

REDUÇÃO DO TEMPO DE LEITURA DO TESTE DELVO-TEST® SP NT PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE CRU REFRIGERADO¹

Jorge Luiz Pereira Martins², Adriano França da Cunha³, Talita Oliveira Maciel Fontes², Junio Cesar Santos², Rayssa Gomes Alves⁴, Sárah Siqueira Ferreira²

Resumo: *O Delvo-Test® é um teste para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite na indústria. Entretanto, o tempo de leitura foi reduzido de 3,5 horas para três horas, causando dúvidas quanto aos resultados. Portanto, objetivou-se avaliar a eficiência do teste Delvo-Test® SP NT com tempo de leitura reduzido, comparando os resultados de 236 amostras de leite cru refrigerado com o teste de referência de Cloreto de Trifeniltetrazolium (TTC). Observou-se que os resultados do teste Delvo-Test® com leitura de três e 3,5 horas tiveram concordância significativa ($p > 0,05$) com os resultados do teste de TTC. Os resultados do Delvo-Test® com leitura a três horas e 3,5 horas também tiveram concordância significativa ($p > 0,05$). O Delvo-Test® SP NT é eficaz e pode ser utilizado por laticínios para controle de qualidade do leite, mesmo com leitura reduzida para três horas.*

Palavras-chave: *Inibidores, lácteos, qualidade, TTC*

Abstract: *The Delvo-Test® is a test for the detection of antimicrobial residues in dairy industry. However, the reading time was reduced from 3.5 hours to three hours, leading to doubt as to the results. Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of Delvo-Test® SP NT with reduced reading time, comparing the results*

¹Parte do Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor;

²Graduando(a) em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: jorgepm2704@hotmail.com; ; talitaomf95@hotmail.com

junio16cesar@gmail.com; siqueirasarah@hotmail.com

³Professor em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: adrianofcunha@hotmail.com.br

⁴Graduanda em Engenharia Química – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: rays-salves@hotmail.com;

of 236 samples of refrigerate raw milk with the reference test Triphenyltetrazolium Chloride (TTC). It was observed that the Delvo-Test® results with reading to three hours and 3.5 showed significant correlation ($p > 0.05$) with the TTC test results. The Delvo-Test® results with reading to three hours and 3.5 hours were also significant agreement ($p > 0.05$). The Delvo-Test® SP NT is effective and it can be used by dairies for quality control of milk, even with reduced reading for three hours.

Keywords: Dairy, inhibitors, quality, TTC

Introdução

A mastite, inflamação da glândula mamária causada principalmente por agentes bacterianos, é uma enfermidade que afeta negativamente a composição do leite. Em função da doença, antimicrobianos são utilizados nos rebanhos, em muitos casos, de maneira indiscriminada (NASCIMENTO, 2001). Entretanto, estes podem afetar a produção de derivados lácteos, causar efeitos tóxicos e alergias, além de favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes e alterar a constituição da biota intestinal humana (MARTIN, 2011; COSTA, 2009).

O Delvo-Test® é um teste de detecção de resíduos de antimicrobianos que tem como princípio a difusão de amostra de leite em ágar contido em ampola de plástico. Neste ágar é colocada a amostra de leite em contato com *Bacillus stearothermophilus* sensível, para que este seja cultivado. Caso o leite não tenha inibidores, a bactéria acidifica o meio, mudando sua coloração em razão da presença do indicador púrpura de bromocresol. Caso o leite contenha inibidores, a coloração do meio não se altera devido a inibição da bactéria (BENETTI, 2011).

O tempo de incubação das ampolas de Delvo-Test® a 64°C pode variar, sendo que tempos de incubação de 2,5 horas resultam em maior ocorrência de resultados falsos positivos quando comparado a tempos de três e 3,5 horas (DSM, 2011). O cultivo pelo Delvo-Test® era realizado em 3,5 horas. Esse tempo

foi reduzido para três horas, a fim de tornar o teste mais rápido. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do teste Delvo-Test® para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite cru refrigerado, considerando a redução do tempo de leitura.

Material e Métodos

Foram coletadas 236 amostras de leite cru refrigerado de propriedades leiteiras localizadas em diferentes regiões de Minas Gerais: Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba, Central Mineira, Oeste de Minas, Vale do Rio Doce, Vale do Mucuri, Zona da Mata, Campo das Vertentes, Sul de Minas e Norte de Minas. As coletadas foram realizadas de acordo com Brito et al. (2007) e levadas abaixo de 7°C para o laboratório.

As amostras foram submetidas à determinação de inibidores por meio do teste de Delvo-Test® SP NT. Do Kit, a quantidade necessária de ampolas foi removida para a realização do teste, tomando os devidos cuidados para não danificar a cobertura do restante das ampolas. Na moldura da ampola foi aberto um orifício na folha de alumínio e marcada com um número para a identificação da amostra. Em seguida foi pipetado 0,1 mL da amostra de leite e transferido para as ampolas através da lâmina superior, em linha reta, para o meio-ágar. As ampolas foram incubadas em “banho maria” a 64°C por três horas (DSM, 2011).

A leitura do teste Delvo-Test® foi realizada no período de três horas, de acordo com as recomendações do laboratório, e novamente, no período de três horas e meia. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com a cor do meio após os períodos de incubação, sendo: amarelo ou marrom, negativo; violeta ou azul, positivo.

As amostras também foram submetidas ao teste padrão de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazolium (TTC) para avaliar a eficiência do teste Delvo-Test®. Para isto, 10mL de leite foram transferidos para o tubo de ensaio, aquecidos em “banho-maria” a 80°C por 15 minutos e deixado resfriar a 45°C.

Depois, 1mL de cultura de iogurte foi inoculado e o material foi incubado a 45°C por duas horas. Após ativação das bactérias do iogurte, 300µL de TTC foram adicionados, para que novamente o tubo fosse incubado a 45°C por 30 minutos. A leitura foi realizada de acordo com a coloração da amostra, sendo: rosa (negativo) e branco (positivo) (TRONCO, 2008).

Os resultados do teste de TTC e Delvo-Test® lido à três e 3,5 horas foram submetidos ao teste de McNemar, sendo calculada a Odds Ratio e seu intervalo de confiança. Toda a análise foi realizada em software GraphPad InStat (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA), ao nível de 5% de significância. A pesquisa foi aprovada pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão (NUPEX) da Faculdade União do Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA) sob número de protocolo 090/2015-I.

Resultados e Discussão

Observou-se que os resultados do teste Delvo-Test® com leitura de 3,5 horas apresentaram concordância significativa ($p > 0,05$) com os resultados do teste de TTC (Tabela 1). A chance dos resultados coincidirem é duas vezes maior do que os resultados não coincidirem.

Tabela 1. Concordância dos resultados obtidos entre os testes TTC e Delvo-Test® SP NT com leitura após 3,5 horas de incubação das amostras de leite

TTC	Delvo-Test® 3,5h.	Total	p*	OR**	ICOR***	
	+	-				
+	15	1	16	1,000	2	0,1-117,9
-	2	218	220			
Total	17	219	236	-	-	-

* Valor $p > 0,05$ indica concordância entre testes; **OR = Odds Ratio; ***ICOR = Intervalo de Confiança da Odds Ratio.

O método TTC é um dos testes utilizados como referência para a detecção de antimicrobianos no leite (TRONCO, 2008). Entretanto, devido ao empecilho do seu tempo prolongado, o TTC é substituído por testes mais rápidos e fáceis de serem executados, como o Delvo-Test®. Portanto, o teste Delvo-Test® possui resultados fidedignos, podendo ser utilizado com leitura a 3,5 horas.

Mesmo o Delvo-Test® sendo realizado com leitura a três horas, os resultados apresentaram concordância significativa ($p > 0,05$) com os resultados do teste de TTC (Tabela 2). A chance dos resultados coincidirem é sete vezes maior do que os resultados não coincidirem. Portanto, a leitura do teste pode ser realizada com três horas de incubação das ampolas, o que permite resultados mais rápidos para a indústria de lácteos.

Tabela 2. Concordância dos resultados obtidos entre os testes TTC e Delvo-Test® SP NT com leitura após 3 horas de incubação das amostras de leit

TTC	Delvo-Test® 3h.	Total	p*	OR**	ICOR***	
	+	-				
+	15	1	16	0,077	7	0,9-315,5
-	7	213	220			
Total	22	214	236	-	-	-

* Valor $p > 0,05$ indica concordância entre testes; **OR = Odds Ratio; ***ICOR = Intervalo de Confiança da Odds Ratio.

Após o período de incubação, ácido láctico suficiente é produzido pelo crescimento e multiplicação do *Bacillus stearothermophilus*, bactéria que utiliza a glicose desconjugada da lactose. Isto altera a coloração do meio, o que pode ser notado pelo avaliador (DSM, 2011). Portanto, mesmo com tempo reduzido para três horas, as bactérias conseguiram crescer e acidificar o meio, tornando-se perceptível a mudança de sua coloração.

Comparando os resultados do Delvo-Test® com leitura a três horas e 3,5 horas, observou-se que houve concordância significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3). A chance dos resultados coincidirem é infinita vezes maior do que os resultados não coincidirem. Isto reforça o que foi observado na Tabela 2, ou seja, o Delvo-Test® pode ser executado com incubação das amostras a três horas para permitir resultados mais rápidos.

Tabela 3. Concordância dos resultados obtidos do teste Delvo-Test® SP NT com leitura após 3 e 3,5 horas de incubação das amostras de leite

Delvo-Test® 3h.	Delvo-Test® 3,5h.	Total	p*	OR**	ICOR***
	+	-			
+	17	5	22	0,073	∞
-	0	214	214		
Total	17	219	236	-	-

* Valor $p > 0,05$ indica concordância entre testes com leituras em tempos diferentes; **OR = Odds Ratio; ***ICOR = Intervalo de Confiança da Odds Ratio.

Mesmo sendo realizado com leitura após três horas de incubação das amostras, o Delvo-Test® se mostrou confiável. Os resultados da Tabela 3 confirmam o que foi notado por meio dos dados da Tabela 2. O tempo de três horas é suficiente para que haja crescimento e multiplicação das bactérias, consequente acidificação do meio e alteração perceptível de sua coloração (DSM, 2011).

Conclusões

A utilização do Delvo-Test® SP NT para detecção de inibidores como resíduos de antimicrobianos é eficaz, podendo ser utilizado por indústrias de lácteos para controle de qualidade do leite. Além disto, o tempo de leitura pode ser reduzido de 3,5 horas para três horas.

Referências Bibliográficas

BENETTI, T.M; ABRAHÃO, W.M; NICKEL, R. Análise comparativa entre os ensaios imunoenzimáticos e microbiológicos para detecção de resíduos de antibióticos em leite. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.66, n.381, p.41-45, 2011.

COSTA, A.S; LOBATO, V. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.64, n.367, p.72-76, 2009.

DSM Bright Science Brighter Living. Instruction for use Delvo-Test® SP NT Ampoules. 2011. 1p. Disponível em: https://www.dsm.com/content/dam/dsm/foodandbeverages/en_US/documents/delvotest-sp-nt-ampoules-instruction-for-use-en.pdf Acesso em 18 de outubro de 2015.

MARTIN, J.G.P. Resíduos de antimicrobianos em leite: uma revisão. Revista Segurança Alimentar e Nutricional, v.18, n.2, p.80-87, 2011.

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

TRONCO, V.M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 3ª Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2008, 168p.

MARTINS, J.L.P.; CUNHA, A.F.; FONTES, T.O.M. Redução do tempo de leitura do teste Delvo-Test® SP NT para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite cru refrigerado. In: VIII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, 8, 2016, Viçosa. Anais... Viçosa: FACISA, Outubro, 2016.