

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia e Análises Toxicológicas

Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de  
resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos  
terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros

ROBERTO BELLIZIA RAIA JÚNIOR

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Profa. Dra. Elizabeth O. da Costa F. Guimarães

São Paulo  
2006

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia e Análises Toxicológicas

Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de  
resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos  
terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros

**ROBERTO BELLIZIA RAIA JÚNIOR**

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Profa. Dra. Elizabeth O. da Costa F. Guimarães

São Paulo  
2006

Roberto Bellizia Raia Júnior

Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de  
resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos  
terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Profa. Dra. Elizabeth O. da Costa F. Guimarães  
orientador/presidente

---

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior

---

Prof. Dr Nilson Roberti Benites

---

Profa. Dra Helenice de Souza Spinosa

---

Profa. Dra Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo, 04 de abril de 2006

## AGRADEÇO

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães, por me guiar pelo caminho do conhecimento e da sabedoria, por ser amiga e conselheira nos momentos de angústia e por compartilhar a sua alegria pela vida.

À Rosângela Viegas, pelo seu carinho e suas receitas maravilhosas e ao Felipe Freitas Guimarães pelas diversas vezes que cedeu o seu espaço.

A médica veterinária Rosana Maria de Oliveira que sempre me apoiou.

Aos pesquisadores do NAPGAMA, em especial:

Cristiana Mármore, que muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

Felício Garino Jr., que sempre encontrou tempo para ajudar aos colegas.

Aos Professores, funcionários e colegas da Faculdade de Ciências Farmacêutica.

Em especial à Prof.<sup>a</sup> Elizabeth de Souza Nascimento.

Aos colegas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP,

Principalmente ao amigo Luís Ivan Martinhão

Aos pesquisadores e funcionários do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, em especial à Juliana Arcaro e a toda sua equipe pela colaboração no desenvolvimento dos trabalhos a campo.

Aos pesquisadores e funcionários do Pólo Regional do Vale do Paraíba, em especial ao Afonso Aurélio de C. Peres e ao Carlos Augusto B. Carvalho.

DEDICO,

Aos meus filhos

Isabel Brigatto Raia e  
Henrique Brigatto Raia,

Que são meu maior estímulo para tudo o que eu faço.

À minha Mãe,

Maria Antonietta,

e

Ao meu Pai,

Roberto,

Meus grandes amigos.

*O lugar para ser feliz é aqui.*

*O tempo é agora.*

*O meio de ser feliz consiste em  
contribuir para que os outros também o sejam.*

Thomas Carlyle

Este trabalho é parte integrante dos projetos desenvolvidos pelo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAPGAMA)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
LEITE	08
MASTITE	09
TRATAMENTO DE MASTITE	12
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE	13
AMINOGLICOSÍDEOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA	16
BETALACTÂMICOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA	18
ASSOCIAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS E BETALACTÂMICOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA	20
TESTES PARA A DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE	22
3. OBJETIVO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
MATERIAL	27
Animais	27
Protocolos experimentais	27
Medicamentos antimicrobianos utilizados nos diferentes protocolos	30
MÉTODOS	34
Diagnóstico do processo inflamatório	34
Tratamento de vacas em lactação	34
Tratamento de vaca seca	35
Colheita das amostras	35
Teste para a detecção de resíduo de antimicrobianos	36
Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS	54



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Composição de medicamentos para tratamento de mastite por via intramamária disponíveis no mercado brasileiro, dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos (baseado no Manual de Produtos Veterinários - SINDAN, 2003-2004). 07
- Figura 2: Composição de medicamentos para tratamento de mastite por via sistêmica disponíveis no mercado brasileiro, dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos.(baseado no Manual de Produtos Veterinários - SINDAN, 2003-2004). 07

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos principais medicamentos utilizados no tratamento de vacas em lactação.	06
Tabela 2	Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para antibióticos aminoglicosídeos em leite (ppb).	17
Tabela 3	Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para antibióticos betalactâmicos em leite (ppb).	20
Tabela 4	Formulação, via de aplicação e período de carência, indicados pelos fabricantes dos medicamentos utilizados no tratamento de vacas em lactação.	31
Tabela 5	Influência da produção leiteira na persistência de resíduos de antimicrobianos ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas tratadas por diferentes vias e diversos antimicrobianos.	37
Tabela 6	Influência do processo inflamatório, mastite, na persistência de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por diferentes vias, com a utilização de medicamentos aminoglicosídeos e betalactâmicos, além do período recomendado para descarte.	38
Tabela 7	Resíduo de antimicrobiano ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas em lactação com mastite, tratadas por via intramamária, sistêmica e combinação de vias.	38
Tabela 8	Resíduo no pós-parto, no leite dos quartos dos animais submetidos ao tratamento de vaca seca, ao término do período de carência previsto pelo fabricante.	39
Tabela 9	Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas com mastite em lactação, tratadas por diversas vias de administração com aminoglicosídeos ou betalactâmicos ou formulações comerciais com associação de ambos.	40
Tabela 10	Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas com mastite em lactação, tratadas com aminoglicosídeo por diversas vias de administração.	40
Tabela 11	Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite, de vacas em lactação com mastite, tratadas com betalactâmicos por diferentes vias de administração.	41
Tabela 12	Avaliação de resíduo no leite, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, de vacas com mastite tratadas na lactação com medicamentos comerciais formulados a base da associação de betalactâmico e aminoglicosídeo, por diferentes vias de administração.	41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 13 Comparação entre tratamento de vaca seca e em lactação, em relação ao nível de resíduo de antimicrobianos, ao término do período de carência no leite, de quartos de vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária. 43
- Tabela 14. Avaliação da ocorrência de resíduo de antimicrobianos, ao término do período de carência no leite, de vacas com mastite clínica tratadas na lactação em relação aos diferentes grupos de antimicrobianos. 44

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Animais avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com o volume de produção	27
Quadro 2	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com a intensidade e presença do processo inflamatório.	28
Quadro 3	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com o grupo de antimicrobianos utilizados no tratamento por via sistêmica e intramamária.	28
Quadro 4	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com os períodos de secagem e lactação.	28
Quadro 5	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de diferentes antimicrobianos de acordo com a via de administração.	29
Quadro 6	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite, após o período de carência de aminoglicosídeos, betalactâmicos e associações, durante a lactação, de acordo com a via de administração.	29
Quadro 7	Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite, após o período de carência de aminoglicosídeos, betalactâmicos e associações, durante o período seco.	30
Quadro 8	Antimicrobianos de aplicação intramamária e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite	30
Quadro 9	Antimicrobianos de aplicação sistêmica e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite.	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/ml}$ : microgramas por mililitro = miligramas por litro= ppm

CMT: *California Mastitis Test*

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FARAD: *Food Animal Residue Avoidance Databank*

FDA: *Food and Drug Administration*

L: litros

$\text{mg/ml}$ : miligramas por mililitro

PNCRB: Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal.

ppb: partes por bilhão

ppm: partes por milhão

UI: unidades internacionais

WHO: *World Health Organization*

## RESUMO

RAIA, R.B. Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros. São Paulo, 2006, 69p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Atualmente a terapia e as práticas de manejo da mastite estão baseadas na administração de agentes antimicrobianos com ampla atividade contra os microrganismos mais comuns desta doença. Os fármacos são administrados diretamente no canal da teta e/ou por sistêmica. Os tratamentos com antimicrobianos são realizados durante o período seco como terapia preventiva, ou durante o período de lactação como terapia curativa. O leite produzido por animais tratados pode conter resíduos do medicamento. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite constitui um risco para a saúde pública devido ao fenômeno de múltipla resistência, bem como uma causa de perdas econômicas, considerando a fabricação de queijo e iogurte, entre outros derivados lácteos. A proposta deste estudo foi avaliar alguns fatores que contribuem para a ocorrência de resíduos em vacas tratadas além do período recomendado para descarte. Os fatores avaliados foram: fisiológico, como a produção leiteira; clínico, como a mastite e farmacológico como a via de administração e o fármaco utilizado. Foi usado um teste comercial para a detecção de resíduos (Delvotest®) por inibição microbiológica. Entre os fatores estudados, foi demonstrada a influência da produção leiteira, ou seja, animais com produção leiteira maior do que 20L/dia apresentaram menor ocorrência de resíduo (39,5%), quando comparado com aqueles com produção menor do que 20L/dia (70,7%) e a diferença foi significativa ( $P < 0,0001$ ). Entre os fatores clínicos foi determinado que a presença e intensidade do processo inflamatório contribuem para a ocorrência de resíduos. Deste modo, entre os quartos com mastite clínica tratados o nível de resíduo foi 47,7%, os quartos com mastite subclínica tratados apresentaram 34,9% e os controles 9,5% (quartos sem mastite tratados) e a diferença entre os três grupos foi significativa ( $P = 0,0381$ ,  $P = 0,0008$ ,  $P = 0,0209$ ). Ao se comparar a ocorrência de resíduos no leite de quartos tratados durante a lactação (41,9%) com os resíduos nos quartos que receberam a terapia de vaca seca (23,2%) foi observado um maior nível entre os grupos tratados durante a lactação e a diferença foi significativa ( $P < 0,0001$ ). Em relação aos fatores farmacológicos, a via de aplicação bem como o grupo farmacológico do antimicrobiano utilizado no tratamento foram demonstradas diferenças estatísticas tanto para os diversos antimicrobianos, quanto para as vias de administração. Um maior nível de resíduo foi observado entre os grupos farmacológicos em quartos tratados por via intramamária com aminoglicosídeos (gentamicina) (66,7%). E o maior nível de resíduo foi observado quando ambas as vias foram utilizadas simultaneamente, tanto para aminoglicosídeos (93,7%), quanto para betalactâmicos (100%). O conhecimento de que o pKa dos antimicrobianos irá determinar diferentes níveis de distribuição nos órgãos e tecidos sustenta a hipótese que a via de administração pode influenciar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Conseqüentemente, o uso simultâneo das duas vias de administração, uma prática comum, contribuiu também para um alto risco da ocorrência de resíduos de antimicrobianos. Deve-se ressaltar que a redução da presença de resíduos no leite não depende apenas de normas e regulamentos, mas envolve uma orientação aos produtores e aos veterinários para controlar e/ou prevenir os fatores de risco. Assim, os resultados deste estudo irão contribuir para esclarecer alguns aspectos importantes para um

melhor entendimento da ocorrência de resíduo no leite além do período recomendado para descarte.

## ABSTRACT

RAIA, R.B. "Evaluation of some physiological, clinical and pharmacological factors to antimicrobials residues in milk under different management and therapeutic protocols"[ Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros] São Paulo, 2006, 69p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Current mastitis therapy and management practices are based on the administration of antimicrobial agents with high activity against most common mastitis bacterial pathogens. Drugs are administered directly into the teat canal and/or systemically. Antibiotic treatments are performed during the dry period as preventive therapy, or during the lactating periods as therapeutic cure. Milk produced from treated animals may contain drug residues. The presence of antibiotic residues in milk constitutes a public health risk due to the multi-resistance phenomenon, as well as, a source of economical losses, considering the industries of cheese and yogurts, among others dairy products. The purpose of this study was to evaluate some factors that contribute to the occurrence of residues in treated cows beyond the recommended discard period. The evaluated factors were: physiological, as milk production, clinical, as mastitis and pharmacological, as routes and antimicrobials. It was used a commercial test for residues detection (Delvotest®) by microbiological inhibition. Among the clinical factors it was demonstrated the influence of the milk production, so animals with milk production higher than 20 L/day showed lower occurrence of residues (39.5%), compared to the ones with less than 20 L/day (70.7%) the difference was significant ( $P < 0.0001$ ). Among the clinical factors it was determined that the presence of inflammatory process and the intensity of it, contributes to the presence of residues. Therefore, among the clinical mastitis treated quarters the level of residues was 47.7%, while the subclinical treated quarters showed 34.9% and, the control ones 9.5% (i.e. treated quarters without mastitis) and the difference among the three groups was significant ( $P = 0.0381$ ,  $P = 0.0008$ ,  $P = 0.0209$ ). Comparing the residues in milk from treated quarters during lactation (41.9%) with the quarters that received the dry cow therapy (23.2%) it was observed a higher level of residues among the groups treated during the lactation and the difference was significant ( $P < 0.0001$ ). Among the pharmacological factors, the routes as well as the pharmacological group of the antimicrobials used in the treatment showed statistical differences either among the antimicrobials as well as the administration routes. A high level of residues was observed among pharmacological groups in quarters treated by intramammary route with aminoglycosides (gentamicin) (66.7%). And, the highest level of residues was observed when both routes were used simultaneously, either with aminoglycosides (93.7%) as well as with betalactams (100%). The knowledge that different pKa among the antimicrobials will determine the level of distribution in different organs and tissues, support the hypothesis that the administration route could influence the presence of residues of antibiotics in milk. Consequently, the simultaneous use of both administration routes, a very usual practice, could also contribute to a higher risk of antimicrobial residue occurrence. To reduce this possibility, it is not only a matter of Regulatory Affairs, but also involves the dairy farmers and veterinarians' proper orientation about how to avoid and to control the risk factors, therefore, the results of this study will contribute to clarify some important aspects to a better understanding of the occurrence of residues in milk beyond the recommended discard period.



## **1. INTRODUÇÃO**

É de fundamental importância prevenir a presença de resíduos de antimicrobianos no leite para reduzir problemas técnicos no processamento de produtos lácteos e a possibilidade da transmissão desses resíduos ao consumidor, o que pode acarretar problemas de saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde - OMS (World Health Organization - WHO) em colaboração com outras organizações internacionais, tais como a Organização para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization - FAO) e a Organização Internacional de Epizootias (Internacional Organization of Epizooties- OIE) desenvolveram recomendações globais sobre o uso prudente de antimicrobianos na agropecuária, com o objetivo de minimizar o impacto negativo representado pelo uso desses em animais de produção e ao mesmo tempo fornecer orientação para o uso seguro e efetivo em medicina veterinária (WHO, 1997; RAIA, 2005).

Os resíduos de antimicrobianos no leite podem apresentar sérias conseqüências toxicológicas e técnicas. A presença destes no leite retarda ou mesmo impede os processos microbiológicos utilizados na manufatura de determinados produtos lácteos (BRADY, KATZ, 1988; DEWDNEY et al., 1991; CURRIE et al., 1998; PORTUGAL, 2003).

Ao se considerar aspectos de saúde do consumidor, além de efeitos tóxicos diretos, como, ototoxicidade, discrasias, efeitos potencialmente teratogênicos, problemas de hipersensibilidade e mesmo choque anafilático, destaca-se a possibilidade desses resíduos contribuírem para a seleção de microrganismos de múltipla-resistência (TAVARES, 1996; COSTA, 2002).

Em relação às cepas multi-resistentes, trabalhos recentes desenvolvidos no Brasil têm alertado sobre o uso indiscriminado e indevido de antimicrobianos na terapia de infecções intramamárias bovinas, causadas por coliformes e outros agentes (COSTA et al, 2000a; GARINO Jr et al., 2000).

O fenômeno de múltipla-resistência tem assumido particular importância nas últimas décadas, tendo sido registrado em microrganismos isolados de humanos e de animais de produção, como verificado por vários autores estrangeiros e nacionais

(RIBEIRO, 2001; SCHILEGELOVA et al., 2002; CATRY et al., 2003; GARINO JR , 2004).

O problema do aumento da resistência bacteriana, de acordo com Stöhr; Wegener (2001), não é somente devido ao mau e intensivo uso de antimicrobianos em saúde pública, mas em muitos casos, às resistências crescentes, decorrentes da transmissão de microrganismos resistentes de origem animal para indivíduos da espécie humana por alimentos ou mesmo pelo contato direto com animais, uma vez que muitos dos antimicrobianos licenciados para uso em medicina humana são também registrados para uso veterinário.

A resistência de microrganismos aos antimicrobianos causadores de zoonoses é um sério e emergente problema de Saúde Pública, como por exemplo, *Escherichia coli* entre outros (MC EWEN; FEDORKA-CRAY 2002).

Garino Jr (2004) verificou ao analisar 154 amostras de *E. coli*, que *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de casos de mastite clínica e subclínica apresentaram múltipla-resistência, sendo que 88,2% de EIEC e 87,5% de EPEC foram resistentes a mais de 5 antimicrobianos. Alguns sorogrupos como EIEC O28, O112 e O152 apresentaram múltipla resistência a 9 antimicrobianos, EPEC O114 e O125 a 10 antimicrobianos e O55 a 12 antimicrobianos.

Microrganismos pertencentes a esses mesmos sorogrupos foram isolados por Almeida et al. (1998) de 196 amostras de fezes de crianças com diarreia aguda, em São José do Rio Preto, São Paulo, portanto a múltipla-resistência apresentada por estes sorogrupos no estudo de Garino Jr. (2004) constitui aspecto altamente preocupante, por suas implicações terapêuticas e epidemiológicas.

Um agravante destacado por Garino Jr. (2004) é que os sorogrupos de EPEC, com resistência múltipla elevada, foram isolados de mastites subclínicas, o que representa risco à saúde pública, pois o leite de casos subclínicos de mastite, por não apresentar alterações visíveis, é muitas vezes comercializado para consumo humano, principalmente pela venda informal.

A terapia antibacteriana em bovinos tem sido incriminada como um fator catalizador de resistência em bactérias isoladas de animais tratados, de outros animais na

propriedade e de alimentos derivados destes animais (BERGHASH et al., 1983; GRIGGS et al. 1994; PIDDOCK., 1996), sendo a mastite, processo inflamatório da glândula mamária, a causa mais freqüente para o uso de antibacterianos em bovinos produtores de leite (McEWEN et al., 1991, COSTA et al., 2000a; ERSKINE et al., 2002, MOLINA et al., 2003).

A resistência aos antimicrobianos apresentada pelos principais agentes etiológicos de mastite foi avaliada por vários pesquisadores brasileiros nos últimos vinte anos (FAGLIARI et al., 1983; SCHOKEN-ITURRINO; NADER FILHO, 1984; COSTA et al., 1985, NADER FILHO et al, 1986; BALDASSI et al. 1991; LANGONI et al, 1991; COSTA et al. 1995a; MORENO et al, 1997; COSTA, 1999a; COSTA et al., 2000c; RIBEIRO, et al. 2001). Uma crescente resistência tem sido observada no transcorrer do período no Brasil (COSTA et al, 1985; COSTA et al. 1995a) bem como em outros países. Barberio et al. (2002) relataram resistência em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de mastite bovina da região do Veneto, Itália.

Devido à relevância da presença de resíduos de antimicrobianos no leite sob o ponto de vista de saúde pública, por contribuir para a seleção de amostras resistentes e como fator econômico relacionado na interferência na produção de derivados, têm sido realizadas pesquisas para elucidar alguns aspectos que influenciam na persistência de resíduos no leite.

No Brasil as pesquisas realizadas (COSTA et al, 1999b; RAIA et al., 1999; RAIA, 2001) têm constatado a presença desses resíduos em período superior ao recomendado pela indústria farmacêutica para o descarte do leite após tratamento do quarto da glândula mamária ou do animal. Alguns fatores que podem contribuir para uma maior persistência de resíduos no leite têm sido avaliados por pesquisadores nacionais e estrangeiros (MITCHELL et al., 1998; FAGUNDES, COSTA, 2002).

Entre os fatores de risco estudados, Raia (2001) demonstrou a influência da intensidade da mastite, na persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados.

Coelho (2003) evidenciou o risco representado pela eliminação de níveis detectáveis de antimicrobianos de quartos mamários não tratados de disposição anatômica diagonal, ipso, contra-laterais aos quartos com mastite tratados por via intramamária, ou melhor, após

tratamento de um dos quartos detectou-se resíduo em quartos não tratados de um mesmo animal.

Fagundes (2004) demonstrou a presença de antimicrobianos no período pós-parto no leite de animais submetidos à chamada terapia de vaca seca, mesmo após o período recomendado pelo fabricante para descarte. Foram avaliados ainda, fatores como a influência da duração do período seco e a produção leiteira na ocorrência destes resíduos no pós-parto (FAGUNDES; COSTA, 2002).

A Organização Mundial de Saúde - OMS em reunião realizada em Berlim, 1999, concluiu que são raros os programas existentes de vigilância em relação ao problema. E ainda nos dados disponíveis não têm sido avaliados todos os antimicrobianos significantes sob o ponto de vista de saúde pública e também não há uma padronização de metodologia, o que em muitos casos dificulta a análise e interpretação desses dados.

Raia et al. (2003) evidenciaram a influência de inibidores naturais (como por exemplo, lactoferrina e peroxidases) oriundos do processo inflamatório nos testes microbiológicos de detecção de resíduos. Deste modo, para impedir a ocorrência de falso-positivos por inibidores naturais, padronizaram o tratamento térmico prévio das amostras de leite como preconizado anteriormente por alguns autores estrangeiros (AERTS et al., 1995).

O Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), implantado em 2005, recomenda maior rigor na avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Para tanto, são necessários estudos sobre o assunto para fornecer subsídios aos produtores, médicos veterinários e técnicos, no sentido de melhor orientar o uso destes e prevenir resíduos, sendo este o objetivo do presente trabalho.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

A mastite é um dos problemas mais importantes nas propriedades leiteiras e a maior fonte de resíduos encontrados no leite (McEWEN et al., 1991, MOLINA et al., 2003a).

Esta enfermidade é responsável por relevante perda econômica no agro-negócio, devido à prevalência e aos gastos elevados, como foi constatado por Costa et al. (1999c), em trabalho realizado nos estados de São Paulo e Minas Gerais, em que o prejuízo estimado em 22 propriedades leiteiras avaliadas, representou em média por fazenda, perdas anuais da ordem de US\$ 20.611,32 por rebanho e US\$ 317,38 por vaca.

O tratamento da mastite é um dos fatores de impacto econômico na produção leiteira, representado pelo custo com os medicamentos, mão de obra e descarte do leite. Na prática é realizado por via sistêmica ou por via intramamária ou, ainda, pelas duas vias concomitantemente. A via intramamária é a mais utilizada por apresentar menores efeitos colaterais, maior facilidade de aplicação e menor custo.

Os medicamentos disponíveis para o tratamento de mastite, de animais em lactação, apresentam formulações com diferentes princípios ativos. Os antibióticos betalactâmicos estão entre os mais usados internacionalmente em medicina humana e veterinária (BRIÑAS et al., 2002).

Na atualidade tem sido observado um predomínio de aminoglicosídeos e betalactâmicos na formulação dos medicamentos para mastite disponíveis no mercado brasileiro (Tabela 1, Figuras 1 e 2) (SINDAN, 2003-2004).

Tabela 1: Distribuição dos principais medicamentos antimicrobianos utilizados no tratamento de vacas em lactação, baseado nos dados do Manual de Produtos Veterinário. Sindan (2003-2004).

Princípio ativo	Via intramamária		Via sistêmica		Total	
	N	%	N	%	N	%
Aminoglicosídeos	8	28,6	7	7,5	15	12,4
Betalactâmicos	10	35,7	8	8,6	18	14,9
Associação betalactamico com aminoglicosídeo	3	10,7	29	31,9	32	26,4
Outras associações com aminoglicosídeos	3	10,7			3	2,5
Outras associações com betalactâmicos	1	3,6			1	0,8
Associação quimioterápico	2	7,1	8	8,6	10	8,3
Quinolonas			15	16,1	15	12,4
Tetraciclinas			24	25,8	24	19,8
Outros	1	3,6	2	2,5	3	2,5
Total	28	23,1	93	76,8	121	100

Baseada nos dados do manual de Produtos Veterinários SINDAN (2003,2004)

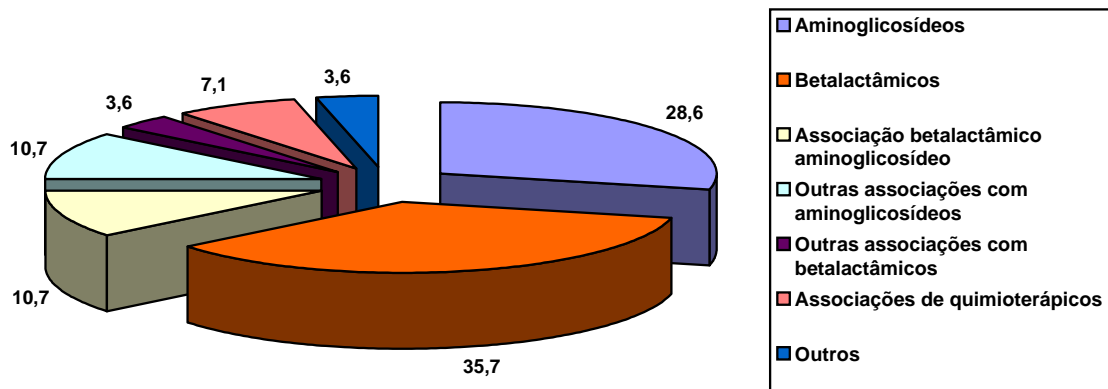


Figura 1. Composição de medicamentos antimicrobianos para tratamento de mastite por via intramamária disponíveis no mercado brasileiro; dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos (baseado nos dados do Manual de Produtos Veterinário. Sindan - 2003-2004).

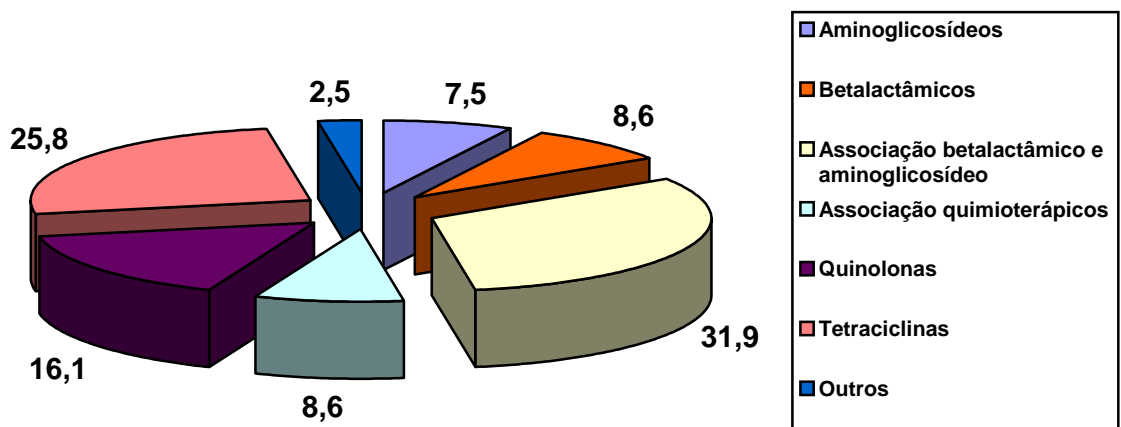


Figura 2. Composição de medicamentos antimicrobianos para tratamento de mastite por via sistêmica, disponíveis no mercado brasileiro; dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos (baseado nos dados do Manual de Produtos Veterinário. Sindan - 2003-2004).

Pelos dados apresentados na Tabela 1 e ilustrados pelas Figuras 1 e 2, observa-se uma maior frequência de aminoglicosídeos (12,4%), betalactâmicos (14,9%), associação de aminoglicosídeos e betalactâmicos (26,4%) e tetraciclinas (19,8%) para o tratamento de mastite bovina no Brasil. A situação brasileira se diferencia do observado no estrangeiro onde predominam betalactâmicos para o tratamento de mastite, sendo que em alguns países o tratamento desta afecção é restrito ao uso destes antimicrobianos (SHITANDI; GATHONI, 2004). Esta peculiaridade na utilização de diferentes grupos farmacológicos no tratamento da mastite no Brasil motivou o planejamento da presente pesquisa no sentido de conhecer melhor os fatores que interferem na presença de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas.

## **LEITE**

O consumidor percebe o leite como um alimento especial, pois ele é um componente importante na dieta de recém nascidos, crianças em fase de crescimento, adultos jovens e idosos. Assim, o conceito nutricional do leite está próximo do alimento completo, além da impressão de pureza associada à cor branca (KATZ; BRADY, 1993, COSTA, 1998; 1999a).

No Brasil a produção de leite é crescente. Em 1993, o País produzia 15 bilhões de litros, no ano de 2003 a produção foi de 22 bilhões. Em 2005, alcançou 24 bilhões de litros, passando a ocupar o 5º lugar entre os países de maior produção, o que demonstra o grande potencial que este setor representa para a economia nacional. (EMBRAPA, 2005; MAPA, 2005).

No final do ano de 1996, foi criado o “Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite” (PNMQL). O PNMQL faz parte do “Programa de Modernização do Setor Lácteo no Brasil”. Este programa vinha sendo discutido desde 1992 quando chegou ao fim o tabelamento do preço do leite pelo Governo. Tal fato, acrescido de outros como a criação do Mercosul, causou grandes modificações no setor, que procurou se adequar a nova realidade. O conceito de “qualidade do leite” até então pouco considerado no País, mas exigido nos países desenvolvidos e de tradicional produção leiteira, por ser essencial inclusive para exportação, passou a merecer destaque.



Com esse objetivo, o Governo Brasileiro, sob orientação e coordenação do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), aprovou regulamentação para o controle e a melhoria da qualidade do leite. Foram formuladas a Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002 e a Portaria 78, de 3 de junho de 1998 que regulamentou os programas de qualidade e o controle de resíduos em leite.

A qualidade do leite depende da genética, da alimentação e principalmente do estado de saúde dos animais. Diversos trabalhos demonstraram que a inflamação da glândula mamária (mastite) é responsável por alterações na composição do leite, muitas vezes tornando o produto impróprio para o consumo. (MATIOLI, PINTO, 2000; SANTOS, 2003). Além disso, o uso de medicamentos no tratamento da mastite favorece a presença de resíduos de medicamentos (COSTA et al. 1999b; RAIA, 2001).

## **MASTITE**

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária que afeta, qualitativa e quantitativamente, a produção de leite. Observa-se um menor teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e um aumento nas células somáticas, imunoglobulinas, cloretos e lipases. Com estas alterações, o leite torna-se inadequado para o consumo e para a produção de derivados (COSTA, 1998; SANTOS, 2003).

A mastite é reconhecida no mundo todo como a maior causa de perda econômica no gado leiteiro devido à diminuição na produção e qualidade do leite. Estima-se que 70% das perdas econômicas por esta doença são causadas pela diminuição na produção de leite, 14% pela retirada prematura do animal da produção, 7% pelo descarte do leite e 8% pelas despesas com veterinário e tratamento (NUÑEZ et al., 2001).

A doença geralmente é classificada em duas formas: clínica na qual o diagnóstico pode ser feito pela detecção de alterações visíveis ou por palpação da glândula e subclínica quando ela é essencialmente diagnosticada pela determinação das células somáticas e/ou cultura bacteriana. Os testes de triagem de mastite são utilizados como guia auxiliar na decisão de tratamento (SHITANDI; GATHONI, 2004).

A principal etiologia das mastites é a infecciosa (COSTA, 1998). Diversos microrganismos podem ser considerados agentes etiológicos de mastite, tais como as bactérias, os protozoários, os vírus, os fungos filamentosos, as leveduras e algas. Fatores anatômicos, fisiológicos, metabólicos, ambientais e de manejo podem também interferir, dificultando com isso o tratamento e controle. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias ocorrem com maior frequência, constituindo cerca de 80 a 90% dos casos, dentre as quais as mais comuns são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus ssp*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli*, *Nocardia ssp*, *Protoheca zopfii*, entre outras (COSTA, et al., 1997a; COSTA, 1998; COSTA et al., 2000a). Dentre estas, destacam-se as espécies do gênero *Staphylococcus*.

No Brasil, Brabes et al. (1999) caracterizaram as espécies de *Staphylococcus* prevalentes, bem como a capacidade de produção de toxinas das espécies isoladas de mastite. Foram estudadas cepas provenientes de amostras de leite de animais com mastite clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Das 127 cepas estudadas, as espécies mais encontradas foram: *Staphylococcus aureus* (39 %), *S. chromogenes* (11%), *S. sciuri* (9%), *S. simulans* (7%), *S. hyicus* (6%), *S. xylosus* (5%), *S. warneri* (2%), *S. epidermidis* (0,78%), *S. hominis* (0,78%), *S. caprae* (0,78%), *S. saprophyticus* (0,78%), sendo que destas, 16 apresentaram produção de enterotoxinas. A capacidade destas de sintetizar enterotoxinas representa na atualidade um sério problema à saúde pública.

Mesmo novilhas primíparas apresentam infecções intramamárias (COSTA et al., 1996b; MYLLYS; RAUTALA, 1995), fato que vem determinando uma crescente preocupação e a recomendação internacional do tratamento preventivo com antimicrobianos no pré-parto, o que merece ser avaliado também como potencial fonte de resíduo de antimicrobianos no leite (COSTA et al., 2004).

Meek et al. (1986) relataram que a ocorrência de mastite clínica (animal/ano) foi a maior entre todas as doenças do gado leiteiro, em 110 propriedades leiteiras selecionadas ao acaso em Ontário (Canadá). Além disso, verificaram que foram administradas, em média, 3,85 doses de antibiótico, por animal, por ano.

McEwen et al. (1991) observaram que a ocorrência de resíduo no leite estava associada com um aumento na frequência de tratamento de vacas em lactação, com

antibióticos por via intramamária, indicando que as propriedades leiteiras devem ter um cuidado extra, quando tratar as vacas por esta via. Muitas propriedades leiteiras, segundo os autores no estudo referido, usavam antibiótico intramamário, quando achavam necessário, sem uma orientação direta do veterinário.

No Brasil, em 28 propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais, Costa et al. (1995b) verificaram que o nível de ocorrência de mastite clínica era da ordem de 17,5%. Na mesma região, Costa et al. (1999b) em estudo realizado em tanques de mistura, observaram que a alta ocorrência de mastite estava relacionada com a presença de resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador de propriedades leiteiras.

Raia; Costa (2001) avaliaram 60 amostras de tanques resfriadores de diferentes propriedades leiteiras e verificaram que ao serem as propriedades agrupadas quanto ao nível de mastite clínica, apresentaram uma correlação de 1,0 ( $r = 1$ , Spearman) em relação à porcentagem de ocorrência de resíduo de antimicrobianos nos tanques resfriadores. Amostras de leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras que apresentaram alta porcentagem de mastite clínica foram relacionadas com a detecção de resíduo de antimicrobianos no leite, reforçando ser a ocorrência de mastite clínica um fator predisponente importante para a presença de resíduos no leite de tanques resfriadores das propriedades.

Costa et al. (1999b) também verificaram, utilizando testes imunoenzimáticos, em 87 propriedades leiteiras no Estado de São Paulo, a ocorrência de 7% das amostras positivas para a presença de resíduos, sendo que a porcentagem de mastite clínica nas propriedades positivas variou de 7,5% a 42%.

O processo inflamatório da glândula mamária, mastite, aumenta o risco da presença de resíduos de antimicrobianos no leite, podendo inclusive determinar períodos de eliminação além daqueles estabelecidos nas bulas dos medicamentos (RAIA et al., 1999; RAIA, 2001).

## **TRATAMENTO DE MASTITE**

No exterior, há uma ampla disponibilidade de medicamentos aprovados para uso em vacas leiteiras com betalactâmicos. Os mais utilizados com esta finalidade são penicilina, ceftiofur, cloxacilina, cefapirina, cefacetril, amoxicilina e ampicilina. (PRESCOTT, et al, 1988). No Brasil esta situação é um pouco diferente, entre os produtos registrados no Ministério da Agricultura para o tratamento de vacas leiteiras por via intramamária há grande ocorrência de aminoglicosídeos e associações (Figura. 1 - SINDAN, 2003-2004).

No Quênia foi estimado que aproximadamente 14.600 Kg de ativos antimicrobianos são usados anualmente em animais produtores de alimentos, sendo que os betalactâmicos são usados extensivamente. Na ausência de programas de controle, como no caso de muitos países de baixa renda, o uso de antimicrobianos em animais leiteiros leva a resíduos indesejáveis no leite com conseqüentes problemas para a saúde pública e indústria leiteira (SHITANDI, GATHONI, 2004).

Taponen et al. (2003) realizaram um estudo de campo para comparar a eficácia do tratamento intramamário somente com penicilina G ou uma combinação de penicilina G e neomicina em mastite clínica bovina causada por bactéria Gram positiva susceptível à penicilina e concluíram que não houve diferença significativa entre os dois tipos de tratamento. Assim estes pesquisadores sugerem evitar o uso da associação de betalactâmico com aminoglicosídeo para diminuir o risco de resíduo no leite, pois os aminoglicosídeos se ligam aos tecidos e favorecem a persistência de resíduos por longos períodos (NOUWS; ZIV, 1978). Na mastite a absorção do medicamento pode ser aumentada devido à alteração na integridade da barreira entre o sangue e o leite e a persistência do fármaco pode ser prolongada (NOUWS; ZIV, 1978). Resíduos de aminoglicosídeos foram encontrados nos rins de vacas com mastite até 60 horas após aplicação intramamária (NOUWS; ZIV, 1978).

## **RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é uma preocupação mundial. Resíduos de antimicrobianos no leite decorrem principalmente do uso abusivo destes medicamentos ou da sua utilização de maneira inadequada: uso de medicamentos não recomendados e com farmacocinética não perfeitamente estabelecida, uso de doses excessivas e não obediência ao período de carência do leite de animais em tratamento, além de problemas idiossincrásicos de animais que apresentam uma prolongada retenção do medicamento e em casos em que ocorre a antecipação do parto (COSTA, 1999b; COSTA et al., 2000b).

No Quênia, Kang'ethe et al. (2005) pesquisaram o risco do consumo de leite comercializado contendo resíduo de antimicrobianos. Os autores testaram 854 amostras de leite cru e 110 amostras de leite pasteurizado colhidos de diferentes locais, entre 1999 e 2000, utilizaram testes de triagem específicos para betalactâmicos e tetraciclinas e verificaram que as amostras de áreas rurais apresentaram uma proporção muito maior de resíduos de que as amostras colhidas em áreas urbanas, provavelmente pela diluição resultante da mistura de leite nos laticínios.

No Brasil estudos recentes realizados por Barros et al., (2001), Denobile (2002), Rosário (2002) e Medeiros et al. (2004) evidenciaram a relevância do problema.

Barros et al. (2001) analisaram 26 amostras de leite pasteurizado tipo C, para a presença de resíduos de antimicrobianos, coletadas em estabelecimentos comerciais da zona metropolitana de Salvador no período de outubro de 1998 a março de 1999. As análises foram realizadas pela utilização de teste microbiológico de triagem. Os resultados demonstraram presença de resíduos em 38,5% das amostras analisadas.

Denobile (2002) utilizou o método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), detectou a presença de resíduos de tetraciclinas no leite enviado em latões para laticínio de Minas Gerais. Um total de 11% das amostras continha níveis detectáveis de oxitetraciclina.

Rosário (2002) avaliou a ocorrência de resíduos de betalactâmicos e tetraciclinas nos diferentes tipos de leite (A, B, C e UHT) comercializados no município de

Pirassununga, SP. As amostras foram analisadas por testes analíticos qualitativos do tipo enzimático (IDEXX SNAP Test). Resíduos de tetraciclina foram encontrados em 6,25% a 8,69% e de betalactâmicos em 2,08% a 2,17%, nos diferentes tipos de leite coletados.

Medeiros et al. (2004) avaliaram 30 amostras de leite *in natura* consumido no município de Patos (Paraíba), quanto à presença de resíduo de antimicrobianos. Foram utilizados testes imunoenzimáticos para betalactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas e detectados resíduos em 43% das amostras.

Os resultados de Barros et al. (2001), Denobile (2002), Rosário (2002) e Medeiros et al. (2004) reforçam a importância de se orientar o produtor e técnicos sobre os principais fatores de risco, que podem contribuir para a ocorrência de resíduos no leite para consumo, pois em relação à presença destes, a existência de regulamentação não basta, é importante orientar o produtor, que deverá ser informado dos procedimentos para evitar que leite apresentando resíduos de antimicrobianos chegue à indústria e ao consumidor. Um dos procedimentos é a adoção de testes de triagem confiáveis, rápidos e práticos. Além disso, a fiscalização deverá dispor de meios e subsídios técnicos para avaliar a qualidade do leite. (COSTA et al., 1999b; GIBBONS-BURGENER et al., 2001; COSTA et al., 2000b; RAIA, 2001; COELHO, 2003; FAGUNDES, 2004).

Costa et al. (2000b) e Raia (2001) observaram a persistência de positividade para resíduo de antimicrobianos após o período de carência no leite de animais com mastite clínica tratados por via sistêmica. Como foi verificado pelos autores citados, é grande o risco de ocorrência de resíduo além do período de carência após o tratamento sistêmico. Raia (2001) também detectou resíduos em amostras de leite de animais tratados por via intramamária, que ultrapassaram o período de carência recomendado em bula.

Após o tratamento intramamário, muitos fatores podem contribuir para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Com a intenção de diminuir os prejuízos econômicos causados pelo tratamento da mastite, ainda é comum observar na prática, o descarte do leite apenas da glândula tratada por via intramamária. No entanto, também foi verificada a presença de resíduo nos quartos não tratados de animais tratados por esta via (COSTA et al., 2000b; COELHO, 2003).

Coelho (2003) verificou que do total de animais avaliados, 397 quartos de glândulas mamárias de 139 vacas holandesas em lactação, de cinco rebanhos brasileiros, 14,3% das amostras de leite de quartos não tratados apresentaram resíduo de antimicrobiano, independente do medicamento utilizado por via intramamária na glândula com mastite (betalactâmicos, aminoglicosídeos e associações de antimicrobianos). Deve-se referir ainda, que no mesmo estudo Coelho (2003) verificou resíduo em 7,5% dos 139 animais pesquisados nas três glândulas não tratadas, adjacentes à tratada por via intramamária, utilizando teste microbiológico comercial (Delvotest<sup>®</sup>). Este resultado é altamente significativo, uma vez que quanto maior o número de quartos resíduo-positivos, maior é o volume de leite contaminado e conseqüentemente mais elevado será o risco de comprometimento do leite da mistura do tanque de resfriamento.

O tratamento de vaca seca, por via intramamária, também contribui para a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo (FAGUNDES, 2004).

No exterior, o denominado “tratamento de vaca seca” ou “dry cow therapy”, isto é, o uso de antimicrobianos por via intramamária, na última ordenha anterior ao período seco, tem sido muito empregado no controle de mastite. É preconizado para tratamento de casos de mastite subclínica na lactação precedente e para prevenção de novas infecções no período seco. Este período entre as lactações constitui fase de alto risco em relação à prevalência de mastite (NATZKE, 1975; THIERS, 1999).

O período seco corresponde a um estágio de involução da glândula mamária extremamente importante para a lactação subsequente e deve ter, no mínimo, 50 a 60 dias de duração (OLIVER, SORDILLO, 1988; SMITH, TODHUNTER, 1982). Durante este período, a glândula mamária é altamente susceptível a novas infecções (NICKERSON, 1989; OLIVER, SORDILLO, 1988). Essas infecções intramamárias podem exercer um efeito deletério na capacidade de síntese e secreção do parênquima mamário, causando sério prejuízo. Segundo estudos realizados por Blood; Radostits (1989) e Nickerson (1990) a infecção do quarto durante o período seco poderá determinar uma diminuição de até 35% da produção deste durante a lactação seguinte.

Fagundes (2004) avaliou a persistência de resíduos de antimicrobiano no leite de vacas após o tratamento no período seco e verificou que houve uma significativa

diminuição do risco de ocorrência de resíduo quando o intervalo tratamento - colheita das amostras foi maior que 70 dias, porém o descarte incondicional do leite até 71 dias pós-tratamento não foi considerado economicamente viável. A adoção do descarte de 71 dias como padrão de segurança para a não presença de resíduo de antimicrobianos no leite resultaria numa perda média diária de 400 litros de leite correspondendo a R\$ 1.075,59 ou em dólares US\$ 372.18 no momento do estudo (2004). Este montante equivaleria aproximadamente ao custo do teste para treze animais durante 10 dias. Portanto a utilização do teste de triagem (Delvotest®SP) a campo seria mais seguro e econômico.

### **AMINOGLICOSÍDEO NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Os aminoglicosídeos têm sido utilizados no tratamento de mastite desde 1960 e na maioria dos produtos estão combinados com penicilina G ou outros betalactâmicos (WHITTEM; HANLON, 1997a). São antibióticos que possuem atividade bactericida sobre vários organismos Gram positivos e alguns Gram negativos. Seu uso clínico é limitado por efeitos colaterais como nefrotoxicidade e ototoxicidade.

Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, como nas enterites e mastites (BOGIALLI et al., 2005). Os mais comumente usados como agentes terapêuticos são: gentamicina, neomicina, diidroestreptomicina e estreptomicina (PRESCOTT, 2000a).

No Brasil não há restrição ao uso deste grupo farmacológico. Ao contrário os aminoglicosídeos estão entre os medicamentos mais utilizados para tratamento de mastite, sendo também encontrados associados aos betalactâmicos na composição de muitos dos medicamentos disponíveis no comércio. Vários trabalhos avaliaram a utilização dos aminoglicosídeos no tratamento de mastite bovina (ARAÚJO et al., 1992; COSTA et al., 1996c, LANGONI et al., 2000d; ERSKINE et al., 1992; JONES; WARD, 1990).

Os limites máximos de resíduos de aminoglicosídeos foram estabelecidos pela COMMISSION REGULATION (EC) 2002, para a Comunidade Européia e em relação aos Estados Unidos, os limites de aminoglicosídeos foram estabelecidos pelo FDA (Food and Drug Administration - revisado em 2003) (BOGIALLI et al., 2005).



Embora os limites máximos permitidos sejam semelhantes, não há um padrão de consenso entre as diferentes entidades reguladoras, por este motivo estão apresentados na Tabela 2 os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para aminoglicosídeos no leite, estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, União Européia e Food and Drug Administration (USFDA) e no Brasil os níveis fixados pelo PCRBL (1998)

Tabela 2 - Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de aminoglicosídeos em leite (ppb) 2005.

	Codex Alimentarius	União Européia	FDA	Brasil
Antimicrobianos				
Diidroestreptomicina	200	200	125	
Estreptomicina	200	200	125	200
Gentamicina	200	100	30	
Neomicina	1500	1500	150	500

Elaborada a partir das seguintes fontes:

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2000. Chemical-physical confirmation tests for the detection of residues of antimicrobials in milk. IDF Standard No. 358. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

\*BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.72, de 3 jun. 1998. Diário Oficial da União, Brasília, n.107, 8 de jun. 1998. Seção I, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].

Entre os aminoglicosídeos utilizados no tratamento da mastite destaca-se a gentamicina. Como se verifica pelos dados apresentados na Tabela 2, o limite máximo para este aminoglicosídeo no leite varia acentuadamente, sendo para a União Européia um limite de 100 ppb, para os Estados Unidos o FDA admite o máximo de 30 ppb e no Brasil não há informação.

Deve-se ressaltar que a gentamicina é um dos aminoglicosídeos mais utilizados no Brasil, em medicina veterinária, inclusive no tratamento de mastite. Araújo et al. (1992) avaliaram a eficácia terapêutica da gentamicina no tratamento de mastite bovina. Jones, Ward, (1990) e Erskine et al. 1992 utilizaram produtos a base de gentamicina no tratamento de mastite por *Escherichia coli*.

Costa et al. (1996c) avaliaram, em protocolo de campo, que englobou 154 vacas com mastite, num total de 214 quartos, a utilização de gentamicina por via intramamária obtendo-se cura de 83,9%. Neste mesmo trabalho foram avaliados tratamentos com cefacetil (betalactâmico) com 80,8% de cura, também foi realizado o tratamento a base de enzimas sem a inclusão de antimicrobianos, com resultado de 68% de cura.

Langoni et al. (2000a) avaliaram o uso de gentamicina e da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. Os medicamentos foram aplicados por via intramamaria, por três dias consecutivos, após a ordenha da tarde. Foram tratados 26 quartos com gentamicina (150 mg/teto/dia) e 26 quartos com a associação gentamicina e bromexina (150 mg/teto/dia e 50 mg/teto/dia), onde os agentes envolvidos foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactae* e *Escherichia coli*. A cura verificada foi de 69,2% e 84,6% nos tratamentos com e sem bromexina, respectivamente.

Apesar da eficácia terapêutica comprovada, alguns aminoglicosídeos podem determinar persistência prolongada de resíduos em animais tratados. (NOUWS; ZIV, 1978; ERSKINE et al., 1992; WHITTEM; HANLON, 1997b).

## **BETALACTÂMICOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Uma grande variedade de betalactâmicos é utilizada em vacas leiteiras. Os mais empregados no tratamento de doenças em vacas em lactação são: penicilinas, ceftiofur, cloxacilina, cefapirina, cefacetil, amoxicilina e ampicilina (PRESCOTT, 2000b, COSTA 2002).

Entre os betalactâmicos, as cefalosporinas de amplo espectro são agentes terapêuticos importantes em medicina veterinária e humana e frequentemente são usadas como antimicrobianos de primeira linha para infecções sistêmicas por Gram negativos. A ceftiofur tem sido também recomendada para tratamento de mastite (HORNISH, R.E.; KOTARSKI, S.F., 2002)

Entre as isoxazolilpenicilinas (resistentes à penicilinase), a oxacilina e cloxacilina têm sido usadas com sucesso no tratamento de mastite bovina (WATKINS et al., 1975; RUFFO et al., 1984; SINGH et al., 1984).

Pesquisadores brasileiros também avaliaram a eficácia dos betalactâmicos em mastite (COSTA et al., 1996c, 1997b) e no tratamento de vaca seca (COSTA et al., 1996b). A associação de betalactâmicos, como ampicilina e cloxacilina, foi utilizada no tratamento de mastite em vacas em lactação e apresentou bons níveis de cura (LANGONI et al., 1999). Nader Filho et al. (2002a) estudaram a eficácia de suspensão oleosa de uma associação sinérgica de betalactâmicos (ampicilina e cloxacilina) no tratamento de mastite clínica de 17 vacas em lactação, a taxa de cura observada foi de 88,2%.

Langoni et al. (2000a) utilizaram betalactâmicos do grupo das cefalosporinas de absorção e eliminação lenta, como a cefapirina benzatina, no tratamento de vaca seca, obtendo taxa de cura entre 84% e 93,7%. Também Nader Filho et al. (2002b) avaliaram a eficácia de betalactâmicos (ampicilina e cloxacilina) no tratamento da mastite subclínica em vacas secas obtendo 84,34% de cura.

Muito embora, como se observa pelos dados da literatura, os betalactâmicos constituem importante ferramenta, o uso inadequado pode causar de resíduo no leite, aumentando o risco de seleção de cepas resistentes. A prevalência de resistência para cefalosporinas em cepas patogênicas de *Escherichia coli*, foi descrita por Winokur et al. (2001) e Garino (2004).

Em relação aos limites máximos, não há consenso entre as diferentes entidades como pode se observar na Tabela 3, onde estão apresentados os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para betalactâmicos no leite estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, União Européia e Food and Drug Administration (USFDA) e no Brasil os níveis fixados pelo PCRBL (1998\*)

Os dados apresentados na Tabela 3 permitem a visualização da ampla variação dos limites máximos entre os diferentes betalactâmicos utilizados no tratamento de animais de produção.

Tabela 3 Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para antibióticos betalactâmicos em leite (ppb)

	Codex Alimentarius	União Européia	FDA	Brasil
<b>Antimicrobianos</b>				
Amoxicilina		4	10	4
Ampicilina		4	10	4
Benzilpenicilina	4	4	5	4
Cefapirina			20	
Cefaquinona		20		
Ceftiofur	100	100	50	100
Cloxacilina		30	10	
Dicloxacilina		30		
Oxacilina		30		
Penetamato		4		

Elaborada a partir das seguintes fontes:

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2000. Chemical-physical confirmation tests for the detection of residues of antimicrobials in milk. IDF Standard No. 358. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

\*BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.72, de 3 jun. 1998. Diário Oficial da União, Brasília, n.107, 8 de jun. 1998. Seção I, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].

### **ASSOCIAÇÕES DE AMINOGLICOSÍDEOS E BETALACTÂMICOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Existem posições contraditórias em relação à utilização de associações no tratamento de mastite bovina. A base teórica para o uso de associações de antimicrobianos tem sido a ampliação de espectro e a ação sinérgica contra certos microrganismos. Segundo alguns autores a superioridade da associação betalactâmicos e aminoglicosídeos nunca foi comprovada em protocolos clínicos em relação ao tratamento de mastite bovina

(TAPONEN et al., 2003). Nos Estados Unidos as associações deste tipo têm uso restrito, porém na União Européia e em vários países tem sido largamente utilizada no tratamento de mastite.

Vários pesquisadores no Brasil estudaram a associação de betalactâmicos e aminoglicosídeos nos tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. Costa et al. (2003) avaliaram a eficácia do tratamento de mastite clínica em 115 animais comparando dois produtos comerciais com associações diversas, verificaram que o grupo tratado com associação de aminoglicosídeos e betalactâmico apresentou 74% de cura clínica e microbiológica.

A eficácia de associações na terapia de vaca seca foi também objeto de pesquisa. Garino Jr (2004) estudou a eficácia da nafcilina (penicilina resistente a penicilinase do grupo das isoxazolilpenicilinas) associada à benzilpenicilina e diidroestreptomicina no tratamento de mastite em vacas secas e prevenção de novas infecções em animais de quatro propriedades leiteiras.

Em relação ao uso de associações, vários estudos foram conduzidos em protocolos de campo com penicilinas no tratamento de mastite clínica e subclínica, comparando com associação de penicilinas e aminoglicosídeos, nenhum desses estudos demonstrou qualquer vantagem da associação sobre o uso do betalactâmico isoladamente (PYÖRÄLÄ; SYVAJARVI, 1987; JARP et al., 1989; MCDOUGALL, 1998; TAPONEN et al., 2003). Os autores concluíram que nesses casos dever-se-ia evitar a utilização da associação, reduzindo o risco de resistência a ambos grupos de antimicrobianos (TAPONEN et al., 2003).

Autores como Whittam; Hanlon (1997b) e Osteras et al. (1999) ressaltaram que o uso desnecessário de associação de antimicrobianos pode contribuir para o aumento da pressão seletiva de cepas resistentes e, portanto, deve ser sempre avaliado criteriosamente.

## **TESTES PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE**

A importância da presença de resíduos de antimicrobianos no leite incentivou o desenvolvimento de vários testes para detecção destes (BARBERIO; SIGNORINI, 1996).

A partir dos anos 50, o método de ensaio de disco com *Bacillus subtilis* e suas modificações foram usados para detectar resíduos de antimicrobianos no leite. Durante os anos 70 e 80 ocorreu o desenvolvimento de técnicas radioimunológicas e enzimáticas para determinar a presença de betalactâmicos e outros antimicrobianos, tais como tetraciclina, estreptomicina, eritromicina, novobiocina e sulfonamidas. Finalmente, durante os anos 80 foram introduzidos testes utilizando anticorpos para resíduos específicos (BISHOP et al., 1992; RAIA, 2001).

O método de inibição microbiana pela presença de resíduos de antimicrobiano no leite é o mais utilizado em virtude do custo e da capacidade de evidenciar uma ampla gama de antibióticos e quimioterápicos (BARBERIO; SIGNORINI, 1996). Este método utiliza uma cultura de microrganismo teste, geralmente *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* ou *Streptococcus thermophilus*, semeada em meio de crescimento agar ou líquido; (MITCHELL, et al., 1998; RAIA, 2001).

Entre os usados como triagem, destacam-se os microbiológicos por inibição de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, tais como: BRTAiM® (Brilliant Black Reduction Test), Delvotest® e CH®-ATK Microplate P&S. Estes foram principalmente desenvolvidos e testados para leite bovino (SEYMOUR et al., 1988; SISCHO; BURNS, 1993; ANDREW et al., 1997). Alguns testes, tais como Delvotest® e BRT-AiM® foram também avaliados para leite de ovinos frente a diferentes antimicrobianos, com base nos limites máximos de resíduos permitidos nos Estados Unidos e União Européia (ALTHAUS et al., 2001, 2002; MOLINA et al., 2003a).

Como parte de um esforço para estabelecer um programa de controle de resíduos de antimicrobianos nas fazendas leiteiras do Quênia, Shitandi; Gathoni (2004) avaliaram um teste de baixo custo em placa com *Bacillus calidolactis*, após a padronização em

laboratório. Os parâmetros estudados foram: a facilidade de aplicação do teste, a sensibilidade em termos de limite de detecção comparado com os limites máximos de resíduos do *Codex Alimentarius* e a repetibilidade em dois laboratórios diferentes. Os limites de detecção observados foram: penicilina G ( $2 \mu\text{g/Kg}$ )<sup>1</sup>, ampicilina ( $2\mu\text{g/Kg}$ ), amoxicilina ( $2 \mu\text{g/Kg}$ ), oxacilina ( $15 \mu\text{g/Kg}$ ), cefalexina ( $50 \mu\text{g/Kg}$ ), cefapirina ( $30 \mu\text{g/Kg}$ ) e ceftiofur ( $50 \mu\text{g/Kg}$ ). Estes níveis foram menores do que os níveis máximos de resíduos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Os pesquisadores concluíram que o teste em placa pode ser um método útil e aplicável para os antimicrobianos betalactâmicos normalmente utilizados no setor leiteiro de países em desenvolvimento.

Outro método muito utilizado para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite é o imunoenzimático, conhecido como ELISA (“Enzyme linked immunoabsorbant assay”). Indiferente do objetivo da análise, todos os testes ELISA envolvem duas etapas básicas. Na primeira etapa, um antígeno e um anticorpo, um conhecido e outro proveniente da amostra a ser testada, são unidos para reagir, com a formação de imunocomplexos. Na segunda etapa, a detecção da reação é realizada pela adição de uma enzima conjugada. O conjugado é um antígeno ou um anticorpo quimicamente unido a uma enzima, como exemplo, a fosfatase alcalina. O conjugado ao reagir com o imunocomplexo forma um produto colorido. A intensidade de cor determina a presença ou ausência do antígeno ou anticorpo primariamente desconhecido e permite a sua identificação (MITCHELL et al. 1998).

A cromatografia também é usada para a detecção de resíduos. É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizado por distribuição destes entre duas fases que estão em contato íntimo. A técnica baseia-se na capacidade diferente que uma molécula ou íon possui de distribuir-se através de duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os constituintes da mistura são distribuídos entre as duas, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes (COLLINS et al., 1990).

---

□  $\mu\text{g/Kg} = \text{ppb}$

Boglialli et al. (2005) desenvolveram métodos confirmatórios dos testes de triagem de detecção de resíduos no leite, para os diversos antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite bovina, como os aminoglicosídeos, penicilinas anfotéricas, tais como a amoxicilina e a ampicilina. Os autores utilizaram a técnica de extração em matriz sólida, ao invés dos métodos convencionais de extração. Este método é baseado na cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massa (MS) com utilização de extração em matriz em fase sólida após dispersão em água aquecida a 70°C. Os limites de quantificação ficaram entre 2 ng/ml<sup>2</sup> (apramicina) e 13 ng/ml (estreptomicina), abaixo dos limites estabelecidos pelo FDA e União Européia.

Embora alguns métodos confirmatórios tenham sido padronizados para a detecção de determinados antimicrobianos, deve-se ressaltar que a campo é necessária a utilização de testes de triagem, práticos, sensíveis, pouco dispendiosos, que permitam a detecção precoce da presença de antimicrobianos. Esta impede que o resíduo contamine a mistura no tanque de refrigeração da fazenda, bem como, o leite de outras propriedades leiteiras ao ser transportado em conjunto nos caminhões refrigerados. Assim, previne o comprometimento da grande mistura nas usinas e laticínios, evitando-se desta forma que o leite com resíduo chegue ao consumidor.

Em relação à especificidade de alguns dos testes de triagem verificou-se na literatura estrangeira que alguns trabalhos de pesquisa estudaram muito bem este aspecto. Uma das propriedades que caracterizam os métodos microbiológicos de triagem é a especificidade, que foi definida por Sischo, Burns (1993) como a relação entre o número de resultados negativos no total de amostras analisadas por um determinado método, utilizando-se leite livre de resíduos. Sischo, Burns (1993) e Charm, Zomer (1995) obtiveram valores de especificidade usando o Delvotest® com amostras de leite de vaca de 98 % e 95%, respectivamente.

Molina et al. (2003a) observaram uma diminuição na especificidade da ordem de 90,2% no BRT e 91,1% nas amostras de leite ovino preservadas com acidol (150 mg cloranfenicol, 1ml etanol, 3,5 g azida sódica e 4,5 g citrato de sódio em 100 ml de água

---

<sup>2</sup> ng/ml=ppb



destilada) testadas com Delvotest®, quando comparadas com amostras isentas deste preservativo.

Um dos aspectos mais relevantes do uso de testes de inibição microbiológica advém do fato destes apresentarem sensibilidade a um amplo espectro de antimicrobianos, o que evita a necessidade do emprego simultâneo de vários testes para uma única amostra de leite, como é caso dos testes imunoenzimáticos que são específicos, ora para os betalactâmicos , ora para os aminoglicosídeos ou então para as tetraciclinas.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar alguns fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite. Assim foram estudados diferentes protocolos terapêuticos, comumente usados no tratamento de mastite bovina.

Fatores avaliados em relação à ocorrência de resíduo no leite:

- **Fisiológico: produção leiteira da glândula mamária tratada;**
- **Clínico: processo inflamatório da glândula mamária;**
- **Farmacológico: grupo farmacológico do antimicrobiano utilizados no tratamento de mastite e via de administração do antimicrobiano.**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

#### **ANIMAIS**

Na presente pesquisa foram utilizados animais de raças leiteiras e cruzamento entre estas (Holandês, Pardo-suíço), perfazendo um total 323 animais e 631 glândulas mamárias tratadas.

Os animais que constituíram os grupos experimentais foram submetidos a diferentes tratamentos, com o objetivo de avaliar a influência de fatores determinantes na ocorrência de resíduos, de antimicrobianos no leite, após período de carência. Foram distribuídos nos seguintes protocolos experimentais:

### **PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **4.1. Influencia dos fatores fisiológicos**

##### **4.1.1. Influência do volume de produção leiteira**

#### **4.2. Influencia de fatores clínicos**

##### **4.2.1 Influência da presença e intensidade do processo inflamatório**

#### **4.3. Influência de fatores farmacológicos**

##### **4.3.1. Influência dos grupos farmacológicos do antimicrobiano**

##### **4.3.2. Influência da via de administração do antimicrobiano**

##### **4.3.3. Influência da via de administração e grupo do antimicrobiano**

##### **4.3.4. Influência do grupo farmacológico no período seco**

#### **4.1.1. Influência do volume de produção leiteira**

Quadro 1: Animais avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com o volume de produção.

<b>Produção</b>	<b>Animais</b>
Total tratados < 20 L	106
Total tratados ≥ 20 L	81
<b>Total</b>	<b>187</b>

#### 4.2.1. Influência da presença e intensidade do processo inflamatório

Quadro 2: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com a intensidade e presença do processo inflamatório.

Processo Inflamatório <i>Presença e Intensidade</i>	Animais tratados	Quartos tratados
Mastite Clínica	183	193
Mastite sub clínica	48	106
Ausência de mastite	13	21
<b>Total</b>	<b>244</b>	<b>320</b>

#### 4.3.1.1. Influência dos grupos farmacológicos do antimicrobiano

Quadro 3: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com o grupo de antimicrobianos utilizados no tratamento por via sistêmica e intramamária.

Grupos de antimicrobianos	Animais	Quartos mamários
Aminoglicosídeos	59	80
Betalactâmicos	86	103
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico	86	116
<b>Total</b>	<b>231</b>	<b>299</b>

#### 4.3.1.2. Influência dos grupos farmacológicos do antimicrobiano na secagem e na lactação.

Quadro 4: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de acordo com os períodos de secagem e lactação.

Grupos farmacológicos	Animais		Quartos mamários	
		Total	Secagem	Lactação
Aminoglicosídeos	74	140	60	80
Betalactâmicos	115	217	114	103
Associação aminoglicosídeos a betalactâmicos	121	253	137	116
<b>Total</b>	<b>310</b>	<b>610</b>	<b>311</b>	<b>299</b>

#### 4.3.2. Influência da via de administração do antimicrobiano

Quadro 5: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência de diferentes antimicrobianos de acordo com a via de administração.

Via de administração	Animais	Quartos
Intramamária	150	155
Sistêmica	59	101
Combinação de vias	22	43
<b>Total</b>	<b>231</b>	<b>299</b>

#### 4.3.3. Influência da via de administração e grupo de antimicrobiano

Quadro 6: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite, após o período de carência de aminoglicosídeos, betalactâmicos e associações, durante a lactação, de acordo com a via de administração.

Grupos de antimicrobianos	Animais	Quartos
Aminoglicosídeos via intramamária	33	33
Aminoglicosídeos via sistêmica	15	31
Aminoglicosídeos ambas vias concomitantes	11	16
Betalactâmicos via intramamária	63	64
Betalactâmicos via sistêmica	18	32
Betalactâmicos ambas vias concomitantes	5	7
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico via intramamária	54	58
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico via sistêmica	26	38
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico ambas vias concomitantes	6	20
<b>total</b>	<b>231</b>	<b>299</b>

#### 4.3.4. Influência do grupo farmacológico no período seco

Quadro 7: Animais e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite, após o período de carência de aminoglicosídeos, betalactâmicos e associações, durante o período seco.

Grupos de antimicrobianos	Animais	Quartos mamários
Aminoglicosídeos	15	60
Betalactâmicos	29	114
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico	35	137
Total	79	311

#### MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NOS DIFERENTES PROTOCOLOS

##### Tratamento na Lactação:

##### Via intramamária:

Quadro 8: Antimicrobianos de aplicação intramamária e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite.

Grupos de antimicrobianos	Antimicrobiano	Quartos mamários
Aminoglicosídeos	Gentamicina	49
Betalactâmicos	Cefacetil, Cefoperazona e Cefoquinona	71
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico	Hidriodeto de penetamato+diidroestreptomicina+neomicina B	78

##### Via sistêmica:

Quadro 9: Antimicrobianos de aplicação sistêmica e quartos mamários avaliados na persistência de resíduo de antimicrobianos no leite.

Grupos de antimicrobianos	Antimicrobiano	Quartos mamários
Aminoglicosídeos	Gentamicina	47
Betalactâmicos	Cefoquinona Hidriodeto de penetamato	59
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico	Penicilina G + diidroestreptomicina	38

Tabela 4. Formulação, via de administração e período de carência, indicados pelos fabricantes dos medicamentos utilizados no tratamento de vacas em lactação.

Especialidade/Indústria	Fórmula	Via de administração	Carência para o leite
AGROVET® 5.000.000 Novartis Saúde Animal Ltda	Cada frasco-ampola contém: Benzilpenicilina procaína 3.750.000 U.I. Benzilpenicilina potássica 1.250.000 U.I. Estreptomicina base (sulfato) 2.000 mg Acompanhado de diluente estéril, em ampolas de 15 mL	Administrado por via intramuscular profunda	3 dias
AGROVET® PS Novartis Saúde Animal Ltda	Cada 100 mL contém: Benzilpenicilina procaína 20.000.000 UI Diidroestreptomicina (sulfato) 18 g Procaína (cloridrato) 1,73 g Veículo q.s.p. .... 100 mL	Administrar por via intramuscular profunda	3 dias
CEPRAVIN® - ANTI- MASTITICO PARA VACAS SECAS Schering-Plough.	Cada seringa contém: Cefalônio anidro....0,25 g Excipiente q.s.p.....3,00 g	Intramamária	96 horas após o parto, se o intervalo entre administração e parto for de pelo menos 51 dias.
COBACTAN® Akzo Nobel Ltda. - Divisão Intervet	Cada 100 mL contém: Sulfato de Cefquinoma*. 2,964 g Veículo q.s.p. .... 100,000 mL  * Equivalente a 2,5 g de Cefquinoma base	Sistêmica	12 horas
COBACTAN® VL Akzo Nobel Ltda. - Divisão Intervet	Cada seringa de 8 g contém: Sulfato de Cefquinoma (equivalente a 75 mg de cefquinoma base) ..... 88,0 mg Veículo q.s.p. ..... 8,0 g	Intramamário	60 horas ou 5 ordenhas.
GENTATEC® Chemitec Agro-Veterinária Ltda	Cada mL de Gentatec contém: Gentamicina (como sulfato).....40 mg Veículo q.s.p.....1 mL	Intramuscular ou subcutânea	96 horas

Tabela 4.(continuação) Formulação, via de aplicação e período de carência, indicados pelos fabricantes dos medicamentos utilizados no tratamento de vacas em lactação.

Especialidade/Indústria	Fórmula	Via de administração	Carência para o leite
GENTOCIN® MASTITE 150MG Coopers Brasil Ltda.	Cada 10 mL contém: Gentamicina base (sulfato micronizado) ..... 150,00 mg Excipiente oleoso q.s.p.....10,00 mL	Intramamária	4 dias (96 horas).
GENTOCIN® MASTITE 250MG Coopers Brasil Ltda	Cada 100 mL contém: Gentamicina (sulfato micronizado)... 2.500,00 mg Veículo oleoso q.s.p....100,00 mL	intramamária	Não informa
MAMYZIN® P Boehringer Ingelheim do Brasil	Cada frasco-ampola de pó contém: Hidriodeto de penetamato .....10 g (equivalente a 10 milhões de UI de benzilpenicilina) Água destilada estéril e apirógena..... 30 mL	Injetável	72 horas ou 6 ordenhas
MAMYZIN® M Boehringer Ingelheim do Brasil	Cada 5 mL contém: Hidriodeto de penetamato 150 mg (150.000 U.I.) Sulfato de dihidroestreptomicina 150 mg Sulfato de framacetina 50 mg Prednisolona 5 mg Veículo q.s.p. 5 mL	Intramamária	72 horas ou 6 ordenhas.
MAMYZIN® S Boehringer Ingelheim do Brasil	Cada injetor de 5 mL contém: Hidriodeto de penetamato 100 mg (100.000 U.I.) Penicilina benetamina 280 mg (280.000 U.I.) Sulfato de framacetina 100 mg Veículo q.s.p. 5 mL	intramamária	Não utilizar o produto durante as 4 semanas que antecedem o parto.
MASTIFIN® Ouro fino Saúde Animal Ltda	Cada seringa de 10 ml contém: Gentamicina (como sulfato).....150,00 mg Cloridrato de bromexina ..... 50,00 mg Excipiente q.s.p. .... 10,00 ml	Intramamária	96 horas



Tabela 4. (continuação) Formulação, via de aplicação e período de carência, indicados pelos fabricantes dos medicamentos utilizados no tratamento de vacas em lactação.

Especialidade/Indústria	Fórmula	Via de administração	Carência para o leite
MASTIFIN® VACA SECA  Ouro fino Saúde Animal Ltda	Cada seringa de 10 g contém: Sulfato de gentamicina.. 677,00 mg Excipiente q.s.p. .... 10,00 g Equivalente a 400,00 mg gentamicina base	Intramamária	Não informa
PATHOZONE®	Cada seringa de 10 mL contém: Cefoperazone sódica .. 250 mg Veículo ... q.s.p. .... 10 mL	Intramamária	60 horas.
VETIMAST®  Novartis Saúde Animal Ltda	Cada seringa de 10 g contém: Cefacetil sódico .....250,00 mg Veículo q.s.p. ....10,00 g	intramamária	96 horas

## **MÉTODOS**

### **DIAGNÓSTICO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Os casos de mastite foram classificados em clínica e subclínica de acordo com a intensidade do processo inflamatório. Em todos os experimentos desta pesquisa para o diagnóstico de mastite clínica e subclínica foi utilizada a mesma metodologia.

Na detecção da mastite clínica os animais foram examinados antes da ordenha pelo teste de Tamis, sendo classificadas como mastite clínica as glândulas mamárias que apresentaram resultado positivo ao teste, isto é, alterações visíveis do leite, como presença de grumos e/ou filamentos e/ou sangue (RADOSTITIS et al., 1994; WATANABE, 1999). Foram excluídos os casos clínicos hiperagudos e agudos severos com envolvimento sistêmico e, os casos crônicos, com fibrosamento da glândula acometida.

Os casos de mastite subclínica foram diagnosticados pela utilização do CMT (California Mastitis Test - SCHALM E NOORLANDER, 1957; THIERS et al. 1999).

### **TRATAMENTO DE VACAS EM LACTAÇÃO**

Foram elaboradas fichas de anotações de todos os tratamentos realizados nos animais. As fichas incluíram dados como: identificação do animal, data de tratamento, medicamento utilizado e vias de administração.

Durante o período de tratamento até o término do período de carência recomendado, os animais em tratamento foram ordenhados em separado e o leite descartado.

#### **Tratamento intramamário**

A aplicação dos tratamentos intramamários foi realizada com seringas e cânulas individuais que acompanham cada produto. Os medicamentos foram aplicados sempre após a ordenha completa da glândula e anti-sepsia da extremidade dos tetos com algodão embebido em álcool iodado. Foram seguidas as recomendações técnicas dos fabricantes quanto ao uso, posologia e período de descarte (Tabela 4).

## Tratamento sistêmico

O tratamento sistêmico consistiu na aplicação intramuscular profunda do antimicrobiano, conforme instrução do fabricante. Foram utilizadas seringas (40 ml) e agulhas (40 X 12) descartáveis e seguidas as recomendações técnicas dos fabricantes quanto ao uso, posologia e período de descarte (Tabela 4).

## TRATAMENTO DE VACA SECA

Todos os tratamentos de vaca seca foram realizados por via intramamária com seringas e cânulas individuais que acompanham cada produto. Os medicamentos foram aplicados sempre após anti-sepsia da extremidade dos tetos com algodão embebido em álcool iodado. Foram seguidas as recomendações técnicas dos fabricantes quanto ao uso, posologia e período de descarte (Tabela 4) O período seco médio foi de 65 dias.

## COLHEITA DAS AMOSTRAS

Para o teste de resíduo de antimicrobianos foram colhidas amostras imediatamente após o período de carência estipulado pelo fabricante de todos os quartos tratados e alguns não tratados para controle. Antes da ordenha dos animais, os tetos foram lavados e secos individualmente, com papel toalha descartável. O leite foi colhido em tubos de ensaio estéreis (16x160 mm). O volume das amostras foi de aproximadamente 5 ml. As amostras foram congeladas até o momento da análise, uma vez que em avaliações preliminares, realizadas em 10 amostras, submetidas em paralelo ao resfriamento e ao congelamento e analisadas pelo teste de detecção de resíduos (Delvotest ®) não se verificou interferência do congelamento sobre o teste.

## TESTES PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

As análises foram realizadas com teste microbiológico comercial (Delvotest® SP - Gis brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands). O teste obedeceu a seguinte metodologia: foram adicionados volumes de 0,1 ml das amostras de leite em ampolas (Delvotest®) com *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, em meio de ágar com indicador. Estas ampolas permaneceram em banho-maria a  $64^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 3 horas, segundo a recomendação técnica, sempre acompanhada de controle negativo. Após este período foram realizadas as leituras e consideraram-se positivos os testes que não apresentaram uma mudança da cor púrpura para amarela, conforme ocorreu com o controle.

Em relação às amostras dos animais tratados no período seco, foram analisadas somente após a fase colostrar, pois, embora não seja descrito na literatura não é possível avaliar a presença de resíduo pelo uso do Delvotest em colostro, pois é rico em substâncias antimicrobianas naturais e após o aquecimento prévio para eliminar estas substâncias a amostra solidifica-se.

Para evitar a ocorrência de falso-positivos, pela interferência de substâncias antimicrobianas naturais do leite (lisozima, lactoferrina), as amostras dos animais tratados foram aquecidas a  $80^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos em banho-maria, antes dos testes (RAIA, 2001; RAIA et al., 2003).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste de Fisher utilizando-se o “Software Instat GRAPHPAD”.

## **5. RESULTADOS**

Os resultados obtidos no presente estudo são apresentados nas Tabelas 5 a 14.

A Tabela 5 apresenta os dados referentes à avaliação da influência de fatores fisiológicos, como volume de produção no momento do tratamento sobre a ocorrência de resíduos no leite após período de carência. Verificou-se que animais com produção superior a 20 litros apresentaram uma menor ocorrência de resíduos no leite (39,5%) em relação ao grupo de animais com produção igual ou inferior a 20 litros de leite por dia (70,7%), e a diferença foi significativa ( $P < 0,0001$ ).

Tabela 5. Influência da produção leiteira na persistência de resíduos de antimicrobianos ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas tratadas por diferentes vias e diversos antimicrobianos.

Produção	total	positivo	Animais	
			% positivo	negativo
Total tratados < 20 L	106	75	70,7 <sup>a</sup>	31
Total tratados ≥ 20 L	81	32	39,5 <sup>a</sup>	49
Total	187	107	57,2	80

Teste de Fisher

<sup>a</sup> $P < 0,0001$  significativa.

Na Tabela 6 estão agrupados os resultados da avaliação da influência do processo inflamatório sobre a ocorrência de resíduos, em amostras de leite de vacas leiteiras em lactação tratadas por diferentes vias com medicamentos a base de betalactâmicos e aminoglicosídeos. Verificou-se que a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de animais tratados com mastite clínica (47,7%) foi maior do que nos animais com mastite subclínica (34,9%),  $P = 0,0381$ . Quando comparada à ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de animais com mastite clínica (47,7%), com a ocorrência em animais sem processo inflamatório na glândula mamária (9,5%) (grupo controle), houve uma diferença estatisticamente significativa,  $P = 0,0008$ . Também, a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de animais com mastite subclínica foi maior do que nos animais sem processo inflamatório na glândula mamária (grupo controle),  $P = 0,0209$ .

Tabela 6. Influência do processo inflamatório, mastite, na persistência de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por diferentes vias, com a utilização de medicamentos aminoglicosídeos e betalactâmicos, além do período recomendado para descarte.

Processo inflamatório	Animais	total	Quartos		
			positivo	% positivos	negativo
Mastite Clínica	183	193	92	47,7 <sup>a,b</sup>	101
Mastite subclínica	48	106	37	34,9 <sup>a,c</sup>	69
Ausência de mastite	13	21	2	9,5 <sup>b,c</sup>	19
total	244	320	131	40,9	189

Teste de Fisher

<sup>a</sup>P = 0,0381, tendência

<sup>b</sup>P = 0,0008, extremamente significativa

<sup>c</sup>P = 0,0209, significativa

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados referentes à avaliação da influência do grupo farmacológico do antimicrobiano utilizado no tratamento de mastite em vacas em lactação, na ocorrência de resíduo no leite por período além do preconizado para descarte pela indústria farmacêutica responsável. Observou-se que a ocorrência de resíduos em animais tratados com aminoglicosídeos (50%) foi estatisticamente maior que nos animais tratados com betalactâmicos (34,9%), P = 0,0495.

Tabela 7. Resíduo de antimicrobiano ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas em lactação com mastite, tratadas por via intramamária, sistêmica e combinação de vias, com diferentes grupos farmacológicos (aminoglicosídeos, betalactâmicos e associação).

Grupos de antimicrobianos	Animais	total	Quartos		
			positivo	%	negativo
Aminoglicosídeos <sup>1</sup>	59	80	40	50 <sup>a</sup>	40
Betalactâmicos <sup>2</sup>	86	103	36	34,9 <sup>a</sup>	67
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico <sup>3</sup>	86	116	53	45,8	63
total	231	299	129	43,1	170

<sup>1</sup>Aminoglicosídeos: Gentocin® intramamário, Gentatec®

<sup>2</sup>Betalactâmicos: Mamyzin P® injetável, Vetimast® intramamário, Cobactan intramamário®, Cobactan injetável®

<sup>3</sup>Associação de antimicrobianos: Agrovét® PS, Agrovét 5.000.000, Mamyzin M® intramamário.

Teste de Fisher

<sup>a</sup>P = 0,0495, significativa

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da avaliação da influência do grupo farmacológico utilizado na terapia de vaca seca, na ocorrência de resíduo no pós-parto após terapia de vaca seca. Não foram detectadas diferenças entre os diversos tratamentos.

Tabela 8. Resíduo no pós-parto, no leite dos quartos dos animais submetidos ao tratamento de vaca seca, ao término do período de carência previsto pelo fabricante.

Grupos de antimicrobianos	Animais	total	Quartos		
			positivo	%	negativo
Aminoglicosídeos <sup>1</sup>	15	60	17	28,3	43
Betalactâmicos <sup>2</sup>	29	114	25	21,9	89
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico <sup>3</sup>	35	137	30	21,9	107
total	79	311	72	23,2	239

Teste de Fisher

<sup>1</sup> Mastifin® vaca seca

<sup>2</sup> Cepravin® vaca seca

<sup>3</sup> Mamizyn S® vaca seca)

Na Tabela 9, 10, 11 e 12 estão apresentados os dados da presença de resíduos de antimicrobianos no leite de glândulas mamárias de animais submetidos ao tratamento com diferentes medicamentos a base de aminoglicosídeo ou betalactâmico ou formulações que associam aminoglicosídeo e betalactâmico, administrados por via sistêmica, intramamária ou combinação de ambas.

Ao serem avaliados outros fatores farmacológicos, como as vias de administração de medicamentos com aminoglicosídeos, betalactâmicos ou formulações comerciais com associação de ambos sobre a presença de resíduos no leite após o período recomendado para descarte (Tabela 9), foi verificada diferença estatisticamente significativa de resíduo de antimicrobiano nas glândulas mamárias tratadas pela combinação de vias concomitantemente (76,7%) em relação à via intramamária (41,9%) e sistêmica (31,7%) (P= 0,0009 e P < 0,0001 respectivamente).

Tabela 9. Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas com mastite em lactação, tratadas por diversas vias de administração com aminoglicosídeos ou betalactâmicos ou formulações comerciais com associação de ambos.

Via de administração	Animais		Quartos		
		total	positivo	% positivo	negativo
Intramamária	150	155	65	41,9 <sup>a</sup>	90
Sistêmica	59	101	32	31,7 <sup>b</sup>	69
Combinação de vias	22	43	33	76,7 <sup>a,b</sup>	10
total	231	299	130	43,5	169

Teste de Fisher

<sup>a</sup>P = 0,0009, significativa

<sup>b</sup>P < 0,0001, extremamente significativa

Na Tabela 10, verificam-se diferenças significantes, quando comparada a presença de resíduo no leite de vacas em lactação com mastite tratadas com aminoglicosídeos por via sistêmica (12,9%) em relação à combinação de vias (93,7%) (P < 0,0001) e em relação à via intramamária (66,7%) (P < 0,0001).

Tabela 10. Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite de vacas com mastite em lactação, tratadas com aminoglicosídeo por diversas vias de administração.

Via de administração	Animais		Quartos		
		total	positivo	% positivo	negativo
Intramamária <sup>1</sup>	33	33	22	66,7 <sup>a</sup>	11
Sistêmica <sup>2</sup>	15	31	4	12,9 <sup>a,b</sup>	27
Combinação de vias <sup>1+2</sup>	11	16	15	93,7 <sup>b</sup>	1
total	59	80	41	51,2	39

<sup>1</sup>Gentocin intramamário

<sup>2</sup>Gentatec

Teste de Fisher

<sup>a</sup>P < 0,0001, extremamente significativa

<sup>b</sup>P < 0,0001, extremamente significativa

Observa-se na Tabela 11 que houve uma diferença estatística significativa em relação à presença de resíduo de antimicrobianos no leite de animais tratados com betalactâmicos, por via intramamária (32,8%) ou por via sistêmica (25%) em relação à combinação de vias (100%) (P = 0,0009 e P = 0,0004).



Tabela 11. Resíduo, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, no leite, de vacas em lactação com mastite, tratadas com betalactâmicos por diferentes vias de administração, São Paulo. 2006.

Via de administração	Animais		Quartos		
		total	positivo	% positivo	negativo
Intramamária <sup>1</sup>	63	64	21	32,8 <sup>a</sup>	43
Sistêmica <sup>2</sup>	18	32	8	25 <sup>b</sup>	24
Combinação de vias <sup>1+2</sup>	5	7	7	100 <sup>a,b</sup>	0
total	86	103	36	34,9	67

<sup>1</sup>Vetimast® intramamário, Cobactan intramamário ®

<sup>2</sup>Mamyzin P® injetável, Cobactan injetável ®

Teste de Fisher

<sup>a</sup> P = 0,0009, extremamente significativa

<sup>b</sup> P = 0,0004, extremamente significativa

Em relação ao tratamento simultâneo por duas vias de administração com o mesmo antimicrobiano, as amostras de leite de animais tratados com aminoglicosídeos apresentaram 93,7% de resíduos (Tabela 10) enquanto aquelas de animais tratados com betalactâmicos apresentaram ocorrência de 100% (Tabela 11).

Na Tabela 12 observa-se que não houve diferença estatística significativa na ocorrência de resíduo de antimicrobiano no leite entre as diferentes vias de aplicação (intramamária, sistêmica e a combinação de ambas), quando os medicamentos utilizados continham na suas formulações a associação de betalactâmicos e aminoglicosídeos.

Tabela 12. Avaliação de resíduo no leite, ao término do período de carência estabelecido pelo fabricante, de vacas com mastite tratadas na lactação com medicamentos comerciais formulados a base da associação de betalactâmico e aminoglicosídeo, por diferentes vias de administração.

Via de administração	Animais		Quartos		
		total	positivo	% positivo	negativo
Intramamária <sup>1</sup>	54	58	22	37,9	36
Sistêmica <sup>2</sup>	26	38	20	52,6	18
Combinação de vias <sup>3</sup>	6	20	11	55	9
total	86	116	53	45,7	63

<sup>1</sup>Mamyzin M® intramamário

<sup>2</sup> Agrovét® PS, Agrovét 5.000.000

<sup>3</sup> Mamyzin M® intramamário, Mamyzin P® injetável

Teste de Fisher

Na Tabela 13 ao se comparar a ocorrência de resíduos nas glândulas mamárias dos grupos tratados com medicamentos comerciais na secagem com os grupos tratados na lactação, com o mesmo princípio ativo, evidenciou que houve maior ocorrência de resíduos nos grupos tratados em lactação (41,9%) que nos grupos tratados na secagem (23,2%) e a diferença foi estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ). Isso foi observado, nos grupos tratados com aminoglicosídeos (gentamicina) ( $P = 0,0004$ ), naqueles tratados com betalactâmicos ( $P=0,087$ ) e tratados com a associação de aminoglicosídeos e betalactâmicos ( $P = 0,0326$ ).

Tabela 13. Comparação entre tratamento de vaca seca e em lactação, em relação ao nível de resíduo de antimicrobianos, ao término do período de carência no leite, de quartos de vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária.

Grupos de antimicrobianos	Animais		Quartos							
	total seca	total lactação	total seca	total lactação	positivo seca	positivo lactação	% seca	% lactação	negativo seca	negativo lactação
Aminoglicosídeos <sup>1</sup>	15	33	60	33	17	22	28,3 <sup>a</sup>	66,7 <sup>a</sup>	43	11
Betalactâmicos <sup>2</sup>	29	63	114	64	25	21	21,9 <sup>b</sup>	32,8 <sup>b</sup>	89	43
Associação aminoglicosídeo e betalactâmico <sup>3</sup>	35	54	137	58	30	22	21,9 <sup>c</sup>	37,9 <sup>c</sup>	107	36
total	79	150	311	155	72	65	23,2 <sup>d</sup>	41,9 <sup>d</sup>	239	90

<sup>1</sup>Mastifin® vaca seca

<sup>2</sup>Cepravin® vaca seca, Cobactan intramamário®, Vetimast® intramamário

<sup>3</sup>Mamizyn S® vaca seca, Mamyzin M® intramamário

Teste de Fisher

<sup>a</sup> P = 0,0004, extremamente significativa

<sup>b</sup> P = 0,0087, muito significativa

<sup>c</sup> P = 0,0326, significativa

<sup>d</sup> P < 0,0001, extremamente significativa

Os dados apresentados na Tabela 14 permitem a análise da influência de diferentes fármacos na presença de resíduos no leite de vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária. Desta forma, observa-se diferença estatística na ocorrência de resíduos no leite de vacas tratadas com gentamicina (68,9%) em relação às tratadas com cefalosporinas (39,3%) ( $P = 0,0033$ ) e às tratadas com associação de aminoglicosídeos e betalactâmicos (penetamato, diidroestreptomicina e neomicina) (32,6%) ( $P = 0,0009$ ). Nas que receberam tratamento com cefalosporinas (39,3%) os resultados foram diferentes quanto às tratadas com associação aminoglicosídeos e betalactâmicos (penetamato, diidroestreptomicina e neomicina) (32,6%) ( $P = 0,0442$ ). Por sua vez, entre as associações também foram detectadas diferenças significantes nas glândulas mamárias tratadas com penicilina associada à estreptomicina (63,3%) em relação às tratadas com a associação penetamato, diidroestreptomicina e neomicina. (32,6%) ( $P = 0,0105$ ).

Tabela 14. Avaliação da ocorrência de resíduo de antimicrobianos, ao término do período de carência no leite, de vacas com mastite clínica tratadas na lactação em relação aos diferentes grupos de antimicrobianos.

Grupos de antimicrobianos	Quartos			
	total	positivo	%	negativo
Aminoglicosídeos <sup>1</sup>	45	31	68,9 <sup>a, b</sup>	14
Cefalosporinas <sup>2</sup>	61	24	39,3 <sup>a, c</sup>	37
Benzilpenicilina & estreptomicina <sup>3</sup>	30	19	63,3 <sup>c, d</sup>	11
Penetamato & estreptomicina <sup>4</sup>	49	16	32,6 <sup>b, d</sup>	33
Total	185	90	47,9	95

& = associação

<sup>1</sup>Aminoglicosídeos: Gentocin® intramamário Gentatec®

<sup>2</sup>Penetamato: Mamyzin P® injetável

<sup>3</sup>Cefalosporinas: Vetimast® intramamário, Cobactan intramamário ®; Cobactan intramamário, Cobactan sistêmico, Pathozone

<sup>4</sup>Benzilpenicilina associada a estreptomicina: Agrovét® PS, Agrovét 5.000.000

<sup>5</sup>Penetamato associado a estreptomicina Mamyzin M® intramamário

Teste de Fisher

<sup>a</sup>  $P = 0,0033$ , muito significativa

<sup>b</sup>  $P = 0,0009$ , extremamente significativa

<sup>c</sup>  $P = 0,0442$ , significativa

<sup>d</sup>  $P = 0,0105$ , significativa

## **6. DISCUSSÃO**

Whittem, Hanlon (1997b), destacaram que as exportações de produtos derivados de animais, na Nova Zelândia, podem ser seriamente prejudicadas pela presença de resíduos de antimicrobianos. Na Índia, Dutta et. al (2001) relataram que após a implantação de acordos internacionais (*World Trade Organization*) o País passou a exportar produtos de origem animal, especialmente leite e derivados. Os pesquisadores ressaltaram uma grande necessidade de melhorar a qualidade do leite, mantendo-o livre de contaminantes, incluindo antibióticos.

No Brasil, o PNMQL, como referido na introdução, foi criado com o objetivo de possibilitar avanços no setor lácteo brasileiro o que envolve pontos críticos de ordem social e econômica. O programa está baseado nos seguintes parâmetros: implantação do resfriamento/granelização no estabelecimento e de limites para diminuição gradativa da contaminação do leite por microrganismos, redução do número de células somáticas por mililitro de leite e ausência de resíduos de antimicrobianos. A globalização exige que sejam adotadas, de imediato, medidas que permitam inserir a produção leiteira brasileira no mercado internacional. Por outro lado, o impacto da implementação destas medidas provoca muita preocupação. É uma situação polêmica que envolve muitos interesses, muitas vezes, conflitantes que deverão ser harmonizados. A melhoria do setor lácteo permitirá alcançar a modernização do agro-negócio leite e obtenção de produtos de qualidade internacional.

Um leite de alta qualidade apresenta como características: sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de patógenos e contaminantes, reduzida carga microbiana, baixa contagem de células somáticas (CCS) e ausência de resíduos de antimicrobianos.

Em relação à ocorrência de resíduos foi objetivo deste estudo avaliar alguns fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos para verificar o potencial destes como fatores determinantes secundários endógenos ou exógenos.

Determinantes são múltiplos fatores que contribuem para a ocorrência de um evento. O conhecimento dos determinantes facilita a identificação das situações mais sujeitas à ocorrência deste, bem como, as populações mais susceptíveis. O conhecimento dos fatores determinantes de um evento é, portanto, um pré-requisito para a prevenção e

controle, constituindo um elemento auxiliar no diagnóstico de situação (THRUSFIELD, 2004)

Os determinantes são classificados como: primário ou secundário; intrínsecos ou extrínsecos. Os determinantes primários são aquelas variações que exercem um maior efeito na indução do evento, freqüentemente, são as chamadas causas necessárias. Alguns determinantes são secundários, na ausência da causa necessária não são suficientes para que ocorra o evento, mas contribuem de forma decisiva para uma maior probabilidade da ocorrência do mesmo.

Analisado desta forma, indubitavelmente a administração de antimicrobianos constitui o determinante primário para a presença de resíduos, é um determinante primário extrínseco ou exógeno. Os determinantes secundários não exercem efeito isoladamente, mas interagem para induzir o fenômeno. A interação entre os fatores pode ser aditiva, sinérgica ou não. Dois ou mais fatores podem interagir e produzir um efeito maior que o esperado quando atuam isoladamente, isto é, sinergismo.

Mastite é a mais freqüente causa para o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (GRAVE et al. 1999), portanto, tem-se a interação de um fator determinante primário exógeno farmacológico e um secundário endógeno clínico.

Outro tipo de interação é o efeito potencializado da combinação entre fatores endógenos, como fisiológicos e clínicos.

Desta forma, a produção leiteira diária dos animais foi avaliada, no presente estudo, como determinante secundário entre os fatores fisiológicos. Observou-se que, os animais com menor produção leiteira (< 20L/dia) apresentaram uma maior ocorrência de resíduos no leite (70,7%).

Smith et al., (2004) com base em resultados e na “*Food Animal Residue Avoidance Databank*” (FARAD) recomendaram que o leite de vacas com produção menor do que 30 libras/dia (cerca de 15L/dia), seja testado após 7 dias do tratamento com ceftiofur antes de ser liberado para consumo, pois vacas que produzem pequenos volumes de leite podem ter um período de carência mais prolongado. Esta observação de Smith et al. (2004) corrobora com os dados obtidos no presente estudo, em relação ao volume de produção.

Entre os fatores clínicos, verificou-se que a presença do processo inflamatório na glândula mamária, assim como, a sua intensidade, mastite clínica ou subclínica, são fatores determinantes, para a ocorrência de resíduos no leite. Este ponto foi demonstrado no presente estudo em que os animais, tratados com antimicrobianos, com mastite clínica apresentaram maior ocorrência de resíduos (47,7%) em relação aos animais com mastite subclínica (34,9%). E, por sua vez, nos animais tratados sem mastite verificou-se que a ocorrência de resíduos foi muito mais baixa (9,5%). E, quando comparados os níveis de positividade as diferenças foram estatisticamente significantes.

Ora, ao se analisar em conjunto ambos os fatores (volume de produção e presença de mastite), evidência-se a ocorrência de uma interação que se caracteriza como aditiva ou mesmo sinérgica, particularmente ao se ponderar que um dos principais sintomas da mastite é a diminuição da produção do leite. Além disso, o processo inflamatório por ativação da cascata do ácido aracdônico interfere com a difusão e persistência do antimicrobiano no parênquima (referência). Deste modo, a persistência de resíduo de antimicrobiano no leite é amplamente influenciada pelo processo inflamatório, já que este modifica os constituintes do leite, devido à alteração de permeabilidade e reduz o volume produzido pela glândula mamária.

Os resultados do presente estudo corroboram com Raia (2001) que já demonstrara a influência do processo inflamatório na presença de resíduos de antimicrobianos no leite, além do período de carência.

Fatores farmacológicos avaliados como grupos de antimicrobianos e vias de administração, são fatores determinantes exógenos que interagem.

Os resultados referentes à avaliação da influência de grupos farmacológicos de antimicrobianos, utilizados no tratamento de mastite em vacas em lactação, na ocorrência de resíduo no leite demonstraram diferenças significantes. Assim, foi observado que a ocorrência de resíduos em animais tratados com aminoglicosídeos (50%) foi estatisticamente maior ( $P = 0,0495$ ) que nos animais tratados com betalactâmicos (34,9%).

Estes resultados demonstraram que embora a eficácia do uso terapêutico de aminoglicosídeos, como a gentamicina, tenha sido comprovada na mastite bovina em diversos trabalhos nacionais e estrangeiros (ARAÚJO et al., 1992; LANGONI, et al.,

2000a; PRESCOTT et al., 2000a; ERSKINE et al., 2002) os fabricantes devem reavaliar o período de carência, uma vez que, antes do lançamento do produto as interações de fatores determinantes muitas vezes não são levados em consideração nos testes preliminares de farmacocinética.

Em relação à avaliação da influência do grupo farmacológico utilizado na terapia de vaca seca, quanto à ocorrência de resíduo de antimicrobiano no leite no pós-parto, respeitado o intervalo preconizado que corresponde ao período colostrado e período de descarte do leite recomendado pelo fabricante, não foram detectadas diferenças entre os diversos tratamentos. Estes resultados corroboram com os de Fagundes (2004) e Fagundes et al. (2005).

Pyörälä (2002) elaborou uma revisão sobre tratamentos de mastite e discutiu aspectos como a importância da via de administração na eficácia do tratamento, porém em estudos clínicos comparativos, não foi demonstrada nenhuma diferença de eficácia entre o tratamento sistêmico e intramamário com o mesmo antibiótico.

Ao serem avaliados outros fatores farmacológicos, como as vias de administração dos medicamentos, sobre a presença de resíduos no leite após o período recomendado para descarte, foi verificado que houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0009$ ) de resíduo de antimicrobiano nas glândulas mamárias tratadas por via intramamária (41,9%) em relação à combinação de vias e a diferença entre os tratados por via sistêmica (31,7%) e os tratados pela combinação de vias concomitantemente (76,7%) também foi significativa ( $P = 0,0009$ ). Da mesma forma foi significativa a diferença na ocorrência de resíduos nas glândulas mamárias tratadas por via sistêmica (31,7%) quando se utilizou o tratamento combinado, isto é, medicamentos do mesmo grupo farmacológico por ambas as vias ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 9).

Ainda em relação à influência das vias de administração, a análise dos resultados apresentados, na Tabela 10 e 11, demonstrou que os animais submetidos ao tratamento simultâneo por duas vias de administração apresentaram alta ocorrência de resíduos, com aminoglicosídeos, gentamicina, 93,7% (Tabela 10). E a administração dos betalactâmicos concomitante por via intramamária e sistêmica, determinou uma ocorrência de 100% de resíduos (Tabela 11). Ao se confrontar estes resultados foram verificadas diferenças



significantes, quando comparados com os tratados pela administração por uma só via, tanto os tratados por aminoglicosídeos ( $P < 0,0001$ ), como os por betalactâmicos, por via intramamária ou por via sistêmica em relação à combinação de vias ( $P = 0,0009$  e  $P = 0,0004$ ). Os tratados com aminoglicosídeos, por via intramamária apresentaram mais resíduos (66,7%) que os tratados apenas por via sistêmica (12,9%) e a diferença foi significativa. ( $P < 0.0001$ ) (Tabela 10).

Pedersoli et al.(1995) que também avaliaram a administração de gentamicina simultânea por via sistêmica e intramamária observaram um período de eliminação prolongado, aproximadamente 228 horas após o último tratamento.

Gehring et al. (2005) referiram que existem poucos estudos na literatura que tornam possível determinar o período de carência de medicamentos com uso não previsto em bula. Estes autores também destacaram que a persistência de resíduos de aminoglicosídeos parece variar e depender de numerosos fatores tais como a formulação utilizada, a dose administrada, o intervalo entre doses, a saúde e fatores fisiológicos.

Bases orgânicas, após a administração parenteral tendem a acumular no leite na forma ionizada e mantém uma concentração mais alta que no sangue (PYÖRÄLÄ, 2002). É o caso de antimicrobianos como o penicilinato. Ao contrário, ácidos fracos concentram-se mais no sangue e menos no leite (PRESCOTT et al., 2000a). É o que provavelmente ocorreu com o grupo tratado com gentamicina, administrada por via sistêmica, no qual foram observados os menores níveis de ocorrência de resíduos (12,9%); a gentamicina sistêmica não se difunde adequadamente para a glândula mamária. Por outro lado, a administração deste antimicrobiano por via intramamária apresentou maior número de amostras com resíduo (66,7%) além do período de carência.

Quando se avaliou a influência das vias de administração utilizando-se medicamentos comerciais que apresentaram em sua formulação uma associação de aminoglicosídeos e betalactâmicos, não foram detectadas diferenças significantes entre as vias de administração e tampouco entre estas e a administração simultânea por ambas as vias. (Tabela 12)

A comparação da ocorrência de resíduos nas glândulas mamárias dos grupos tratados com medicamentos comerciais na secagem com os grupos tratados na lactação,

com o mesmo princípio ativo, evidenciou que houve maior ocorrência de resíduos nos grupos tratados em lactação (41,9%) que nos grupos tratados na secagem (22,3%) e a diferença foi estatisticamente significante ( $P < 0,0001$ ). Isso foi observado tanto nos grupos tratados com aminoglicosídeos (gentamicina) ( $P = 0,0004$ ), como naqueles tratados com a associação de aminoglicosídeos e betalactâmicos ( $P = 0,0326$ ). O mesmo ocorreu com os tratados com betalactâmicos ( $P = 0,087$ ) (Tabela 13). Este fato que pode estar relacionado com fatores determinantes fisiológicos, como estágio de involução da glândula mamária, durante o período seco. Outra explicação seria o maior intervalo entre tratamento e a avaliação. Dever-se-ia, entretanto, considerar que também houve uma evolução dos veículos de absorção lenta, que na atualidade determinam maior persistência do medicamento na glândula mamária, ao redor de sessenta dias, que é o intervalo ideal entre lactações.

A análise em separado dos diferentes princípios ativos administrados em vacas no período de lactação com mastite clínica, por via intramamária, demonstrou a influência dos fármacos na presença de resíduos no leite. Desta forma, verificou-se diferença estatística nas tratadas com gentamicina das com cefalosporinas ( $P = 0,0033$ ) e também diferiram das submetidas à associação farmacológica de aminoglicosídeos e betalactâmicos (penetamato, diidroestreptomicina e neomicina) ( $P = 0,0009$ ). Nas que receberam tratamento com cefalosporinas os resultados foram diferentes quanto às tratadas com associação aminoglicosídeos e betalactâmicos (penetamato, diidroestreptomicina e neomicina) ( $P = 0,0442$ ). Por sua vez, entre as associações também foram detectadas diferenças significantes nas glândulas mamárias tratadas com penicilina associada à estreptomicina em relação às tratadas com a associação penetamato, diidroestreptomicina e frameticina. ( $P = 0,0105$ ) (Tabela 14)

Em relação à utilização de associações no tratamento de mastite bovina há posições conflitantes. Assim, apesar da base teórica para o uso destas ser a ampliação de espectro e a ação sinérgica contra certos microrganismos, alguns autores argumentam que, não foi devidamente comprovada em protocolos clínicos de tratamento de mastite bovina, a superioridade da formulação betalactâmicos associados aos aminoglicosídeos (TAPONEN et al., 2003). Nos Estados Unidos as associações deste tipo foram retiradas do mercado há alguns anos, devido às restrições impostas pela Food and Drug Administration. Entretanto,

na União Européia e em vários países estas são amplamente utilizadas no tratamento de mastite.

De acordo com alguns autores (PYÖRÄLÄ, 2002; SMITH et al., 2005), para uma grande parte dos antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite foram realizados estudos farmacocinéticos bem planejados, conduzidos para definir o período de descarte apropriado do leite, enquanto que, para outros as recomendações foram formuladas com base em dados limitados. Portanto, para se garantir a segurança alimentar e evitar resíduos de antimicrobianos é extremamente importante que veterinários e fazendeiros mantenham registros confiáveis de todos os animais tratados no rebanho, não apenas dos casos de mastite e que sejam obedecidos os períodos recomendados de descarte de leite. Os autores citados também preconizaram, que fazendeiros sejam orientados e treinados para realizar testes de detecção de resíduos na propriedade. Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com as recomendações dos referidos autores.

Algumas situações verificadas nas condições brasileiras merecem especial atenção, este é o caso das informações técnicas que acompanham alguns produtos veterinários, as quais muitas vezes apresentam incongruências e mesmo incoerências, como ilustrado na Tabela 4. Além disso, usualmente os procedimentos não estão descritos de forma clara. Por exemplo, em relação ao período de descarte do leite após final do tratamento, não existe uma padronização quanto ao tipo e a forma das informações fundamentais disponibilizadas nas bulas, que permita uma orientação mais segura para utilização adequada do medicamento. Estas deficiências podem induzir a erros no descarte do leite dos animais tratados, contribuindo também para o aumento da ocorrência de resíduos no leite, além dos fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos analisados na presente pesquisa.

O exposto revela a necessidade da adoção de medidas rigorosas pelas autoridades responsáveis para coibir estas irregularidades que afetam direta e indiretamente os animais, os produtores, os consumidores e comprometem a expansão do agro-negócio do setor leiteiro e as exportações do leite e derivados.

## **7. CONCLUSÕES**

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar alguns fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes da ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite. Com esta finalidade foram estudados diferentes protocolos terapêuticos, comumente usados no tratamento de mastite bovina.

Entre os fatores determinantes avaliados em relação à ocorrência de resíduo de antimicrobianos no leite após o período de carência, isto é, período de descarte do leite posterior à administração do tratamento, os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

**O volume de produção leiteira da glândula mamária tratada constituiu importante fator fisiológico** na ocorrência de resíduo após período de carência, pois foi verificado que animais com maior produção, superior a 20 litros, apresentaram uma menor ocorrência em relação ao grupo de animais com produção igual ou inferior a 20 litros de leite por dia e a diferença foi significativa.

**O processo inflamatório da glândula mamária, mastite, é fator clínico** que contribuiu para com uma maior presença de resíduos de antimicrobianos após o período recomendado para descarte do leite.

**Em relação aos fatores farmacológicos, como as vias de administração e grupos farmacológicos dos antimicrobianos** foi possível concluir, pelos resultados obtidos que, estes fatores exercem influência sobre a presença de resíduos no leite após o período recomendado para descarte.

Em relação à influência dos grupos **farmacológicos** de antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite em vacas em lactação, os resultados da ocorrência de resíduo no leite, permitiram concluir que são fatores determinantes, pois apresentaram diferenças significantes. No presente estudo foi observado maior nível de resíduos nos grupos tratados com gentamicina em relação aos tratados com betalactâmicos. Entre as associações de aminoglicosídeos e betalactâmicos detectou-se maior nível de resíduos nas associações de penicilina com estreptomicina.

Em relação à administração terapêutica de medicamentos, com o mesmo princípio ativo, na secagem, fase de involução das glândulas mamárias, comparada com os grupos tratados na lactação, glândulas mamárias em fase de produção, evidenciou-se que houve maior ocorrência de resíduos, após período de carência, nos em lactação que nos grupos tratados na secagem, e a diferença foi estatisticamente significante.

## **8. REFERÊNCIAS**

- AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **J. Chromatogr. B: Biom. Sci Appl.**, Amsterdam, v. 667, n.1, p.1-40, 1995.
- ALMEIDA, M.T.G. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 4, p.291-298, 1998.
- ALTHAUS, R.L., MOLINA, P.; RODRIGUEZ, M.; FERNANDEZ, N. Evaluation of the BRT<sup>®</sup> method for detection of beta-lactam antibiotics in ewe milk. **Milchwissenschaft**, Berlim, v.56, n.10, p.568–572, 2001.
- ALTHAUS, R.L.; PERIS, C.; MONTERO, A.; TORRES, A.; MOLINA, P. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest<sup>®</sup> test. **Milchwissenschaft**, Berlim, v.57, n.11/12, p.660–664, 2002.
- ANDREW, S.M.; FROBISH, R.A.; PAAPE, M.J.; MATURIN, L.J. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.80, n.11, p.3050–3057, 1997.
- ARAÚJO, W.P., D'ANGELINO, J.L., COSTA, E.O.; SCHALCH, V.; SAKAMOTO, M.; RESENDE, L.; Avaliação da eficácia terapêutica da gentamicina no tratamento de mastite bovina. **Hora Vet.**, Porto Alegre, n.68, p.29-32, 1992.
- BALDASSI, L.; FERNANDES FILHO, M.; HIPÓLITO, M.; MOLIN, A.A.P.; CALIL, E.M.B.; PIRES, D.C. Etiologia da mastite subclínica na Bacia Leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 58, p. 29-36, 1991.

---

De acordo com a Norma NRB 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004. [CD-ROM]

- BARBERIO, A., SIGNORINI, F. Antibiotici e sulfamidicini nel latte. **Obiettivi Doc. Vet.**, Bologna, v.17, n.12, p.29-36, 1996.
- BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. In vitro Sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região do Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Revista Napgama**, São Paulo, v.5, n.1, p.3-10, 2002.
- BARROS, G.M.S., JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** Salvador, v.2, n.3, p.69-73, 2001.
- BERGHASH, S.R; DAVIDSON, J.N.; ARMSTRONG, J.C.; DUNNY,G.M. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.24, n.5, p.771-776, 1983.
- BLOOD, D.C., RADOSTITS,O.M. **Clínica Veterinária**, 7<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.
- BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A.; MELE, M.; NAZZARI M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1067, n.1/2, p. 93–100, 2005.
- BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONISIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO JUNIOR, F.; COSTA, E O. Avaliação da participação de espécies do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, n.3, p.4-11, 1999.
- BRADY, M.S.; KATZ. S.E. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. **J. Food Prot**, Des Moines, v.51, n.1, p. 8–11, 1988.
- BRASIL. Portaria n. 527, de 15 de ago. 1995. O Ministério da Agricultura instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal – PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 157, 16 de ago. 1995.

- BRASIL. Portaria n. 72, de 3 JUN. 1998.. O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Leite– PNCRBL. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 107, 8 JUN, 1998 Seção I, p.131
- BRASIL. Portaria n.51, de fevereiro de 1986. O Ministério da Agricultura instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal – PNCRB **Diário Oficial da União**, Brasília, n.23, 7 fev. 1986.
- BRASIL. Instrução Normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 ago. 2002, Seção1, p.2-4.
- BRIÑAS, L.; ZARAZAGA, M.; SAÉNZ, Y.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C.  $\beta$ -lactamases in Ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.46, n.10, p.3156-3163, 2002.
- CATRY, B.; LAEVENS, H.; DEVRIESE, L.A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A. DE Antimicrobial resistance in livestock **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Londres, v.26, n., p.81-93, 2003.
- CHARM, S.E.; ZOMER, E. The evolution and direction of rapid detection / identification of antimicrobial drug residues. In: Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. **Int. Dairy Fed.**, Brussels, IDF, special issue n.9505, p.224–233, 1995.
- COELHO, V.R.P. **Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária**, Pirassununga, 2003, 102p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4.ed. Campinas: Unicamp, 1990. 279p. (Série manuais).



- COSTA, E. O.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 65-69, 1985.
- COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; WHITE, C. R. Dinâmica da resistência de agentes etiológicos da mastite bovina aos antimicrobianos. **Rev Bras Med Vet**, Niterói, v. 17, p. 260-263, 1995a.
- COSTA, E.O., MELVILLE, P.A., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., WHITE, C.R., PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Niterói, v.17, n.5, p.215-217, 1995b.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; VIANI, F.C.; WHITE, C.R. Prevalence of intramamarian infections in primigravid Brazilian dairy heifers. **Prev. Vet. Med.**, Amsterdam, v.29, p. 151-155, 1996a.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; SÁ, R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B.; GARINO JR., F. Evaluation of dry cow treatment on the occurrence of bovine mastitis: cure rate and new infection rate. In: **WORLD BUIATRICS CONGRESS**, 19, Edinburgh, 1996b. **Proceedings**, 1996b. p.193-195.
- COSTA, E.O.; MANGERONA, A.M.; BENITES, N.R.; CIRILLO, S.L.; GARINO JÚNIOR, F.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.16, n.3, p.19-21, 1996c.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; PRADO, R. B.; WHITE, C. R. Métodos para diagnóstico microbiológico de mastite clínica bovina. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v.49, n.2, p.159-167, 1997a.
- COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; PRADA, M.S.; TESSARI, J.R.; MELVILLE, P.A.; Tratamento de mastite bovina: comparação in vitro e in vivo da sensibilidade a antimicrobianos. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.16, n.95, p.27-30, 1997b.
- COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Continuada**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

- COSTA, E. O. Uma contribuição da pesquisa para melhorar a produção de leite. **Notícias FAPESP**, São Paulo, n. 40, p. 14-16, 1999a.
- COSTA, E.O., RAIA, R.B., GARINO JR., F., WATANABE, E.T., RIBEIRO, A.R., GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, n.1, p.10-13, 1999b.
- COSTA, E. O; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J.A.B.; GARINO JR, F.; BENITES, N.R.; HORIUTI, A M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, n.2, p. 16-20, 1999c.
- COSTA, E.O., GARINO JR, F.; MELVILLE, P.A., SILVA, J.A B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C. R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do estado de São Paulo. **Revista Napgama**, São Paulo, v.3, n.4, p.6-13, 2000a.
- COSTA, E.O.; RAIA, R.; WATANABE, E.T.; GARINO JÚNIOR, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios não tratados. **Revista Napgama**, São Paulo, v.3, n.4, p14-17, 2000b.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **J. Vet. Med B Infect Dis Vet Public Health**, Berlim,v.47, n.2, p.99-103, 2000c.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.42., p.443-455.
- COSTA E.O.; GARINO JR, F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E. Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. **Revista Napgama**, São Paulo, v.6, n.1, p. 3-9, 2003.
- COSTA E.O.; GARINO, F.JR.; FAGUNDES, H.; RAIA, R.; ARCARO, J.P.; MÁRMORE,C. Comparação do nível de ocorrência de infecções em novilhas de

- primeira cria em duas propriedades leiteiras e avaliação custo/benefício da antibioticoterapia. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 7, n.1, p. 14-19, 2004.
- CURRIE, D.; LYNAS, L.; KENNEDY, D.G.; MC CAUGHEY, W.J. Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. **Food Addit Contam**, London, v.15, n.6, p.651–660, 1998.
- DENOBILO, M. **Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxicilina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2002. 121 p. Dissertação de Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DEWDNEY, J.M.; MAES, L.; RAYNAUD, J.P; BLANC, F.; SCHEID, J.P; JACKSON, T.; LENS, S.; VERSCHUEREN, C. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immuno-allergic potential. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.29, n.7, p.477–483, 1991.
- DUTTA, G.N.; DUTTA, R.; BURAGOHAJ, J.; MILLI, D.C., Antibiotic residues in milk after treatment of bovine mastitis. **Indian J. Dairy Sci.**, v.54, n. 6, p.322-325, 2001.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Gado de leite - – **Classificação mundial dos principais produtores de leite** – 2004. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/leite/index.php>. Acesso em: 18 jul. 2005.
- ERSKINE, R.J.; WILSON, R.C.; RIDDELL, M.G. JR.; TYLER, J.W.; SPEARS, H.J.; DAVIS, B.S. Intramammary administration of gentamicin as treatment for experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. **Am J Vet Res**, Chicago, v.53, n.3, p. 375–381, 1992.
- ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C.; VANLENTE, J.L; PHIPPS, C.R. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.85, n.10, p.2571-2575, 2002.
- FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J.M. Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.471-478, 1983.

FAGUNDES, H.; COSTA, E.O. Influência do medicamento, duração do período seco e volume de produção na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas na interrupção da lactação. **Revista Napgama**, São Paulo, v.5, n.2, p.15-18, 2002.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção da lactação subsequente em animais com período seco recomendado**, Pirassununga, 2004, 76p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

FAGUNDES, H.; GARINO, F.; ARCARO, J.R.P.; GUIMARAES, F.F.; COSTA, E.O. Influence of dry cow therapy in milk antimicrobial residues. In: IDF INTERNATIONAL MASTITIS CONFERENCE, 4, Maastricht, 2005. **Proceedings**. Maastricht: IDF, 2005. v.1. p.997-997. CD ROM

FDA.CODE OF FEDERAL REGULATION, Title 21 (**Food and Drugs**), vol. 6, Part 556 (Revised 1 January 2003). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm> Acesso em: 16 de agosto de 2005.

GARINO, JR. F; RIBEIRO, A.R.; SILVA J.A.B.; RIBEIRO, M.G.; COSTA E.O. Avaliação da susceptibilidade ‘in vitro’ aos antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de cepas de *Escherichia coli*, isoladas de mastite bovina. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, p.19-22, 2000.

GARINO JÚNIOR, FELÍCIO. **Avaliação da sensibilidade “in vitro” e “in vivo” de sorotipos *Escherichia coli* de casos de mastite bovina e pesquisa da produção de beta-lactamase e detecção múltipla resistência**. São Paulo, 2004 Dissertação de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo.

GEHRING, R.; HASKELL, S.R.; PAYNE, M.A.; CRAIGMILL, A.L.; WEBB, A.I. Aminoglycoside residues in food of animal origin, **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.227, n.1, p.63-66, 2005.

GIBBONS-BURGENER, S.N.; KANEENE, J.B.; LLOYD, J.W.; LEYKAM, J.F.; ERSKINE, R.J. Reliability of three bulk-tank antimicrobial residue detection assays

- used to test individual milk samples from cows with mild clinical mastitis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.62, n.11, p.1716-1720, 2001.
- GRAPHPAD INSTAT software. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993.
- GRAVE, T., GREKO, C., NILSSON, L., ODENSVIK, K., MÖRK, T. AND RÖNNING, M. The usage of veterinary antibacterial drugs for mastitis in cattle in Norway and Sweden during 1990-1997. **Prev. Vet. Med.**, Amsterdam, v.42, p. 45-55,1999.
- GRIGGS, D.J.; HALL, M.C.; JIN, Y.F.; PIDDOCK, L.J.V. Quinolones resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. **J Antimicrob Chemother**, London, v.33, n.6, p.1173-1189, 1994.
- HORNISH, R. E.; KOTARSKI, S. F. Cephalosporins in veterinary medicine – ceftiofur use in food animals. **Curr Top Med Chem**, Hilversum ,v.2, n. 7, p.717-731, 2002.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Chemical-physical confirmation tests for the detection of residues of antimicrobials in milk. **IDF Standard** Brussels, n. 358, 2000.
- JARP, J.; BUGGE, H.P.; LARSEN, S. Clinical trial of three therapeutic regimens for bovine mastitis. **Vet Rec**, London, v.124, n.24, p.630–634, 1989.
- JONES, G.F.; WARD, G.E. Evaluation of systemic administration of gentamicin for treatment of coliform mastitis in cows. **J Am Vet Med Assoc**, Schaumburg, v.197, n.6, p.731–735, 1990.
- KANG'ETHE, E.K.; ABOGE, G.O.; ARIMI, S.M.; KANJA, L.W.; OMORE, A.O.; MCDERMOTT, J.J. Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. **Food Control**, v.16, n.4, p.349-355, 2005.
- KATZ, S.E.; BRADY, M.S. Antibiotic residues in food and their significance In: **Antimicrobials in foods**, 2<sup>a</sup> ed., Davidson, P.M.; Branen. A. L.1993, cap 16, New York, Marcel Dekker, Inc.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PINTO, M.P.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v.43, n.6, p. 507-515, 1991.

- LANGONI, H; TONIN, F.B; CABRAL, K.G; CAVALIERO, M.J.; Tratamento da mastite bovina com a associação ampicilina + cloxacilina (Bovigan L). **Revista Nappama**, São Paulo, v.2, n.3, p. 21-23, 1999.
- LANGONI, H., DE ARAÚJO, W.N., DA SILVA, A.V., DE SOUZA, L.C Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacina, bem como com a sua associação. **Arq Inst Biol.**, São Paulo, v.67, n.2, p.177-180, 2000a.
- LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista Nappama**, São Paulo, v.3, n.1, p. 4-7, 2000d.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – **Produção brasileira de leite por unidades da federação**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PECUARIA/3.3.XLS>. Acesso em: 18 jul. 2005.
- MATIOLI, G.P.; PINTO, S.M.; Effect of milk from cows with mastitis on the production of fresh Minas cheese. **Rev Inst Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, p.38-45, 2000.
- McEWEN, S.A.; MEEK, A.H.; BLACK, W.D. A dairy farm survey of antibiotic treatment practices, residue control methods and associations with inhibitors in milk. **J. Food. Prot.**, Des Moines, v.54, n.6, p.454-459, 1991.
- McEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.34, n.3, p.93-106, 2002.
- MCDUGALL, S. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. **New Zealand Vet J**, v. 46, n.6, p.226–232, 1998.
- MEDEIROS, N.G.A.; CARVALHO, M.G.X.; SANTOS, M.G.O; SUELY, C.P.L.; Detecção de antibióticos no leite in natura consumido no município de Patos, Paraíba **Higiene Alimentar**, São Paulo,v.18, n.124, p.85-88, 2004.
- MEEK, A.H., MARTIN, S.W., STONE, J.B., MCMILLAN, I., BRITNEY, J.B., GRIEVE, D.J. The relationship among current management systems, production, disease and drug usage on Ontario dairy farms. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v.50, n.1, p.7-14, 1986.

- MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W., MCEWEN, S.A., MCNAB, W.B., YEE, J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- MOLINA, A.; MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; GALLEGO, L. Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy. **Vet. J.**, London, v.165, n.1, p. 84-89, 2003.
- MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; BALASCH, S.; TORRES, A.; PERIS, C.; FERNANDEZ, N. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.86, p. 1947–1952, 2003a.
- MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; MOLINA, A.; FERNANDEZ, N. Antimicrobial agent detection in ewe milk by the microbial inhibitor test (Brilliant Black Reduction Test – BRT-AiM®). **Int. Dairy J.**, Barking, v.13, n.10, p. 821–826, 2003b.
- MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; GOTTSCHALK, A. F.; MODOLO, J. R. Incidence and characterization of mastitic bovine milk antimicrobial multi-drug resistant bacteria in middle west region of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.34, n.3, p.207-210, 1997.
- MYLLYS V.; RAUTALA H.. Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers, **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.78, n.3, p. 538–545, 1995.
- NADER FILHO, A.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D.; MARA.L.A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus*, isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos.. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 4, p. 581-588, 1986
- NADER FILHO, A.; MANGERONA, A.C.S.; MOURA, E.S.; Eficácia de antimicrobiano intramamário no tratamento da mastite subclínica em vacas secas. **Revista Nappama**, São Paulo, v.5, n.2, p.12-14, 2002a.
- NADER FILHO, A.; MANGERONA, A.C.S.; MOURA, E.S. Eficácia da associação sinérgica de betalactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário da mastite de vacas em lactação **Revista Nappama**, São Paulo, v.5, n.1, p. 20-22, 2002b.

- NATZKE, R.P.; EVERETT, R.W.; BRAY, D.R. Effect of drying off practices on mastitis infection. **J Dairy Sci**, Savoy, v.58, n.12, p.1828-1825, 1975.
- NICKERSON, S.C. Immunological aspects of mammary involution. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.72, n.6, p.1665-1678,1989.
- NICKERSON, S.C. Mastitis and its control in heifers and dry cows. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE MASTITIS**, Indianapolis: 1990.
- NOUWS, J.F.M.; ZIV, G. Tissue distribution and residues of antibiotics in normal and emergency-slaughtered dairy cows after intramammary treatment. **J Food Prot.**, Ames, v.41, p. 8–13, 1978.
- NUÑEZ B. S. M., CAÑON, H., IRAGÜEN, D., ESPINOZA, S., LILLO, J., Depletion study of trimethoprim and sulphadiazine in milk and its relationship with mastitis pathogenic bacteria strains minimum inhibitory concentrations (MICs) in dairy cows. 001. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Londres, v.24, p.83-88, 2001.
- OLIVER, S.P.; SORDILLO, L. M. Udder health in the periparturient period. **J Dairy Sci**, Savoy, v. 71, p. 2584-2589, 1988.
- OSTERAS, O.; MARTIN, S.W.; EDGE, V.L. Possible risk factors associated with Penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. **J Dairy Sci**, Savoy, v.82, p. 927–938, 1999.
- PEDERSOLI, W.M.; JACKSON, J.; FROBISH, R.A. Depletion of gentamicin in the milk of Holstein cows after single and repeated intramammary and parenteral treatments. **J Vet. Pharmacol. Ther** Londres,v.18, p.457–463, 1995.
- PIDDOCK, L.J.V. Does the use of antimicrobials agents in medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, Londres, v.38, n.1, p.1-3, 1996.
- PORTUGAL, J.A.B. Influência de resíduos de antibióticos sobre a qualidade do leite para a manufatura dos produtos lácteos, Cap. 13, p.151-158 In: Brito, J.R.F.; Portugal, J.A.B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2003



- PRESCOTT, J.F., BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 3. ed., Ames:, 1988.
- PRESCOTT, J.F. Aminoglycosides and aminocyclitols. In: PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, 3a. ed.,Ames: . Eds Prescott, J.F., Baggot, J.D. & Walker, R.D. pp. 191–228. Iowa State University Press, Ames, IA. 2000a
- PRESCOTT, J F. Beta-lactam antibiotics. In: PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, 3<sup>a</sup>.ed., 2000b, p. 105–133. Iowa State University Press, Ames, IA.
- PYORALA, S.; SYVAJARVI, J.; Bovine acute mastitis. Part. II. Effect of mastitis pathogen, initial inflammatory reaction and therapy on the outcome of the disease. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlim, v.34, n.9, p.629–639, 1987.
- PYÖRÄLÄ, S. Antimicrobial treatment of mastitis – choice of the route of administration and efficacy. **Proc British Mastitis Conference** (2002) Brockworth, p 20-29 Institute for Animal Health/Milk Development Council
- RADOSTITIS, O. M.; LESLIE, W.B.; FETROW, J. Mastitis control in dairy herds In: **Herd health: food animal production medicine**. 2a.. ed. Philadelphia: Saunders, 1994. p.229-276.
- RAIA, R.B., COSTA, E.O., GARINO JR., F., WATANABE, E.T., THIERS, F.O., GROFF, M.R. Estudo da persistência de eliminação de resíduos de antibióticos no leite após tratamento sistêmico e intramamário de mastite. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, n.1, p.4-8, 1999.
- RAIA JR. R., COSTA E. O.; Influence of mastitis on the withdraw period of several intramammary and parenteral antimicrobial agents used in lactating cows. In: **INTERNATIONAL MASTITIS CONGRESS**. 12 –15 September. Vancouver. CA. 2001.
- RAIA JUNIOR, R. B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2001. 78 p. Dissertação de Mestrado - Toxicologia e

Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAIA, R.; GARINO JR, F.; COSTA, E.O. Interferência da ocorrência de inibidores naturais do leite sobre teste microbiológico comercial para detecção de resíduos de antimicrobianos. **Revista Napgama**, São Paulo, v.6, n.1, p.10-14, 2003.

RAIA, R.; GARINO JR, F.; COSTA, E.O Influence of mastitis in the withdraw period. In: IDF INTERNATIONAL MASTITIS CONFERENCE, 4, Maastricht, 2005. **Proceedings**. Maastricht: IDF, 2005, v.1, p.995-996. CD-ROM:

RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; GARINO JR, F.; COSTA, E.O.; *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina: avaliação da susceptibilidade “in vitro” aos antibióticos, quimioterápicos e anti-sépticos. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 4, n.2, p. 16-19, 2001.

RIBEIRO, M. G. **Fatores de Virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina clínica e subclínica**. 2001. 104p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSÁRIO, T. R. **Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga**, SP. 2002. 89 p. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

RUFFO, G., PICCININI, R., HUBER, H. Oxacillina nella terapia delle mastiti bovine. **Obiettivi. Doc. Vet.**, Bologna, v.4, p. 57–64, 1984.

SANTOS, M.V. Influência de resíduos de antibióticos sobre a qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. Cap. 12, p.139-149 In: Brito, J.R.F.; Portugal, J.A.B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2003

- SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. **J Am Vet Med Assoc**, Schaumburg, v. 139, p. 199-204, 1957.
- SCHOKEN-ITURRINO; NADER FILHO, A. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina. **Rev Instit Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.233, p. 29-33, 1984.
- SEYMOUR, E., JONES, G., GILLARD, M.; Comparisons of on-farm screening test for detection or antibiotics residues. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.71, p.539–544, 1988.
- SHITANDI A., GATHONI K. Evaluation of the *Bacillus calidolactis* plate for post screening assay of b-lactam antimicrobial residues in Kenyan dairies **Food Control**, v.16, p. 227–230, 2004.
- SINDAN. **Manual de Produtos Veterinários** – MPV Veículo Oficial do SINDAN, 4ª ed., São Paulo, Robe ed., 2003-2004. 1106p.
- SINGH, K.B., RANDHAWA, S.S., NAURIYAL, D.C.; SIDHU, S.S.; Clinical efficacy of Orbenin L.A. (Cloxacillin) and Ampiclox (Cloxacillin and Ampicillin) in acute mastitis. **Indian J Vet Med**, v.4, p.94–96, 1984.
- SISCHO, W.M., BURNS, C.M.,. Field trial of four cowside antibiotic residue screening test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** Schaumburg, v.202, p.1249–1254, 1993.
- SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. In: **Anual Meeting National Mastitis Council**, 21., Lousville, p.15-18,1982.
- SMITH, G.W.; GEHRING, R.; RIVIERE, J.E.; YEATTS, J.L.; BAYNES, R.E. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** Schaumburg, v.224, n.11, p.1827-1830, 2004.
- SMITH, G.; GEHRING, R.; CRAIGMILL, A.I.; WEBB, A.I; RIVIERE, J. E. Extralabel intrammary use of drugs in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** Schaumburg, v.226, n.12, p.1994-1996, 2005.

- STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Non-human antibiotic use and resistance. **Drug resistance updates.** v.3, p.2007-2009, 2001.
- TAPONEN, S.; DREDGE, K.; HENRIKSSON, B.; PYYHTIA, A.M.; SUOJALA, L.; JUNNI, R.; HEINONEN, K.; PYORALA, S. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria – a double blind field study. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Londres,. v.26, p.193–198. 2003
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.
- THIERS, F.O. **Avaliação do conteúdo celular do leite de bovinos leiteiros em diferentes fases de lactação e do tanque de expansão de propriedades produtoras de leite do estado de São Paulo e Minas Gerais.** 1999. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- THIERS, F.O.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; COSTA, E.O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test” (CMT) no leite de vacas. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, n.4, p.9-12, 1999.
- THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**, 2<sup>a</sup>.ed., Roca, São Paulo, 556p., 2004
- WATANABE, E. T.. **Avaliação in vitro e in vivo do esquema de tratamento sistêmicos e intramamários para vacas em lactação e vacas no período seco.** 1999. Dissertação de Mestrado Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- WATKINS, J.H.; BUSWELL, J.F.; HUTCHINSON, I. The treatment of clinical mastitis with a combination of ampicillin and cloxacillin. **Vet Rec**, v.96, p.289–290, 1975.
- WHITTEM, T.; HANLON, D. Dihydrostreptomycin or streptomycin in combination with penicillin in dairy cattle therapeutics: a review general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In and re-analysis of published data, Part 1: Clinical pharmacology. **New Zealand Vet J**, v.45, p.178–184,1997a.

WHITTEM, T.; HANLON, D. Dihydrostreptomycin or streptomycin in combination with penicillin in dairy cattle therapeutics: a review and re-analysis of published data, Part 2: Resistance and residues. **New Zealand Vet J**, v.45, p.223–229, 1997b.

WHO - The medical Impact of the use of Antimicrobials in Food Animals, Report and **Proceedings of a WHO meeting**, Berlim, Alemanha, 13-17 Outubro, 1997.

WINOKUR, P.L.; VONSTEIN, D. L.; HOFFMAN, L. J. ;UHLENHOPP, E. K. ; DOERN, G. V.. Evidence for transfer of CMY-2 ampC - lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Ames, v. 45, n. 10, p. 2716–2722, 2001.