

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Atividade antimicrobiana dos desinfetantes Iodóforo e Cloreto de Benzalcônio  
(quaternário de Amônio) frente a cepas de *Escherichia coli* de alta patogenicidade  
(APEC) de origem aviária**

**Autora: Daiane Carvalho**

**Porto Alegre**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**Atividade antimicrobiana dos desinfetantes Iodóforo e Cloreto de Benzalcônio  
(quaternário de Amônio) frente a cepas de *Escherichia coli* de alta patogenicidade  
(APEC) de origem aviária**

**Autora: Daiane Carvalho**

**Orientador: Prof. Dr. César A. M. Avancini**

**Monografia apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Especialista em  
Produção, Tecnologia e Higiene em Alimentos de  
Origem Animal, pela Faculdade de Veterinária  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Porto Alegre**

**2015**

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Daiane

Atividade antimicrobiana dos desinfetantes Iodóforo e Cloreto de Benzalcônio (quaternário de Amônio) frente a cepas de Escherichia coli de alta patogenicidade (APEC) de origem aviária / Daiane Carvalho. -- 2015.  
29 f.

Orientador: César Augusto Marchionatti Avancini.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. desinfetantes. 2. APEC. 3. avicultura. I. Avancini, César Augusto Marchionatti, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho  
a meus pais Maria e Alcides.  
Obrigada pela confiança,  
por nunca deixarem  
de acreditar em mim!*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de ter chegado ao final de mais esta etapa na minha vida acadêmica-profissional.

Ao professor Doutor César Avancini, meu orientador, agradeço pela paciência, ensinamentos transmitidos e pela excelente orientação para que este trabalho pudesse ser concluído.

Agraço também ao professor Carlos Tadeu Pippi Salle por ter nos cedido às amostras de *Escherichia coli* utilizadas como objeto para este estudo.

Ao Doutor Benito Guimarães de Brito pela cessão do espaço físico que possibilitou a execução deste trabalho no laboratório de Saúde das Aves e Inovação Tecnológica do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

Meu muito obrigada ao Doutor Lucas Brunelli de Moraes, pelo auxílio na execução da parte prática do trabalho.

Por fim, agradeço a minha família pelo apoio e incentivo, sem os quais eu jamais teria conseguido chegar ao final de mais esta etapa.

Só me resta dizer: Muito obrigada a todos!!

“Ele não sabia que era possível.

Foi lá e fez.”

(Jean Cocteau)

## RESUMO

Visando reduzir ou eliminar a possibilidade de transmissão de micro-organismos considerados indesejáveis, ou potencialmente patogênicos, tanto nas instalações das granjas avícolas quanto nos estabelecimentos matadouros é rotineiramente adotado o procedimento de desinfecção. Contudo, características intrínsecas ou adquiridas das bactérias podem impedir sua inativação por grupos químicos antimicrobianos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi testar os compostos químicos iodóforo e cloreto de benzalcônio frente a cepas APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária) (n=10) e amostra padrão de *Escherichia coli* (ATCC 5922), a fim de avaliar/monitorar a eficácia destes desinfetantes, bem como verificar se a característica alta patogenicidade confere fator de proteção contra esses compostos antimicrobianos. O ensaio *in vitro* para verificação da eficiência dos desinfetantes foi o de diluição por meio do teste qualitativo de suspensão, observando-se a atividade sob a influência das variáveis tempos de contato (5, 10 e 20 minutos), concentrações do iodóforo (100, 75, 50 e 25 ppm) e do Cloreto de benzalcônio (300, 150, 75 e 50 ppm) e temperatura ambiente (20°C). O Cloreto de benzalcônio mostrou-se eficaz frente todos as cepas nas concentrações de 300 e 150 ppm, em todos os tempos de contato, porém a 75 e 50 ppm no tempo de cinco minutos o desinfetante não foi eficaz para uma e quatro cepas de APEC, respectivamente. O iodóforo a 100 e 75 ppm também apresentou 100% de eficácia em todos os tempos avaliados, mas a 50 ppm quatro amostras foram resistentes no tempo de cinco minutos e uma em todos os tempos de exposição. A 25 ppm o iodóforo foi eficaz apenas para dois isolados em 5, 10 e 20 minutos de contato. Concluiu-se que, nas condições do experimento, tanto o iodóforo quanto o cloreto de benzalcônio foram capazes de inativar todos os isolados de APEC confrontados, podendo ser empregados nos processos de desinfecção. A característica alta patogenicidade não pareceu promover maior grau de resistência, quando comparado com a cepa padrão, já que os resultados de suscetibilidade foram similares. Cabe enfatizar que as variáveis concentração, e tempo de contato, interferiram na atuação destes compostos devendo ser levados em consideração quando no estabelecimento e monitoramento dos protocolos de higiene.

**Palavras-chave:** desinfetantes, APEC, avicultura

## **ABSTRACT**

*In order to reduce or eliminate the possibility of transmission of microorganisms considered undesirable or potentially pathogenic it is routinely adopted the disinfection procedure, at both, poultry slaughterhouses and poultry farms. However, intrinsic or acquired characteristics of the bacteria can prevent its inactivation by antimicrobial chemical groups. In this context, the aim of this study was to test the iodophor chemical compounds and benzalkonium chloride against strains APEC (Avian pathogenic Escherichia coli) (n = 10) and standard sample of Escherichia coli (ATCC 25922), to assess / monitor effectiveness of disinfectants and verify that the highly pathogenic feature provides protection factor against these antimicrobial compounds. The in vitro assay for verification of the effectiveness of disinfectants was the dilution by means of the qualitative suspension test, observing the activity under the influence of contact time (5, 10 and 20 minutes), iodophor concentrations (100, 75, 50 and 25 ppm) and benzalkonium chloride concentrations (300, 150, 75 and 50ppm) and room temperature (20 ° C). The benzalkonium chloride proved to be effective against all the strains at concentrations of 300 and 150 ppm at all contact times, but at 75 and 50 ppm of five minutes the disinfectant was not effective for one and four strains of APEC, respectively. The iodophor at 100 and 75 ppm also showed 100% efficacy in all time periods, but at 50 ppm four samples were resistant in five minutes time and in all exposure times. At 25 ppm the iodophor is effective only for two isolated at 5, 10 and 20 minutes of contact. In conclusion, the experimental conditions, both the iodophor as benzalkonium chloride were able to inactivate all APEC isolates confronted and can be used in the disinfection process. The highly pathogenic characteristic did not appear to promote higher degree of resistance compared to standard strain, since the results have showed similar susceptibility. It should be emphasized that the variables concentration and contact time, interfere with the action of these compounds and it should be taken into account in the establishment and monitoring of hygiene protocols.*

**Keywords:** *disinfectant, APEC, poultry*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de amostras de APEC inativadas (sensíveis) pelo cloreto de benzalcônio nas concentrações de 300, 150, 75 e 50 ppm, por tempo de contato (5, 10 e 20 minutos), a temperatura de 20°C e comparação com cepa padrão 25922.....	22
Tabela 2 - Número de amostras de <i>E. coli</i> APEC inativadas (sensíveis) pelo iodóforo nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 ppm, por tempo de contato (5, 10 e 20 minutos), a temperatura de 20°C e comparação com cepa padrão 25922.....	23

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- A - Metodologia utilizada para padronização da suspensão teste dos isolados APEC de alta patogenicidade (n=10) e cepa padrão (ATCC 25922); B - Técnica aplicada para verificação da eficácia do cloreto de benzalcônio e iodóforo frente a isolados APEC de alta patogenicidade (n=10) e cepa padrão (ATCC 25922).....	21
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (APEC) e seu impacto na avicultura</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Prevenção e controle da APEC através de procedimentos de higienização no ambiente avícola</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>APEC e resistência a antimicrobianos</b> .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Local de estudo</b> .....	19
<b>3.2</b>	<b>Amostras bacterianas</b> .....	19
<b>3.3</b>	<b>Reativação das amostras</b> .....	19
<b>3.4</b>	<b>Método para avaliação da eficiência do desinfetante (BRASIL, 1993)</b> .....	19
3.4.1	Determinação contagem da suspensão teste.....	19
3.4.2	Desinfetante e preparo da diluição.....	20
3.4.3	Neutralizador da atividade desinfetante.....	20
3.4.4	Teste da atividade antimicrobiana do cloreto de benzalcônio e iodóforo.....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é uma bactéria responsável por quadros de colibacilose nas aves, considerada uma das principais doenças da avicultura industrial moderna (FERREIRA & KNÖBL, 2009). A associação deste micro-organismo a outros patógenos e também a manifestação sob a forma de celulite aviária, a qual acomete frangos de corte, resulta em um grande número de condenações em matadouros-frigoríficos (FERREIRA et al. 2012), principalmente em decorrência do aspecto da carcaça, gerando grandes prejuízos a indústria.

Este micro-organismo é encontrado frequentemente em laudos bacteriológicos de amostras clínicas e de campo, o que é justificado pela sua ampla distribuição tanto no aviário quanto nos matadouros - frigoríficos. Estima-se que é possível encontrar nos aviários cerca de  $10^6$  UFC/g de fezes, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente do ambiente avícola (GROSS, 1994). Deste total, avalia-se que entre 10 a 15% sejam representados por cepas APEC, as quais são excretadas continuamente no ambiente através das fezes dos animais (BACK, 2010). Carvalho et al., (2015) evidenciaram em amostras de *Escherichia coli* (*E. coli*) de origem ambiental potencial patogênico em mais de 50% dos isolados de campo, ratificando a importância das APEC no âmbito da sanidade avícola.

Visando reduzir a transmissão ou a quantidade de microorganismos considerados indesejáveis, no caso deste estudo a *E.coli*, trabalha-se constantemente com procedimentos de limpeza e desinfecção das instalações tanto nas granjas quanto nos matadouros – frigoríficos.

Desinfecção pode ser definida como sendo o tratamento de superfícies e equipamentos através de métodos físicos e químicos, os quais visem reduzir a um nível aceitável a quantidade de formas microbianas vegetativas (LELIEVELD et al., 2005), porém não age sobre formas esporuladas. Contudo, falhas na inativação dos microorganismos ocorrem frequentemente seja pelo uso de desinfetantes não adequados, mau uso desses ou até mesmo por resistência microbiana, entre outros (KUANA, 2009). Neste contexto, os testes laboratoriais *in vitro* são de extrema importância, já que ao se controlar algumas variáveis preconizando determinadas condições de uso, podem-se inferir os motivos de uma menor ou maior eficácia dos desinfetantes.

Diversos trabalhos de investigação detectaram que cepas APEC apresentam resistência contra antibióticos (ABREU et al., 2010; DHEILLY et al., 2012; CARVALHO et al., 2015). Por outro lado, há uma carência de estudos enfatizando a suscetibilidade destes micro-organismos frente a desinfetantes. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo testar

os compostos químicos iodóforo e cloreto de benzalcônio (composto químico quaternário de amônio) frente a cepas APEC, anteriormente classificadas como sendo do mais elevado grau de patogenicidade conforme descrito por Souza (2006), a fim de avaliar a eficácia destes desinfetantes para inativação bacteriana e posterior comparação com cepa padrão de *E. coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 APEC e seu impacto na avicultura

Micro-organismo componente da microbiota intestinal dos mamíferos e das aves, a *E. coli* é uma bactéria Gram negativa e integrante da família *Enterobacteriaceae*, caracterizando-se por possuir metabolismo aeróbio e fermentativo, atuando como anaeróbio facultativo. Nas aves, as amostras de *E. coli* que possuem fatores de virulência são designadas APEC. Dentre os diferentes patotipos, a APEC é uma representante do grupo o qual possui atuação extra – intestinal (ExPEC) e do qual também fazem parte as *E. coli* responsáveis por causar quadros de meningite em recém-nascidos (NMEC) e infecções urinárias em humanos (UPEC) (BARNES et al., 2008).

O fato das cepas APEC apresentarem fatores de virulência, facilita o desenvolvimento de enfermidade nas aves (DELICATO et al., 2003), a qual manifesta-se de forma localizada ou infecções sistêmicas, assim denominada colibacilose aviária (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A colibacilose geralmente inicia-se com a colonização do trato respiratório superior pela APEC após uma infecção causada por outros agentes patogênicos, como o vírus da doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa ou Mycoplasmoses. Outro aspecto importante são fatores ambientais, os quais podem também funcionar como facilitadores da colonização pela *E. coli*, como excesso de amônia no aviário, falta de ventilação, pó, água e cama contaminados. A forma sistêmica da doença é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões como peritonite, perihepatite, aerossaculite e pericardite em função do quadro de colisepticemia (NOLAN et al., 2013). Em matrizes, a *E. coli* infecta o oviduto através do contato com os sacos aéreos abdominais ou via cloaca e vagina, levando a um quadro de salpingite e transmitindo o patógeno verticalmente (BACK, 2010). No incubatório, o percentual de mortalidade embrionária é bastante elevado nos ovos infectados, chegando a 70%. Ainda, mesmo que o pintinho consiga nascer, pode morrer em função da septicemia ou, no caso de sobrevivência, terá o desenvolvimento a quem do esperado em relação ao restante do lote durante o período de produção no aviário, já que não foi capaz de absorver o saco vitelínico (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Além da forma sistêmica clássica, uma apresentação menos comum da colibacilose é o coligranuloma, o qual esporadicamente é encontrado em aves adultas. Os animais acometidos

apresentam nódulos branco-amarelados no fígado, ceco, duodeno mesentérico e baço. As lesões observadas são muito semelhantes aos tumores da doença de Marek e leucose aviária (BACK, 2010).

Outra importante manifestação é o desenvolvimento de dermatite necrótica, também conhecida como celulite aviária (NOLAN et al., 2013). Conforme dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2014 estimou-se que cerca de 0,6% das condenações totais e 8% das condenações parciais de carcaças de frango foram em decorrência desta enfermidade (BRASIL, 2015). Economicamente, estes percentuais representam para indústria brasileira um prejuízo de aproximadamente um milhão de dólares com condenações totais e 9,6 milhões de dólares com condenações parciais. Dentre os principais fatores de risco, é conhecido que a solução de continuidade na pele causada por traumas facilita a penetração do patógeno e instalação do quadro infeccioso no tecido subcutâneo (Quel et al., 2013). Portanto, a superlotação nos aviários é considerada um fator determinante ao aparecimento da celulite, já que arranhões e canibalismo são mais comuns neste ambiente de criação e funcionam como porta de entrada para o patógeno (DELICATO et al., 2003).

Não obstante, a associação da *E. coli* com o pneumovírus aviário vem sendo constada frequentemente, causando uma enfermidade denominada síndrome da cabeça inchada. Esta doença resulta em sinusite com edema peri e infra-orbitário, podendo levar ao comprometimento do sistema nervoso central. Dentre as lesões mais observadas, pode-se destacar edema facial, celulite e exsudato caseoso amarelado no espaço aéreo dos ossos do crânio. Nestes casos, avalia-se que *E. coli* atue de forma secundária após o quadro de sinusite causado pelo pneumovírus, sendo responsável pelo aparecimento das lesões e maior severidade da doença (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Considerando a importância deste patógeno no desenvolvimento de enfermidades às aves e os prejuízos causados ao produtor e a indústria, medidas de visem à eliminação ou redução da carga microbiana são necessárias.

Tendo em vista que a maioria das infecções naturais por *E. coli* ocorre secundariamente a falhas no manejo e outras enfermidades, é imprescindível a adoção de um rigoroso programa sanitário e a manutenção de boas práticas no ambiente de criação (BACK, 2010). Neste contexto, um bom programa de higiene e desinfecção das instalações e equipamentos é fundamental.

## 2.2 Prevenção e controle da APEC através de procedimentos de higienização no ambiente avícola

Imediatamente após a saída de um lote de aves para o abate é realizada a limpeza do aviário, a qual é subdividida em limpeza seca e limpeza úmida. A primeira consiste na retirada dos equipamentos e demais instrumentos do galpão, em seguida utiliza-se um lança-chamas a fim de eliminar as penas do ambiente, retira-se a cama, ração, matéria orgânica e sujidades impregnadas nas paredes, cortinas e utensílios. Após, é realizada a limpeza úmida através da lavagem com água sob pressão dos equipamentos, comedouros, bebedouros, paredes, teto, vigas, cortinas e muretas (JAENISCH et al., 2004). Posteriormente, é feita a aplicação de detergentes e o enxágue das superfícies.

Segundo Andrade & Macedo (1996), uma vez realizada de forma correta, a limpeza reduz a contaminação microbiana no ambiente seja por meio da ação mecânica da água ou bactericida dos detergentes. Entretanto, a quantidade remanescente de micro-organismos pode ainda permanecer em níveis altos, fazendo-se necessária a continuidade da higienização através da desinfecção.

Nos estabelecimentos avícolas o processo de desinfecção tem por objetivo destruir micro-organismos patogênicos mediante utilização de agentes químicos bactericidas (destruição da bactéria na sua forma vegetativa) ou germicidas (eliminação de bactérias, fungos e esporos) (JAENISCH et al., 2004). Dentre os desinfetantes de maior uso na avicultura, destacam-se o cloreto de benzalcônio, representante do grupo dos quaternários de amônio, e o iodóforo, representante da classe dos halogênicos (WOLFRAN, 1994).

Os compostos químicos a base de quaternário de amônio possuem atuação limitada em presença de matéria orgânica, bem como em superfícies com resíduos de detergentes aniônicos (CONY & ZOCHE, 2004). Segundo Paulino (2006), o seu mecanismo de ação dá-se através da desnaturação e precipitação das proteínas da membrana celular e citoplasma da bactéria, ocorrendo à liberação de nitrogênio e potássio. Agem também promovendo a liberação de enzimas através da quebra dos complexos lipoproteicos da bactéria. Geralmente ocorre a ligação entre o quaternário de amônio e as estruturas da parede celular bacteriana, local este onde o desinfetante desempenha sua atuação.

A amônia quaternária possui no seu espectro de ação micro-organismos Gram positivos e Gram negativos, porém não atuam sobre esporos bacterianos (PAULINO, 2006). São facilmente degradados no ambiente e atuam em uma ampla faixa de pH, sendo sua ação facilmente comprometida em locais onde a água apresenta uma dureza maior e sobre

materiais mais fibrosos (KUANA, 2009). Em relação ao risco ocupacional, não são considerados irritantes para a pele, possuem baixa toxicidade e são inodoros, além de não causarem corrosão de metais (RUI et al., 2011).

Os compostos a base de iodo apresentam uma boa atuação germicida, ou seja, agem sobre formas vegetativas e esporos. Além disso, são de baixo poder residual e mecanismo de ação tendo como princípio a desnaturação proteica. Atuam também promovendo a oxidação de aminoácidos ou pela adição do iodo aos ácidos graxos insaturados, levando a danos na parede celular e extravasamento de material intracelular (MENDES et al., 2004). Em geral, o iodo é complexado a um veículo, o qual tem por finalidade aumentar sua solubilidade, diminuir o equilíbrio das moléculas de iodo livres, além de fornecer uma fonte de liberação mais prolongada do princípio ativo. Como desvantagens do uso deste desinfetante destacam-se a má atuação sobre matéria orgânica e a possibilidade de manchar as superfícies nas quais é aplicado (MENDES et al., 2004).

### **2.3 APEC e resistência a antimicrobianos**

Diversos estudos vêm demonstrando que ao longo dos anos o uso terapêutico ou preventivo com antibióticos tem levado ao aparecimento de isolados com características de resistência (PESSANHA & GONTIJO FILHO, 2001; ZANATTA et al., 2004; SMITH et al., 2007). O mesmo pode ser observado para os desinfetantes, onde o uso de um mesmo produto por período prolongado, bem como subconcentrações favorecem o surgimento de mutantes resistentes.

Alguns pesquisadores relacionaram a presença de certos fatores de virulência, como por exemplo o gene *iss*, a uma maior resistência dos isolados APEC. Johnson et al. (2002) observaram em uma amostra APEC um plasmídeo R de aproximadamente 100 kilobases (kb) o qual codificava, além do gene *iss*, resistência a antibióticos e a um desinfetante (composto quaternário de amônia). Mesmo não bem estabelecida a associação entre a presença do gene *iss* e a resistência a antimicrobianos, Yang et al. (2004) verificaram multirresistência em 71 isolados provenientes de galinhas, sendo que 97% carregava o gene *iss*, quando comparados a outros fatores de virulência. Da mesma forma, Gonçalves et al. (2012) também relacionaram a positividade do gene *iss* com a resistência a tetraciclina e a ampicilina. Segundo Bennett (2004), em função destes genes de resistência estarem presentes em plasmídeos, a capacidade de uma bactéria escapar a ação dos antimicrobianos pode ser transferida de micro-organismo para outro.

Barnes et al. (2008) afirmaram que a *E. coli* é um micro-organismo capaz de adquirir facilmente resistência a diversos desinfetantes, tais como clorexidina, formaldeído, peróxido de hidrogênio e compostos a base de quaternário de amônio.

Além disso, vem observando-se indícios de que a resistência a antibióticos favorece a resistência a desinfetantes e vice-versa. Isto ocorre, pois o mecanismo de ação de alguns destes compostos antimicrobianos são muito similares, levando a resistência cruzada (HEIR et al., 2001; MC CAY et al., 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de estudo

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Saúde das Aves pertencente ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) – Fundação de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO)/Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Rio Grande do Sul.

#### 3.2 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 10 amostras de APEC oriundas de lesões cutâneas, de quadros respiratórios e de fezes coletadas em cama de aviário. Sua classificação quanto ao índice de patogenicidade (IP) foi realizada conforme metodologia descrita por Souza (2006). Neste índice, as cepas foram avaliadas conforme a capacidade em causar lesões compatíveis com colibacilose, além de se considerar o tempo de morte e o número de pintos de mortos no período considerado (SOUZA, 2006). Para termos de comparação da atividade desinfetante, foi utilizada paralelamente a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 totalizando, portanto, 11 amostras avaliadas.

#### 3.3 Reativação das amostras

Estas amostras encontravam-se estocadas à -20°C em solução contendo 800µL de BHI (*Brain Heart Infusion*) e 200µL de glicerol. As amostras estocadas foram repicadas em 10mL de BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o inóculo foi plaqueado em Ágar EMB (meio seletivo para a diferenciação de bacilos entéricos - as colônias de *E. coli* apresentam centro escuro e coloração verde metálica), para a visualização das colônias compatíveis com *E. coli*.

#### 3.4 Método para avaliação da eficiência do desinfetante (BRASIL, 1993)

##### 3.4.1 Determinação contagem da suspensão teste

Foram realizadas diluições seriadas (1:10) em água peptonada 0,1% ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) a partir da cultura do BHI de 24 horas de cada uma das amostras. Foi transferido 0,1 mL de cada diluição para placas de Petri com ágar EMB, e distribuído na superfície do meio com uma alça de Drigalsky. O plaqueamento em EMB foi realizado em triplicata, sendo as placas

incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas. Foi realizada a contagem das colônias de cada uma das placas e estabelecido o intervalo de confiança e repetibilidade das UFC/diluição entre 20 e 200 (BRASIL, 2003). No anexo 1 constam os resultados das contagens de todas as amostras em UFC/mL, os quais variaram entre  $10^8$  e  $10^9$ . A figura 1A demonstra a metodologia utilizada para determinação da suspensão teste.

#### 3.4.2 Desinfetante e preparo da diluição

Foram avaliados dois desinfetantes, o cloreto de benzalcônio e o iodóforo. Foram utilizados os princípios ativos puros dos desinfetantes citados, sendo que para o cloreto de benzalcônio foram utilizadas as concentrações 300, 150, 75 e 50 ppm; já o iodóforo foi diluído à concentrações de 100, 75, 50 e 25 ppm, conforme recomendado pelo Código de Regulamentações Federais do FDA (Food and Drug Administration).

Cada desinfetante foi diluído em água destilada estéril e distribuído em tubos de ensaio estéreis com roscas (10 mL por tubo), sem adição de matéria orgânica.

#### 3.4.3 Neutralizador da atividade desinfetante

O meio BHI utilizado para o ensaio de eficácia de desinfetantes foi adicionado de uma mistura de neutralizadores, seguindo a proporção: 3% de Polisorbato 80, 0,3% de Lecitina e 0,1% de Histidina. Após a adição dos neutralizadores os tubos foram autoclavados para então serem utilizados como meio de crescimento das bactérias sobreviventes ao desinfetante após cronometrado o tempo de contato com o mesmo.

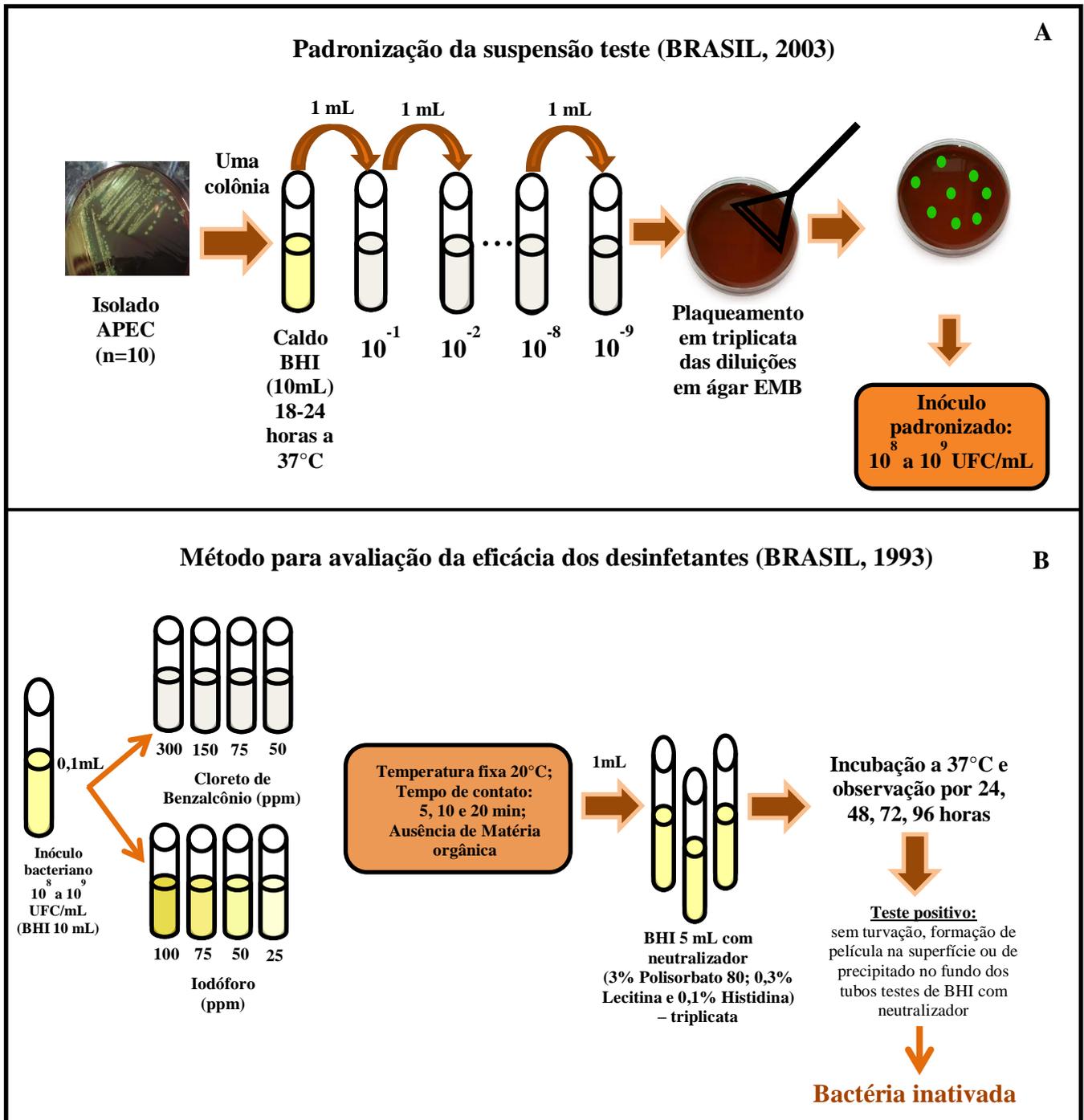
#### 3.4.4 Teste da atividade antimicrobiana do cloreto de benzalcônio e iodóforo

Cada tubo de ensaio contendo a diluição do desinfetante foi mantido a temperatura ambiente ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, todos receberam 0,1 mL da “suspensão teste” (cultura de BHI 24 horas), sendo cronometrado o contato com o desinfetante nos períodos de 5, 10 e 20 minutos. Posteriormente, foi retirado 1 mL do caldo em cada tempo e inoculados em triplicata em tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI com inibidor da atividade desinfetante (neutralizador).

Os tubos foram agitados, incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  e observados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Como critério para interpretação dos resultados, os testes positivos foram

considerados como ausência do crescimento bacteriano (sem turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos testes - bactéria inativada). A figura 1B ilustra como foi realizada esta etapa do experimento.

Figura 1- A- Metodologia utilizada para padronização da suspensão teste dos isolados APEC de alta patogenicidade (n=10) e cepa padrão (ATCC 25922); B - Técnica aplicada para verificação da eficácia do cloreto de benzalcônio e iodóforo frente a isolados APEC de alta patogenicidade (n=10) e cepa padrão (ATCC 25922).



#### 4 RESULTADOS

O cloreto de benzalcônio mostrou-se eficaz para todos os isolados nas concentrações de 300 e 150ppm em todos os tempos de contato, porém a 75 e 50ppm no tempo de cinco minutos o desinfetante não foi eficaz para uma e três amostras de *E. coli*, respectivamente, sendo as amostras inativadas com 10 minutos de contato. Quando as APEC foram comparadas com a amostra padrão de *E. coli* observou-se similaridade nos resultados, já que na menor concentração utilizada foi necessário 10 minutos de contato para inativação (Tabela 1).

O iodóforo a 100 e 75ppm apresentou 100% de eficácia em todos os tempos avaliados, mas a 50ppm quatro amostras foram resistentes com cinco minutos de contato e uma em todos os tempos de exposição. A 25 ppm o iodóforo foi eficaz apenas para dois isolados em todos tempos de contato analisados. Ao avaliarmos a atividade antimicrobiana deste desinfetante frente à cepa padrão, verificou-se resistência em todos os tempos de contato a 25 ppm, resultado este encontrado em oito das 10 cepas APEC (Tabela 2).

Tabela 1- Número de amostras de APEC inativadas (sensíveis) pelo cloreto de benzalcônio nas concentrações de 300, 150, 75 e 50 ppm, por tempo de contato (5, 10 e 20 minutos), a temperatura de 20°C e comparação com cepa padrão 25922.

Cepas	Tempo de contato (minutos)	Concentração (ppm)			
		300	150	75	50
APEC (n=10)	5	10	10	9	7
	10	-	-	1	3
	20	-	-	-	-
Não inativadas		-	-	-	-
Padrão (ATCC 25922)	5	S	S	S	R
	10	S	S	S	S
	20	S	S	S	S

S: sensível; R: resistente

Tabela 2- Número de amostras de *E. coli* APEC inativadas (sensíveis) pelo iodóforo nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 ppm, por tempo de contato (5, 10 e 20 minutos), a temperatura de 20°C e comparação com cepa padrão 25922.

Cepas	Tempo de contato (minutos)	Concentração (ppm)			
		100	75	50	25
APEC	5	10	10	5	2
	10	-	-	4	-
	20	-	-	-	-
Não inativadas		-	-	1	8
Padrão (ATCC 25922)	5	S	S	S	R
	10	S	S	S	R
	20	S	S	S	R

S: sensível; R: resistente

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados relacionados à utilização do cloreto de benzalcônio demonstraram que este princípio ativo mostrou-se mais eficaz frente às cepas APEC, já que foi capaz de inativar todos os isolados. Porém, sua atuação ficou comprometida a partir da redução na concentração e tempo de contato, sendo que a 75 e 50ppm uma e três amostras, respectivamente, precisaram de 10 minutos de exposição para serem inativadas.

O iodóforo, de maneira similar ao cloreto de benzalcônio, foi 100% eficaz nas mais altas concentrações (100 e 75ppm). A 25ppm observou-se o menor desempenho deste desinfetante, sendo que apenas duas amostras foram inativadas nas condições testadas. Apesar da maioria dos isolados terem sido inativados a 50ppm, já se notou o aparecimento de resistência nesta concentração, pois uma das amostras não foi inativada. Estes achados vão de encontro ao observado por Molina et al. (2010) ao analisar amostras de *E. coli* provenientes de abatedouros, onde o iodóforo obteve máxima eficácia em concentrações inferiores a 25ppm com apenas cinco minutos de contato e sem interferência de carga orgânica.

A cepa padrão utilizada para comparação apresentou resultados de suscetibilidade bastante similares às APEC. Para o cloreto de benzalcônio esta cepa mostrou-se resistente a 50 ppm com cinco minutos de contato, já para o iodóforo foi observada resistência a concentração de 25 ppm em todos os tempos de contato. Estes achados indicam que a ATCC 25922 ainda permanece como um bom padrão para avaliação da eficácia de compostos químicos a serem colocados no mercado para uso comercial, já que possui um comportamento de suscetibilidade compatível com os isolados de campo.

Neste estudo ficou evidente que mesmo na ausência de matéria orgânica, simulando uma situação ideal de limpeza, é preciso atentar para a concentração e tempo de ação dos produtos, pois estas variáveis interferiram na eficácia dos mesmos. Este fato é de grande relevância prática, já que na rotina dos ambientes avícolas (granjas, incubatórios, abatedouros), normalmente, situações desejáveis de limpeza que precedem a desinfecção são praticamente inexistentes, portanto, a eficácia dos antimicrobianos pode ficar ainda mais comprometida. Isto foi observado por Camilotti et al. (2015) em amostras de *Salmonella* Hadar, onde na presença de matéria orgânica a 20°C foi necessário 100 ppm para inativar todas as amostras. Este achado demonstra que são necessárias altas concentrações do desinfetante para obtenção da eficácia quando a matéria orgânica é considerada.

Neste experimento a variável temperatura foi fixada a 20° ±1°C, fato este que pode explicar o bom desempenho geral que obtiveram os desinfetantes testados, já que segundo

Camilotti et al. (2015) temperaturas mais baixas são responsáveis por uma piora na atuação dos compostos químicos, quando comparado a temperatura ambiente.

A avaliação da eficácia do iodóforo e cloreto de benzalcônio já foi realizada no âmbito da produção animal por Borowsky et al. (2006) em amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. De maneira semelhante ao constatado no presente trabalho, os autores também verificaram uma melhor atuação do cloreto de benzalcônio em relação ao produto a base de iodo. Oosterik et al. (2014) testaram a atuação de um quaternário de amônio frente a cepas APEC constituindo biofilmes. Como resultado, os autores observaram que a 0,01% (100 ppm) o desinfetante foi capaz de inativar todas as amostras. Estes dados se assemelham aos observados no presente estudo, onde no intervalo entre 300 e 75 ppm os isolados sofreram inativação do antimicrobiano.

Por se tratarem de *E. coli* com características de alta patogenicidade, em tese, esperava-se uma maior resistência frente aos princípios ativos testados. Porém, os microorganismos mostraram-se, de modo geral, sensíveis tanto ao cloreto de benzalcônio quanto ao iodóforo. Carvalho et al. (2015) em estudo avaliando a relação entre a patogenicidade e a resistência a antibióticos de amostras de *E. coli*, também constataram a inexistência de associação entre estas variáveis. Portanto, pode-se afirmar que, nas condições deste experimento, a patogenicidade de um isolado APEC não deve ser considerada como um fator primordial para sua resistência ou sensibilidade aos desinfetantes.

Apesar da importância das cepas APEC para a avicultura industrial, tanto pelo aspecto sanitário quanto econômico, são poucos os relatos na literatura sobre a eficácia de atuação de compostos desinfetantes frente a estes organismos. Portanto, cabe ressaltar a importância deste trabalho para a cadeia avícola, mesmo não se avaliando um grande número de isolados com potencial patogênico.

## 6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que, nas condições do experimento, tanto o cloreto de benzalcônio quanto o iodóforo foram, de modo geral, capazes de inativar todos os isolados de *E. coli* de alta patogenicidade confrontados, podendo ser empregados nos processos de desinfecção. No entanto, cabe ressaltar que as variáveis concentração e tempo de contato podem interferir na atuação destes antimicrobianos. Além disso, a variável patogenicidade não pode ser considerada como determinante para indicar a suscetibilidade de um isolado APEC aos desinfetantes.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, D.L.C.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.; PERERIRA, V.L.A.; ALVES, F.M.X.; ALMEIDA, J.F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene ISS pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção. **Pesquisa Vetetrinária Brasileira** v. 30, n. 5, p. 406-410, maio 2010.
- ANDRADE, N. J. de; MACÊDO, J. A. B. de. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 179 p.
- BACK, A. Colibacilose Aviária. In: **Manual de Doenças de Aves**. 2. ed. Cascavel/PR. 2010. p. 132-135.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In. CALNEK, B. D. **Diseases of poultry**. 12 ed. University Press, 2008. p. 691-738.
- BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bactéria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 347-357, jan. 2008.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes , 1993. **Diário Oficial da União**; Poder executivo, de 17/08/1993, seção 1, anexo parte 1. p. 11937.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 18/09/2003, seção 1, p. 14.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Serviço de inspeção federal. <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/sif>>. Acesso em: 10 jun. 2015.
- BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. 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 iodoform. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1474-1479, set-out, 2006.
- CAMILOTTI, E.; ROCHA, S. L.S.; TEJKOWSKI, T.M.; MORAES, H. L.S.; SALLE, C.T. P.; AVANCINI, C. A. M. Simulação de condições de uso de quaternário de amônio frente amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.16, n.1, p.66-72, 2015
- CARVALHO, D.; FINKLER, F.; GRASSOTTI, T.T.; KUNERT FILHO, H.C.; LIMA, F.E.S.; SOARES, B.D.; ROSSATO, J.M.; CUNHA, A.C.; BRITO, K.C.T.; BRITO, B.G. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Escherichia coli* strains of environmental origin. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 45, n. 7, p. 1249-1255, jul. 2015 .

- CONY, A. V.; ZOCHE, A. T. Manejo de frango de corte. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: **Facta**, 2004. Cap.8, p. 117 – 136.
- DELICATO, E. R., BRITO, B. G., GAZARI, L. C. J., VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 97-103, jul. 2003.
- DHEILLY, A.; LE DEVENDEC, L.; MOURAND, G.; BOUDER, A.; JOUY, E.; KEMPF, I. Resistance Gene Transfer during Treatments for Experimental Avian Colibacillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 189-196, oct. 2012.
- FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR, *et al.* **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 197-205, 2009.
- FERREIRA, T. Z. SESTERHENN, R.; KINDLEIN, L. Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, pub 1021, 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food and Drugs. Departamento of Health and Human Services, Part 178 Indirect Food Additives: Adjuvants, Producers AIDS and Sanitizers. **Code of Federal Regulation**. Title 21, v. 3. Abril 2012.
- GONÇALVES, M.R.; PEREIRA, V.L.A.; SILVA, R.C.F.; OLIVEIRA, L.A.T.; NASCIMENTO, E.R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15, p. 1288, nov. 2012.
- GROSS, W.G. Disease due to *Escherichia coli* in poultry. In: Gyles, C. L. (Ed.) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Oxford: Cab International, p. 237-259. 1994.
- HEIR, E.; LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; STEINBAKK, M. [Can disinfectants contribute to antibiotic resistance?]. **Tidsskr Nor Laegeforen**. v. 121, n. 27, p. 3201-3206, nov. 2001.
- JAENISCH, F. R. F., COLDEBELLA, A, MACHADO, H.G.P., ABREU, P.G., ABREU, V.M.N., SANTIAGO, V. Importância da higienização na produção avícola. **Comunicado Técnico Embrapa** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. p.05, 2004.
- JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; KYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; HERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Disease**. v. 46, n. 2, p. 342-352, apr./ jun. 2002.
- KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas/SP: FACTA, 2. ed., p. 21-38, 2009.

LELIEVELD, H., MOSTERT, M. & HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. USA: Woodhead Publishing Limited. 1. Ed. 2005, 744 p.

MC CAY, P.H.; OCAMPO-SOSA, A.A.; FLEMING, G.T.A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous Culture. **Microbiology** v. 156, p. 30–38, oct. 2010.

MENDES, A.A. et al. Produção de Frangos de Corte. Campinas, FACTA, **Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Agrícola**, 2004. Cap. 8, p.117- 119. Cap. 11, p.171- 173.

MOLINA, P.D.S.; KINDLEIN, L.; BERGMANN, G. P. AVANCINI, C.A.M. Simulação in vitro de condições de uso de desinfetantes e avaliação da eficácia frente bactérias sobreviventes a higienização de Superfícies em matadouro-frigorífico de bovinos. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 17, n. 3/4, p. 134-138, set./dez. 2010.

NOLAN, L.K., BARNES, H.J., VAILLANCOURT, J.R., ABDUL-AZIZ, T., LOGUE, C.M. Collibacilosis. In: SWAYNE, D.E., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SUAREZ, D.L., NAIR, V.L. (Eds.), **Diseases of Poultry**, Wiley-Blackwell: Georgia, 2013, p. 1408.

OOSTERIK, L.H.; TUNTUFYE, H.N.; BUTAYE,P.; GODDEERIS, B.M. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 561–565, dec. 2014.

PAULINO, C. A. Antissépticos e desinfetantes. In: SPINOSA, H.; GORNIK, S.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4ª ed.: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2006, p. 441-447.

PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n. 1, p. 111-115, fev. 2001.

QUEL, N.G., ARAGÃO, A.Z.B., SALVADORI, M.R., FARIAS, A.S., JOAZEIRO, P.P., SANTOS, L.M.B., SÁ, L.R.M., FERREIRA, A.J.P., YANO, T., 2013. Cellulitis lesions in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 866-872, mar. 2013.

RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. S. R.; CRUZ, L. V.; MACHADO, T. L.; LOPES, H. C. Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Garça – SP, Ano IX, n. 16. 2011.

SOUZA, G. F. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. 48f. Porto Alegre, RS. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

SMITH, J.L.; DRUM, D.J.V.; DAI, Y.; SANCHEZ, S.; MAURER, J.J. HOFACRE, C.L.; LEE, M.D. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal

*Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 5, p. 1404-1414, mar. 2007.

WOLFRAN, Q. Desinfecção moderna. In: SEMANA DE ESTUDOS AGROPECUÁRIOS DE BOTUCATU, 8., 1999, Botucatu. Curso. Botucatu: UNESP, 1994. 40 p.

YANG H., CHEN S., WHITE D.G., ZHAO S., MCDERMOTT P., WALKER R. & MENG J. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3483-3489, aug. 2004.

ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; PULICI, S.C.P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n. 3, p.283-286, jul./set. 2004.