

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE
PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO DE ESPONJAS UTILIZADAS EM
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

Eliandra Mirlei Rossi

Porto Alegre, RS, Brasil
Março, 2010

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO DE ESPONJAS UTILIZADAS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

Eliandra Mirlei Rossi
Bióloga

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de Concentração: Microbiologia de alimentos

Orientador: Eduardo César Tondo

Porto Alegre, RS, Brasil
Março, 2010

Dedico este trabalho:
Aos meus pais Elias e Miraci e
minhas irmãs Elaine e Elis, pelo seu amor, carinho,
incentivo e paciência incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por ter me acompanhado durante todo este tempo nas minhas inúmeras viagens de São Miguel do Oeste a Porto Alegre.

A minha família, meus pais Elias e Miraci, pelo amor e apoio constante e as minhas duas anjas irmãs Elaine e Elis que sempre estiveram ao meu lado, sinceramente não tenho palavras o suficiente que expressem meus sentimentos, a única coisa que posso dizer: AMO VOCÊS!

Ao meu cunhado Odair por ser tão prestativo durante todas as minhas idas e vindas de São Miguel do Oeste a Porto Alegre.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS que contribuíram para minha formação profissional. Em especial ao meu orientador Eduardo, que foi além de mestre, um verdadeiro amigo, repassando muitos conhecimentos, experiência profissional, amizade e confiança.

A Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus São Miguel do Oeste pelo apoio e incentivo repassados.

Aos meus colegas de laboratório na UNOESC Jackson, Diane e Débora. Em especial para Diane, Williane, Mônica e Débora que auxiliaram nos experimentos.

As minhas amigas Patricia, Taís, Juliane e Karla que, apesar de estarmos distantes, sempre estiveram presentes. Em especial para as amigas irmãs Elis, Daniela e Juliane que me fizeram sorrir durante os momentos mais angustiantes dessa caminhada, meus eternos agradecimentos.

Aos colaboradores Juliane, Sandra, Voltair e Lurdete pelo auxílio na estatística e na elaboração de gráficos.

A dois inesquecíveis mestres da graduação Cassius e Fernanda que me ensinaram os primeiros experimentos na microbiologia.

A Carolina pela incansável colaboração na revisão do inglês.

Enfim, minha eterna gratidão a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante esses dois anos.

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

[Isaac Newton]

RESUMO

Avaliação da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de esponjas utilizadas em serviços de alimentação

Autor: Eliandra Mirlei Rossi

Orientador: Eduardo César Tondo

Esponjas de cozinha podem promover contaminação cruzada ao transferirem microrganismos de superfícies variadas para os alimentos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a contaminação microbiológica e a eficácia de dois procedimentos de desinfecção de esponjas utilizadas em serviços de alimentação, bem como avaliar a transferência microbiana a partir de esponjas para o aço inoxidável e polietileno. Na primeira parte deste estudo, 80 esponjas naturalmente contaminadas foram coletadas em serviços de alimentação e então transferidas para o laboratório, onde foram divididas em três partes iguais. Uma das partes foi submetida à contagem de microrganismos heterotróficos (MH), coliformes a 45 °C (CF), *Staphylococcus* coagulase positiva (SA) e à pesquisa de *Salmonella* sp. (SAM). As outras duas partes foram submetidas, separadamente, à fervura em água durante cinco minutos e à desinfecção por hipoclorito de sódio 200ppm, por 10 minutos, adicionada de enxágue com água potável. Na segunda parte do estudo, 24 esponjas naturalmente contaminadas foram friccionadas sobre superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno, separadamente, a fim de investigar o número de microrganismos transferidos e sua sobrevivência. Os resultados demonstraram contaminações médias por MH de aproximadamente 9,1 LogUFC/esponja, e 76,25% delas apresentaram contagens médias de CF de aproximadamente 8,4 Log UFC/esponja. Apenas 2,5% das amostras apresentaram SA e SAM. Ambos os procedimentos de desinfecção foram capazes de reduzir significativamente as contagens bacterianas, porém a fervura demonstrou reduções maiores (6,7 Log UFC/esponja) que a desinfecção por hipoclorito de sódio a 200ppm (2,7 Log UFC/esponja). A média de transferência de microrganismos variou entre 3,3 e 5,5 LogUFC/cm², para aço inoxidável, entre 3,5 e 5,6 LogUFC/cm², para o polietileno, sendo que os microrganismos transferidos foram perdendo sua viabilidade sobre ambos materiais. Nas primeiras quatro horas de exposição em temperatura ambiente a redução do número de microrganismos foi mais acentuada, e em 24 horas restaram cerca de 1 a 2 logUFC/cm² de microrganismos viáveis.

Palavras-chave: Esponjas contaminadas, contaminação cruzada, desinfecção

Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 81 pág. março, 2010.

ABSTRACT

Evaluation of microbiological contamination and disinfection procedures of sponges used in food services

Author: Eliandra Mirlei Rossi

Adviser: Eduardo César Tondo

Kitchen sponges can promote cross-contamination by transferring microorganisms from various surfaces to food. The objectives of this study were to evaluate the microbiological contamination and effectiveness of two procedures for disinfection of sponges used in food services, and to assess the microbial transfer from sponges to stainless steel and polyethylene. In the first part of this study, 80 sponges were collected in food services and then transferred to the laboratory where they were divided into three equal parts. One part was subjected to quantification of heterotrophic microorganisms (HM), fecal coliforms (CF), *Staphylococcus* coagulase-positive (SA) and *Salmonella* sp. (SAM). The other two parts were separately subjected to boiling in water for five minutes, and disinfection by sodium hypochlorite 200ppm for 10 minutes, added by rinse with water. In the second part of the study, 24 naturally contaminated sponges were rubbed on surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene, separately, to investigate the number of transferred microorganisms and their survival. The results showed contamination averages by HM of approximately 9.1 log CFU/sponge, and 76.25% had average scores of CF of about 8.4 log CFU/sponge. Both disinfection procedures were able to significantly reduce bacterial counts, but the boiling showed greater reductions (6.7 log CFU/sponge) than the disinfection by sodium hypochlorite at 200ppm (2.7 log CFU/sponge) The average transfer of microorganisms varied between 3.3 and 5.5 log CFU/cm² for stainless steel, and 3.5 to 5.6 log CFU/cm², for polyethylene, and the transferred microorganisms were losing their viability on both materials. In the first four hours of exposure at room temperature the reduction of the number of microorganisms was more pronounced, and in 24 hours there were about 1 to 2 log CFU/cm² remaining viable microorganisms.

Key-words: sponges contaminated, cross-contamination, disinfection.

Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. 81 pág. March, 2010.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Frequência de microrganismos heterotróficos em 80 esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....32
- Figura 2: Frequência de microrganismos heterotróficos em 80 esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....32
- Figura 3: Reduções bacterianas (LogUFC/esponja) em esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação não desinfetadas, desinfetadas por fervura em microondas por 5 minutos e desinfecção com hipoclorito de sódio 200ppm, por 10 minutos, mais enxágue com água potável.....33
- Figura 4: Sobrevivência de MH transferidos de esponjas de limpeza para superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno em diferentes níveis de contaminação: Grupo um: esponjas com 7 à 10 Log UFC/esponja e grupo dois: esponjas contaminadas com 4 à 6,9 Log UFC/esponja.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

APPCC- Análises de pontos e perigos críticos de controle
CDC- Centers for Disease Control and Prevention
CF- Coliformes à 45°C
cm²- Centímetros quadrados
DTA- Doenças Transmitidas por Alimentos
Log- Logaritmo
MH- Microrganismos heterotróficos
mL- Mililitro
ppm- partes por milhão
SA- *Staphylococcus* coagulase positiva
SAM- *Salmonella* sp.
SIH- Sistemas de Informações Hospitalares
SVS- Secretaria da Vigilância Sanitária
UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 OBJETIVO GERAL	03
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
3 HIPÓTESES DE PESQUISA	05
4 REFERENCIAL TEÓRICO	06
4.1 ALIMENTOS CONTAMINADOS	06
4.2 CONTAMINAÇÃO CRUZADA	08
4.3 ESPONJAS E SUPERFÍCIES	09
4.4 PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO DE ESPONJAS E SUPERFÍCIES	12
5 MATERIAIS E MÉTODOS	16
5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO	16
5.2 CONTAMINAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO	18
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	20
6 RESULTADOS	21
6.1 CONTAMINAÇÃO DAS ESPONJAS	21
6.2 PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO	23
6.3 CONTAMINAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO	24
7 DISCUSSÃO	27
7.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO	27
7.2 CONTAMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO	31
8 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um aumento expressivo de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem ocorrendo em nível mundial (Havelaar et al., 2009), e isso também tem acontecido no Brasil (Oliveira et al., 2009). Neste país, segundo o Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, ocorreram 3.410.048 internações devido a DTA, com uma média de 568.341 casos por ano. Além disso, foram registrados cerca de 6.320 óbitos devido a essas doenças, somente no período de 1999 a 2002 (SVS, 2005).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS, 2005), os restaurantes e as escolas estão entre os serviços de alimentação que mais contribuíram com a ocorrência de DTA no Brasil, sendo responsáveis por 18,8% e 11%, respectivamente, dos surtos registrados, no período de 1999 a 2004.

Um dos fatores mais importantes que podem contribuir para o aumento do número de DTA, em serviços de alimentação, é a contaminação cruzada dos alimentos. Essa contaminação pode ser originada pelos manipuladores, ambiente de produção, equipamentos, móveis e utensílios (Greig; Ravel, 2009).

Neste contexto, as esponjas de limpeza ganham destaque, uma vez que podem transferir quantidades significativas de microrganismos para superfícies e utensílios utilizados na preparação dos alimentos (Kusumaningrum et al., 2003).

As esponjas podem reter restos de alimentos e servir como um reservatório de microrganismos causadores de doenças (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009), podendo estar contaminadas por várias bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,

Salmonella sp. (Erdogrul; Erbilir, 2005; Kusumaningrum et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2002; Ikawa; Rossen, 1999). Esses patógenos podem permanecer nas superfícies por horas ou dias após a contaminação (Kusumaningrum et al., 2003), podendo alcançar os alimentos e provocar surtos de DTA. Além disso, muitos serviços de alimentação mantêm as esponjas em temperatura ambiente, dentro de recipientes contendo água, restos de alimentos e resíduos de detergente, os quais podem favorecer a multiplicação de microrganismos.

Por esses motivos, cuidados especiais devem ser tomados, a fim de diminuir a contaminação microbiológica de esponjas e alguns métodos de desinfecção têm sido avaliados, a fim de encontrar ações eficazes, acessíveis e, ao mesmo tempo, fáceis de serem aplicadas nas rotinas de trabalho de serviços de alimentação e residências (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Beumer; Kusumaningrum, 2003;). Dentre os métodos que têm sido mais frequentemente estudados destacam-se a fervura das esponjas em água potável e a desinfecção com soluções cloradas (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Kusumaningrum et al., 2002).

O presente estudo foi direcionado para avaliar a hipótese de que esponjas de serviços de alimentação podem estar expressivamente contaminadas durante o uso. Também investigou-se a eficácia de dois métodos de desinfecção, a fim de propor estratégias para o controle dessa possível contaminação. Além disso, foi avaliada a transferência de microrganismos a partir de esponjas naturalmente contaminadas para materiais frequentemente utilizados em equipamentos e utensílios de cozinhas residenciais, comerciais e industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a contaminação microbiológica, a transferência e de sobrevivência de microrganismos e dois procedimentos de desinfecção de esponjas utilizadas em serviços de alimentação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o número de microrganismos heterotróficos, *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes a 45° C, em esponjas utilizadas em serviços de alimentação;
- Verificar a presença de *Salmonella* sp. nas esponjas utilizadas em serviços de alimentação;
- Avaliar a redução das contagens microbianas através da desinfecção das esponjas por fervura em água e por solução de hipoclorito de sódio 200ppm seguido de enxague com água potável;
- Avaliar a quantidade de microrganismos heterotróficos transferidos de esponjas utilizadas nos serviços de alimentação para superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno;

- Avaliar a sobrevivência dos microrganismos transferidos das esponjas para o aço inoxidável AISI 316 e polietileno quando expostos à temperatura ambiente.

3 HIPÓTESES DE PESQUISA

3.1 As esponjas utilizadas nos serviços de alimentação podem estar contaminadas por níveis elevados de microrganismos, os quais podem ser transferidos para superfícies de aço inoxidável e polietileno.

3.2 A fervura em água potável ou desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm adicionada de enxágue em água potável podem ser utilizadas para a redução das contagens de microrganismos presentes nas esponjas.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ALIMENTOS CONTAMINADOS

Alimentos contaminados são uma das principais preocupações de saúde pública (WHO, 2007), podendo ser uma das maiores causas de doenças e mortes (Sarter; Sarter; Gilabert, 2010). As diversas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas por agentes químicos, como pesticidas, metais e micotoxinas, ou por agentes biológicos, como microrganismos patogênicos através da ingestão de água ou alimentos contaminados (Piggot, 2008). Mesmo assim, os agentes biológicos são a maior causa das DTA, sendo, portanto, intensivamente estudados, durante décadas (Greig; Ravel, 2009).

Apesar dos esforços para a sua prevenção, as DTA continuam sendo um evento muito frequente, podendo apresentar elevada gravidade para um grande número de pessoas, no Brasil e no mundo (Havelaar et al., 2009; SVS, 2005).

Dados fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2005), estimam 76 milhões de casos de DTA, com 25.000 hospitalizações e 5.000 mortes ocorram a cada ano, nos Estados Unidos.

No Brasil, os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH), do Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, demonstraram a ocorrência de 3.410.048 internações por DTA, com uma média de 568.341 casos por ano (SVS, 2005). Ressalta-se que destes,

foram notificados ao Ministério da Saúde, apenas 3.737 surtos, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos (SVS, 2005).

A falta de notificação ocorre principalmente pelo fato de que, normalmente os alimentos contaminados não apresentam características organolépticas alteradas ou perceptíveis e como o consumidor não está devidamente esclarecido ou consciente dos perigos envolvidos, não consegue identificar qual alimento está contaminado (Forsythe, 2002).

Segundo dados do SVS (2005), apesar das residências serem os locais onde ocorreram a maior parte dos surtos notificados (48,5%), os serviços de alimentação, como restaurantes (18,8%) e escolas (11,6%) também têm sido envolvidos frequentemente.

Diversos estudos apontam que os surtos causados por alimentos contaminados ocorrem com grande frequência em restaurantes, pois, na maioria das vezes, a supervisão e o treinamento na manipulação são falhos (Swanger; Rutherford, 2004).

Segundo Piggot (2008), as DTA são o resultado de preparações impróprias de alimentos, pois as contaminações microbiológicas podem ocorrer durante todas as etapas da preparação destes. De acordo com Erdogrul; Erbilir (2005), desde o final de 1960, são realizados estudos relacionados com contaminação nas cozinhas, investigando a quantidade de microrganismos nesses locais. Os mesmos autores destacam que no final de 1970 a matéria prima era o principal fator responsável pela contaminação, contudo a área que circundava as cozinhas pôde igualmente atuar como fonte de microrganismos. Lindqvist; Lindblad (2008) sugerem que provavelmente

alimentos crus, utensílios, superfícies e manipuladores sejam as principais fontes das contaminações nas cozinhas.

Um estudo recente de Greig; Ravel (2009) sugeriu que a contaminação cruzada, pode ser comum ao longo da cadeia de alimentos. Esse tipo de contaminação pode ser a causa de doenças e ocorrer nas cozinhas, pois segundo Ryan et al. (1996) ela contribuiu para 28% dos casos de DTA, na Inglaterra.

4.2 CONTAMINAÇÃO CRUZADA

A contaminação cruzada é um termo utilizado para referir-se a transferência de bactérias e vírus de alimentos contaminados para outro alimento, através de superfícies ou utensílios contaminados (Luber, 2009; Rodríguez et al. 2008).

A transmissão dos patógenos de uma superfície contaminada para os alimentos ocorre, aparentemente, durante o processamento destes. Os microrganismos patogênicos são continuamente introduzidos nas casas, através de pessoas, alimentos, superfícies, animais, insetos, da água e do ar (Gormam; Bloomfield; Adley, 2002). Os riscos de ocorrer contaminação cruzada estão associados a várias etapas da preparação dos alimentos (Greig; Ravel, 2009). Segundo Chen et al. (2001) é frequente a contaminação cruzada, tanto em cozinhas residenciais, quanto em serviços de alimentação e essa ocorre principalmente entre mãos e alimentos, ou várias superfícies das cozinhas.

Essa transferência de bactérias torna-se uma preocupação nas cozinhas, pois a presença de microrganismos nas superfícies aumentam os riscos de contaminação

cruzada (Rodríguez et al., 2008) que conseqüentemente contribuem para o aumento de DTA.

Diversas ações têm sido estudadas e aplicadas para evitar contaminações cruzadas nestes locais, dentre elas pode-se citar manuais de higienização, Análises de Perigos Críticos de Controle (APPCC) e análises de riscos (Sarter; Sarter; Gilabert, 2010; Havelaar et al., 2009; Beumer; Kusumaningrum, 2003; Bloomfield, 2003).

Porém, de acordo com Mattick et al. (2003) e Genti; Sylla; Faille (2010), apesar dos processos de lavagem serem um ponto de controle para prevenir a contaminação cruzada nas cozinhas, quando não efetuados corretamente podem ser responsáveis por contaminações de utensílios ou de superfícies.

Nos últimos anos observou-se que dentre as causas mais comuns associadas à contaminação cruzada dos alimentos, estão a limpeza inadequada de equipamentos e utensílios, bem como a higiene pessoal deficiente (Rodríguez et al., 2008).

Diversos estudos indicam que panos e esponjas tem sido reconhecidos como importantes difusores de patógenos, favorecendo a contaminação cruzada nos alimentos (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2002; Nielsen; Brumbaugh, Kananen, 2002; Hilton; Austin, 2000).

4.3 ESPONJAS E SUPERFÍCIES

Durante o processo de limpeza de equipamentos e utensílios (facas, placas de corte, panelas, entre outros), as etapas de pré-lavagem e lavagem são realizadas, frequentemente, com auxílio de esponjas, visando à eliminação de resíduos de

alimentos (Srebernich et al., 2007). Como conseqüência desse procedimento, parte dos resíduos adere-se à superfície das esponjas o que pode favorecer o crescimento e sobrevivência de microrganismos, aumentando o risco de transferência de contaminação para superfícies (Erdogrul; Erbilir, 2005; Kusumaningrum et al., 2002).

Estudos como os de Kusumaningrum et al. (2003) e Mattick et al (2003) demonstraram que as esponjas utilizadas na higienização nas cozinhas podem contaminar superfícies de aço inoxidável e fórmica, o que conseqüentemente contribui para contaminação cruzada entre ambiente e alimentos.

Diversas pesquisas revelaram que nas esponjas utilizadas nos processos de limpeza e desinfecção de superfícies, equipamentos e utensílios foram encontrados coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., fungos filamentosos, leveduras, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e outros oportunistas como *Pseudomonas* sp. (Rossi, 2001; Erdogrul; Erbilir, 2005; Hilton; Austin, 2000; Josephon; Rubino; Pepper, 1997).

Dos microrganismos citados acima, salienta-se a importância de *E. coli* (principal indicadora de contaminação fecal), *S. aureus* e *Salmonella* sp. que estão entre os principais causadores de surtos de DTA (Greig; Ravel, 2009, Piggot, 2008, SVS, 2005).

Desse modo, os riscos de ocorrer contaminação dos alimentos nas cozinhas são elevados, pois as bactérias transferidas de esponjas podem sobreviver por horas nas superfícies (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003). Esses dados demonstram que as esponjas devem ser consideradas como fontes potenciais de contaminações cruzadas, dentro de cozinhas residenciais e serviços de alimentação.

Os materiais mais comumente utilizados nos serviços de alimentação e que entram em contato com os alimentos durante a sua preparação são o aço inoxidável e o polietileno. O aço inoxidável tem sido utilizado para a elaboração de mesas, tanques e equipamentos em geral, enquanto o polietileno vem sendo bastante útil para a elaboração de placas de corte e cabos de utensílios. Entretanto, ambos os materiais possuem a capacidade de acumular matéria orgânica ou restos de alimentos, contribuindo para a sobrevivência dos microrganismos (Sinde; Carballo, 2000).

De acordo com Rodríguez et al. (2008), a topografia da superfície pode ser outro fator significativo para a transferência e manutenção de bactérias, ou seja, superfícies lisas (p.ex., aço inoxidável) e superfícies rugosas (por exemplo, de borracha e PVC).

O polietileno, por apresentar superfícies com irregularidades muito maiores e profundas pode aumentar ainda mais o acúmulo de resíduos e, portanto, a sobrevivência dos microrganismos.

De acordo com Kusumaningrum et al. (2003), bactérias transferidas das esponjas para superfícies de aço inoxidável podem sobreviver por horas, aumentando os riscos de contaminação cruzada.

Alguns estudos demonstraram que patógenos alimentares são capazes de sobreviver sob superfícies por horas ou dias e, conseqüentemente, contaminar alimentos (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003). Diversos fatores podem influenciar na sobrevivência desses microrganismos nas esponjas, entre os quais se destacam a presença de restos de alimentos, água, gordura, resíduos de detergentes, etc. (Mattick et al, 2003).

Por esses motivos, alguns métodos de desinfecção têm sido avaliados, a fim de encontrar ações eficazes, acessíveis e, ao mesmo tempo, fáceis de serem aplicadas nas rotinas de trabalho de serviços de alimentação e residências (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Beumer; Kusumaningrum, 2003; Ikawa; Rossen, 1999; Rusin; Orosz-Couplin; Gerba, 1998).

A desinfecção de esponjas e superfícies são ações recomendadas para evitar contaminações cruzadas nas cozinhas, o que conseqüentemente pode diminuir os riscos de disseminação de patógenos nesses ambientes.

4.4 PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO DE ESPONJAS E SUPERFÍCIES

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define higienização como a operação que compreende duas etapas, a limpeza e a desinfecção.

A desinfecção é a operação de redução, por método físico e ou agente químico, do número de microrganismos em nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária do alimento e limpeza é a operação de remoção de substâncias minerais e ou orgânicas indesejáveis, tais como terra, poeira, gordura e outras sujidades (Brasil, 2004).

Conforme o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação, preconizado pela Resolução RDC N° 216, de 15 de setembro de 2004 a área de preparação do alimento deve ser higienizada quantas vezes forem necessárias e imediatamente após o término do trabalho (Brasil, 2004)..

De acordo com Kusumaningrum et al. (2003), a umidade e presença de resíduos de alimentos nas superfícies favorecem a sobrevivência de microrganismos.

No entanto, durante a rotina diária de um serviço de alimentação, várias vezes ao dia as superfícies são higienizadas com esponjas, e se estas estiverem contaminadas conseqüentemente contaminarão as superfícies.

Conforme Erdogrul; Erbilir (2005), detergentes com antimicrobianos (compostos base de cloro) são produtos utilizados na redução de bactérias em esponjas e panos de prato e estes podem ser uma opção para diminuir os riscos de contaminação cruzada entre ambiente e alimentos.

Porém, é importante ressaltar que estes agentes antimicrobianos presentes nas esponjas não são efetivos na presença de restos de alimentos, reduzindo consideravelmente a ação desses produtos (Kusumaningrum et al., 2002).

Na escolha de um desinfetante deve-se observar aspectos como uso autorizado do produto pela legislação, grau de toxicidade, poder corrosivo, efeito residual sobre os alimentos, efeito sobre o meio ambiente e o custo (Rossoni; Gaylarde, 2000). Entre os agentes químicos que seguem essa exigência, estão os compostos liberadores de cloro, como o hipoclorito de sódio (Vialta, Moreno, Valle, 2002), que têm um amplo espectro germicida, agindo na membrana celular, inibindo enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, causando danos no DNA e oxidando proteínas celulares (Schmidt, 2003).

O Food and Drug Administration (FDA, 2001) recomenda a utilização de cloro líquido e o hipoclorito de sódio concentrações entre 50 a 200ppm, com tempo de contato de 1 a 2 minutos em superfícies e equipamentos. Para esponjas Rusin; Orosz-

Coughlin; Gerba (1998) recomendam o uso de soluções com 5,25% de hipoclorito de sódio com uma frequência mínima de 3 vezes por semana.

Scott; Bloomfield (1990), em seus estudos reportam que embeber esponjas e panos de prato por apenas 5 minutos em uma solução com concentração 1,1% de hipoclorito de sódio reduz >99,9% dos microrganismos.

Ainda Mattick et al. (2003) recomendam que a água utilizada na lavagem de louça apresente maior temperatura possível, uma vez que diminui o risco de bactérias viáveis sobreviverem nas superfícies e durante a lavagem de louças e secagem de pratos. Logo, a frequente higienização das esponjas com água quente também é uma prática recomendada, pois poderá reduzir consideravelmente a quantidade de microrganismos presente nestas.

Segundo Ikawa; Rossen (1999), a imersão das esponjas após o uso em água fervente por 5 minutos é um efetivo processo de descontaminação destas. Assim, por ser uma prática não onerosa de fácil execução e sem custo, torna-se uma opção na redução de microrganismos nas esponjas usadas nos serviços de alimentação.

Dentre os métodos que têm sido estudados destacam-se a fervura das esponjas em água potável e a desinfecção com soluções cloradas (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Kusumunaningrum et al., 2002). Grande parte da legislação brasileira não menciona a utilização de esponjas em serviços de alimentação, contudo elas continuam sendo muito utilizadas nesses estabelecimentos. Em vista disso, e como uma das poucas legislações brasileiras que abordam esse tema, recentemente a Portaria 78/2009 da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, publicou que esponjas de serviços de alimentação devem ser desinfetadas diariamente

através de fervura em água por 5 minutos, contudo o embasamento científico para a recomendação desse procedimento não foi divulgado.

Porém, muitos serviços de alimentação além de armazenar as esponjas lavadas apenas com água em locais com temperatura ambiente, favorecendo a multiplicação e sobrevivência de microrganismos, desconhecem dos riscos que a falta de desinfecção e contaminação das esponjas pode causar.

Desse modo, observa-se a importância de monitorar microbiologicamente as esponjas utilizadas em serviços de alimentação e avaliar a quantidade de microrganismos transferidos por esponjas de cozinha naturalmente contaminadas, bem como acompanhar a sobrevivência dos mesmos sobre aço inoxidável e polietileno. Além disso, sugerir e testar métodos de desinfecção de esponjas naturalmente contaminadas utilizadas em serviços de alimentação, que sejam práticas acessíveis aos serviços de alimentação, não havendo a necessidade de grandes investimentos financeiros que contribuam para redução da contaminação cruzada e consequentemente disseminação de DTA.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO

Foram coletadas 80 esponjas sintéticas de espuma de poliuretano em serviços de alimentação do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC). No RS, as esponjas foram coletadas em cinco cozinhas industriais da cidade de Porto Alegre e em SC as esponjas foram coletadas de 35 restaurantes comerciais da cidade de São Miguel do Oeste. Em cada cidade foram coletadas 40 esponjas, as quais estavam em uso por pelo menos um dia. As coletas ocorreram após contato prévio e consentimento verbal dos responsáveis pelos estabelecimentos. Após as coletas, as esponjas foram transportadas em condições isotérmicas, dentro de sacos plásticos estéreis, até o Laboratório de pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC).

No laboratório, as esponjas foram cortadas assepticamente em três partes iguais. Uma das partes foi adicionada de 100mL de água peptonada 0,1% (AES, Bruz Cedex, França) com 0,1mL de tiosulfato de sódio 10% para neutralizar os resíduos de detergentes, e então agitada em “stomacher” (ITR, Esteio, RS), por 60 segundos. Posteriormente, essa parte da esponja foi submetida à quantificação de MH, CF, SA e à pesquisa de SAM, conforme Normativa 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2003).

As duas partes restantes da esponja foram submetidas, separadamente, à desinfecção por fervura, durante cinco minutos (conforme preconizado pela Portaria

78/2009 SES/RS), e a desinfecção com hipoclorito de sódio 200ppm, por 10 minutos, mais enxágue com água potável, conforme adaptado de Ikawa; Rossen, (1999). Para a desinfecção por fervura, proposta desta pesquisa, (Continental, São Paulo, SP), as esponjas foram mergulhadas em frascos contendo 300 mL de água destilada estéril e então colocadas em forno microondas sendo o tempo de fervura quantificado após o início do surgimento de bolhas na água onde as esponjas foram imersas. Após os procedimentos de desinfecção, ambas as partes de cada esponja foram adicionadas de água peptonada 0,1% (AES, Bruz Cedex, França) e analisadas segundo os mesmos parâmetros acima citados.

A contagem de MH foi efetuada pela técnica do *pour-plate* com ágar padrão para contagem (PCA, Merck, Darmstadt), a quantificação de CF foi realizada pela técnica do *pour-plate* em sobrecamada com ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA, Merck, Darmstadt) e as colônias características foram confirmadas em caldo EC (Merck, Darmstadt). As contagens de SA foram efetuadas pela técnica de semeadura em ágar Baird-Parker (DIFCO, Basingstoke). As colônias características (negras com halos) foram submetidas à coloração de Gram e testes bioquímicos para confirmação (catalase, coagulase e termonuclease)- (BRASIL, 2003).

Todas as contagens foram efetuadas em triplicata em placas da mesma diluição contendo 25 e 250 colônias. Os resultados foram multiplicados por três, uma vez as esponjas eram divididas em três partes e então expressos em Log UFC/esponja.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp. foram utilizados 25mL da água peptonada 0,1%, na qual a esponja foi hidratada após a coleta. Essa alíquota foi adicionada a 225mL de água peptonada tamponada 1% (Merck, Darmstadt, Germany) e incubada a

36°C, por 20 horas. Posteriormente foi inoculado 1mL desta amostra em tubos contendo caldo selenito-cistina (Merck, Darmstadt, Germany) e caldo tetrionato (Merck, Darmstadt, Germany), foram incubados a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 24 horas. Em seguida, as amostras foram estriadas em Agar Verde brilhante e Xilose Lisina Desoxicolato (Merck, Darmstadt, Germany) e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 18-24 horas. Colônias características foram confirmadas por testes bioquímicos e sorológicos conforme a normativa nº 62 de 2003 do MAPA (BRASIL, 2003). Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *Salmonella* sp.

5.2 CONTAMINAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO

Foram coletadas 24 esponjas sintéticas com espuma de poliuretano naturalmente contaminadas, em cozinhas industriais do Rio Grande do Sul (RS). No momento das coletas as esponjas estavam em uso por pelo menos um dia, e foram coletadas após contato prévio e consentimento verbal dos responsáveis pelos estabelecimentos. Após as coletas, as esponjas foram transportadas em condições isotérmicas, dentro de sacos plásticos estéreis, até o Laboratório de pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC).

No laboratório, as esponjas foram cortadas assepticamente em duas partes iguais. Uma das partes foi adicionada de 100mL de água peptonada 0,1% (AES, Bruz Cedex, França) com 0,1mL de tiosulfato de sódio 10%, e então agitada em

“stomacher” (ITR, Esteio, RS), por 60 segundos. Posteriormente, essa parte da esponja foi submetida à quantificação de MH, CF, SA e à pesquisa de SAM.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme Normativa 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com metodologia citada no item 5.1.

Todas as contagens foram efetuadas em triplicata em placas da mesma diluição contendo 25 e 250 colônias. Os resultados foram expressos em Log UFC/esponja.

A outra parte das 24 esponjas foi friccionada sobre superfícies de aço inoxidável AISI 316 (mesa de aço inoxidável) e polietileno (placa de corte nova) previamente higienizadas com álcool 70%. Para tanto, foram utilizadas 12 metades de esponjas para cada superfície.

As superfícies foram mantidas em ambiente fechado mantidas em temperatura ambiente de aproximadamente 20° C, através do uso de ar condicionado.

Cada esponja foi hidratada com 30mL de água peptonada 0,1% (AES, Bruz Cedex, França), contendo 30µL de tiosulfato de sódio 10%, sendo, em seguida, friccionada cinco vezes na superfície (10x10cm) de aço inoxidável AISI 316 e na superfície de polietileno. Após, as superfícies contaminadas foram amostradas, utilizando um *swab* estéril, previamente imerso em 10 mL de água peptonada 0,1% esfregado sobre a superfície (10x10cm) dos materiais, em três direções diferentes, sendo posteriormente colocado em tubo de ensaio contendo água peptonada 0,1%. O *swab* foi agitado por 30 segundos, em agitador magnético e a suspensão bacteriana foi submetida a diluições decimais em água peptonada 0,1%. Em seguida, a contagem total de MH foi realizada pela técnica de semeadura por *pour-plate* em Agar PCA

(Merck, Darmstadt, Alemanha), incubado à $36\pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas. As contagens foram realizadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 24 horas, após a contaminação com as esponjas.

Todas as contagens foram efetuadas em triplicata, em placas contendo 25 e 250 colônias. Os resultados foram expressos em Log UFC/cm².

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar as diferenças estatísticas nos processos de desinfecção foi utilizado o teste ANOVA e para avaliar as diferenças da sobrevivência nas superfícies foi utilizado o Teste-T Students ambos considerando como nível de significância 5% (ou ambos considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo).

6 RESULTADOS

6.1 CONTAMINAÇÃO DAS ESPONJAS

As esponjas apresentaram contaminação por MH, variando de 3,4 a 10,4 Log UFC/esponja, com média de 9,1 Log UFC/esponja. Dentre as esponjas analisadas, 76,75% (61/80) apresentaram contaminação de MH entre 7 e 9 Log UFC/esponja. A maior frequência de esponjas contaminadas por MH (28,75%) apresentou aproximadamente 7 Log UFC/esponja (Figura 1).

Das amostras avaliadas, 76,25% apresentaram CF, variando entre 4,5 a 9,9 Log UFC/esponja, com média de 8,4 Log UFC/esponja. A maior frequência de esponjas com contaminação por CF (25%) apresentou cerca de 7 Log UFC/esponja (Figura 2).

SA e SAM foram encontrados em 2,5% das amostras (2/80), sendo SA em contagens de 3,6 a 5,3 Log UFC/esponja. As amostras contaminadas por SA e SAM foram de esponjas diferentes.

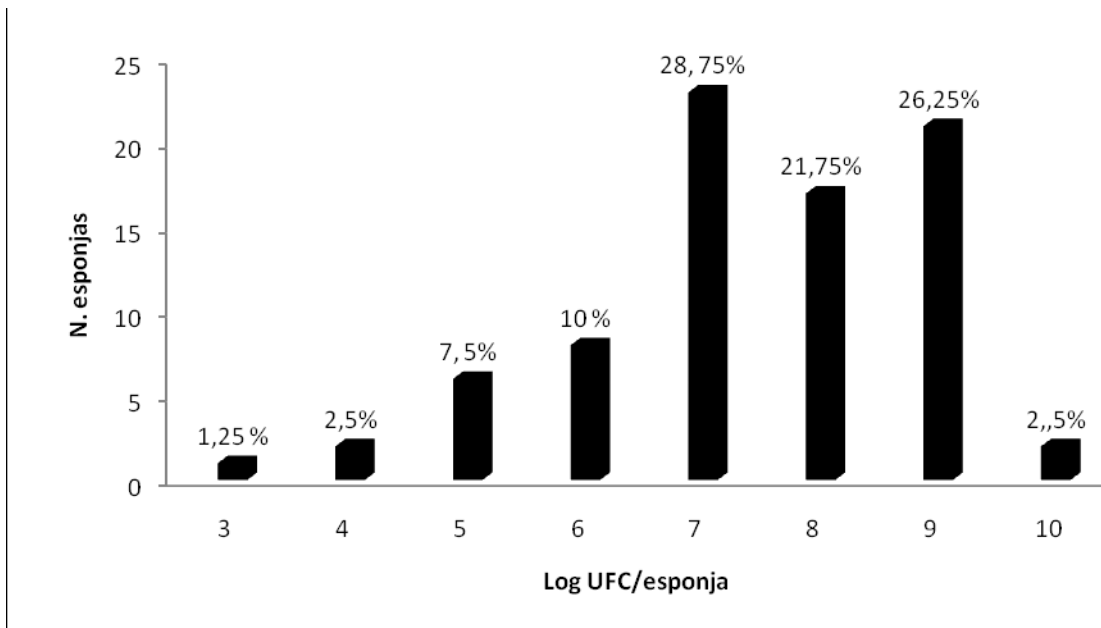


Figura 1. Frequência de microrganismos heterotróficos (MH) em 80 esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

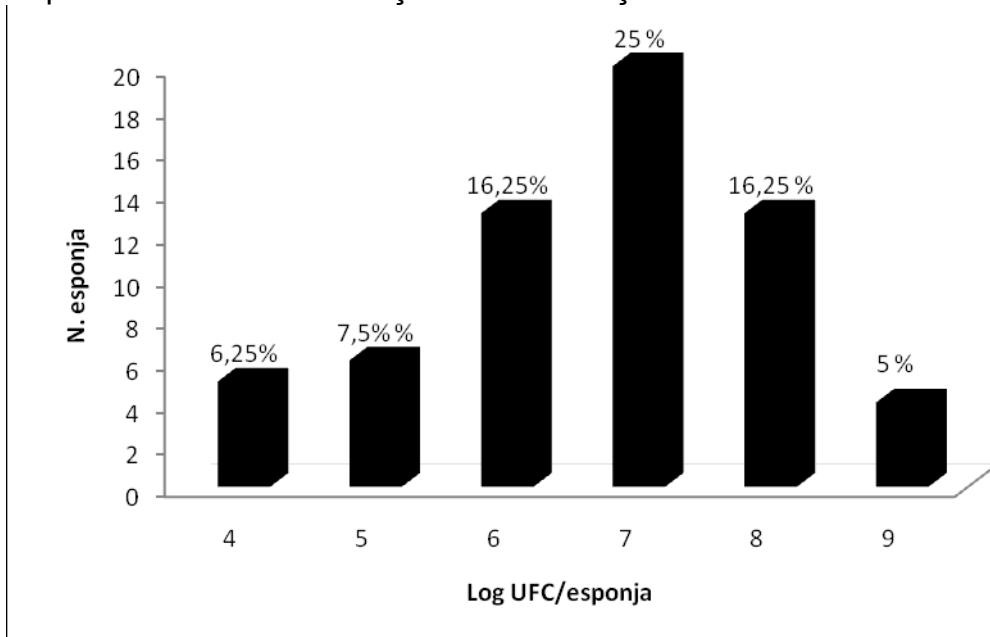


Figura 2. Frequência de Coliformes à 45° C (CF) em 80 esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

6.1 PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO

Embora ambos métodos de desinfecção tenham reduzido as contagens de MH significativamente ($P < 0,05$), a fervura inativou um maior número de microrganismos. A fervura por 5 minutos, em microondas e a desinfecção por hipoclorito de sódio 200ppm, por 10 minutos, adicionado de enxágue em água potável apresentaram reduções médias de 6,7 (>99,9%) e 2,7 Log UFC/esponja (99,9%), respectivamente (Figura 3).

As reduções médias de CF alcançadas após a fervura e após a desinfecção com hipoclorito de sódio 200ppm foram de 8,4 (>99,9%) e 2,1 Log UFC/esponja (99%), respectivamente. Após a fervura, não foram encontrados CF, enquanto que após a desinfecção com solução clorada, sobreviveram em média 6,3 Log UFC/esponja. Após ambos os métodos, não foram encontrados SA e SAM nas amostras contaminadas.

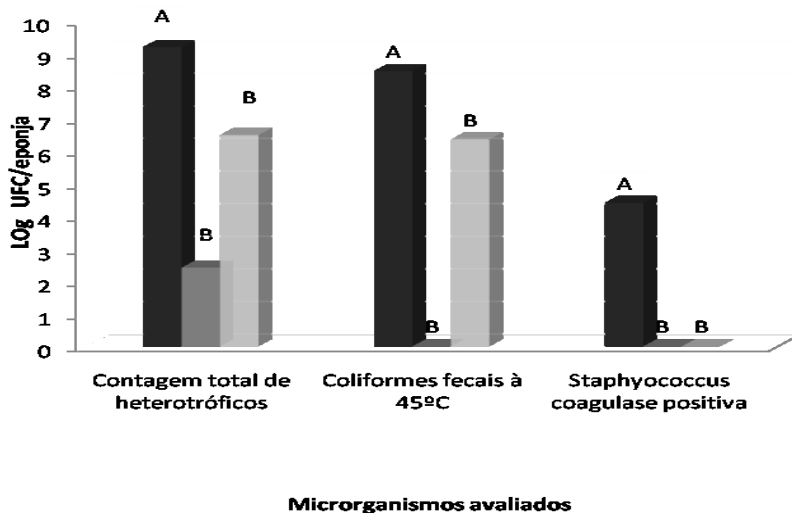


Figura 3. Reduções bacterianas (LogUFC/esponja) em esponjas de limpeza coletadas em serviços de alimentação não desinfetadas (■)desinfetadas por fervura em microondas por 5 minutos (■) e desinfecção com hipoclorito de sódio 200ppm, por 10 minutos, mais enxágue com água potável (■). Diferentes letras indicam reduções estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

6.2 CONTAMINAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO

As 24 esponjas analisadas apresentaram contagens de MH, variando entre 4,1 à 10 LogUFC/esponja, com média de 6,8 LogUFC/esponja. Dessas esponjas, 83,3% apresentaram CF em quantidades que variaram entre 3 à 9,7 LogUFC/esponja, com médias de 5 Log UFC/esponja. Nenhuma das esponjas avaliadas apresentou SA ou SAM.

Devido a grande variação da contaminação por MH, as esponjas foram divididas em dois grupos distintos para a realização desse experimento: grupo um: esponjas contaminadas com 7 à 10 Log UFC/esponja e grupo dois: esponjas contaminadas com 4 à 6,9 Log UFC/esponja.

A transferência de microrganismos (tempo zero na Figura 4) foi maior pelas esponjas do grupo um, do que para as esponjas do grupo 2. O grupo um transferiu em média 5,5 LogUFC/cm² da contaminação inicial para aço inoxidável AISI 316 e 5,6 Log UFC/cm² para o polietileno. Já o grupo dois transferiu em média 3,3 LogUFC/ cm² e 3,5 Log UFC/ cm², respectivamente, para as superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno (Figura 4).

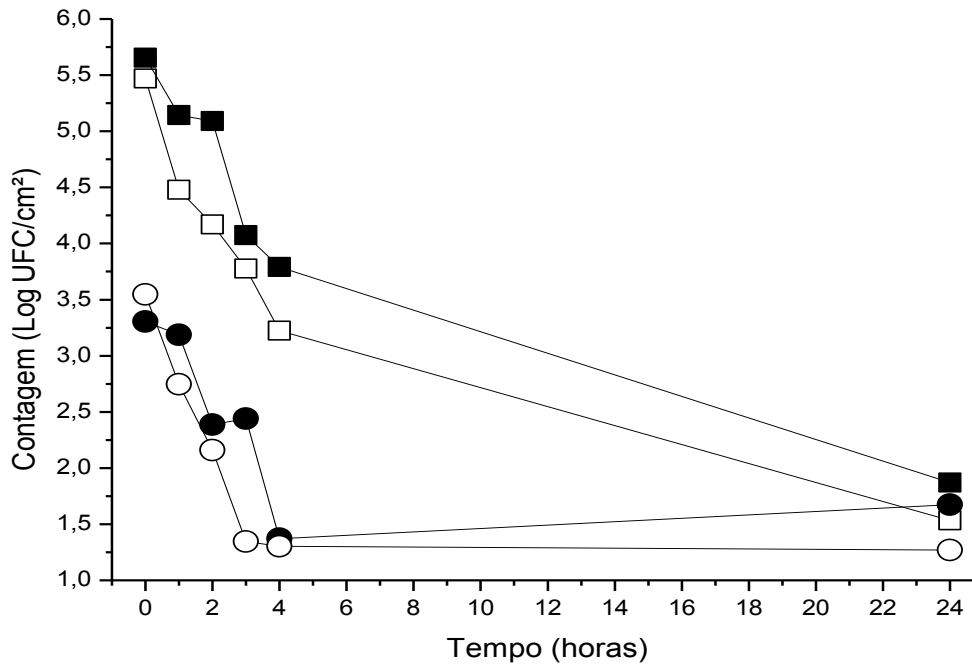


Figura 4: Sobrevivência de MH transferidos de esponjas de limpeza para superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno em diferentes níveis de contaminação: Grupo um: esponjas com 7 à 10 Log UFC/esponja e grupo dois: esponjas contaminadas com 4 à 6,9 Log UFC/esponja. (■) Grupo um em em polietileno; (□) Grupo um em aço inoxidável AISI 316; (●) Grupo dois em em aço inoxidável AISI 316 e (○) Grupo dois em polietileno;

Após uma hora, ocorreu uma redução de aproximadamente 1 Log UFC/cm² de MH do grupo um presentes na superfície de aço inoxidável AISI 316 e 0,51 Log UFC/cm² no polietileno. No grupo dois a redução da quantidade de MH foi de 0,2 Log UFC/cm² e 0,8 Log UFC/cm², respectivamente, para as duas superfícies (Figura 4).

As contagens médias de MH decresceram nas horas seguintes de exposição, em ambos os grupos e superfícies. Por exemplo, as contagens médias de bactérias do grupo um, após quatro horas, sofreram reduções de 2,27 Log UFC/cm² no aço

inoxidável e 1,86 LogUFC/cm² no polietileno e no grupo dois as reduções foram de 1,94 Log UFC/cm² e 2,24 Log UFC/cm², respectivamente, após quatro horas (Figura 4).

Após 24 horas, houve uma redução média de aproximadamente 2,9 LogUFC/cm² nas bactérias do grupo um, enquanto que as bactérias do grupo dois permaneceram em quantidades praticamente iguais. Após esse período de exposição, as quantidades de sobreviventes do grupo um e do grupo dois não diferiram estatisticamente (entre 1,26 a 1,87 LogUFC/cm²).

7 DISCUSSÃO

7.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO

Diversos estudos têm demonstrado que esponjas de limpeza podem ser potenciais fontes de contaminação cruzada, inclusive disseminando microrganismos patogênicos (Scott, 1999; Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003).

No presente estudo, as análises demonstraram que as esponjas estavam contaminadas, corroborando com resultados encontrados por outros pesquisadores. Por exemplo, elevada contaminação por MH também foi encontrada por Kusumaningrum et al. (2002), os quais observaram a presença de aproximadamente 6 Log UFC/esponja de MH em esponjas utilizadas durante três dias em cozinhas, na Holanda. Do mesmo modo, Erdogrul; Erbilir (2005), na Turquia, encontraram 6,9 Log UFC/esponja de MH em esponjas utilizadas durante 10 dias.

A porcentagem de esponjas contaminadas por CF encontrada no presente estudo foi semelhante aos resultados de Josephson, Rubino e Pepper (1997) e Ojima et al. (2002). Esses pesquisadores demonstraram que 67% de 100 e 78,3% de 84 esponjas coletadas nos Estados Unidos e no Japão, respectivamente, estavam contaminadas por CF. Kusumaningrum et al. (2002) encontraram aproximadamente 6 Log UFC/esponja de CF em esponjas de cozinha, na Holanda.

CF nas esponjas indicam a presença de material fecal e podem indicar a presença de patógenos alimentares (Tebbutt, 2007). Essa contaminação nas esponjas

pode ser atribuída a diversos fatores, como por exemplo, práticas higiênico-sanitárias inadequadas durante a preparação dos alimentos, contaminação por produtos crus, ausência de procedimentos de desinfecção, contaminação cruzada carregada por alimentos contaminados, armazenamento em locais com umidade e temperatura elevada.

Se forem comparadas as contagens médias de MH (9,1 log UFC/esponja) e CF (8,4 log UFC/esponja) e consideradas as frequências encontradas desses microrganismos nas esponjas analisadas, pode-se constatar que parte expressiva da contaminação microbiológica presente nas esponjas foi, de fato, de origem fecal. Contudo, apenas 2,5% das esponjas apresentaram contaminação SAM, microrganismo esse também de origem fecal.

É necessário ressaltar que a baixa frequência dos patógenos SA e SAM nas esponjas, quando comparados com MH e CF, também foi encontrada por outros estudos (Erdogrul; Erbilir, 2005; Josephson; Rubino; Pepper, 1997 e Srebernich et al., 2005) e embora sejam menos frequentes nas esponjas, sua presença representa um elevado risco nas cozinhas, uma vez que, são os principais patógenos causadores de DTA, em muitos países (Greig; Ravel, 2009) inclusive no Brasil (SVS, 2005).

Embora as esponjas sejam utilizadas através do contato direto com as mãos dos funcionários e é sabido que 30 a 50% dos humanos são portadores de SA na pele (Kanafani; Fowler Jr., 2006) apenas 2,5% das amostras continham esse microrganismo. Essa baixa porcentagem de amostras contaminadas por essa bactéria Gram positiva pode ser atribuída ao a presença e ao efeito inibidor de detergentes nas esponjas, o que foi comprovado visualmente em muitas amostras, após as coletas nos serviços de

alimentação (resultados não mostrados). Segundo Kusumaningrum et al. (2002), as bactérias Gram positivas possuem a estrutura da parede celular mais sensível aos surfactantes aniônicos presentes nos detergentes, o que pode contribuir para inativação desses microrganismos.

Os dois métodos de desinfecção analisados foram significativamente eficazes na redução de bactérias das esponjas, contudo a fervura foi capaz de reduzir um maior número de microrganismos. Resultados semelhantes foram apresentados por Sharma; Eastridge e Mudd (2009) que encontraram reduções significativas ($p < 0,05$) para desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 10%, por três minutos, e fervura em microondas por um minuto, a qual obteve melhor resultado quando comparado ao hipoclorito de sódio. As reduções de MH encontradas por Sharma; Eastridge; Mudd (2009) foram de 7,1 Log e 1 Log UFC/esponja para desinfecção por fervura com microondas e hipoclorito de sódio 10%, respectivamente. A menor redução microbiana verificada após a utilização do hipoclorito de sódio pode ser explicada pela presença de matéria orgânica nas esponjas, bem como o tempo de uso médio (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Kusumaningrum et al. 2002; kotula et al.,1997). Por outro lado, os resultados do presente estudo demonstraram que algumas esponjas (7/80) ainda mantiveram microrganismos viáveis após a fervura, o que pode ser explicado pela provável presença de microrganismos esporulados termoresistentes (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009). Conforme Celadroni et al. (2004), apesar de microrganismos esporulados sobreviverem facilmente à fervura, esse processo pode eliminar parte da população de esporulados, dependendo da cepa. Por exemplo, a fervura em microondas foi mais eficaz que a fervura convencional para a inativação de *Bacillus*

subtilis. Segundo esses autores, a inativação dos endósporos ocorre devido à formação de um complexo estável entre o ácido dipicolínico e outros componentes do envoltório.

A efetividade na destruição de CF foi verificada nos dois métodos, contudo a fervura por cinco minutos reduziu 99,999999% dessas bactérias nas esponjas, enquanto que o hipoclorito de sódio reduziu 99%. Segundo Ikawa; Rossen (1999) a fervura por cinco minutos é um excelente método de desinfecção de esponjas, reduzindo drasticamente a quantidade de CF.

A eficiência da fervura por microondas pode ser explicada pela elevada temperatura da água capaz de desnaturar proteínas e, conseqüentemente, destruir a integridade das membranas, causando a morte dos microrganismos (Woo; Rgee e Park, 2000).

Park et al. (2006) e Sharma; Eastridge; Mudd (2009) atribuem a efetividade da fervura na redução de microrganismos à água dentro das esponjas, a qual pode gerar vapor e matar os microrganismos que estão no seu interior. No presente estudo, as esponjas estavam imersas em água, logo a redução microbiana, provavelmente, ocorreu devido ao calor da água e não do seu vapor. Além disso, outro fator importante a ser ressaltado é que durante a fervura em água, ocorre a movimentação da esponja dentro desse líquido, possibilitando a remoção de boa parte da matéria orgânica e com isso, melhor penetração do calor. Essa movimentação não ocorreu durante a avaliação da solução de hipoclorito de sódio 200ppm, o que pode ter influenciado na menor inativação de microrganismos.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que métodos de desinfecção de esponjas podem ser facilmente realizados, alcançando reduções

significativas de microrganismos. Os resultados também demonstraram que a fervura de esponjas por cinco minutos foi mais efetiva na redução de microrganismos do que o hipoclorito de sódio a 200ppm. Assim, a exigência de desinfecção diária de esponjas por cinco minutos de fervura em água preconizada pela Portaria 78/2009 da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, está correta. Corroborando essa exigência para os serviços de alimentação desse estado, algumas empresas que comercializam o mesmo tipo de esponja utilizado neste estudo recomendam que elas sejam mergulhadas em água fervente por alguns minutos, no intuito de reduzir a quantidade de bactérias.

7.2 CONTAMINAÇÃO DA SUPERFÍCIE E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS EM AÇO INOXIDÁVEL AISI 316 E POLIETILENO

Os riscos de contaminação cruzada por esponjas durante a higienização de utensílios e superfícies é elevado, uma vez que esses objetos podem ser uma importante fonte de bactérias (Hilton e Austin, 2000). Tais microrganismos podem sobreviver por semanas nas esponjas (Kusumaningrum et al., 2003) e, conseqüentemente, serem transferidos para as superfícies (Kusumaningrum et al. 2003, Mattick et al., 2003).

Nesse estudo, observou-se que esponjas naturalmente contaminadas podem transferir um número elevado de microrganismos para superfícies que sejam friccionadas com elas. Kusumaningrum et al. (2003) contaminaram artificialmente esponjas de cozinha com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e

Campylobacter jejuni. Depois de friccionar as esponjas em aço inoxidável, puderam verificar que as mesmas transferiram entre 21% e 43% dos inóculos iniciais colocados nas esponjas.

Outros materiais também podem ser contaminadas por esponjas, como demonstraram Mattick et al. (2003) em seu estudo realizado na Inglaterra, onde esponjas artificialmente contaminadas transferiram *E. coli* e *Salmonella* sp. para superfícies de fórmica. Esses autores também relataram que a quantidade de microrganismos transferidos para superfícies depende da contaminação inicial, ou seja, quanto maior a quantidade de bactérias nas esponjas, maior será a quantidade transferida. Resultados semelhantes foram demonstrados no presente estudo, no qual o grupo um (contendo 7 a 10 LogUFC/esponja) transferiu em média 5,5 LogUFC/cm² da contaminação inicial para aço inoxidável AISI 316 e polietileno, enquanto o grupo dois (contendo 4 a 6,9log UFC/esponja) transferiu aproximadamente 1,9 LogUFC/esponja.

Os resultados desse estudo também demonstraram que o número de bactérias transferidas para o aço inoxidável e para o polietileno decresceu rapidamente ao longo da exposição dessas superfícies à temperatura ambiente. Independente da quantidade transferida, após 24 horas, o número de bactérias sobreviventes foi bastante baixo em relação ao número inicial de microrganismos. Esses resultados foram semelhantes a aqueles publicados por Kusumaningrum et al. (2003) que demonstraram reduções acentuadas de *E. coli*, *S. Enteritidis* e *C. jejuni*, em quatro horas, sobre superfícies de aço inoxidável. Segundo esses pesquisadores, as características fisiológicas das bactérias são fatores que influenciam na sobrevivência dos microrganismos, pois

células de *S. Enteritidis* e *S. aureus* permaneceram viáveis sobre a superfície por até 96 horas, enquanto que *C. jejuni* não foi detectada após 4 horas de exposição.

No presente estudo, a rápida redução encontrada no intervalo de tempo entre 0 e 4h, para ambos os grupos e superfícies, pode ser atribuída a diminuição da umidade sobre os materiais. Segundo Tebbut et al. (2001) suspensões bacterianas sobre superfícies podem formar grumos, evitando a desidratação e o funcionamento das células microbianas.

No presente estudo não foram observados diferenças significativas no número de bactérias sobreviventes nas superfícies, após 24 horas em temperatura ambiente, contudo Kusumaningrum et al. (2003) afirmaram que, quanto maior a concentração de bactérias nas superfícies e resíduos de matéria orgânica nas esponjas, maior é a sobrevivência dos microrganismos.

O fato das esponjas analisadas conterem diferentes quantidades de restos de alimentos (resultados não avaliados) pode ter influenciado na sobrevivência dos microrganismos, contudo isso não foi avaliado.

O presente trabalho demonstrou que não houve diferenças significativas na transferência e sobrevivência dos microrganismos nas superfícies de aço inoxidável e polietileno. Dados semelhantes foram demonstrados por Malheiros et al (2010) que em seu estudo verificaram que o *S. aureus* foi transferido em quantidades semelhantes para o aço inoxidável e para o polietileno, a partir de cubos de carne de frango contaminados artificialmente.

Cabe ressaltar que as superfícies dos materiais avaliados nesse trabalho eram novas, sem ranhuras, o que nem sempre é observado durante as rotinas dos serviços

de alimentação, onde as placas de corte ou mesas de aço inoxidável estão frequentemente arranhadas. Nessas situações é possível que a quantidade de bactérias transferidas por esponjas seja maior, facilitando a formação de biofilmes. Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis embebidas em uma matriz polimérica que aderidas em uma superfície sólida tornam-se um problema significativo para cozinhas de serviços de alimentação e domiciliares, uma vez que conferem aos microrganismos resistência a antibióticos, desinfetantes, metais pesados, entre outros (Garret et al., 2008). Muitos patógenos encontrados nas esponjas, panos de prato e diversas superfícies das cozinhas formam biofilmes, podendo aumentar a possibilidade de ocorrência da contaminação cruzada nesses ambientes (Rayner; Veeh; Flood, 2004).

Conforme Scott; Sally; Bloomfield (1990), contaminações cruzadas podem transferir microrganismos suficientes para causar DTA. Considerando a baixa dose infectante de certos microrganismos, como por exemplo a *Shigella* e *E. coli* O157:H7 que podem causar doenças com menos de 100 células (Montville; Matthews, 2008), as contagens de bactérias transferidas das esponjas para ambas as superfícies poderiam ser suficientes para causar DTA, pois a contaminação das superfícies provenientes das esponjas no tempo zero foi de aproximadamente 5,5 e 3,4 Log UFC/cm².

Com base no elevado número de microrganismos que podem ser transferidos a partir de uma esponja contaminada, o controle da higiene dentro de um serviço de alimentação, a fim de diminuir as fontes de contaminação, assim como a realização de procedimentos de desinfecção de esponjas, são muito importantes.

8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as esponjas utilizadas em serviços de alimentação estavam contaminadas e puderam transferir quantidades elevadas de microrganismos para superfícies de aço inoxidável AISI 316 e polietileno.

Embora a quantidade de microrganismos transferidos para as superfícies tenha sido elevada, ocorreu uma redução do número de microrganismos ao longo do tempo, sendo que a redução foi maior nas primeiras 4 horas de exposição a temperatura ambiente. Mesmo assim, após 24 horas de exposição, ainda foram encontrados microrganismos viáveis.

Ambos os métodos testados neste estudo reduziram significativamente as contagens bacterianas, mas a fervura, por cinco minutos, foi mais efetiva que a desinfecção com hipoclorito de sódio a 200ppm, por 10 minutos, adicionada de enxágue com água potável. Esses resultados demonstraram a adequação da exigência da fervura, por cinco minutos, da Portaria 78/2009 – SES/RS para a desinfecção de esponjas em serviços de alimentação do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Legislação de Boas Práticas para Serviços de Alimentação: [Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004](#)**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public>>. Acesso em: 22 março de 2008.
- BEUMER, R.R. ; KUSUMANINGRUM, H. Kitchen hygiene in daily life. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, pág. 299-302, 2003.
- BLOOMFIELD, S. F. Home hygiene: a risk approach. **International Journal of Hygiene Environmental Health**. v. 206, pág 1 – 8, 2003.
- BRASIL, Instrução Normativa nº. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003.
- BRASIL, Portaria nº 78 de 28 de janeiro de 2009 da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul Aprova a lista de verificação em Boas práticas para serviços de alimentação, aprova as normas para os cursos de capacitação em Boas Práticas para serviços de alimentação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Porto Alegre-RS 30 de janeiro de 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne illness**. Janeiro, 2005. Acesso em: 04 de janeiro de 2010.
- CELADRONI, F. et al. Effects of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Applied Microbiology**, 97, pág. 1220–1227. 2004
- CHEN, Y.H. et al. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. **Journal of Food Protection**. v. 64, n. 1, p. 72-80, 2001.
- ERDOGRUL, O.; ERBILIR, F. Microorganisms in kitchen sponges. **Internet Journal of food safety**. v.6, p. 17-22, 2005.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce Table of Contents**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Cap 4 setembro 2001.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, pág. 1049–1056, 2008.

GENTIL, C. L.; SYLLA, Y.; FAILLE, C. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. **Journal of Food Engineering**. v. 96, 37–42 pág 2010.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C.C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Food Microbiology**, v.76, pág. 143-150, 2002

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, pág. 77-87, 2009.

HAVELAAR, A. H et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**. 2009. IN Press.

HILTON, A.C ; AUSTIN, E. The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. **International Journal Of Environmental Health Research**, v. 10, 257-261, 2000.

IKAWA; J. K.; ROSSEN, J. S. Reducing Bacteria in Household Sponges. **Journal of Environmental Health**, v. 62, n. 1, p. 18-22, 1999.

JOSEPHSON, K.L., RUBINO, J.R.; PEPPER, I. L. Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchens with and without the use disinfectant cleaner. **Journal of Applied Microbiology**, 87, 737-750, 1997.

KOTULA, K. L. et al. Reductions of aqueous chlorine by organic material. **Journal of Food Protection**, v. 60, 276-282.1997.

KUSUMANINGRUM, H.D. et al. Effects of dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. **Journal of food protection**, v.65, n.1, pág 61-65, 2002.

KUSUMANINGRUM, H.D. et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 03, pág 227-236, 2003.

LINDQVIST, R.; LINDBLAD, M. Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. and cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden. **Journal of Food Microbiology**, v. 121 pág. 41–52, 2008.

- LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, 21–28, 2009.
- MALHEIROS, P. S. et al. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21 , pág. 298–301, 2010.
- MATTICK, K. et al. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 03, p. 213-226, 2003.
- MONTEVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. **Food microbiology**: An introduction. 2 ed. ASM Press: Washington, DC, 2008. 428 p.
- NILSEN, P. BRUMBAUGH, E. KANANEN, L. Evaluation of the use of liquid dishwashing compounds to control bacteria in kitchen sponges. **Journal of OAC International**, v. 85, n.1,107-12. Jan-Feb 2002.
- OJIMA, M. et al. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, pág. 800-809, 2002.
- OLIVEIRA, F. A .,et al. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**. v. 20, 606–610, 2009.
- PARK, D.; BITTON, G. ; MELKER R. Microbial inactivation by microwave radiation in the home environment. **Journal of Environmental Health**, v. 69, n.5, pág. 17–24, 2006.
- PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its stailless. **International Journal Food Mycrobiology**. v. 65, pág. 105-111. 2001.
- PIGGOT, D. C. Foodborne Illness Emergency **Medicine Clinical of North América**, v. 26, pág 475–497, 2008.
- RAYNER, J.; VEEH, R.; FLOOD, J. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. **International Journal of Food Microbiology** , v. 95, pág. 29– 39, 2004.
- RODRÍGUEZ, F. P. et al. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. **Trends in Food Science & Technology**. v.19, pág. 131e144, 2008.
- ROSSI, C.F.**Condições higiênico sanitárias de restaurantes comerciais do tipo self-service de Belo Horizonte-MG**. 2006. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Porto Alegre, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

RUSIN, P.; OROSZ-COUGHILIN, P.; GERBA C. Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 819–828, November, 1998.

RYAN, M. J. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. **Communicable disease report. review**, v. 6, n.13 p.179-183, Dez.1996.

SARTER, S.; SARTER. G. ; GILABERT, P. A Swot analysis of HACCP implementation in Madagascar. **Food Control** . v.21 pág. 253–259, 2010.

SCOTT, E. Hygiene issues in the home. **Am Journal Infection Control (AJIC)**. v.27, n. 6. p. S22-S25., 1999.

SCOTT, E; BLOOMFIELD, S.F. Investigations of effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths. **Journal Applied bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 279-283, março 1990.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim eletrônico epidemiológico**. n.6 , 2005. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em 03 de junho de 2008.

SHARMA, M.; EASTRIDGE, J. ; MUDD, C. Effective household disinfection methods of kitchen sponges. **Food Control** , 20, pág 310-313, 2009.

SINDE, E; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 17, 439–447, 2000.

SREBERNICH, S. et al. Avaliação microbiológica de esponjas comerciais utilizadas em cozinhas industriais na cidade de Campinas, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 75-78, jun. 2005.

SREBERNICH, S. et al. Avaliação microbiológica de esponjas contendo agentes bactericidas usadas em cozinhas de unidades de alimentação e nutrição da região de Campinas/SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 01, p. 85-88, 2007.

SWANGER, N.; RUTHERFORD, D. G. Foodborne illness: the risk environment for chain restaurants in the United States. **Hospitality Management** , v. 23 , pág 71–85, 2004.

TEBBUT, G.M. An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling high-risk foods. **Epidemiology and Infection**. v. 106, pág 319-327, 2001.

TEBBUTT, G.M. Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales?. **Journal of Applied Microbiology**. v.102, p. 883-891.2007.

VIALTA, A.; MORENO, I.; VALLE, J.L.E. Boas práticas de fabricação, higienização e análise de pontos críticos de controle na indústria de Laticínios: 1- Requeijão. **Revista Laticínios**, São Paulo, n. 37, p. 56-63, 2002.

WHO Food safety and foodborne illness.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>> Acesso em : 04 de janeiro de 2007.

WOO, I.; RHEE, I. ; PARK, D. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, 2243–2247, pág. 2000.

ANEXOS

ANEXO A- Artigo I

Submetido para *Journal Food Safety*

Microbiological Contamination and Disinfection Procedures of Kitchen Sponges Used in Food Services

Eliandra Mirlei Rossi¹; Diane Scapin²; Williani Fabíola Grando²; Eduardo César Tondo^{3*}

¹ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade do Oeste de Santa Catarina – 89900-000 – São Miguel do Oeste – SC – Brazil

² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Curso de graduação em Biologia – Universidade do Oeste de Santa Catarina – 89900-000 – São Miguel do Oeste – SC – Brazil.

³ Departamento de Ciências dos Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, Porto Alegre – RS, Brazil Cep. 91501-970

* Corresponding author: tondo@ufrgs.com.br

Fone: 051 33086677

Abstract

Kitchen sponges continue to be very used in Brazilian food services, even though it may be very contaminated. The objective of this study was to evaluate the microbiological contamination and the efficacy of two procedures of disinfection of kitchen sponges used in Brazilian food services. Eighty sponges were collected in food services and then submitted to the quantification of heterotrophic microorganisms (HM), fecal coliforms (CF), *Staphylococcus* coagulase-positive (SA) and to the investigation of the presence of *Salmonella* sp. (SAM). After that, the sponges were submitted, separately, to boiling water for five minutes and to disinfection by sodium hypochlorite 200ppm, for 10 minutes, added by rinse with potable water. The results showed that sponges presented HM counts between 3.4 and 10.4 log CFU/sponge, with an average of 9.1 log CFU/sponge, and 76.25 % of them presented CF with average counts of 8.4 log

CFU/sponge. SA and SAM were found in 2.5 % of samples. Both disinfection procedures were able to reduce significantly the bacterial counts, but the boiling method showed greater reduction (99.9999 %) than the disinfection by sodium hypochlorite 200ppm (99.9 %).

Key-Words: Kitchen sponges, microbiological contamination, disinfection, food services.

INTRODUCTION

In the last years, there have been happening a significant increase of foodborne illnesses worldwide (Greig; Ravel, 2009; Havelaar et al., 2009), including in Brazil (Oliveira et al., 2009). In this country, according to the Hospital Information System of the Ministry of Health, from 1999 to 2004, there were 3.410.048 hospital admissions due to foodborne illness, with an average of 568.341 cases per year. Besides that, between 1999 and 2002, around 6.320 deaths were registered due to these diseases in Brazil (SVS, 2005).

According to data of Health Surveillance Secretary (SVS, 2005), food services, such as restaurants and schools were responsible for 18.8 % and 11 %, respectively, of outbreaks occurred in Brazil, from 1999 to 2004.

The kitchen sponges have been recognized as important diffusers of pathogens, and they can cause cross contamination in food (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003; Sharma; Eastridge; Mudd, 2009). These sponges can contain food residues and moisture, and can serve as reservoir of foodborne pathogens such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. (Erdogrul; Erbilir, 2005; kusumaningrum et

al., 2003; kusumaningrum et al., 2002; Ikawa; Rossen, 1999). Contaminated sponges can transfer those pathogens to the surface that get in contact with food, and these microorganisms can remain viable in the surfaces for hours or days after contamination (Kusumaningrum et al., 2003). Many food services keep their sponges in room temperature, inside containers with water and food residues, which can contribute to microorganism multiplication.

For these reasons, special care must be taken in order to reduce microbiological contamination of sponges. Some disinfection methods have been applied to reduce microbial sponge contamination (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Beumer; Kusumaningrum, 2003). Among these methods, the boiling of sponges in potable water and the sodium hypochlorite disinfection are the most highlighted (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Kusumaningrum et al., 2002). The largest part of the Brazilian legislation does not mention the use of sponges in food services; however, they continue being often used in these establishments. Because of that, and due to the fact that there are few Brazilian legislations approaching this topic, recently the Regulation 78/2009 of the Rio Grande do Sul State Department of Health, Southern Brazil, has published that sponges of food services must be disinfected daily through boiling in water for 5 minutes. However, the scientific basis for the procedure recommendation was not provided.

The objective of the present study was to evaluate the microbiological contamination and two procedures of disinfection of sponges that can be easily used in food services.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Eighty polyurethane pad synthetic sponges were collected in food services of the States of Rio Grande do Sul (RS) and Santa Catarina (SC), Southern Brazil. In RS, the sponges were collected in five industrial kitchens from the city of Porto Alegre, and in SC the sponges were collected in 35 commercial restaurants from the city of São Miguel do Oeste. In each city, 40 sponges were collected, which were in use for at least one day. The sampling happened after previous contact and verbal consent of the establishment responsible technicians. After sampling, the sponges were carried under isothermal conditions, inside sterile plastic bags, until the Laboratory of Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia of the Universidade do Oeste de Santa Catarina -UNOESC.

Microbiological Analysis and Disinfection Procedures

In the laboratory, the sponges were aseptically cut in three equal parts. One of them was added by 100 ml of 0.1 % peptone water (AES, Bruz Cedex, França) with 0.1 ml of sodium thiosulphate 10 %, and then mixed in a stomacher (ITR, Esteio, RS), for 60 seconds. Later, this part of the sponge was subjected to quantification of HM, CF, SA, and SAM investigation, in compliance with the Normative Regulation 62 of August 26th, 2003, from the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply (MAPA)

The two remaining parts of the sponge were subjected, separately, to boiling water disinfection for five minutes (in compliance with the Directive 78/2009 SES/RS),

and to disinfection with sodium hypochlorite 200ppm, for 10 minutes, added by rinse with potable water, as adapted from Ikawa; Rossen, (1999). The boiling water disinfection was performed inside a microwave oven (Continental, São Paulo, SP), being the boiling time quantified after the beginning of bubbles in the water where the sponges were immersed. After the disinfection procedure, both parts of each sponge were added to 0.1 % peptone water and quantified according to the same parameters above mentioned.

The count of HM was performed by the *pour-plate* technique using Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt), the quantification of CF was performed by the overlay technique with Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck, Darmstadt) and the characteristic colonies were confirmed in EC broth (Merck, Darmstadt). The SA counts were carried out by using the spreading plate technique in Baird-Parker Egg Yolk-Tellurite Agar (DIFCO, Basingstoke). The characteristic colonies (Black with halos) were subjected to Gram-color staining and biochemical tests for confirmation (catalase, coagulase and thermonuclease – BRAZIL, 2003).

All counts were executed in triplicate, in plates containing 25 and 250 colonies. The results were expressed in log CFU/sponge.

For the *Salmonella* sp. Investigation, 25 ml of 0.1 % peptone water were used, in which the sponge was hydrated after its collection. This aliquot was added to 225 ml of buffered peptone water 1 % (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 36° C, for 20 hours. After that, 1 ml of this sample was inoculated in tubes containing selenite-cystine broth (Merck, Darmstadt, Germany) and tetrathionate broth (Merck, Darmstadt, Germany). These were incubated at 41±0.5° C, for 24 hours. Then, the samples were

striated in Brilliant Green Agar and Xylose Lysine Deoxycholate (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at $36 \pm 1^\circ \text{C}$, for 18-24 hours. Characteristic colonies were confirmed by biochemical and serological tests according to Normative Regulation nº 62 of 2003 from MAPA. The results were expressed in presence or absence.

Statistical Analysis

The disinfection procedures were statistically analyzed by the Anova of the Analysis Statistical software, being $P < 0.05$ % considered significant.

RESULTS

Sponge Contamination

The sponges demonstrated contamination by HM ranging from 3.4 to 10.4 log CFU/sponge, with an average of 9.1 log CFU/sponge. Among the analyzed sponges, 76.75 % (61/80) present contamination of HM between 7 and 9 log CFU/sponge. The highest frequency of contaminated sponges by HM (28.75 %) demonstrated approximately 7 log CFU/sponge (Figure 1).

From the evaluated samples, 76.25 % presented CF, ranging from 4.5 to 9.9 log CFU/sponge, with an average of 8.4 log CFU/sponge. The highest frequency of sponges with CF contamination (25 %) presents around 7 log CFU/sponge (Figure 2).

SA and SAM were found in 2.5 % of the samples (2/80), being SA with 3.6 and 5.3 log CFU/sponge. The samples that were contaminated by SA and SAM were different sponges.

Disinfection Procedures

Even though both disinfection methods have significantly reduced the counts of HM ($P < 0.05$), the boiling method was the most effective in inactivating microorganisms. The boiling method was able to reduce 6.7 log CFU/sponge (99.9999 %), while the disinfection by sodium hypochlorite 200ppm, for 10 minutes, added by rinse in potable water reduced 2.7 log CFU/sponge (99.9 %) of the HM (Figure 3).

The average reductions of CF reached after boiling and sodium hypochlorite disinfection were of 8.4 log CFU/sponge (99.999999 %) and 2.1 log CFU/sponge (99%), respectively. CF were not detected after boiling, while 6.3 log CFU/sponge survived after sodium hypochlorite disinfection.

After both methods, SA and SAM were not found in sponges.

DISCUSSION

Many studies have shown that kitchen sponges can be potential sources of cross contamination, including the spread of pathogen microorganisms (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003; Scott, 1999).

In the present study, the analysis showed that sponges were vigorously contaminated, supporting results found by other researchers. For example, high HM contamination was also found by Kusumaningrum et al. (2002), who observed approximately 6 log CFU/sponge of HM in sponges used during three days in kitchens,

in Netherlands. Also, Erdogrul; Erbilir (2005) found 6.9 log CFU/sponge of HM in sponges used during 10 days, in Turkey.

The percentage of sponges contaminated by CF found in the present study was similar to those results reported by Josephson, Rubino and Pepper (1997), and Ojima et al. (2002). These researchers reported that 67 % of 100 and 78.3 % of 84 sponges collected in the United States and Japan, respectively, were contaminated by CF. Kusumaningrum et al. (2002) found approximately 6 log CFU/sponge of CF in kitchen sponges in Netherlands.

CF in the sponges indicate the presence of faecal material and may indicate the presence of food pathogens (Tebbutt, 2007). The CF contamination in sponges can be attributed to different factors such as inappropriate hygienic and sanitary practices during the food preparation, contamination by raw products, absence of disinfection procedures, cross contamination due to contaminated food, storage of sponges in places with high humidity and adequate temperature to promote microbial growth.

When the average counts of HM and CF were compared, and the frequencies of these microorganisms found in sponges were considered, one may suggest that an expressive part of the microbiological contamination present in the sponges was, in fact, from faecal origin. However, only 2.5 % of sponges presented contamination by SA and SAM.

It is necessary to emphasize that the low frequency of pathogens SA and SAM in sponges, when compared to HM and CF, was also found by other studies (Erdogrul; Erbilir, 2005; Josephson; Rubino; Pepper, 1997 and Srebernich et al., 2005). Even though they are less frequent in sponges, their presence may represent a high risk in

kitchens, once they are the main pathogens responsible for foodborne illnesses in many countries (Greig; Ravel, 2009) including Brazil (SVS, 2005).

Although sponges are used through the direct contact with the staff hands and it is known that of humans have SA on their skin (Kanafani;Fowler Jr., 2006) only 2.5 % of samples had these microorganisms. This low percentage of samples contaminated by the SA can be attributed to the inhibited effect of detergents present in the sponges, which was visually proved in many samples, after sampling in food services (results not shown). According to Kusumaningrum et al. (2002), the Gram-positive bacteria, such as SA, have their cell wall more sensitive to anionic surfactant present in detergents, which can contribute to the inactivation of these microorganisms.

The two analyzed methods of disinfection were significantly effective in the reduction of bacteria in sponges. Nevertheless, the boiling method was able to reduce a great number of microorganisms. Similar results were presented by Sharma; Eastridge and Mudd (2009), who found significant reductions ($P < 0.05\%$) for disinfection with 10 % solution of sodium hypochlorite, for three minutes, and boiling in microwave oven for one minute, which obtained a better result when compared to sodium hypochlorite. The reductions of HM found by Sharma; Eastridge; Mudd (2009) were of 7.1 log and 1 log CFU/sponge for disinfection by boiling inside a microwave oven and 10 % sodium hypochlorite, respectively. The lowest microbial reduction verified after the use of sodium hypochlorite can be explained by the presence of organic matter in sponges (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009; Kusumaningrum et al. 2002; Kotula et al., 1997). On the other hand, the results of the present study showed that some sponges (7/80) still kept viable microorganisms after boiling, which can be explained by the probable

presence of heat-resistant spore forming microorganisms (Sharma; Eastridge; Mudd, 2009). According to Celadroni et al. (2004) even if these microorganisms survive easily to boiling, this process can eliminate part of the microbial population, depending on the strains. For example, the microwave boiling was more effective than the conventional boiling for the inactivation of *Bacillus subtilis*. According to these authors, the inactivation of endospores occurs due to the formation of a stable complex between the dipicolinic acid and other components of the endospore.

The effectiveness in the inactivation of CF was verified in both methods, but the boiling reduced 99.999999 % of these bacteria in sponges, while the sodium hypochlorite reduced 99 %. According to Ikawa; Rossen (1999), the boiling for five minutes is an excellent method of disinfection of sponges, reducing drastically the amount of CF.

The efficiency of boiling method can be explained by the high temperature of the water able to denature proteins and, consequently, destroy the membrane integrity, causing the death of microorganisms. (Woo; Rgee e Park, 2000).

Park et al., (2006) and Sharma; Eastridge; Mudd (2009) attribute the effectiveness of boiling in the reduction of microorganisms to water within the sponges, which can generate steam and kill microorganisms in the interior of the sponges. In the present study, the sponges were immersed in water, therefore the microbial reduction has probably happened due to the water heat and not to its steam. Besides that, another important factor to be emphasized is that during the water boiling, it happens the sponge movement within this liquid, making the removal of a great deal of organic matter possible and, with that, a better heat penetration. This movement did not happen during

the evaluation of the solution of sodium hypochlorite 200 ppm, which can have influenced in the lower inactivation of microorganisms.

CONCLUSION

The results of the present study showed that the sponges can be extensively contaminated, but there are effective methods for their disinfection. Although both methods have significantly reduced the bacterial counts, the boiling for 5 minutes was more effective than the disinfection with sodium hypochlorite 200 ppm. These results showed the adequation of the boiling method by the Directive 78/2009 – SES/RS for the disinfection of sponges in food services of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Furthermore, this method proved to be easy and affordable by means of cost, and can be performed in food services and residences.

References

BEUMER, R.R. and KUSUMANINGRUM, H. 2003. Kitchen hygiene in daily life. *Int. Biodeterioration Biodegrad.* 51, 299-302.

Brasil, Instrução Normativa n°. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. Diário Oficial da União, 18/09/2003.

Brasil, Portaria n° 78 de 28 de janeiro de 2009 da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul Aprova a lista de verificação em Boas práticas para serviços de alimentação, aprova as normas para os cursos de capacitação em Boas Práticas para serviços de alimentação e dá outras providências. Diário Oficial da União. Porto Alegre-RS 30 de janeiro de 2009.

CELANDRONI, F., LONGO, I., TOSORATTI, N, GIANNESI, F., GHELARDI E., SALVETTI, S., BAGGIANI, A. and SENESI, S. 2004. Effects of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1220–1227.

ERDOGRUL, O. and ERBILIR, F. 2005. Microorganisms in kitchen sponges. Internet Journal of food safety. 6, 17-22.

GREIG, J.D. and RAVEL, A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int. J. Food Microbiol. 130, 77-87.

HAVELAAR, A. H., BRUL, S., JONG A. D., JONGE, R. D., ZWIETERING M. H. AND KUILE, B. H. T. 2009. Future challenges to microbial food safety. Int. J. of Food Microbiol, In Press.

IKAWA, J. K. and ROSSEN, J. S. 1999 Reducing Bacteria in Household Sponges. Environ Health. 62,18-22.

JOSEPHSON, K.L., RUBINO, J.R. and PEPPER, I. L. 1997. Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchens with and without the use disinfectant cleaner. J. Appl. Microbiol. 87, 737-750.

KANAFANI, Z. A. and FOWLE JR, V.G. 2006 *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. Enferm Infec Microbiol Clin. 24,182-193.

KOTULA K. L., KOTULA A. W., ROSE B. E., PIERSON C. J. and CAMP M. 1997. Reductions of aqueous chlorine by organic material. J. Food Prot. 60, 276-282.

KUSUMANINGRUM, H. D., RIBOLDI, G., HAZELEGER W. C and BEUMER R. R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces cross-contamination to foods. Int. J. Food Microbiol. 25, 227-236.

KUSUMANINGRUM, H. D., PUTTEN, M. M., ROMBOUTS, F. M. and BEUMER, R R. 2002. Effects of dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. J. Food Prot., 65, 61-65.

MATTICK, K., DURHAM, K., DOMINGUE, G., JORGENSEN, F., SEN, M., SCHAFFNER, D.W. and HUMPHREY, T. 2003. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. Int. J. Food Microbiol. 25, 213-226.

OJIMA, M., TOSHIMA, Y., KOYA, E., ARA, K., TOKUDA, H., KAWAI, S. KASUGA, F., UEDA, N. 2002. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. J. Appl. Microbiol., 93, 800-809.

OLIVEIRA, F. A ., GEIMBA, M. P., PASQUALOTTO, A. P., BRANDELLI, A., PASQUALI, GIANCARLO , SILVA, W. P. and TONDO, E. C. 2009. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. Food Control. 20, 606–610.

PARK, D., BITTON, G., and MELKER, R. 2006. Microbial inactivation by microwave radiation in the home environment. J. Environ Health. 69, 17–24.

SCOTT, E. 1999. Hygiene issues in the home. *Am. J. Infec Control.* 27, S22-S25.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim eletrônico epidemiológico. n.6 , 2005. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em 03 de junho de 2008.

SHARMA, M.; EASTRIDGE, J. and MUDD, C. 2009. Effective household disinfection methods of kitchen sponges. *Food Control.* 20, 310-313.

TEBBUTT, G.M. 2007. Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales?. *J. Appl. Microbiol.* 102, p. 883-891.

WOO, I., RHEE, I. and PARK, D. 2000. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl Environ Microbiol.* 66, 2243–2247.

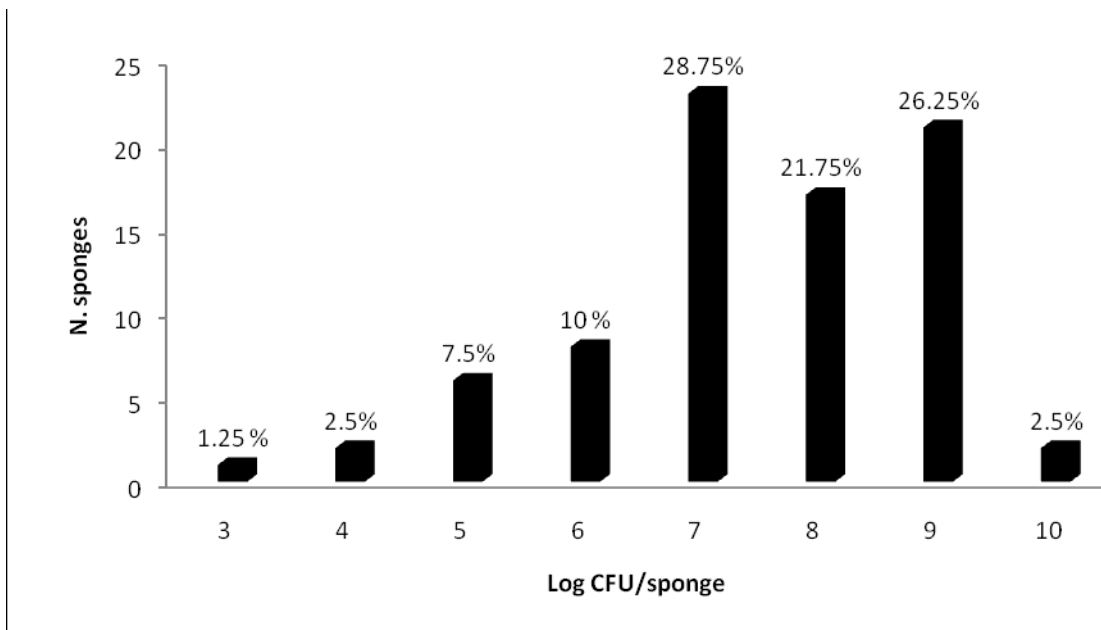


FIGURE 1. FREQUENCY OF HETEROTROPHIC MICROORGANISMS (HM) IN 80 KITCHEN SPONGES IN FOOD SERVICES OF THE STATES OF RIO GRANDE DO SUL AND SANTA CATARINA.

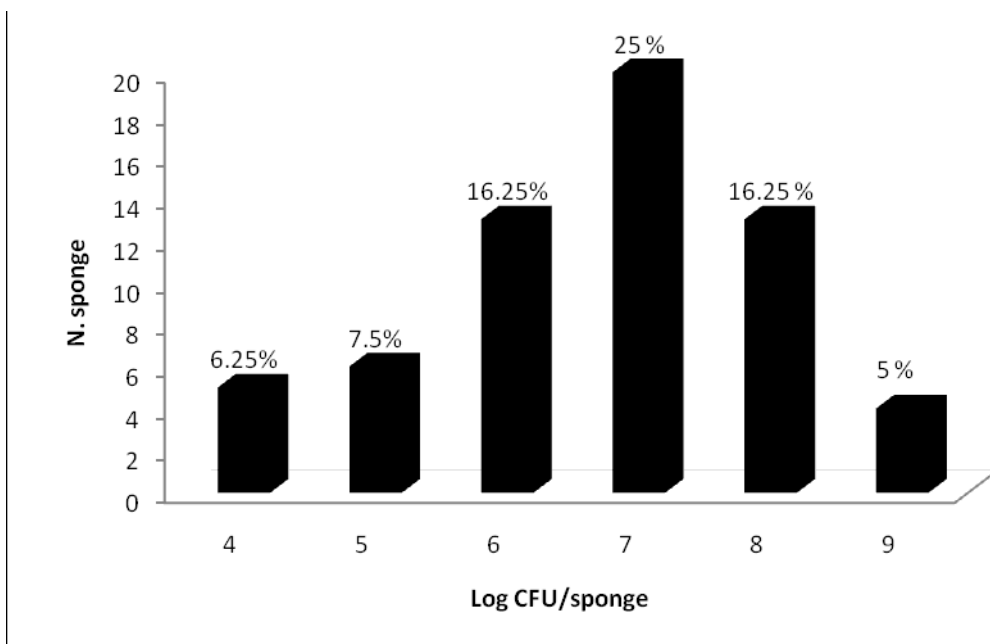


FIGURE 2. FREQUENCY OF COLIFORMS AT 45° C (CF) IN 80 KITCHEN SPONGES IN FOOD SERVICES OF THE STATES OF RIO GRANDE DO SUL AND SANTA CATARINA.

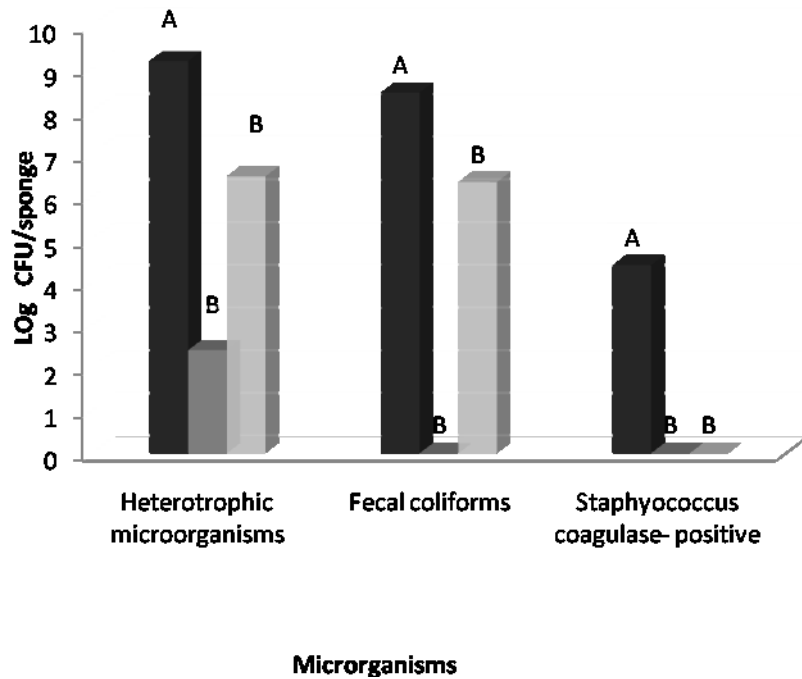


FIGURE 3. BACTERIAL REDUCTION (LOG CFU/SPONGE) IN COLLECTED SPONGES IN FOOD SERVICES NOT DISINFECTED (■) DISINFECTED BY BOILING IN MICROWAVE FOR 5 MINUTES (■), AND DISINFECTION WITH SODIUM HYPOCHLORITE 200PPM, FOR 10 MINUTES, ADDED BY RINSE WITH POTABLE WATER(■). DIFFERENT LETTERS INDICATE STATISTICALLY SIGNIFICANT REDUCTIONS ($P < 0.05$ %).

Anexo B- Artigo II

Será submetido para Journal Food Protection

Survival and transfer of microorganisms from kitchen sponges to stainless steel surfaces and polyethylene

Eliandra Mirlei Rossi¹; Diane Scapin²; Eduardo César Tondo^{3*}

¹ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade do Oeste de Santa Catarina – 89900-000 – São Miguel do Oeste – SC – Brazil

² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Curso de Graduação em Biologia - Universidade do Oeste de Santa Catarina – 89900-000 – São Miguel do Oeste – SC – Brazil.

³ Departamento de Ciências dos Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, Porto Alegre/RS, Brazil. Cep: 91501-970.

* Corresponding author: tondo@ufrgs.com.br

Abstract

Contaminated sponges may favor the occurrence of cross-contamination in kitchens, since they transfer microorganisms to surfaces that survive for hours or days and thus contaminate food. The main objective of this study was to evaluate the transfer and survival of bacteria from sponges on surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene. Twenty four sponges were collected from industrial kitchens in the State of Rio Grande do Sul (RS) and aseptically cut into two equal parts. One part was subjected to quantification of heterotrophic microorganisms (HM), fecal coliforms at 45 °C (CF) *Staphylococcus* coagulase positive (SA), and to *Salmonella* sp. (SAM) investigation. The other part was rubbed separately on surfaces of AISI 316 stainless steel (n = 12) and polyethylene (n = 12). The transfer and survival of HM was quantified by swab collection and seeded by pour-plate technique with plate count Agar. All sponges were contaminated by HM (average of 6.8 log CFU / sponge), and 83.3% with CF (average of 5 log CFU / sponge). None of the sponges were contaminated by SAM and/or SA. The

average transfer of microorganisms varied between 3.3 and 5.5 log CFU/cm² for stainless steel and from 3.5 to 5.6 Log CFU/cm² for polyethylene. Although the survival rate decreased over time, more than 1 log CFU/cm² of HM survived after 24 h on both surfaces.

Keywords: Sponges, microbiological contamination, survival of microorganisms, surfaces.

INTRODUCTION

Cross-contamination is one of the major factors responsible for outbreaks of foodborne illnesses (Greig; Ravel, 2009) and is associated with various stages of food preparation (Chen et al., 2001).

According to Mattick et al. (2003), cleaning and disinfecting surfaces and utensils prevent cross-contamination in kitchens, because they promote the physical removal of food residue that may be associated with pathogens. According to these researchers, cross-contamination is often associated with contamination of dishes or surfaces with washing water, contaminated sponges or contaminated items placed on them.

Several studies have already revealed that cloths and sponges can be important disseminators of pathogens and can transfer bacteria to surfaces and utensils, encouraging cross-contamination in food (kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003; Josephson;Rubino, Pepper, 1997).

The most commonly used surfaces in industries and kitchens are stainless steel and polyethylene. However, these surfaces are irregular when observed microscopically,

which facilitates the deposition of organic matter or food residues, contributing to the maintenance of microorganisms' survival (Sinde; Carballo, 2000).

According to Kusumaningrum et al. (2003), bacteria that were transferred from sponges to surfaces can survive for hours on stainless steel surfaces and thus increase the risk of cross-contamination.

Thereby, due to the frequent use of sponges in the cleaning processes in kitchens, the main objective of this study was to assess the survival and transfer rate of microorganisms from sponges used in food services to AISI 316 stainless steel surfaces and polyethylene.

MATERIALS AND METHODS

Sponges

Twenty four synthetic sponges with polyurethane were collected from industrial kitchens in the State of Rio Grande do Sul (RS), which were in use for at least one day and collected after previous contact and verbal consent of the establishment responsible technicians. After sampling, the sponges were carried under isothermal conditions, inside sterile plastic bags, until the Laboratory of Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia of the Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC.

Microbiological Analysis

In the laboratory, the sponges were aseptically cut into two equal parts. One of them was added by 100 ml of 0.1% peptone water (AES, Bruz Cedex, France) with 0.1 ml of sodium thiosulphate 10%, and then mixed in a stomacher (ITR, Esteio, RS), for 60 seconds. Later, this part of the sponge was subjected to quantification of HM, CF, SA, and to SAM investigation, in compliance with the Normative Regulation 62 of August 26th, 2003, from the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply (MAPA).

The count of HM was performed by the *pour-plate* technique using Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt), the quantification of CF was performed by the overlay technique with Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck, Darmstadt), and the characteristic colonies were confirmed in EC broth (Merck, Darmstadt). The SA counts were carried out by using the spreading plate technique in Baird-Parker Egg Yolk-Tellurite Agar (DIFCO, Basingstoke). The characteristic colonies (black with halos) were subjected to Gram-color staining and biochemical tests for confirmation (catalase, coagulase and thermonuclease – BRAZIL, 2003).

All counts were executed in triplicate, in plates containing 25 and 250 colonies. The results were expressed in log CFU/sponge.

For the *Salmonella* sp. investigation, 25 ml of 0.1 % peptone water were used, in which the sponge was hydrated after its collection. This aliquot was added to 225 ml of buffered peptone water 1 % (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 36° C, for 20 hours. After that, 1 ml of this sample was inoculated in tubes containing selenite-cystine broth (Merck, Darmstadt, Germany) and tetrathionate broth (Merck, Darmstadt, Germany). These were incubated at 41±0.5° C, for 24 hours. Then, the samples were

striated in Brilliant Green Agar and Xylose Lysine Deoxycholate (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at $36 \pm 1^\circ \text{C}$, for 18-24 hours. Characteristic colonies were confirmed by biochemical and serological tests according to Normative Regulation 62 of 2003 from MAPA. The results were expressed in presence or absence.

Transfer and survival of bacteria on surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene

The other part of 24 sponges was rubbed separately on surfaces of 316 stainless steel and polyethylene. A total of 12 sponges were used for each surface.

Each sponge was hydrated with 30 ml of 0.1% peptone water (AES, Bruz Cedex, France) containing 30 μL of sodium thiosulfate 10%, and then rubbed five times on the AISI 316 stainless steel surface (10x10cm) and on the polyethylene surface. After, the contaminated surfaces were sampled using a sterile swab previously immersed in 10 ml of 0.1% peptone water, rubbed on the surface (10x10cm) of the materials in three different directions, and subsequently put into test tubes containing 0.1% peptone water. The swab was agitated for 30 seconds, in a magnetic stirrer and the bacterial suspension was subjected to decimal dilutions in 0.1% peptone water. After that, the total count of HM was performed by seeding by pour-plate technique in Plate Count Agar (Merck, Darmstadt, Germany), incubated at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ for 48 hours. During the evaluation period, the surfaces were kept at room temperature of about 20°C , using air conditioning. Counts were performed at 0, 1, 2, 3, 4 and 24 hours after contamination with sponges.

All counts were performed in triplicate on plates containing 25 and 250 colonies. The results were expressed in log CFU/cm².

Statistical Analysis

The differences in survival on the surfaces were statistically analyzed by the Students T-test, considering the significance level of 5%

RESULTS

Microbiological analysis

The 24 analyzed sponges showed HM scores ranging from 4.1 to 10 log CFU/ sponge, with an average of 6.8 log CFU / sponge. From these sponges, 83.3% presented CF in quantities ranging from 3 to 9.7 log CFU / sponge, with average of 5 log CFU / sponge. None of the evaluated sponges had SA or SAM.

Transfer and survival of bacteria on surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene

Due to the large variation of contamination by HM, the sponges were divided into two groups for this experiment performance. The first group was composed by sponges contaminated with 7 to 10 log CFU / sponge, and second group made of sponge contaminated with 4 to 6.9 log CFU / sponge.

The transfer of microorganisms (time zero in Figure 1) was higher by sponges of group 1 than of group 2. The group 1 transferred an average of 5.5 log CFU/cm² of the

initial contamination to AISI 316 stainless steel and 5.6 log CFU/cm² to polyethylene. Whereas group two transferred an average of 3.3 logCFU / cm² and 3.5 log CFU / cm², respectively, to the surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene (Figure 1).

One hour later, there was a reduction of approximately 1 log CFU/cm² of HM from group one present on the surface of AISI 316 stainless steel and 0.51 log CFU/cm² on polyethylene. In group two the reduction of the amount of HM was 0.2 log CFU/cm² and 0.8 log CFU/cm², respectively, for both surfaces (Figure 1).

The average counts of HM decreased significantly in the following exposure hours, in both groups and surfaces. For example, the average bacteria scores of group one after four hours suffered reduction of around 2.27 log CFU/cm² in stainless steel and 1.86 log CFU/cm² in polyethylene; while in group two, the reductions were 1.94 log CFU/cm² and 2.24 log CFU/cm², respectively, after four hours (Figure 1).

After 24 hours, there was an average decrease of about 2.9 log CFU/cm² in bacteria from group one, while bacteria from group two remained in almost equal amounts. After this exposure period, the number of survivors from groups one and two was nearly equal (between 1.26 and 1.87 log CFU/cm²).

DISCUSSION

The results demonstrated that the sponges used in kitchens may be contaminated by microorganisms, which corroborates with several studies (Erdogrul;Erbilir, 2005; Kusumanigrum et al., 2002; Hilton e Austin, 2000; Josephson;Rubino; Pepper, 1997).

The count of HM found in this study was similar to the results of Erdogrul; Erbil (2005), who found 6.9 log CFU/ ml in sponges after 10 days of use in kitchens of Turkey. Other studies such as Kusumaningrum et al. (2003) and Josephson, Rubino, Pepper (1997) showed, respectively, that the sponges used after 14 days had about 6 log CFU / sponge in the Netherlands and 7 log CFU / sponge in the United States.

The contamination by CF corroborates with other studies that have reported these bacteria in sponges, such as the study of Josephson, Rubino, Pepper (1997) who found an average of approximately 7 log CFU / sponge in 67% of samples from the United States, and of Kusumaningrum et al (2002), that verified about 6 log CFU / sponge of CF in sponges used for only 3 days in England.

The results showed that sponges can contain pathogenic bacteria, since CF are used as indicators of fecal contamination, and according to Keeratipibul; Techaruwichit, Chaturongkasumrit (2009) the presence of coliforms is worrying because it reflects sanitary conditions. Such contamination in sponges may come from raw or cooked contaminated food, inadequate hygienic practices during food preparation, absence of disinfection procedures, cross-contamination carried by contaminated food, storage in places where there is humidity and temperature after contamination.

According to a study by Mattick et al. (2003), kitchen sponges can be contaminated during the washing of dishes contaminated with microorganisms that, by their turn, can be transferred to surfaces. These results are worrying, because according to Kusumaningrum et al. (2002), some pathogens such as *E. coli* can survive for days in sponges, which can increase the risk of food cross-contamination.

In this study, an absence of both SA and SAM was observed, different from the results by Josephson, Rubino, Pepper (1997), who found an average of 3 log CFU / sponge of SA in 66% and SAM in 1% of 100 analyzed samples.

It should be emphasized that the low frequency of these pathogens in sponges when compared to HM and CF was also found in other studies (Erdogrul, Erbil, 2005; Josephson, Rubino, Pepper, 1997) and although they are less frequent in sponges, their presence represents a high risk in kitchens, since they are the main pathogens that cause foodborne illnesses (Greig, Ravel, 2009).

The risk of cross-contamination by sponges during the cleaning of utensils and surfaces is high, since these objects can be an important source of bacteria (Hilton and Austin, 2000). Such microorganisms can survive for weeks in sponges (Kusumaningrum et al., 2003) and, therefore, be transferred to surfaces (Kusumaningrum et al. 2003, Mattick et al., 2003).

In this study, it was observed that naturally contaminated sponges can transfer a large number of microorganisms to surfaces that are rubbed with them. Kusumaningrum et al. (2003) artificially contaminated kitchen sponges with *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni*. After rubbing the sponges in stainless steel, they could verify that they transferred between 21% and 43% of the initial inoculums placed in the sponges.

Other materials may also be contaminated by sponges, as shown by Mattick et al. (2003) in their study conducted in England, where artificially contaminated sponges transferred *E. coli* and *Salmonella sp.* to formica surfaces. These researchers have also reported that the number of microorganisms transferred to surfaces depends on the

initial contamination, that is, the greater the amount of bacteria in sponges, the greater the amount transferred. Similar results were demonstrated in the present study, in which group one (containing from 7 to 10 log CFU / sponge) moved an average of 5.5 log CFU/cm² from the initial contamination to AISI 316 stainless steel and polyethylene, while group two (containing from 4 to 6.9 log CFU / sponge) transferred approximately 1.9 log CFU/ sponge.

The results of this study also showed that the number of bacteria transferred to stainless steel and polyethylene decreased rapidly over the exposure of these surfaces at room temperature. Regardless the amount transferred, after 24 hours, the number of surviving bacteria was very low compared to the initial number of microorganisms. These results were similar to those published by Kusumaningrum et al. (2003) that showed high reductions of *E. coli*, *S. Enteritidis* and *C. jejuni* in four hours on stainless steel surfaces. According to these researchers, the physiological characteristics of bacteria are factors that influence the survival of microorganisms, because *S. Enteritidis* and *S. aureus* cells remained viable on the surface for up to 96 hours, while *C. jejuni* was not detected after 4 hours of exposure.

In the present study, the rapid reduction found in the time interval between 0 and 4 hours for both groups and surfaces can be attributed to the decrease of moisture on the materials. According to Tebbut et al. (2001), bacterial suspensions on surfaces can form clumps, avoiding dehydration and functioning of microbial cells.

In the present study, significant differences in the number of surviving bacteria after 24 hours at room temperature were not observed; however, Kusumaningrum et al.

(2003) stated that the higher the concentration of bacteria on surfaces and residue of organic material in sponges, the higher the survival of microorganisms.

The fact that the analyzed sponges contain different amounts of food residue (results not evaluated) may have influenced the survival of microorganisms, but this was not evaluated.

This study showed no significant differences in the transfer and survival of microorganisms on the surfaces of stainless steel and polyethylene. Similar results were demonstrated by Malheiros et al (2010), who found that *S. aureus* was transferred in similar amounts to stainless steel and polyethylene, from cubes of chicken artificially contaminated. It is noteworthy that the surfaces of materials evaluated in this study were new, without grooves, which is not always observed during food service routines, where cutting boards and stainless steel tables are often scratched. In these situations it is possible that the amount of bacteria transferred by sponges is higher, helping the formation of biofilms. Biofilms are sessile microbial communities embedded in a polymer matrix that, adhered to a solid surface, become a significant problem for food services and home kitchens, once they give resistant to microorganisms against antibiotics, disinfectants, heavy metals, among others (Garret et al., 2008). Many pathogens found in sponges, dish cloths and many kitchen surfaces form biofilms, which could increase the possibility of cross-contamination in these environments (Rayner; Veeh, Flood, 2003).

According to Scott, Sally; Bloomfield (1990), cross-contamination can transfer enough microorganisms to cause DTA. Given the low infectious dose of certain microorganisms, such as *Shigella* and *E. coli* O157: H7 that can cause disease with less

than 100 cells (Montville and Matthews, 2008), the amount of bacteria transferred from the pads for both surfaces could be sufficient to cause DTA. Contamination from sponge surfaces at zero time was of approximately 5.5 and 3.4 log CFU/cm².

Based on the large number of microorganisms that can be transferred from a contaminated sponge, the control of hygiene in food services in order to reduce the sources of contamination, as well as the implementation of procedures for disinfection of sponges are very important.

CONCLUSION

The results of this study showed that the sponges used in food services were significantly contaminated and could transfer large amounts of microorganisms to surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene.

Although the amount of microorganisms transferred to the surfaces was high, there was a reduction in the number of microorganisms over time, and the reduction was greater in the first 4 hours of exposure to room temperature. Even so, after 24 hours of exposure, viable microorganisms were still found.

Thus, it is recommended that sponges are disinfected daily, since they can transfer microorganisms to surfaces and increase the risk of cross contamination occurrence in kitchens.

References

Brasil, Instrução Normativa nº. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003.

CHEN, Y.H. et al. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. **Journal of Food Protection**. v. 64, n. 1, p. 72-80, 2001.

Erdogrul, O.; Erbilir, F. (2005). Microorganisms in kitchen sponges. **Internet Journal of food safety**. V.6, p. 17-22.

Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, 18 1049–1056.

Greig, J.D.; Ravel, A. (2009). Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, 130, 77-87.

Hilton, A.C & Austin, E. (2000). The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. **International Journal Of Environmental Health Research**, 10, 257-261.

Josephson, K.L., Rubino, J.R., & Pepper, I. L. (1997). Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchens with and without the use disinfectant cleaner. **Journal of Applied Microbiology**, 87, 737-750.

Keeratipibul S. ; Techaruwichit , P.; Chaturongkasumrit, Y. (2009). Contamination sources of coliforms in two different types of frozen ready-to-eat shrimps. **Food Control** , 20, 289–293.

KUSUMANINGRUM, H.D. et al. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 03, p. 227-236.

Kusumaningrum, H.D. et al.(2002). Effects of dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. **Journal of food protection**, v.65, n.1, p.61-65, 2002.

Malheiros, P. S. et al. (2010) Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control** 21 , 298–301

Mattick, K. et al. (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 03, p. 213-226.

Rayner, J.; Veeh, R.; Flood, J. (2004) Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. **International Journal of Food Microbiology** , 95, 29– 39

Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 17, 439–447.

SCOTT, E; BLOOMFIELD, S.F. Investigations of effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths. **Journal Applied bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 279-283, março 1990.

MONTEVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R (2008). **Food microbiology: An introduction**. 2 ed. ASM Press: Washington, DC, 428 p.

TEBBUT, G.M. (2001). An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling high-risk foods. **Epidemiology and Infection**. v. 106, pág 319-327.

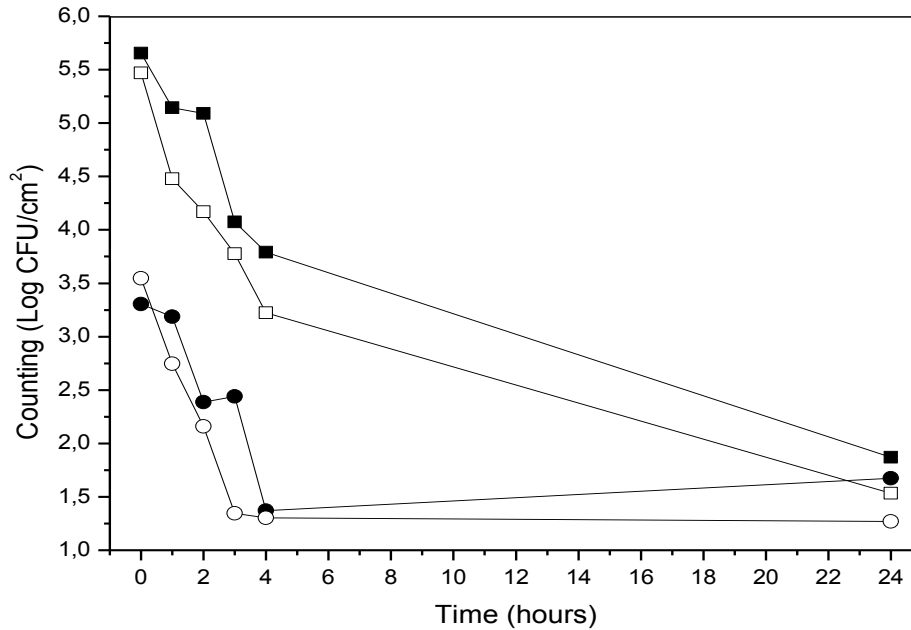


Figure 1: Survival of HM transferred from cleaning sponges to surfaces of AISI 316 stainless steel and polyethylene in different levels of contamination. Group one: sponges with 7 to 10 log CFU/sponge, and group two: sponges contaminated with 4 to 6.9 log CFU/sponge. (■) Group one in polyethylene; (□) Group one in AISI 316 stainless steel; (●) Group two in AISI 316 stainless steel and (○) Group two in polyethylene;