of such reagent product's stated shelf life, or, if none is stated, for one year from the date of delivery of such reagent product. This warranty is void if the reagent product is used in a manner not intended by Charm. Charm does not warrant the performance of the reagent product or the results of the test kit. THE WARRANTY PROVIDED HEREIN MAY NOT BE ALTERED OR SUPPLEMENTED BY ANY OTHER STATEMENT, REPRESENTATION, OR WRITING. CHARM SHALL NOT BE LIABLE FOR INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO LOSS OF PROFITS, LOSS OF BUSINESS OR REVENUE, LOSS OF DATA, OR LOSS OF GOODWILL, ARISING OUT OF OR CAUSED BY ANY DEFECTIVE OR EMBROIDERED TEST RESULT OBTAINED WHILE USING ANY SUCH REAGENT PRODUCT, WHETHER OR NOT CAUSED BY A DEFECT IN SUCH REAGENT PRODUCT.

<p><b>Interferences and Cross Reactivity</b></p> <p>The Blue Yellow II Test is a broad-spectrum antibiotic screening test. No interferences are known from somatic cells (1,000,000 SCC/ml) or bacteria (300,000 cfu/ml). The following drugs, at 100 ppb, showed no interferences: Ivomectin, novobiocin, furazemide, trichloromethazide, chlorothiazide, oxytocin, phenylbutazone, dexamethasone, and dipyrone.</p> <p><b>Training</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Equipment setup and use is simple and can be self-taught from the manual.</li> <li>For questions contact your local representative or Charm Sciences at +1.978.687.9200 or <a href="mailto:support@charm.com">support@charm.com</a>.</li> </ul>
<p><b>Reagents and Storage</b></p> <p><b>Charm Blue Yellow II Test</b></p> <p>Store refrigerated. Do not freeze. Blue Yellow II Tests (plates / wells) containing purple agar are supplied in a humidified, sealed, moisture resistant bag. After opening the bag and removing the number of wells needed, immediately reseal the zip-lock bag and refrigerate.</p> <p><b>Negative Control</b></p> <p>Use a known negative milk sample for negative control. Zero Control Standard, a known negative milk powder, is available from Charm Sciences.</p> <p><b>Positive Control Standard</b></p> <p>4 ppb Penicillin G Standard is supplied with the kit. Reconstitute 4 ppb Penicillin G Standard with 10.0 ml of Negative Control. Shake well. Allow to stand refrigerated or on ice for 15 minutes. Shake before use. Storage conditions for Positive Control Standard are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Dry: Refrigerated (see label for expiration date).</li> <li>Reconstituted: Refrigerated (for up to 48 hours).</li> <li>Frozen: -15°C or below (for up to 2 months).</li> </ul> <p><b>Long-Term Sample and Control Storage</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mix sample and freeze (at least 0.5 ml) aliquots in clean vials.</li> <li>Controls should be frozen within 6 hours of preparation.</li> <li>Freeze aliquots at -15°C or below for up to 2 months.</li> <li>Thaw slowly (overnight in refrigerator or with cool water) and shake well. Thawed sample is stable for 24 hours refrigerated. Noticeable protein precipitation indicates an unsuitable sample. Discard thawed sample. Do not refreeze.</li> </ul> <p><b>Performance Check</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Positive controls are provided to periodically check equipment and reagent performance. Use controls in place of 50 µl milk sample.</li> <li>If negative control fails to produce negative result or positive control standard fails to produce a positive result, timing may need to be adjusted for incubator used. Discontinue use of test and contact your local representative or Charm Sciences at +1.978.687.9200 or <a href="mailto:support@charm.com">support@charm.com</a>.</li> </ul> <p><b>Air Incubator</b></p> <p>Use a humidified air incubator at 64±1°C. Include an open container of 64°C water in the chamber for humidification.</p>

<p><b>Sample and Test Information</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>For commingled raw and ultra-pasteurized cow milk. For individual cow samples, avoid foremilk and pool milk from all 4 quarters. Test milk at 0 to 15°C or cool to 0 to 7°C and test within 5 days of milking. Freeze samples at -15°C or below for longer storage. Thaw, centrifuge and use skim portion for testing. Noticeable precipitation from frozen/thawed milk indicates poor quality sample for testing. Abnormal milk may yield incorrect results due to natural inhibitory substances. Milk with high somatic cells, colostrum and/or bacterial levels may interfere with test performance.</li> </ul> <p><b>Procedure</b></p> <p>Adjust air incubator to 64°C and allow to stabilize (64±1°C).</p>	
	<p><b>Step 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Remove wells from well holder, cut foil seal with scissors, and peel foil off Blue Yellow II Test wells to be used (one well per test).</li> </ul>
	<p><b>Step 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Break apart into individual wells or use strips of 8 wells.</li> </ul>
	<p><b>Step 3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Return separated wells to holder.</li> </ul>
	<p><b>Step 4</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Shake milk sample well. Pipette 50 µl milk sample to purple agar portion of well. For multiple samples, add milk to each well.</li> <li>First time users: Run a negative control to check Blue Yellow II Test operation. Pipet 50 µl of negative control in place of milk sample.</li> </ul>
	<p><b>Step 5</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Place Blue Yellow II Test well(s) on a hard surface. Apply clear sealing tape (cut into pieces to apply to each well) and press firmly to seal rim of each well. If wells are not sealed properly they will dry out and tests will be invalid.</li> </ul>
	<p><b>Step 6</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Place prepared sample wells into air incubator at 64±1°C. Set timer to incubation time specified on kit for specific label. See <b>Performance Check</b>.</li> </ul>

**ANEXO 4 – Cartão de referência para leitura visual de resultados do kit Charm®  
Blue Yellow II Test**

