

**AValiaÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE SUBSTÂNCIAS  
ANTIMICROBIANAS E Amônia QUATERNÁRIA NA DESINFECÇÃO DE OVOS  
COMERCIAIS EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADOS COM *Salmonella*  
*enterica* SOROVAR ENTERITIDIS**

Adriano Sakai Okamoto<sup>1</sup>  
Raphael Lucio Andreatti Filho<sup>2</sup>  
Edna Teresa de Lima<sup>3</sup>

**RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial inibitório de substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e amônia quaternária na desinfecção da superfície das cascas de ovos de consumo experimentalmente contaminados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE). Um total de 40 ovos obtidos no comércio foram contaminados individualmente por aspersão com 3mL de cultura de SE, contendo  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Posteriormente os ovos foram armazenados à temperatura de 26°C durante 24 horas para secagem e fixação da SE nas cascas dos ovos. Os tratamentos com solução salina fosfatada tamponada (PBS), amônia quaternária e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* foram aspergidos na quantidade de 5mL sobre cada ovo. Cada um dos ovos foi submetido à contagem bacteriana por diluição seriada, após 24 horas da contaminação experimental e também 30 minutos após os tratamentos. O grupo tratado com amônia quaternária apresentou a menor contagem bacteriana de SE nas cascas dos ovos após o tratamento, com redução de 92% de UFC, mostrando-se mais eficiente quando comparado ao tratamento com substâncias antimicrobianas, onde foi observada diminuição da contagem bacteriana de 71,6%. O potencial inibitório das substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* foi significativo na redução de SE da superfície das cascas dos ovos, porém o tratamento com amônia quaternária demonstrou ser mais efetivo.

**Palavras-chave:** Substâncias antimicrobianas, ovos, desinfecção, *Salmonella*, *Lactobacillus*.

**EVALUATION OF INHIBITORY POTENTIAL OF ANTIMICROBIAL  
SUBSTANCES AND QUATERNARY AMMONIA IN DISINFECTION OF  
COMMERCIAL EGGS EXPERIMENTALLY CONTAMINATED WITH *Salmonella*  
*enterica* SEROVAR ENTERITIDIS**

**ABSTRACT**

The present work aimed to evaluate the inhibitory potential of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* and quaternary ammonia in disinfection of shell surfaces of eggs available for consumption that were experimentally contaminated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). A total of 40 eggs, obtained commercially, were contaminated individually by aspersion with 3mL of SE culture, containing  $1.5 \times 10^6$  colony forming units (CFU)/mL. Subsequently, the eggs were stored at a temperature of 26°C for 24

<sup>1</sup> Docente disciplina de Ornitopatologia FMVZ-UNESP-BOTUCATU-SP [adrisakai@hotmail.com](mailto:adrisakai@hotmail.com) (14) 97863057 Endereço: Departamento de Clínica Veterinária FMVZ UNESP Distrito de Rubião Junior S/N Botucatu - SP

<sup>2</sup> Docente disciplina de Ornitopatologia FMVZ-UNESP-BOTUCATU-SP

<sup>3</sup> Doutoranda Ornitopatologia FMVZ-UNESP-BOTUCATU-SP

hours for drying and fixation of SE on eggshells. The treatments with phosphate buffered saline solution (PBS), quaternary ammonia and antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* were sprinkled at the volume of 5mL on each egg. Each egg was submitted to bacterial count by series dilution, 24 hours after experimental contamination and also 30 minutes after the treatments. The group treated with quaternary ammonia presented the lowest SE bacterial count on eggshells after treatment, with CFU reduction of 92%, thus showing more efficiency compared to treatment with antimicrobial substances, where 71.6% diminution of bacterial count was observed. The inhibitory potential of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* was significant in SE reduction on eggshell surfaces, but treatment with quaternary ammonia was demonstrated to be more effective.

**Key words:** Antimicrobial substances, eggs, disinfection, *Salmonella*, *Lactobacillus*.

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE SUSTANCIAS  
ANTIMICROBIANAS Y AMONIO CUATERNARIO EN LA DESINFECCIÓN DE  
HUEVOS COMERCIALES CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE CON  
*Salmonella enterica* SEROVARIEDAD ENTERITIDIS**

**RESUMEN**

Este trabajo tuvo por objetivo evaluar el potencial inhibitorio de sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus reuteri* y amonio cuaternario en la desinfección de la superficie de las cáscaras de huevos de consumo contaminados experimentalmente con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE). Un total de 40 huevos obtenidos en comercios fueron contaminados individualmente por aspersión con 3 mL de cultivo de SE, que contenía  $1.5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. Posteriormente los huevos fueron almacenados a temperatura de 26°C durante 24 horas para secado y fijación de las SE en las cáscaras de los huevos. Los tratamientos con solución salina fisiológica tamponada (PBS), amonio cuaternario y sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus reuteri* fueron aplicados por aspersión en una cantidad de 5 mL sobre cada huevo. Cada uno de los huevos fue sometido a conteo bacteriano por dilución seriada, después de 24 horas de la contaminación experimental y también 30 minutos después de los tratamientos. El grupo tratado con amonio cuaternario presentó un conteo bacteriano menor de SE en las cáscaras de los huevos después del tratamiento, con reducción de 92% de UFC por lo que dicho compuesto demostró ser más eficiente en comparación con el tratamiento por sustancias antibacterianas, en el cual se observó disminución del conteo bacteriano de 71,6%. El potencial inhibitorio de las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus reuteri* fue significativo en la reducción de SE de la superficie de las cáscaras de los huevos. Sin embargo, el tratamiento con amonio cuaternario demostró ser más efectivo.

**Palabras-clave:** sustancias antimicrobianas, huevos, desinfección, *Salmonella*, *Lactobacillus*.

## INTRODUÇÃO

Aves comerciais constituem um dos maiores e mais importantes reservatórios de *Salmonella* spp., sendo que alguns sorotipos adaptados à transmissão pelos ovos, como por exemplo a *Salmonella* Enteritidis (SE) fagotipo 4, podem determinar quadros de infecção alimentar em humanos (1, 2). Evidências epidemiológicas indicaram que o conteúdo

contaminado de ovos limpos e intactos foi responsável pela transmissão de SE para humanos (3).

A garantia da qualidade e segurança dos alimentos para a manutenção da saúde é reconhecida internacionalmente. Os avanços na área da tecnologia de alimentos têm como objetivo maior garantir a qualidade e a inocuidade dos mesmos, pois as doenças veiculadas por alimentos representam problemas de saúde pública e uma importante causa de redução da produtividade econômica (4).

Segundo KONDO (5), a desinfecção de ovos pode ser feita na forma seca (fumigação) ou úmida (aspersão ou imersão). Na desinfecção seca é utilizado formol ou paraformol, enquanto que na desinfecção úmida podem ser utilizados desinfetantes como glutaraldeído, amônia quaternária, fenólicos, clorhexidina e proxitane, entre outros.

Desinfetantes como amônia quaternária e hipoclorito de sódio são eficazes na redução da multiplicação e penetração de SE na casca dos ovos (6), mas a sua escolha deverá recair sobre aquele que cumprir com o maior número de requisitos à finalidade desejada, sendo que na mesma concentração e no mesmo espaço de tempo deve eliminar bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitos (7).

Os agentes antimicrobianos são definidos como substâncias que matam ou previnem o crescimento de microrganismos. As denominações bactericidas, fungicidas e viricidas indicam o tipo de microrganismo destruído e bacteriostático se refere aos agentes que apenas inibem o crescimento das bactérias (8).

Segundo SERVIN *et al.* (9), as bactérias lácticas apresentam grande efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. A eficácia e o espectro de ação contra microrganismos patogênicos ocorrem devido a uma gama de metabólitos produzidos por essas bactérias, denominados de substâncias antimicrobianas, as quais incluem os ácidos orgânicos como lático e acético, o peróxido de hidrogênio que inibe o crescimento de patógenos por meio do efeito oxidante nas células bacterianas (10) ou pela destruição molecular da estrutura básica dos ácidos nucleicos e proteínas celulares (11) e produção de proteínas específicas ou complexo de proteínas denominadas bacteriocinas (12, 13), as quais são conhecidas como peptídeos com ação bactericida ou bacteriostática e que demonstram atividade antagônica contra microrganismos patogênicos (14).

LIMA *et al.* (15), demonstraram que cepas de *Lactobacillus reuteri* produtoras de substâncias antimicrobianas, apresentaram ação antagônica *in vitro* frente a *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella*. No entanto, a eficiência de um antimicrobiano depende de fatores ambientais, que podem agir isoladamente ou em combinação, tais como pH, atividade de água, temperatura, atmosfera e carga microbiana inicial (16).

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial inibitório de substâncias antimicrobianas e amônia quaternária na desinfecção de ovos comerciais experimentalmente contaminados com SE.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Local*

O experimento foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – *Campus* Botucatu.

## Ovos

Foram utilizados 40 ovos para consumo, provenientes de estabelecimento comercial em condições de temperatura ambiente. Concomitantemente, 10 ovos excedentes foram examinados com o intuito de verificar contaminação prévia por *Salmonella* spp.

### **Amostra bacteriana para desafio – *Salmonella* Enteritidis.**

Foi utilizada amostra de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), isolada de fígado de matrizes pesadas, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif) e desenvolvida por meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo Nal (100µg/mL de meio) e Rif (100µg/mL de meio) (17). O inóculo constituiu-se do cultivo de SE em 150mL de caldo infusão de cérebro coração (BHI), incubado a 37°C durante 18 horas. O número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL foi determinado por diluições decimais seriadas em PBS com pH 7,0.

### **Amostras bacterianas para tratamento – *Lactobacillus reuteri***

Foram utilizadas cinco amostras de *Lactobacillus reuteri* com atividade antimicrobiana *in vitro* frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (15), isoladas do Inglúvio e cecos de matrizes pesadas, empregando-se cultivo anaeróbio (Anaerobac-PROBAC) em caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS). As amostras foram identificadas no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu, utilizando os testes de hidróxido de potássio, coloração pelo método de Gram, produção de catalase e formação de gás a partir de glicose. A identificação das amostras foi confirmada utilizando o API 50 CH<sup>®</sup> e a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo posteriormente estocadas a -190°C até o momento de uso.

### **Contaminação experimental**

A contaminação foi realizada com SE cultivada em 150mL de BHI com incubação a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação a cultura foi aspergida sobre cada ovo (40 ovos) na proporção de 3mL e concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL.

Os 40 ovos foram armazenados à temperatura de 26°C durante 24 horas para secagem e fixação da SE nas cascas, sendo posteriormente divididos em três grupos de 10 ovos cada, sendo que os 10 ovos restantes foram submetidos à contagem bacteriana de SE antes dos tratamentos.

### **Atividade antimicrobiana – extração de substâncias antimicrobianas**

As amostras de *Lactobacillus reuteri* com atividade antimicrobiana frente a microrganismos indicadores dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella* (15) observada no método de antagonismo *spot on the lawn* (18), foram submetidas a prova de atividade antimicrobiana pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços, com incubação a 37°C por 24 horas e em condições de anaerobiose para descartar a possível ação do peróxido de hidrogênio. As amostras de *Lactobacillus reuteri* foram semeadas em tubos contendo 10mL de caldo MRS modificado (acrescido com apenas 0,05% de glicose) e incubados em aerobiose a 37°C por 18 horas, visando assim eliminar a ação de ácidos orgânicos.

A extração de bacteriocinas foi realizada por meio de centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos, obtendo-se sobrenadante livre de células. O pH foi ajustado para 5,5 e realizou-se microfiltração com membrana de poro Millex GV de 22µm e 25mm de diâmetro (Millipore). A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células frente aos microrganismos

indicadores foi verificada por meio da formação de halo de inibição e mensurada da borda do orifício (poço) até o final da zona de inibição (mm).

Posteriormente utilizou-se o método de *sandwich* modificado de acordo com HECHARD *et al.* (19), onde as amostras foram semeadas sob a forma de pontos em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas a 37°C por 12 horas. Em seguida, adicionou-se camada de ágar nutriente que após solidificação recebeu camada de ágar semi-sólido de BHI contendo os microrganismos indicadores. As placas foram incubadas novamente a 37°C por 24 horas. Este procedimento foi realizado para descartar a possível ação de bacteriófagos.

### **Tratamentos**

Foram realizados três tratamentos após 24 horas da contaminação experimental com SE. No primeiro grupo o tratamento foi realizado com substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri*. No segundo grupo este foi realizado com solução de amônia quaternária (AQ-CABQ-100 Buckman Laboratórios Ltda) na concentração de 200ppm (20). No terceiro grupo o tratamento foi feito com PBS, sendo este o grupo controle. Todos os tratamentos foram realizados na forma de aspersão de 5mL sobre cada ovo.

### **Contagem bacteriana**

Após trinta minutos da aspersão dos tratamentos, cada um dos ovos foi transferido para bolsas plásticas estéreis (Nasco-Whirl-Pak<sup>®</sup>) contendo 5mL de solução de água peptonada tamponada a 1%. Os ovos foram homogeneizados por 30 segundos e alíquotas de 1mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9mL de PBS, realizando-se diluições decimais seriadas até 10<sup>-6</sup>. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das respectivas diluições decimais em duplicata de AVB Nal/Rif. O inóculo foi espalhado sobre o ágar com auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O número de UFC/ovo foi convertido em Log<sub>10</sub> para interpretação dos resultados. As suspensões originais (ovo + 5 mL de água peptonada) foram incubadas em caldo tetratoato e caldo selenito cistina a 37°C por 24 horas e plaqueadas em AVB e ágar MacConkey para identificação da presença de SE nos casos em que a quantidade baixa não permitiria a observação na diluição 10<sup>-1</sup> (21).

### **Análise estatística**

Foi utilizada análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis, para comparação das medianas de UFC de SE em cada tratamento e momento, com delineamento experimental inteiramente ao acaso, com dez repetições (22).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados foram expressos em medianas de UFC de SE nas cascas dos ovos. A quantidade de SE nas cascas dos ovos antes e após os tratamentos com substâncias antimicrobianas, amônia quaternária e PBS (controle), está apresentada na Tabela 1.

Neste experimento não houve diferença significativa no grupo tratado com PBS (grupo controle) antes e após o tratamento, diferindo apenas dos demais grupos após os tratamentos.

O grupo tratado com amônia quaternária apresentou a menor contagem bacteriana após o tratamento, com redução de 92% da quantidade de UFC nas cascas dos ovos, quando comparado com os demais grupos, concordando com OLIVEIRA e SILVA (21) que também demonstraram redução de SE nas cascas dos ovos, utilizando como desinfetante a amônia quaternária.

BARROS *et al.* (23), observaram que a lavagem dos ovos com amônia quaternária a 25°C ou 43°C, reduziu a quantidade de SE, quando comparado com o uso de água de torneira, independente do tempo e temperatura de armazenamento, demonstrando eficiente poder residual sobre SE, semelhantemente também ao que foi observado por WANG & SLAVIK (6) e OLIVEIRA & SILVA (21).

Foi observada redução de 71,6% da quantidade de SE na casca de ovos do grupo tratado com substâncias antimicrobianas, quando comparado com o grupo controle.

**Tabela 1.** Quantidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) na casca de ovos tratados com substâncias antimicrobianas provenientes de *Lactobacillus reuteri* ou amônia quaternária.

Tratamento	Antes do tratamento	Após o tratamento
Substâncias antimicrobianas	8,5* Aa**	2,3 Ba
Amônia quaternária	8,5 Aa	0,6 Bb
Controle	8,5 Aa	8,1 Ac

\*Medianas de SE em unidades formadoras de colônia (Log<sub>10</sub>) obtidas de dez repetições para cada tratamento.

\*\*Letras maiúsculas comparam medianas de momento em cada tratamento (linha).

Letras minúsculas comparam medianas de tratamento em cada momento (coluna).

As bactérias lácticas aparecem naturalmente em quase todos os alimentos fermentados e algumas amostras podem produzir naturalmente substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, sendo assim aceitáveis como aditivos pelas autoridades e também pelos consumidores (24). A redução de SE nas cascas dos ovos observada neste estudo, sugere que a ação antagonista pode ter ocorrido devido à ação de substâncias antimicrobianas de natureza protéica, como as bacteriocinas.

A redução de populações bacterianas patogênicas pelas bacteriocinas é considerável a ponto de se vislumbrar a substituição de agentes químicos, utilizados usualmente na prevenção de diversas bactérias em alimentos, sendo esta atualmente a tendência de muitos consumidores em diversos países do mundo.

## CONCLUSÃO

O potencial inibitório das substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* reduziu significativamente a quantidade de SE nas cascas dos ovos, porém o tratamento com amônia quaternária demonstrou ser mais efetivo nas condições implementadas neste experimento.

## REFERENCIAS

1. Gast RK. Paratyphoid infections. In: Calnek BW, Barnes HJ, Berard CW, McDougald LR, Salf YM, editors. 10th ed. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University, 1997. p. 97.
2. Hirsh DC. Salmonella. In: Hirsh DC, Zee YC. Veterinary microbiology and immunology. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 69.
3. Mishu B, Griffin PM. Salmonella enteritidis gastroenteritis transmitted by intact chickens eggs. Ann Intern Med. 1991; 115: 190-4.

4. Delazari I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: Conferência Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas; 2001, Campinas. Campinas: FACTA; 2001. 191-203.
5. Kondo N. Quais são os desinfetantes que podem ser utilizados na desinfecção dos ovos para incubação? Rio Claro; 2006 [cited 2006 Ago 22]. Departamento de Serviços Veterinários Agroceres Ross Melhoria Genética de Aves S.A. Available from: <<http://64.233.187.104/search?q=cache:HeeBIx3znm4J:www.avisite.com.br/canal>>.
6. Wang H, Slavik MF. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. J Food Prot. 1998; 61: 276-9.
7. Office International Des Épizooties – OIE. Código Zoosanitário Internacional. 2007 [cited 2007 Dez 8]. Available from: <<http://www.oie.int/eng/normes/manual/A-00550.htm>>.
8. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books; 2003.
9. Servin AL, Coconier M. Adhesion of probiotic strain to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract Res. 2003; 17: 741-54.
10. Gilliland SE, Speck ML. Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. J Milk Food Technol. 1972; 35: 307- 10.
11. Dahl TA, Midden WR, Hartmean PE. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by puri single oxygen. J Bacteriol. 1989; 171: 2188-94.
12. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol Rev. 1976; 40: 722-56.
13. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 1988; 70: 337-49.
14. Bruno MEC, Montville TJ. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 1993; 59: 3003-10.
15. Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. Can J Vet Res. 2007; 71: 103-7.
16. Wiley RC. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: Wiley RC. Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. New York: Chapman Hall, 1994. p.1-14.
17. Andreatti Filho RL, Silva EN, Ribeiro AR, Kondo N, Curi PR. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*. Braz J Microbiol. 2000; 31: 107-12.

18. Lewus CB, Montville TJ. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods*. 1991; 13: 145-50.
19. Hechard Y, Dheibomez M, Cenatiempo Y, Letellier F. Antagonism of lactic acid bacteria from goats milk against pathogens strains assessed by the “sandwich method”. *Lett Appl Microbiol*. 1990; 11:185-8.
20. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Manual Técnico. Procedimentos Operacionais de Atividade de Campo. 2002. [cited 2006 Maio 08]. Available from: <[www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/C9D345F76AEBEC3CE0300801FD0AA49](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/C9D345F76AEBEC3CE0300801FD0AA49)>.
21. Oliveira DD, Silva EN. Salmonella em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000; 52: 6.
22. Zar JH. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall; 1996.
23. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Sampaio HM, Crocci AJ. Sobrevivência de Salmonella Enteritidis em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. *Braz J Poult Sci*. 2001; 3: 3.
24. Gonzáles B, Glaasker E, Konji ERS, Driessen AJM, Suarez JE, Konings WN. Bactericida mode of action of plataricin C. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62: 2701-9.

**Recebido em: 08/04/2008**

**Aceito em: 17/05/2010**