



Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos*

Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine

Jalusa Deon Kich^{1,2}, Luciane Martins Borowsky¹, Virginia Santiago Silva², Marni Ramenzoni², Nelise Triques², Felipe Leonardo Kooler² & Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso³

RESUMO

Os aspectos relacionados a biossegurança, limpeza e desinfecção são os principais componentes de programas de controle da infecção por *Salmonella* sp. em rebanhos suínos. Dessa forma, a eleição de um desinfetante eficaz deve ser a primeira etapa do protocolo de controle. A partir disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de seis desinfetantes comerciais (amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo, hipoclorito de sódio (1 e 0,1%), fenol e ácido peracético) frente a amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos. O trabalho foi conduzido em duas etapas: na primeira, os desinfetantes foram testados frente a uma amostra padrão de *Salmonella* Typhimurium, na presença e ausência de matéria orgânica, sob duas diferentes temperaturas, em tempo de contato de 15 minutos. Na segunda etapa os desinfetantes foram avaliados frente a 8 amostras de *Salmonella* Typhimurium, com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos, por um tempo de contato de 5 minutos. Todos os desinfetantes foram eficazes na ausência de matéria orgânica e nas duas temperaturas testadas. Entretanto, quando na presença de matéria orgânica, somente o hipoclorito de sódio (1%), fenol e o ácido peracético foram eficazes. Da mesma forma, os desinfetantes a base de hipoclorito de sódio (1%), fenol e ácido peracético foram os mais eficazes frente a todas amostras testadas após cinco minutos de contato. As observações indicam que a eficácia dos desinfetantes frente às amostras de *Salmonella* sp. esteve mais relacionada com as condições de utilização, principalmente quanto à presença de matéria orgânica e tempo de exposição, do que com o perfil de resistência apresentado pelas diferentes linhagens.

Descritores: desinfetantes, *Salmonella* Typhimurium, programa de controle.

ABSTRACT

Measures related to biosecurity and hygiene, are major components of control programs for *Salmonella* infection on swine farms. Thus, the first step of control programs is the adoption of effective disinfectants. In this study, the effectiveness of six disinfectants (quaternary ammonium, glutaraldehyde, iodophor, sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid) was tested against strains of *Salmonella* sp. isolated from pigs. The test was conducted in two phases: on the first assay a *Salmonella* Typhimurium reference strain was submitted to a 15 minutes contact with each disinfectant, in presence or in absence of organic matter and under two different temperatures. On the second assay, disinfectants were evaluated against 8 porcine *Salmonella* Typhimurium strains, presenting different antibiotic resistance profiles, with a contact time of 5 minutes. All disinfectants were effective in the absence of organic matter at both tested temperatures. However, when organic matter were included on the assay, only sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid were effective. Furthermore, sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid were also the most effective against porcine *Salmonella* Typhimurium strains after five minutes of contact. These results indicate that the effectiveness of the tested disinfectants was more related to the presence of organic matter and exposure time than to the resistance profile presented by the tested strains.

Key words: disinfectants, *Salmonella* Typhimurium, control programs.

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* sp. é considerada uma das mais importantes causas de doença de origem alimentar em humanos, sendo os produtos de origem animal um dos principais veículos de transmissão [6,9].

A prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate no Rio Grande do Sul, nos anos de 1999/2000, foi estimada em 55%, sendo o sorovar Typhimurium o mais freqüente [2]. Estes dados indicam que o animal portador tem sido o principal fonte de introdução de *Salmonella* sp. na linha de abate, podendo chegar ao produto final.

Inúmeros fatores de risco têm sido associados à ocorrência de infecção por salmonelas em suínos, entre os quais o tipo de ração [3,12]; mistura de animais de diferentes origens na creche e terminação [17]; e o contato com o microrganismo em fases zootécnicas anteriores à terminação [4]. Entretanto, os aspectos relacionados à biossegurança, limpeza e desinfecção, controle de vetores e manejo pré-abate sempre são os principais componentes de programas de controle [8, 19].

O Código Zoonosológico Internacional, ao abordar medidas de higiene e segurança sanitária na produção animal, alerta sobre a existência de poucos desinfetantes universais e da necessidade do controle da atividade dos produtos existentes. Variáveis como a amostra do microrganismo de interesse e a concentração do produto recomendada pelo fabricante devem ser submetidas à avaliação para comprovar sua efetividade.

Uma vez que a eleição do desinfetante deve ser uma das etapas de um protocolo de controle de *Salmonella* sp., este estudo teve como objetivo avaliar a atividade de seis desinfetantes comerciais, amplamente utilizados em suinocultura, frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, os desinfetantes foram testados frente a uma amostra padrão de *Salmonella* Typhimurium na presença e ausência de matéria orgânica e em duas diferentes temperaturas. Na segunda etapa os desinfetantes foram avaliados, numa só condição de teste, frente a diferentes amostras de *Salmonella* Typhimurium.

Etapa 1:

Amostra: foi adotada como padrão uma amostra de *Salmonella* Typhimurium isolada na Embrapa Suínos e Aves, estocada com a identificação 7430, e sorotipada pelo FIOCRUZ nº IOC 3485, originada de um surto de diarreia em suínos.

Desinfetantes: no Quadro 1 estão descritos os desinfetantes testados, seus respectivos desinibidores [12, 25] e recomendação de uso pelo fabricante.

Delineamento experimental: os tratamentos consistiram na utilização dos diferentes desinfetantes na diluição recomendada pelo fabricante, sob quatro diferentes condições:

Tratamento 1 (T1): 10°C, sem matéria orgânica;

Tratamento 2 (T2): 30°C, sem matéria orgânica;

Tratamento 3 (T3): 10°C, com matéria orgânica;

Tratamento 4 (T4): 30°C, com matéria orgânica.

O controle consistiu em submeter a amostra padrão às mesmas condições, porém na ausência do desinfetante. Todos os ensaios foram realizados em cinco repetições.

Protocolo do teste: a metodologia utilizada foi adaptada da diluição em tubos e inoculação em placas [15]. Foram preparados 28 tubos contendo 1mL de suspensão bacteriana (inóculo) contendo aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Aos tubos pertencentes aos tratamentos com adição de matéria orgânica (CMO) foram adicionados 250µL de soro bovino estéril. Nos tubos correspondentes aos tratamentos sem matéria orgânica (SMO), foi adicionada a mesma quantidade de PBS. Esta mistura permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos, enquanto os desinfetantes eram diluídos conforme indicação do fabricante. A seguir, a esses tubos foi acrescido 1mL de desinfetante e foram incubados por 15 min a 10°C ou a 30°C, conforme o tratamento. Os tubos controles foram submetidos às mesmas condições, sendo acrescido 1mL de PBS ao invés de desinfetante. Após a incubação, foram adicionados 7,75mL do respectivo desinibidor aos tubos tratamento e a mesma quantidade de PBS, aos controles. Finalmente, foi determinado o número de UFC de *Salmonella* Typhimurium/mL nos tubos tratamento e controle, através da técnica de contagem em superfície [23].

A atividade desinfetante foi expressa através da redução decimal (DR) de 4 log (10^4) das UFC [5] entre o controle (C) e o teste (T), calculado pela fórmula $RD = \log C - \log T$.

Quadro 1. Identificação e composição dos desinfetantes utilizados no presente estudo, respectivos desinibidores e diluição de uso recomendada pelo fabricante

Produto	Composição	Desinibidor	Diluição de uso
Amônia Quaternária	Cloreto de Alquil dimetil amônio (80g /100mL)	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80 e lecitina 0,07%	1 :2000
Glutaraldeído + Cloreto de Benzalcônio	Glutaraldeído 42,5g Cloreto de Benzalcônio 7,5g	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80 e 5% de soro de coelho	1 :1000
Iodóforos	Iodophor contendo 2,3% de iodo ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :500
Hipoclorito de Sódio 1%	Hipoclorito de sódio com 10 a 12% de cloro ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :10
*Hipoclorito de Sódio 0,1%	Hipoclorito de sódio com 10 a 12% de cloro ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :100
Fenol	Orto-fenilfenol 12% Orto-benzil paraclorofenol 10% Para-terciário amilfenol 4%	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80	1:250
Ácido Peracético	Acido peracético 15% Peróxido de hidrogênio 23% Ácido acético 16%	Tiosulfato de sódio 2g/litro no meio de TSA	1 :3000

* utilizado apenas na primeira etapa do trabalho

Etapa 2:

Amostras: foram utilizadas 10 amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos, sendo 5 multi-resistentes (resistentes a >4 antimicrobianos) e 5 não multi-resistentes (resistentes a <4 antimicrobianos). A amostra padrão da primeira etapa foi testada paralelamente.

Protocolo do teste: foi adotado o método de diluições, descrito anteriormente [20], com modificações. A quantidade de 180µL do desinfetante a ser testado, na diluição recomendada pelo fabricante, foi pipetada no primeiro poço de cada linha de uma placa estéril de cultivo celular. Nos demais poços (3-12) foram colocados 180µL de BHI. A seguir, 20µL da amostra cultivada em BHI (18h), contendo aproximadamente 10⁸UFC/mL, foram acrescentados ao primeiro poço. Após 5 min de contato com o desinfetante, foram retirados 20µL da suspensão do primeiro poço (10⁻¹) e adicionados ao poço 3 (10⁻²), seguindo-se deste modo sucessivamente nos demais poços até a diluição de 10⁻⁸. O segundo poço ficou vazio para facilitar a manipulação das diluições na placa. Todas as amostras testadas foram submetidas a um tratamento controle, o qual consistiu em contato com caldo BHI por 5 min, seguido de diluições geométricas. Após incubação a

37°C/18h a redução nas contagens foi determinada pela comparação da última diluição em que houve crescimento (turvação do caldo) nos tratamentos com o resultado do crescimento encontrado no controle. A atividade desinfetante foi expressa como descrito na primeira etapa.

RESULTADOS

Na ausência de matéria orgânica, todos os desinfetantes foram eficazes nas duas temperaturas testadas, após 15 min de contato (Tabela 1). Dois produtos, hipoclorito de sódio (1%) e ácido peracético, foram eficazes, independente das condições de matéria orgânica e temperaturas testadas. Por outro lado, na presença de matéria orgânica os produtos a base de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%), glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram prejuízo em sua atividade. Em uma das observações, na presença de matéria orgânica a 10°C, o desinfetante a base de fenol não teve a atividade esperada, embora nas demais repetições tenha se mostrado eficaz.

Na segunda etapa, os desinfetantes a base de amônia quaternária, glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo que tiveram, anteriormente,

Tabela 1. Número de repetições em que houve redução decimal mínima de 4 log (RD>4) no número de unidades formadoras de colônia de uma amostra de *Salmonella* Typhimurium padrão após contato de 15 min, a 10 ou 30°C, com seis desinfetantes comerciais, na presença e ausência de matéria orgânica.

Desinfetante	SMO		CMO	
	10°C	30°	10°C	30°
Amônia quaternária	5/5	5/5	2/5	2/5
Glutaraldeído/cloreto de benzalcônio	5/5	5/5	0/5	0/5
Iodóforos	5/5	5/5	0/5	0/5
Hipoclorito de sódio (1%)	5/5	5/5	5/5	5/5
Hipoclorito de sódio (0,1%)	4/4	4/4	0/4	1/4
Derivado de fenol	5/5	5/5	4/5	5/5
D6: Ácido peracético	5/5	5/5	5/5	5/5

SMO: sem matéria orgânica; CMO: com matéria orgânica

Tabela 2. Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium que apresentaram redução decimal mínima de 4 log (RD>4) no crescimento bacteriano, ao contato de 5 minutos com seis desinfetantes comerciais.

Desinfetante	S.Typhimurium MR	S.Typhimurium NMR	S.Typhimurium padrão
Amônia quaternária	0/5	0/5	-*
Glutaraldeído/cloreto de benzalcônio	0/5	0/5	-
Iodóforos	0/5	0/5	-
Hipoclorito de sódio 1%	5/5	5/5	+
Derivado de fenol	5/5	5/5	+
Ácido peracético	5/5	5/5	+

MR: multi-resistente (resistente a >4 antimicrobianos); NMR: não multi-resistente (resistente a <4 antimicrobianos); * (-) sem redução/(+) com redução.

sua atividade prejudicada pela matéria orgânica, quando colocados em contato com os inóculos por um tempo menor (5 min), também apresentaram menor eficácia (Tabela 2). Os demais desinfetantes, hipoclorito de sódio (1%), derivado de fenol e ácido peracético, foram eficazes frente a todas as amostras testadas.

Não houve diferença de sensibilidade aos desinfetantes entre os grupos de amostras de *Salmonella* Typhimurium multi-resistente e não multi-resistente. A amostra padrão apresentou sensibilidade similar às demais amostras testadas.

DISCUSSÃO

Vários princípios ativos estão disponíveis no mercado, sendo que os mais utilizados na suinocultura são os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo e hipoclorito. Os derivados fenólicos têm experimentado utilização crescente por apresentarem ação sobre micobactérias [16] e o ácido peracético, embora exigente quanto a sua manipulação e transporte, tem a vantagem de ser biodegradável.

A perda da atividade antimicrobiana na presença de matéria orgânica é amplamente registrada

na literatura [14,18], variando com o princípio ativo do desinfetante e linhagem desafiadora, demonstrando a importância de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados em programa de controle de certos agentes infecciosos. Especificamente em granjas de suínos, dada a dificuldade da eliminação total de resíduos e o efeito comprovado da matéria orgânica sobre a atividade de desinfetantes amplamente utilizados, a sobrevivência de *Salmonella* frente a determinados produtos pode ser um fator importante da sua permanência no meio ambiente [15]. Este fato foi demonstrado anteriormente, ao comparar um grupo de granjas que utilizava desinfetantes com granjas sem programa de desinfecção. Neste estudo, os autores observaram que o grupo de granjas que apenas fazia uma lavagem com água sob pressão apresentava uma menor prevalência de animais positivos para *Salmonella* sp., quando comparado com o grupo que utilizava desinfetantes. Uma possível explicação apontada pelos autores seria o fato que a utilização de desinfetantes, muitas vezes, induz a um relaxamento das medidas de limpeza prévia, ocasionando um nível de matéria orgânica residual alto que acaba por interferir na ação do desinfetante. Desta forma, é possível afirmar que a implantação de um programa de desinfecção deve incluir procedimentos rigorosos de limpeza prévia para que seja eficaz [22].

Destaca-se o fato de que o produto a base de hipoclorito não perdeu sua atividade na presença de matéria orgânica quando testado na dose recomendada pelo fabricante (1%). Entretanto, foi inativado na concentração de 0,1%, comumente adotada na suinocultura. Os hipocloritos têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos, entre outras razões, pela sua boa efetividade contra uma grande variedade de microrganismos e por ser ativo mesmo em baixas concentrações [1].

Os resultados observados na segunda etapa deste estudo, que avaliou 11 amostras de *Salmonella* em condições de ausência de matéria orgânica, mostraram a influência do tempo de contato na eficácia de alguns desinfetantes. Ao lado disto, os resultados encontrados não apresentaram diferença frente às amostras testadas de *S. Typhimurium*, que apresentavam diferentes níveis de resistência frente a antimicrobianos e uma amostra proveniente de surto de diarreia em suínos. Observações semelhantes haviam sido feitas anteriormente em amostras de

Salmonella pertencentes a diferentes sorovares e isoladas em indústria de alimento [15] bem como amostras de *Staphylococcus aureus* [18].

O mecanismo de resistência a desinfetantes mais comum em bactérias Gram negativas é intrínseco, porém já foi especulada a possibilidade de resistência adquirida, mediada por plasmídios [14]. Neste último caso, a resistência combinada a desinfetantes e antimicrobianos, carregada por um mesmo grupo de genes, seria esperada. Entretanto, apenas em estafilococos a associação entre resistência a desinfetantes e antissépticos pôde ser demonstrada, de forma conclusiva, geralmente codificada em elementos transponíveis, carregados por plasmídios [20]. Já no caso de bactérias Gram negativas, apesar de alguns estudos haverem constatado um alto nível de resistência a desinfetantes em amostras isoladas de ambiente hospitalar, não foi possível traçar uma correlação consistente com a presença de plasmídios ou de resistência a antimicrobianos [10]. Por outro lado, observa-se que bactérias Gram negativas que apresentam mutações em sua membrana externa podem tornar-se mais sensíveis a desinfetantes [7]. Esta maior sensibilidade está relacionada ao fato de que a membrana externa deste grupo de bactérias é responsável pela maior hidrofobicidade da célula bacteriana, o que dificulta a penetração dos desinfetantes. As células mutantes, por sua vez, tendem a ser menos hidrofóbicas, propiciando uma maior concentração do desinfetante no interior da célula [14].

Estas observações indicam que a eficácia dos desinfetantes frente a *Salmonella* esteve mais relacionada com as condições de utilização, principalmente quanto a presença de matéria orgânica e tempo de exposição, do que com o perfil de resistência apresentado por linhagens presentes nas granjas. Este fato deve ser considerado nos protocolos de desinfecção a serem adotados em programas de controle de salmonela em granjas de suínos.

CONCLUSÕES

Os desinfetantes a base de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%) glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram sua atividade contra amostra de *Salmonella Typhimurium* prejudicada na presença de matéria orgânica. O tempo de contato destes desinfetantes, mesmo na ausência de matéria orgânica, afetou a eficácia do mesmo, porém não houve

REFERÊNCIAS

- 1 **Andrade N. J. & Macedo J. A. 1996.** Agentes químicos para higienização. In: *Higienização na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela, pp. 53-137.
- 2 **Bessa M.C., Costa M. & Cardoso M. 2004.** Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24:80-84.
- 3 **Bush E. J., Wagner B. & Fedorka-Cray P. J. 1999.** Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by US finishing hogs. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork* (Washington, U.S.A). pp. 106-108.
- 4 **Dahl J., Wingstrand A., Nielsen B. & Baggesen D. L. 1997.** Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by strategic movement of pigs. *Veterinary Record*. 140: 679-681.
- 5 **DEFRA. 2003.** Department for Environment, Food and Rural Affairs, UK. Disponível em www.defra.gov.uk. Acesso em 22/06/2003.
- 6 **Ekperigin H. E. & Nagaraja K. V. 1998.** Salmonella. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. 14: 17-29.
- 7 **El Falaha B. M. A, Russel A. D & Furr J. R. 1985.** Sensitivity of wild-type and envelope-defective strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* to antibacterial agents. *Microbiology*. 38: 99-105.
- 8 **Fedorka-Cray P. I., Whipp S. C., Isaacion R. E., Nord N. & Lager K. 1994.** Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology*. 41: 333-348.
- 9 **Hald T. & Wegener H. C. 1999.** Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork* (Washington, U.S.A.). pp.200-205.
- 10 **Hammond S. A., Morgan J. R. & Russel A. D. 1987.** Comparative susceptibility of hospital isolates of gram-negative bacteria to antiseptic and disinfectants. *Journal of Hospital Infection*. 9: 255-264.
- 11 **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. 1997.** *Manual de Qualidade*, POP nº 65.3210.007, Seção 10, Método da Diluição de Uso. p.17.
- 12 **Lo Fo Wong D. M. A , Hald T., van der Wolf P. I. & Swanenburg M. 2002.** Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*. 76: 215-222.
- 13 **Martins S. C. S., Soares J. B., Matos J. H. G. & Andrade A. P. S. 1994.** Atividade esporicida e bactericida de desinfetantes comerciais. *Higiene Alimentar*. 8: 21-23.
- 14 **McDonnell G. & Russell A. D. 1999.** Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 147-179.
- 15 **Moretro T., Midtgaard E. S., Nesse L. L. & Langsrud S. 2003.** Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Veterinary Microbiology*. 94: 207-217.
- 16 **Pinheiro S. R. 1999.** Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade de São Paulo.
- 17 **Quessy S., Letellier A. & Nadeau E. 1999.** Risk factor associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and control of Salmonella in Pork* (Washington, U.S.A). pp. 165-169.
- 18 **Rodgers J., McCullagh J. J., McNamee P. T., Smyth J. A. & Ball H. J. 2001.** An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associated with the poultry industry. *Veterinary Microbiology*. 82: 131-141.
- 19 **Salin pork International. 2001.** Animal Health Service. In: *IV Symposium on the Epidemiology e Control of Salmonella and other Food borne Pathogens in Pork* (Leipzig Germany). p.646.
- 20 **Sasatsu M., Shirai Y., Hase M., Nogreshi N., Kono M. , Behr H., Frurey J. & Arai T. 1995.** The origin of antiseptic-resistance gene *abr* in *S.aureus*. *Microbios*. 84: 161-169.

- 21 **Silva N., Junqueira V. C. A & Silveira N. F. A. 1997.** *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela, 295p.
- 22 **Van der Wolf P. J., Elhers A. R. W., Van der Heijden H. M. J. F., Van Schie F. W., Hunneman W. A. & Tielenn M. J. M. 2001.** *Salmonella* soroprevalence at the population and herd level in pigs in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*. 80: 171-184.
- 23 **Vargas A. C. & Weiss R. D. N. 1994.** Avaliação da atividade antibacteriana “in vitro” do proxitane. *Informação Técnica PROXITANE* 1512.