

Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009¹

Fernanda Lúcia Colla^{2*}, Laura B. Rodrigues², Elci Lotar Dickel², Anderlise Borsoi³, Vladimir Pinheiro do Nascimento⁴ e Luciana Ruschel dos Santos^{2**}

ABSTRACT.- Colla F.L., Rodrigues L.B., Dickel E.L., Borsoi A., Nascimento V.P. & Santos L.R. 2012. [*In vitro* evaluation of chlorhexidine, quaternary ammonium and peracetic acid against *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry slaughterhouse in 2005 and 2009.] Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(4):289-292. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, Passo Fundo, RS 99052-900, Brazil. E-mail: luruschel@upf.br

The objective of this investigation was to evaluate the *in vitro* sensibility of *Salmonella* Heidelberg to three commercially available disinfectants used for sanitization in poultry slaughterhouses. A total of 20 *S. Heidelberg* were tested (14 isolated in 2005 and six in 2009), and as active ingredients were used chlorhexidine (0.5%), quaternary ammonium (0.5 %) and peracetic acid (1%) at contact intervals of 5, 10, 15 e 20 minutes. All isolates were found to be sensitive to peracetic acid at four specific contact intervals. One hundred percent of *S. Heidelberg* isolated in 2005 was found to be sensitive to quaternary ammonium, while 33% of 2009 isolates were resistant at a 5-minute contact interval and 16.6% at 10-minutes. With respect to chlorhexidine, 25% of the 2005 isolates were resistant at a 5-minute contact interval, 33% of the 2009 isolates were resistant with the same time, and 17% at a 10-minute contact interval. It can be concluded that the highest disinfectant activity *in vitro* was found to be with peracetic acid for *S. Heidelberg* isolates in 2005 and 2009, whereas chlorhexidine and quaternary ammonium had a reduced action against 2009 isolates, indicating the progression of bacterial resistance against these sanitizers and the need for periodic evaluation and rotation of active principles for sanitization.

INDEX TERMS: Sanitizers, *Salmonella* Heidelberg, poultry slaughterhouse.

RESUMO.- Objetivou-se avaliar a ação de três princípios ativos rotineiramente utilizados na higienização de abatedouros avícolas frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas em diferentes pontos da tecnologia de abate

de um mesmo frigorífico. Foram testadas 20 amostras de *S. Heidelberg* (14 isoladas em 2005 e seis em 2009) frente a clorexidina (0,5%), amônia quaternária (0,5%) e ácido peracético (1%) nos tempos de contato de 5, 10, 15 e 20 minutos. Todas as amostras foram sensíveis ao ácido peracético 1% em todos os tempos testados. Observou-se que 100% das amostras isoladas em 2005 foram sensíveis a amônia quaternária enquanto que as isoladas em 2009 apresentaram 33% de resistência com 5 minutos de contato e 16,6% com 10 minutos de contato. Com relação à clorexidina, 25% dos isolados em 2005 mostraram-se resistentes após 5 minutos de contato enquanto que 33% das amostras isoladas em 2009 foram resistentes neste tempo e 17% no tempo de 10 minutos de contato. Pode-se concluir que o ácido peracético teve ação *in vitro* sobre as amostras isola-

¹ Recebido em 13 de setembro de 2011.

Aceito para publicação em 11 de novembro de 2011

² Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900, Brasil. *Bolsista PIBIC CNPq. **Autor para correspondência: luruschel@upf.br

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Tuiuti do Paraná, Rua Sydnei Rangel dos Santos 238, Santo Inácio, PR 82010-330, Brasil.

⁴ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

das em 2005 e 2009, enquanto que a clorexidina e a amônia quaternária tiveram sua ação reduzida frente às amostras de 2009, indicando a progressão da resistência bacteriana frente a estes sanitizantes e a necessidade de testes periódicos e rotação de princípios ativos nos programas de higienização dos frigoríficos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Sanitizantes, *Salmonella* Heidelberg, abatedouro avícola.

INTRODUÇÃO

A carne de aves e seus derivados são considerados os principais alimentos envolvidos em surtos de infecções por *Salmonella* em decorrência do preparo inadequado e da contaminação cruzada. Na prevenção da ocorrência ou na interrupção da evolução de enfermidades infecto-transmissíveis comuns aos animais e aos seres humanos, o uso de um desinfetante capaz de agir sobre o agente causal quando em vida livre, no ambiente, exerce grande importância. No entanto, a resistência microbiana, intrínseca ou adquirida, pode apresentar-se como um limitante no uso deste instrumento sanitário (Borowsky et al. 2006). As salmonelas paratíficas são tipicamente associadas a doenças não sintomáticas, mas com diferentes padrões de colonização no trato intestinal das aves. As boas práticas de fabricação nas plantas de abate podem reduzir a contaminação do produto final, sendo essencial o controle de pontos críticos ao longo de toda a cadeia de produção (Bailey et al. 1991).

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanificantes. Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (Moraes et al. 1997). Na indústria de carnes e derivados, a limpeza e sanitização é prática de extrema importância no sentido de evitar contaminação dos alimentos, que levam à perda das suas qualidades organolépticas e nutricionais, bem como a sua degradação, que pode ocasionar enfermidades de maior ou menor gravidade ao homem (Pardi et al. 1995).

Este trabalho objetivou avaliar a ação *in vitro* de três sanitizantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas em um mesmo abatedouro de aves em diferentes períodos (2005 e 2009) a fim de se observar a resistência ou sensibilidade destes isolados frente a produtos de uso rotineiro nos programas de higienização dos frigoríficos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 20 amostras de *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladas do mesmo abatedouro em 2005 (14 amostras, sendo as SH 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 e 14 isoladas de carcaças antes do *chiller*; SH 3, 9, 10 e 13 de carcaças depois do *chiller* e SH 15 e 16 de suabes de cloaca) e em 2009 (seis amostras) isoladas de pontos críticos de abatedouro de aves, sendo quatro SH provenientes de aves após a depenagem e duas SH isoladas de amostras de água do *chiller*. Utilizou-se metodologia adaptada para quantificação de *Salmonella*

(Desmidt et al. 1998, Dufrenne et al. 2001), como segue: *pools* de *swabs* de cloaca foram colocados em 50mL de água peptonada 1% (AP 1%) e incubados a 37°C por 12 horas. Nas análises de água inoculou-se 100mL da amostra em 50 mL de AP 1% com concentração tripla e incubou-se por 12 horas a 37°C. Os frangos e carcaças foram acondicionados em sacos estéreis com capacidade para 4000mL, adicionados 150mL de AP 1%, agitados manualmente por um minuto e o caldo de rinsagem incubado por 12 horas a 37°C. Após incubação foram feitas diluições decimais da AP 1% em caldo Rapaport Vassiliadis (RV), sendo inoculados 1mL de AP 1% em 9mL de caldo RV até a diluição 10^{-3} e os caldos RV incubados por 24h a 41°C em banho-maria, com agitação. Após este período foram semeados com alça de Drigalski 100µL de cada diluição de caldo RV em Agar Rambach e Agar XLD, em duplicata, e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias compatíveis com *Salmonella* foram reisoladas em Agar Rambach, incubadas a 37°C/ 24 horas e submetidas a provas bioquímicas (inoculação em TSI, LIA, SIM e caldo uréia) e Agar nutriente para sorologia com anti-soro polivalente O para *Salmonella* (Difco®). A identificação final das salmonelas foi realizada por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR, Premi®Test *Salmonella* DSM).

Para os testes de eficácia de desinfetantes as amostras foram testadas frente a clorexidina 0,5%, amônia quaternária amônio 0,5% e ácido peracético 1%. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de diluição com teste de suspensão (Brasil 2003). As bactérias foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 18 horas a 37°C para obtenção de fase estacionária. Em tubos estéreis colocou-se 9mL do desinfetante a ser avaliado, 1mL de leite integral UHT (Ultra High Temperature) e 100µL da cultura teste. Utilizou-se os tempos de contato de 5,10,15 e 20 minutos e repicou-se uma alíquota de 10µL para tubos com 5mL de BHI (Brain Heart Infusion). Após 96 horas de incubação a 37°C, considerou-se as bactérias resistentes (R) quando o meio de cultura apresentou turbidez e sensíveis (S) na ausência de turbidez (Beltrame 2009).

RESULTADOS

Todas as amostras isoladas em 2005 mostraram-se susceptíveis a amônia quaternária 0,5%, enquanto que as amostras isoladas em 2009 apresentaram resistência de 33,3% com 5 minutos de contato e de 16,6% com 10 minutos de contato. Vinte e cinco por cento das amostras de 2005 mostraram-se resistentes a clorexidina 0,5% com 5 minutos de contato e, considerando as amostras de 2009, observou-se resistência de 33,3% com 5 minutos de contato e 17% com 10 minutos. Todas as amostras foram sensíveis ao ácido peracético 1%. Das nove amostras isoladas em 2005 de carcaças de frango antes do *chiller*, três delas apresentaram resistência à ação da clorexidina. Quando testadas frente a amônia quaternária e ácido peracético, apresentaram 100% de sensibilidade. As quatro amostras isoladas de carcaças de frango após o *chiller* foram sensíveis ao ácido peracético e à amônia quaternária e apenas uma das amostras foi resistente à clorexidina. As amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de *swabs* cloacais foram sensíveis a todos os sanitizantes avaliados. Dentre as amostras isoladas em 2009 após a depenagem, 50% foram resistentes a ação da amônia quaternária 0,5% e clorexidina 0,5%, sendo que apenas uma das amostras foi resistente aos dois sanitizantes. As amostras isoladas neste mesmo ano da água do *chiller* foram sensíveis a todos os sanitizantes testados.

DISCUSSÃO

O ácido peracético possui excelente ação sanitizante e esporicida. Neste estudo apresentou 100% de ação frente a todas as amostras nos quatro tempos de contato. A boa ação deste produto leva a duas inferências: (1) o teste *in vitro* é um indicativo da ação do produto, devendo-se levar em consideração a importância da higienização prévia das superfícies dos frigoríficos para melhor atuação deste princípio ativo; (2) mesmo produtos com boa ação devem sofrer alternância com outros produtos eficazes visando a não progressão de resistência bacteriana.

A clorexidina foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de amplo espectro. Neste estudo, os resultados indicaram um processo de desenvolvimento de resistência a este sanitizante, que apresentou um índice de resistência de 25% entre as amostras de SH isoladas em 2005 e uma progressão para 33,3% em 2009. Beltrame (2009), observou um incremento da eficiência da clorexidina quando a temperatura do diluente é elevada de 10°C para 45°C, sendo que o sanitizante mostrou-se eficaz mesmo na concentração de 0,2% em 18 minutos de tempo de contato.

Os compostos de amônia quaternária são detergentes catiônicos sintéticos que possuem atividade antimicrobiana, boa estabilidade, solubilidade em água e toxicidade relativamente baixa (Pelczar et al. 1980). A amônia quaternária é eficiente em baixas concentrações frente a bactérias, bolores, leveduras e vírus (Frasier 1993). Sua ação bactericida é atribuída à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação de proteínas celulares e à ruptura da membrana celular (Romão 1996). Borowsky et al. (2006) ao confrontar amostras de *Salmonella* Typhimurium a duas concentrações diferentes, 0,1mg.L⁻¹ (concentração recomendada) e 0,05mg L⁻¹ (subconcentração) de amônia quaternária observou eficiência de 100% em ambas as concentrações, com tempo de contato de 5 minutos, diferentemente do que ocorreu neste estudo onde a amônia quaternária 0,5% mostrou eficácia de 100% somente com tempos de contato superiores aos 10 minutos.

A resistência microbiana à amônia quaternária é um problema potencial em diferentes áreas da indústria de alimentos (Sundheim et al. 1998). Neste estudo este sanitizante apresentou eficácia de 100% sobre as SH isoladas em 2005. Porém, 33,3% das SH isoladas em 2009 mostraram-se resistentes após 5 minutos de contato. Beltrame (2009) verificou a eficácia de 100% da amônia quaternária 0,2%, com tempo de contato de 18 minutos, enquanto concentrações superiores mostraram-se eficazes com o tempo de contato de apenas dois minutos. Deve-se considerar que, na rotina de higienização dos abatedouros de aves, o tempo para ação do sanitizante pode ser inferior a cinco minutos, reforçando a importância do sanitizante utilizado ter ação sobre as bactérias deste ambiente em um período reduzido de tempo.

Em um estudo realizado por Sander et al. (2002), 17 amostras dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia* e *Pasteurella*, isoladas em ambiente de avicultura foram confrontadas com três grupos de desinfetantes: compostos fenólicos, quater-

nário de amônio e peróxido de hidrogênio. No caso da *Salmonella* sp., os desinfetantes do grupo dos fenóis inibiram a maioria das amostras, enquanto que o grupo do quaternário de amônio foi incapaz de promover a inativação das mesmas amostras, o que difere do resultado encontrado neste estudo, no qual o sanitizante com amônia quaternária mostrou ser ativo.

O estudo de Beltrame (2009) revelou que o melhor desempenho frente à *Salmonella* Choleraesuis foi alcançado com a utilização de ácido peracético a 10°C. Como segunda opção o autor cita o quaternário de amônio, que apresentou resultados semelhantes em todas as temperaturas testadas e a clorexidina a 45°C. No presente estudo, quando testados frente a *Salmonella* Heidelberg, estes sanitizantes apresentaram resultados semelhantes, sendo o ácido peracético o sanitizante de maior eficácia, seguido pela amônia quaternária e a clorhexidina.

Deve-se também considerar que as diluições de uso dos sanitizantes necessitam atender as especificações dos fabricantes e à legislação vigente, particularmente no que se refere a sub dosagens, que podem contribuir para a progressão da resistência bacteriana, e o excesso de produto, que embora menos frequente na rotina de sanitização, pode trazer problemas sanitários e impedimentos de comercialização.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, o ácido peracético teve ação *in vitro* sobre as amostras isoladas em 2005 e 2009, enquanto que a clorexidina e a amônia quaternária tiveram sua ação reduzida frente às amostras de 2009, indicando a progressão da resistência bacteriana frente a estes sanitizantes e a necessidade de testes periódicos e alternância de princípios ativos nos programas de higienização dos frigoríficos.

O aumento da resistência de *Salmonella* Heidelberg serve de alerta para a progressão da resistência bacteriana aos sanitizantes usados em abatedouros avícolas e para a necessidade de se documentar e inibir esta progressão.

REFERÊNCIAS

- Bailey J.S., Cox A.C. & Blankenship L.C. 1991. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring *Salmonellae* from processed broiler carcasses. *J. Food Protection* 54:354-356.
- Beltrame C.A. 2009. Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS. 78p.
- Borowsky L.M., Bessa M.C., Cardoso M.I. & Avancini C.A.M. 2006. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofores. *Ciência Rural* 36:1474-1479.
- Brasil 2003. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e águas. Secretária de Defesa Agropecuária, MAPA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p.14, 18 de setembro de 2003.
- Desmidt M., Ducatelle R. & Haesebrouck F. 1998. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* hadar in chickens. *Veterinary Microbiology* 60:259-269.

- Dufrenne J., Ritmeester W. & Van Asch 2001. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *J. Food Protection* 64:538-541.
- Frasier M.C. 1993. *Microbiologia de los alimentos*. Acribia, Zaragoza. 681p.
- Moraes M.S.V., Andrade N.J., Chaves J.B.P., Passos F.J.V. & Gomide L.A.M. 1997. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Ciênc. Technol. Aliment.* 17:325-329.
- Pardi M.C., Santos I.F., Souza E.R. & Pardi H.S. 1995. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne: riscos microbiológicos da carne*. Vol.1. UFG, Goiânia, p.294-308.
- Pelczar M. 1980. *Microbiologia*. Vol.1. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo.
- Romão C.M.C.A. 1996. Desinfecção e esterilização química, p.133-162. In: Teixeira P. (Ed.), *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Sander J.E., Hofacre C.L., Cheng I.H. & Wyatt R.D. 2002. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. *Avian Dis.* 46:997-1000.
- Sundheim S., Langsrud E.H. & Holck A.L. 1998. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. I. *Biodeterioration and Biodegradation* 41:235-239.