

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de
desinfecção de panos e esponjas utilizadas em serviços de alimentação
hospitalar**

Ana Paula Maia Almeida

Pelotas, 2019

Ana Paula Maia Almeida

**Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de
desinfecção de panos e esponjas utilizadas em serviços de alimentação
hospitalar**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a. Simone Pieniz

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314a Almeida, Ana Paula Maia

Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de panos e esponjas utilizadas em serviços de alimentação hospitalar / Ana Paula Maia Almeida ; Simone Pieniz, orientadora. — Pelotas, 2019.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Unidade de alimentação e nutrição. 2. Poliuretano. 3. Algodão. 4. Aderência bacteriana. 5. Virulência. I. Pieniz, Simone, orient. II. Título.

CDD : 641.1

Ana Paula Maia Almeida

Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de panos e esponjas utilizadas em serviços de alimentação hospitalar

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30 de Agosto de 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. Simone Pieniz (Orientadora)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr^a. Isabela Schneid Kroning

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Prof. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues

Doutora em Ciências e Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Resumo

ALMEIDA, Ana Paula Maia. **Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de panos e esponjas utilizadas em serviços de alimentação hospitalar.** Orientadora: Simone Pieniz. 2019. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A inocuidade do alimento, dentro do contexto de Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), é um dos fatores primordiais para a garantia da qualidade do serviço. Em uma unidade hospitalar, onde o objetivo principal é a recuperação da saúde, o serviço de alimentação e nutrição tem papel importante ajudando a oferecer o aporte de nutrientes necessário. A contaminação cruzada é responsável pela maioria dos casos de doenças transmitidas por alimentos. Sendo assim, os panos e as esponjas de limpeza ganham destaque uma vez que podem transferir quantidades significativas de micro-organismos para superfícies e utensílios utilizados no preparo dos alimentos. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi analisar a contaminação microbiológica de esponjas e panos de limpeza utilizados em unidades de alimentação hospitalar, bem como a eficácia de dois métodos distintos de desinfecção realizados pela UAN e a aderência bacteriana nestes materiais. Panos de prato, panos multiuso descartáveis e esponjas de limpeza, foram coletados em uma UAN hospitalar localizada na cidade de Pelotas-RS. Estes materiais foram submetidos a contagem de células viáveis para coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e mesófilos; além disso, foram realizados testes de eficiência dos métodos de desinfecção realizados pela UAN; microscopia eletrônica de varredura; teste de susceptibilidade a antimicrobianos; capacidade de formação de biofilme dos isolados e fatores de virulência. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que nas amostras de panos de prato e esponja higienizados pela própria UAN foi encontrada contagem de coliformes totais e termotolerantes, na amostra proveniente da louça dos pacientes, apenas totais. Nos panos e esponjas analisados após o uso no turno foi encontrada contagem de todos os micro-organismos analisados. Após higienizados conforme legislação vigente, não houve crescimento de nenhum dos micro-organismos analisados. De acordo com os resultados obtidos por meio das análises eletromicroscópicas verificou-se elevada adesão bacteriana após o uso dos materiais de limpeza no período de um turno pela UAN. Foi possível observar que todos os isolados mostraram-se resistentes ao antimicrobiano penicilina e foram classificados como fracos produtores de biofilme. Isolados de esponjas apresentaram maior virulência que os demais materiais quando analisados os testes de gelatinase, DNase e atividade hemolítica. Adicionalmente é essencial que procedimentos de boas práticas sejam implementados nos serviços de alimentação e nutrição.

Palavras-chave: algodão; poliuretano; aderência bacteriana; virulência; resistência; unidade de alimentação e nutrição.

Summary

ALMEIDA, Ana Paula Maia. **Analysis of microbiological contamination and disinfection procedures of cloths and sponges used in hospital food services.** Advisor: Simone Pieniz. 2019. Dissertation (Masters in Nutrition and food) – Nutrition College, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Food safety, within the context of Food and Nutrition Units, is one of the key factors in ensuring quality of service. In a hospital unit, where the primary goal is health recovery, food and nutrition services play an important role in helping to provide the necessary nutrient input. Cross contamination is responsible for most cases of foodborne illness. As such, cleaning cloths and sponges are highlighted as they can transfer significant amounts of microorganisms to surfaces and utensils used in food preparation. Based on the above, the objective of this study was to analyze the microbiological contamination of sponges and cleaning cloths used in hospital feeding units, as well as the effectiveness of two different methods of disinfection performed by Nutrition Units and the bacterial adherence in these materials. Dishcloths, disposable multipurpose cloths and cleaning sponges were collected at a hospital Nutrition Units located in the city of Pelotas-RS. These materials were subjected to viable cell counts for total and thermotolerant coliforms, coagulase positive Staphylococcus and mesophiles; In addition, efficiency tests of the disinfection methods performed by Nutrition Units were performed; scanning electron microscopy; antimicrobial susceptibility testing; biofilm formation capacity of isolates and virulence factors. According to the results obtained, it can be observed that in the samples of dishcloths and sponge sanitized by Nutrition Units itself, total and thermotolerant coliforms counts were found in the sample from the patients' dishes, only total. In the rags and sponges analyzed after the shift use was found count of all analyzed microorganisms. After being sanitized according to current legislation, there was no growth of any of the analyzed microorganisms. According to the results obtained by electromicroscopic analysis, high bacterial adhesion was verified after the use of cleaning materials during one shift by Nutrition Units. It was observed that all isolates were resistant to penicillin antimicrobial and were classified as poor biofilm producers. Sponges isolates showed higher virulence than other materials when the gelatinase, DNase and hemolytic activity tests were analyzed. Additionally, it is essential that good practice procedures are implemented in food and nutrition services.

Keywords: cotton; polyurethane; bacterial adherence; virulence; resistance; food and nutrition unit.

Lista de Figuras

Figura 1	Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de esponja utilizada na produção de alimentos na área hospitalar.....	34
Figura 2	Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de pano de algodão utilizado na produção de alimentos na área hospitalar.....	35
Figura 3	Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de pano multiuso descartável utilizado na produção de alimentos na área hospitalar.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1	Contagem de coliformes totais e termotolerante em panos de pratos e multiuso descartáveis provenientes da utilização na produção (funcionários e pacientes) em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar.....	30
Tabela 2	Contagem de mesófilos e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em panos de pratos e multiuso descartáveis provenientes da utilização na produção (funcionários e pacientes) em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS.....	31
Tabela 3	Contagem de coliformes totais e termotolerantes em esponjas de limpeza utilizadas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS.....	32
Tabela 4	Contagem de mesófilos e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em esponjas de limpeza utilizadas em uma unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS.....	32
Tabela 5	Classificação dos isolados de acordo com a produção de biofilme.....	38

Sumário

1 Introdução	11
2 Referencial Teórico	12
2.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTA).....	12
2.2 Contaminação Cruzada.....	14
2.3 Utilização e contaminação de panos e esponjas de limpeza em serviços de alimentação.....	15
2.4 Eficiência dos processos de Higienização.....	16
2.5 Formação de Biofilme.....	17
2.6 Fatores de Virulência e resistência das bactérias.....	18
3 Artigo	20
1 Introdução	21
2 Materiais e métodos	22
2.1 Caracterização das amostras e procedimento de coleta.....	22
2.2 Quantificação Microbiana.....	22
2.2.1 Enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos.....	23
2.2.2 Enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	24
2.2.3 Enumeração de Coliformes Totais e Termotolerantes.....	24
2.3 Eficiência dos métodos de desinfecção pela UAN.....	25
2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	25
2.5 Teste de Susceptibilidade a antimicrobianos.....	26
2.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados.....	27
2.7 Análises fenotípicas.....	28
2.7.1 Gelatinase.....	28
2.7.2 DNase.....	28
2.7.3 Atividade Hemolítica.....	29
3 Resultados	29
3.1 Quantificação microbiana e eficiência dos métodos de desinfecção pela UAN.....	29

3.1.1 Panos de Limpeza.....	29
3.1.2 Esponjas.....	31
3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	32
3.3 Teste de Susceptibilidade a antimicrobianos.....	37
3.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	37
3.5 Análises de Virulência e Resistência.....	38
3.5.1 Gelatinase.....	38
3.5.2 DNase.....	38
3.5.3 Atividade Hemolítica.....	39
4 Discussão.....	41
5 Conclusão.....	47
6 Referencias.....	47
7 Anexos.....	54

1 Introdução

Em uma unidade hospitalar, onde o objetivo principal é a recuperação da saúde e a atenção integral ao paciente sob internação, é englobado um conjunto de cuidados, dentre estes os relacionados ao serviço de alimentação e nutrição que atua de forma conjunta com o tratamento médico, auxiliando a oferecer o aporte de nutrientes necessário (MARTINELLI, 2007; SETA et al., 2010).

A disponibilidade e o fornecimento de alimentos seguros, ou seja, com qualidade sensorial e necessidades nutricionais aceitáveis, livres de contaminantes de origem física, química ou biológica é entendida como indício de qualidade em unidades de alimentação e nutrição (UAN). Sendo assim, a inocuidade do alimento, dentro deste contexto, é um dos fatores primordiais para garantia da qualidade do serviço (SOUSA et al., 2009; FARIAS et al., 2011).

Além disso, deve-se levar em consideração que os alimentos são direcionados à pessoas enfermas, nas quais o sistema imunológico pode estar comprometido. Deste modo, a responsabilidade com a inocuidade e a segurança dos alimentos é ainda maior, visto que um surto de infecção ou intoxicação alimentar pode trazer graves consequências podendo levar risco de morte aos pacientes (FARIAS et al., 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos casos de doenças de origem alimentar ocorrem por técnicas inadequadas de processamento dos alimentos, higiene precária da estrutura física, de utensílios e de equipamentos, e deficiência nas medidas higiênico-sanitárias de manipuladores (WHO, 2019).

Na UAN hospitalar é comum o uso de panos e esponjas de limpeza na higienização de equipamentos que não podem entrar em contato direto com a água corrente, além disso, é comum o uso prolongado destes materiais de limpeza. Este fato justifica-se pela dificuldade nos processos de higienização e sanitização visto que a estrutura de alguns estabelecimentos não disponibiliza pontos de água em todos os setores. O indesejável uso prolongado destes pode levar a multiplicação de micro-organismos, ocasionando riscos para a saúde da população (BARTZ, 2008).

Práticas inadequadas de higienização e manipulação podem levar a contaminação cruzada, que consiste na transferência por meio de utensílios e superfícies contaminadas por micro-organismos provenientes de um alimento contaminado para outro (LUBER, 2009). A contaminação cruzada é uma das responsáveis pelo surgimento de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), cujo principal micro-organismo causador de infecções alimentares é a *Salmonella* spp, a qual tem capacidade de se incorporar, colonizar e formar biofilme em locais em contato direto com os alimentos (DANTAS, 2014).

Sendo assim, os panos e as esponjas de limpeza ganham destaque uma vez que podem transferir micro-organismos, em concentrações acima do limite tolerado, para superfícies e utensílios utilizados no preparo dos alimentos. Estes podem reter restos de alimentos e servir como um reservatório de micro-organismos causadores de doenças. Essas bactérias podem permanecer na superfície de um determinado material durante dias após a contaminação, podendo ocasionar surtos de DTA (BARTZ, 2008; ROSSI, 2010).

Para este tipo de material (panos de limpeza e esponjas) recomenda-se o descarte diário após a utilização, ou a higienização adequada segundo a legislação vigente (Portaria nº. 78/2009); por este motivo, no caso de UAN é relevante que estas estejam comprometidas a estabelecer procedimentos operacionais padronizados (POP) a fim de proporcionar condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

2 Referencial Teórico

2.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTA)

As DTA são ocasionadas por agentes que acessam o organismo por meio da ingestão de alimentos, e tem caráter infeccioso ou tóxico de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2019). A contaminação do alimento pode ocorrer durante todas as etapas de produção e distribuição, pela ação de diferentes agentes etiológicos, químicos, físicos e biológicos que são os principais responsáveis pela ocorrência das DTA (SESC/DN, 2003; STAMFORD et al., 2006).

Quando duas ou mais pessoas apresentam em um determinado intervalo de tempo, sinais e sintomas similares após a ingestão de um mesmo

alimento identificado como contaminado após investigação, identifica-se como surto de DTA (BRASIL, 2016).

De acordo com o Ministério da Saúde (MS), existem mais de 250 tipos de DTA, visto que há uma variedade de agentes etiológicos, sendo a maioria delas causadas por parasitas, vírus ou bactérias e suas toxinas. Algumas delas ainda podem ser causadas por toxinas naturais, como as de alguns tipos de cogumelos ou algas por exemplo, ou por produtos químicos como agrotóxicos e pesticidas que podem contaminar o alimento (BRASIL, 2014). As bactérias, devido a sua patogenia e diversidade, representam quase a totalidade dos casos onde o agente etiológico é identificado, sendo responsáveis por 90,5% dos casos (BRASIL, 2016).

O aumento da população, a maior exposição a alimentos destinados ao pronto consumo e/ou em vias públicas e a deficitária fiscalização dos serviços públicos em relação a qualidade dos alimentos destinados a população são alguns dos diversos determinantes que contribuem para emergência de DTA. (BRASIL, 2018).

Segundo o MS, os alimentos de origem animal merecem destaque, já que são os maiores responsáveis por surtos alimentares. Contudo, alimentos *in natura* ou industrializados, de origem vegetal e água, também podem ser contaminados por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas (BRASIL, 2019).

As DTA são consideradas um problema de saúde pública, já que sua manifestação pode ocorrer de diversas formas, desde sintomas brandos até situações mais graves que podem necessitar de atendimento médico e, em alguns casos, podendo levar a morte (MARCHI et al., 2011).

Uma ferramenta indispensável para a obtenção de alimentos seguros é o programa de qualidade Boas Práticas de Fabricação (BPF). De acordo com a Portaria nº. 368/97, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, as BPF são normas e procedimentos exigidos na elaboração de produtos alimentícios para o consumo humano. Dessa forma, referem-se às medidas a serem tomadas pelos estabelecimentos que trabalham com elaboração de alimentos, para garantia da qualidade sanitária e conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 1997).

Apesar de não existir até o momento atual uma legislação específica para unidades de alimentação hospitalar e por serem locais onde existe extrema importância na segurança dos alimentos, é imprescindível a consonância desses estabelecimentos e seus serviços às BPF, Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) e Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) como meio de garantia da qualidade (SOUSA, 2009).

2.2 Contaminação Cruzada

A transferência de bactérias e vírus de alimentos contaminados para outros alimentos, por meio de superfícies ou utensílios contaminados é classificada como contaminação cruzada (LUBER, 2009). A contaminação cruzada é uma das razões causadoras de DTA que pode ser causada pelos manipuladores, equipamentos, utensílios e ambiente de preparação (ROSSI, 2010).

A probabilidade de ocorrer a contaminação de alimentos pela contaminação cruzada depende de dois fatores: da contaminação dos utensílios em que os alimentos são preparados e, da possibilidade destes equipamentos de transferirem micro-organismos para os alimentos a serem consumidos (DANTAS, 2014).

Diversas ações têm sido estudadas e aplicadas para evitar contaminações cruzadas nos serviços de alimentação, dentre estas, pode-se citar manuais de higienização e análises de riscos (SARTER et al., 2010).

Apesar dos processos de lavagem serem um ponto de controle para prevenir a contaminação cruzada nas cozinhas, quando não efetuados de maneira correta podem ser responsáveis por contaminação de utensílios e superfícies (GENTIL et al., 2010). Diversos estudos indicam que panos e esponjas tem sido reconhecidos como importantes difusores de patógenos, favorecendo a contaminação cruzada nos alimentos (KUSUMANINGRUM et al., 2002; KUSUMANINGRUM et al., 2003; MATTICK et al., 2003).

2.3 Utilização e contaminação de panos e esponjas de limpeza em serviços de alimentação hospitalar

Em uma UAN, os colaboradores dos serviços de alimentação e nutrição podem não ter treinamento e experiência na área. Sendo assim, não possuem conhecimento sobre o Manual de Boas Práticas (MBP) ou sobre o trabalho que vão desempenhar na unidade, favorecendo a contaminação dos materiais utilizados como as esponjas e os panos de limpeza, facilitando a contaminação cruzada. O controle de higienização dentro de uma UAN deve ser rigoroso, levando em conta que grande parte dos surtos por DTA são causados por manipulação e procedimentos de higienização inadequados dos alimentos, dos utensílios e dos equipamentos utilizados na produção (FARIAS et al., 2011).

Aliado a isso, também existe o fato de que em muitas unidades não existe um procedimento padrão para a troca dos panos, sendo estes usados frequentemente, em tempo indeterminado e sem o correto processo de sanitização (BARTZ, 2008). Estudos descreveram que panos em uso no preparo de alimentos após 3 horas, apresentaram micro-organismos em números e níveis incontáveis, facilidade de dispersão de micro-organismos e vírus por meio dos panos e pelo contato das mãos com os alimentos e quando não usados adequadamente e não sanitizados, são grande fonte de reservatório de micro-organismos (SCOTT, 1997; SCOTT e BLOOMFIELD, 1990).

Os panos de limpeza são uma fonte de disseminação de patógenos alimentares nas UAN, devido à forma em que são conservados, seja com restos de alimentos ou alimentos com excesso de umidade. Além disso, o material dos panos de limpeza na maioria das vezes é o algodão, o que permite que restos de alimentos e micro-organismos se fixem aos mesmos, levando à níveis de contaminação significativos (KUSUMANINGRUM et al., 2003; BARTZ, 2008).

As esponjas de limpeza também merecem destaque, já que podem transferir quantidades significativas de micro-organismos para superfícies e utensílios utilizados na preparação de alimentos (KUSUMANINGRUM et al., 2003). Restos de alimentos podem estar presentes nas esponjas que podem

servir como um reservatório de micro-organismos causadores de doenças (SHARMA, 2009).

Bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. são patógenos que podem permanecer por horas ou dias após a contaminação na superfície das esponjas, podendo alcançar os alimentos e provocar surtos de DTA. Um agravante é a multiplicação dos micro-organismos que pode ser favorecida pelo acondicionamento das esponjas em recipientes contendo água, restos de alimentos e resíduos de detergente em temperatura ambiente (ROSSI, 2010).

2.4 Eficiência dos processos de higienização

Procedimentos de higienização mal conduzidos podem gerar graves consequências, como a transmissão de doenças. Por isso, a higienização em estabelecimentos produtores de alimentos tem como objetivo garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, para obtenção de produtos que não ofereçam riscos à saúde do consumidor (ROSSI et al., 2010).

O procedimento de higienização nos equipamentos industriais é realizado em duas etapas: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais, com aplicação de detergentes ácidos e alcalinos. A sanitização visa a eliminação de micro-organismos patogênicos por meio da aplicação de agentes à base de diversos compostos químicos, como hipoclorito de sódio e quaternário de amônio (LINDSAY et al., 2006).

É fundamental que procedimentos de higienização sejam estabelecidos e padronizados dentro das UAN, já que os equipamentos utilizados podem estar contaminados por produtos estranhos ao processo ou resíduos de processos anteriores que vão contribuir para proliferação de micro-organismos (EVANGELISTA, 2000; GORMEZANO, 2007).

Os sanitizantes utilizados para a limpeza devem ser adquiridos não só por sua eficiência na remoção de sujidades, como também pelo seu efeito sobre os equipamentos, superfícies, tratabilidade dos efluentes industriais gerados e também sobre os operadores. Para uma limpeza eficiente é

imprescindível conhecer a concentração, temperatura, tempo de exposição e ação mecânica adequada (ANDRADE et al., 2008).

Uma grande diversidade de micro-organismos apresenta a capacidade de aderirem e aglomerar-se à superfície dos equipamentos, resultando na formação de biofilmes. Após a formação do biofilme, as bactérias continuam se multiplicando, constituindo assim uma fonte potencial de contaminação aos alimentos, principalmente quando se trata da adesão de bactérias patogênicas (ROSADO, 2009).

Os biofilmes constituem uma barreira física, protegendo as bactérias de detergentes e sanitizantes. A resistência intensificada das células no interior dos biofilmes também é atribuída a fatores como baixa taxa de crescimento das bactérias e neutralização de sanitizantes pela matriz polimérica, já que a mesma é constituída por matéria orgânica. Aquisição de resistência bacteriana pela exposição das células a concentrações subletais de sanitizantes no interior do biofilme também pode ocorrer. Dessa forma, as bactérias em biofilmes podem permanecer aderidas e sobreviver por longos períodos mesmo após procedimentos de higienização, representando uma fonte de contaminação para os alimentos, comprometendo a qualidade e segurança microbiológica do produto final (ROSSI et al, 2009).

2.5 Formação de Biofilme

Biofilmes são caracterizadas como comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. (BOARI et al., 2009). Como etapas importantes para a sua formação, são descritas a adesão inicial, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, à formação de microcolônias, à maturação e ao destacamento de células, retornando estas a seu estilo de vida planctônico (MANSFELD, 2007).

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas com as bactérias organizadas em comunidades de diferentes

graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. Esses biofilmes são constituídos por células aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de exopolissacarídeo. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (IST, 2008; KYAW, 2008). Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogêneos, compostos por duas ou mais espécies, podendo os produtos do metabolismo de uma espécie auxiliar o crescimento das demais e a adesão de uma dada espécie fornecer substâncias que promovem a ligação de outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e a acumulação de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras poderão limitar a diversidade de espécies num biofilme (IST, 2008). Do ponto de vista da segurança de alimentos e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Se formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, podem acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

2.6 Fatores de Virulência e Resistência das bactérias

Alguns microrganismos, ao longo do tempo, desenvolveram a capacidade de resistir a determinados tipos de antimicrobianos e deste modo, por consequência, aumentaram sua virulência. A virulência refere-se a gravidade de uma doença que é ocasionada por um agente infeccioso, então o aumento desta capacidade dos microrganismos é extremamente prejudicial a saúde do paciente (MARGUET et al., 2008).

Os microrganismos patogênicos possuem e expressam genes que são capazes de codificar fatores de virulência, que são estruturas, produtos ou estratégias que as bactérias utilizam para escapar do sistema imune, causando uma infecção. Estes microrganismos podem colonizar o hospedeiro ou causar lesões, através de toxinas por exemplo (HÁRSI, 2009).

A capacidade de produção de toxinas e a capacidade de multiplicação no organismo parasitado definem a virulência do microrganismo, visto que os

fatores de virulência estão envolvidos com a colonização ou com o aumento das lesões ao hospedeiro, dependendo da cepa, da quantidade de agentes infecciosos e o local de entrada do patógeno. Além disso, fatores como estado nutricional, imunológico, estresse, gravidez e idade que referem-se a predisposição do hospedeiro também estão envolvidos na virulência (TORTORA et al., 2005).

3. Artigo

Análise da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de panos e esponjas utilizadas em Serviços de Alimentação Hospitalar

Ana Paula Maia Almeida^a; Gabriela Rosa da Rosa^b; Thayane Garcia Blumberg^b; Luany Oliveira Marques^b; Fernanda Weber Bordini^c; Michele Dutra Rosolen^d; Simone Pieniz^e

^aNutricionista, Mestranda em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

^bNutricionista, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

^cMestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000, Pelotas-RS.

^dDoutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000, Pelotas-RS.

^eProfessora orientadora, Faculdade de Nutrição, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

***Autor para correspondência:** Simone Pieniz - Rua Gomes Carneiro, nº 1, Centro, Pelotas-RS, Brasil, CEP: 96010-610, Tel.: +5553 3284 3834; Fax: +5553 3284 3830. E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br.

1 Introdução

Em uma unidade hospitalar, onde o objetivo principal é a recuperação da saúde e a atenção integral ao paciente sob internação, engloba-se um conjunto de cuidados, dentre estes os relacionados ao serviço de alimentação e nutrição que atua de forma conjunta com o tratamento médico, auxiliando no aporte de nutrientes necessário (MARTINELLI, 2007; SETA et al., 2010).

A disponibilidade e o fornecimento de alimentos seguros, ou seja, com qualidade sensorial e necessidades nutricionais aceitáveis, livres de contaminantes de origem física, química ou biológica é entendida como índice de qualidade em unidades de alimentação e nutrição (UAN). Sendo assim, a inocuidade do alimento, dentro deste contexto, é um dos fatores primordiais para garantia da qualidade do serviço (SOUSA et al., 2009; FARIAS et al., 2011).

Na UAN é comum o uso de panos e esponjas de limpeza na higienização de equipamentos que não podem entrar em contato direto com a água corrente, além disso, é comum o uso prolongado destes materiais de limpeza. Este fato justifica-se pela dificuldade nos processos de higienização e sanitização, visto que a estrutura de alguns estabelecimentos não disponibiliza pontos de água em todos os setores. O indesejável uso prolongado destes materiais pode levar a multiplicação de micro-organismos, ocasionando riscos para a saúde da população (BARTZ, 2008).

Práticas inadequadas podem levar a contaminação cruzada, que consiste na transferência por meio de utensílios e superfícies contaminadas de micro-organismos provenientes de um alimento contaminado para outro (LUBER, 2009). A contaminação cruzada é responsável por casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), cujo principal micro-organismo causador de infecções alimentares é a *Salmonella* spp., a qual tem capacidade de se aderir, colonizar e formar biofilme em locais em contato direto com os alimentos (SOUSA et al., 2009; FARIAS et al., 2011).

Sendo assim, os panos e as esponjas de limpeza ganham destaque uma vez que podem transferir micro-organismos, em concentrações acima do limite tolerado, para superfícies e utensílios utilizados no preparo dos alimentos. Estes podem reter restos de alimentos e servir como um reservatório de micro-

organismos causadores de doenças. Essas bactérias podem permanecer na superfície de um determinado material durante dias após a contaminação, podendo potencializar a contaminação cruzada (BARTZ, 2008; ROSSI, 2010). Para este tipo de material (panos de limpeza e esponjas) recomenda-se o descarte diário após a utilização, ou a higienização adequada segundo a legislação vigente (Portaria nº. 78/2009); por este motivo, no caso de UAN é relevante que estas estejam comprometidas a estabelecer procedimentos operacionais padronizados (POP) a fim de proporcionar condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

Com base no presente exposto, o objeto deste estudo foi analisar a contaminação microbiológica de esponjas e panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação hospitalar, bem como a eficácia de dois métodos distintos de desinfecção realizados pela UAN e a aderência bacteriana nestes materiais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Caracterização das amostras e procedimentos de coleta

Panos de prato (100% algodão), panos multiuso descartáveis (Perfex®) e esponjas de limpeza (poliuretano), foram coletados de uma UAN hospitalar localizada na cidade de Pelotas-RS. O projeto foi previamente aprovado pela administração da mesma e, em seguida, aplicado um *check-list*, desenvolvido para este estudo baseado e conforme o preconizado pela Portaria nº 78/2009 (Anexo 1), com modificações. Após coletados, os materiais foram transportados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição - UFPEL sob condições de temperatura controladas em saco de plástico estéril e imediatamente analisados.

2.2 Quantificação Microbiana

Para análise da quantificação microbiana nas amostras foram realizadas duas coletas na UAN hospitalar: a primeira realizada após a limpeza e sanitização de acordo com os POP da própria UAN, e a segunda após o fim do período de utilização no turno (manhã). Os panos de prato e as esponjas de

limpeza são destinados na UAN separadamente à higienização de louças utilizadas por pacientes e de funcionários.

A análise microbiológica das amostras coletadas após a higienização e a sanitização pela própria UAN foi realizada utilizando uma amostra de cada um dos panos (17,5 x 35cm) e esponjas, divididas em três partes iguais (2,5 x 11cm) usando uma tesoura desinfetada e mãos enluvadas e, posteriormente, foram realizadas as seguintes análises (contagem padrão em placas, ECP, coliformes totais e termotolerantes).

Para a análise microbiológica dos panos multiuso descartáveis e panos de prato (funcionários e pacientes), coletados após o turno de uso (manhã), estes foram divididos em três partes iguais (17,5 x 35cm), sendo que cada parte foi destinada para as análises de contagem padrão em placas, ECP, coliformes totais e termotolerantes; sanitização por hipoclorito de sódio (200 ppm) e por fervura (15 min em forno micro-ondas) realizadas de acordo com a portaria nº. 78/2009; já no que se refere as esponjas, foi utilizado o mesmo procedimento citado anteriormente, e as mesmas foram coletadas após o fim do período de utilização no turno (manhã) e analisadas.

Para as análises de contagem padrão em placas, ECP, coliformes totais e termotolerantes, uma peça de cada amostra de cada um dos panos e esponjas de limpeza (funcionários e paciente) foi adicionada em 225 mL de água peptonada (0,1%) e agitada em *stomacher* durante 1 min. Após, 1 mL do homogeneizado foi adicionado em 9 mL de água peptonada 0,1% para a obtenção da diluição de 10^{-1} , sendo realizadas diluições seriadas até 10^{-5} . O experimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/cm² de pano e/ou esponja.

2.2.1 Enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos

Para o isolamento de mesófilos aeróbios foi adicionado 1 mL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-5}) em placas de Petri esterilizadas, as quais foram adicionados 20 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA), utilizando-se a técnica de *pour-plate*. Após a solidificação, as placas foram incubadas invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h. O número de UFC por cm² de amostra foi obtido por meio da multiplicação do número de colônias pelo fator de diluição e este

produto foi dividido pela área correspondente à superfície do pano e esponja de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2010).

2.2.2 Enumeração de *Staphylococcus*

Foi inoculada sobre a superfície de Ágar de Baird-Parker, 0,1 mL das diluições (10^{-1} a 10^{-5}). Após completa incorporação, as placas foram incubadas invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. O número de UFC/cm² de amostra foi obtido por meio da multiplicação do número de colônias pelo fator de diluição e este produto foi dividido pela área correspondente à superfície de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2010). A confirmação dos isolados como *Staphylococcus aureus* foi realizada por meio do teste de coagulase.

2.2.3 Enumeração de Coliformes totais e termotolerantes

Para a contagem de coliformes totais foi utilizado o método proposto pela U. S. Food and Drug Administration (USFDA, 2002) com algumas modificações. Alíquotas de 1 mL das diluições, citadas acima foram colocadas em placas de petri esterilizadas, as quais foram adicionados 20 mL de ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (Violet Red Bile Lactose Agar - VRBA – Merck-Alemanha) dissolvido e resfriado a 45°C com posterior homogeneização. Após solidificação, uma sobrecamada de 5 mL do mesmo meio foi adicionada. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias características de coliformes totais (vermelho púrpura com 0,5 mm ou mais de diâmetro, rodeados por halo avermelhado de precipitação de sais biliares). Para a confirmação de coliformes totais, foram retiradas de três a cinco colônias, de cada placa, e inoculadas em tubos contendo Caldo Verde Brilhante (VB) (Bile 2%) (Biobrás-Brasil). Os tubos permaneceram durante 24 h em banho maria a 37°C . Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram presença de gás no tubo de Durham e turvação. A contagem de coliformes totais foi determinada multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso da diluição, sendo o resultado expresso em Log UFC /cm² de pano e esponja.

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada semeando cinco colônias características (rosa intenso com ou sem presença de precipitado de sais biliares), proveniente das placas com ágar VRBA, em tubos contendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (EC) (Difco – EUA). Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e presença de gás no tubo de Durhan após 48 h em banho maria a 45 °C. A contagem foi determinada por meio do número de colônias típicas contadas pelo inverso da diluição inoculada dos tubos positivos, sendo o resultado expresso em Log UFC/cm² de pano e esponja.

2.3 Eficiência dos métodos de desinfecção pela UAN

Para a avaliação dos métodos de desinfecção dos panos foram aplicados como parâmetros a sanitização com hipoclorito de sódio (200 ppm) e fervura (15 min em forno micro-ondas). Para isto foi utilizado um pedaço de pano para cada método (17,5 x 35 cm). Os panos foram lavados à mão por 10 min, pela mesma pessoa, usando detergente neutro comercial adquirido em comércio local. Depois de lavados, os panos foram enxaguados em água potável corrente, e após, uma das peças foi fervida em água por 15 min (micro-ondas) e a outra peça colocada em uma solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 min, seguido de enxágue em água potável corrente (Portaria nº. 78/2009).

Após a higienização, os panos foram colocados em 225 mL de água peptonada 0,1% e vigorosamente agitado. Um volume de 0,1 mL do homogeneizado foi inoculado diretamente em placas de Petri contendo PCA, BP e 1 mL do homogeneizado em VRBA, e após incubação em tubos contendo VB e EC. As placas e/ou tubos foram incubados na temperatura ideal para cada um dos micro-organismos isolados, durante 48 h. O experimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em Log UFC/cm² de pano.

2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada para avaliar qualitativamente a adesão bacteriana nas amostras. A forma de fixação e desidratação das amostras utilizada foi a

desidratação por ponto crítico, com protocolo fornecido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As amostras em estudo, primeiramente foram lavadas com 10 mL de solução de tampão fosfato-salino (PBS) 1x e imersos em solução fixadora contendo gluteraldeído (25%). Após um período mínimo de sete dias de fixação, as amostras foram lavadas por três vezes com solução de lavagem contendo tampão fosfato 0,2 M e água destilada na proporção de 1:1. Em cada lavagem, as amostras foram imersas em solução de lavagem por 30 minutos (Tondo et al., 2010). Em seguida, foi realizada a desidratação com concentrações crescentes de acetona (30 a 100%). Depois de atingida a concentração de acetona de 100%, as amostras foram inseridas em um secador de ponto crítico (Critical Point Dryer - Balzers® CPD030), para substituir a acetona do interior das células por CO₂. Uma vez finalizado o processo de desidratação, as amostras foram metalizadas com ouro (Sputter Coater - Balzers® SCD050) para permitir sua visualização no microscópio. As imagens foram obtidas em MEV (JSM 5800 – JEOL®) e realizadas no Laboratório de Nanotecnologia do Curso de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

2.5 Teste de Susceptibilidade a antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com o método padrão de difusão em disco recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), sendo os isolados testados classificados em sensíveis ou resistentes. Os isolados provenientes de panos e esponjas de limpeza foram previamente inoculados em placas contendo Agar Mueller-Hinton (MH) e incubados à 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, as colônias dos micro-organismos foram ressuspendidas em solução salina esterilizada (0,9%) e mensuradas espectrofotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (Densidade Óptica - DO_{600nm}) a qual corresponde ao padrão de turbidez de 0,5 na Escala de McFarland. Em seguida, com auxílio de swabs, placas de petri contendo agar MH foram inoculadas com a solução padronizada, contendo seis antimicrobianos comumente utilizados em ambiente hospitalar: clindamicina-2µg (CLI), cloranfenicol-30µg (CLO),

vancomicina-30 μ g (VAN) eritromicina-50 μ g (ERI), meropenem-20 μ g (MER) e penicilina-10 μ g (PEN), todos da marca Laborclin. Após a incubação, foi mensurado o diâmetro das zonas de inibição dos diferentes antimicrobianos testados. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes, e os dados foram expressos em mm.

2.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados

Para a análise da capacidade de formação de biofilmes e de fatores de virulência e de resistência, foram selecionados oito isolados no total, sendo dois isolados de *E. coli* (esponja e pano multiuso da louça dos pacientes), dois de *Salmonella* (pano de prato da louça dos pacientes, esponja da louça da cozinha), dois de *Staphylococcus* (esponja e pano multiuso da louça da cozinha) e dois isolados de mesófilos (esponja e pano multiuso da louça da cozinha).

A capacidade de formação de biofilme dos isolados de panos e esponjas de limpeza foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000). Os isolados foram previamente inoculados em placas contendo BHA e incubadas a 35 °C durante 24 h. Placas de microtitulação foram aliquoteadas com 180 mL de BHI estéril. Após incubação *overnight*, as colônias dos micro-organismos foram ressuspensas em solução salina e ajustada espectro fotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (DO_{600nm}). Em seguida, 20 μ L de solução, foram inoculadas em cada poço. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo e, como controle negativo, foi utilizado apenas o meio BHI. As placas foram cobertas e incubadas a 35 °C durante 24 h. Após o crescimento, as culturas foram aspiradas com pipeta multicanal e as microplacas foram lavadas três vezes com uma solução de 200 mL de solução salina. A micro-placa foi invertida sobre papel absorvente para secar e as amostras foram fixadas posteriormente com 150 mL de metanol (CH₃OH) durante 20 min.

Após este período, o metanol foi descartado e as placas mantidas invertidas durante a noite. As placas foram coradas com 150 μ L de violeta de cristal (5 g L⁻¹) durante 15 min. Após as placas foram invertidas e o excesso removido sob água corrente. Em seguida, após um curto período de secagem,

150 μ L de etanol (95% v/v) foi adicionado. As placas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 min e a absorvância medida em leitor de microplacas (Anthos 2010, Tipo 4894 17550) a 450 nm. Com base na densidade ótica (OD) produzida por biofilmes, cepas foram classificadas nas seguintes categorias: não há produção de biofilme (0), fraco (+), moderado (++) ou forte produtor de biofilme (+++), como descrito anteriormente por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte de OD (ODC) foi definido como três desvios padrão acima da média OD do controle negativo. As cepas foram classificadas como segue: $OD \leq Odc$ = sem produção de biofilme, $Odc < OD \leq (2 \times ODC)$ = fraco produtor, $(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$ = moderado produtor ($4 \times Odc$) $< OD$ = forte produtor. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independente.

2.7 Análise dos Fatores de Virulência e de Resistência

2.7.1 Gelatinase

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). Os micro-organismos foram inoculados em tubos contendo 4 mL de caldo BHI contendo 12% de gelatina e incubados por 48 h a 37°C. Após a incubação, os tubos foram alocados em banho de gelo por 30 min, sem agitação. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido ou positivo: meio líquido. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

2.7.2 Atividade de DNase

A atividade de DNase foi testada como descrito por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o Agar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil). Os isolados foram estriados diretamente na placa com o Agar DNase e incubados por 24 h à 37°C. Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1 N por 3 min. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerado indicativo de resultado positivo. Foi utilizado como controle

positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O experimento foi realizado em duplicata em experimentos independentes.

2.7.3 Atividade Hemolítica

Os oito isolados foram testados quanto a atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), utilizando Agar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubação a 37°C por 48 h. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: α -hemólise - linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias; γ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de Agar Sangue (serão consideradas não hemolíticas). Linhagens, que apresentam zonas de lise de sangue ao redor das colônias foram classificadas como hemolíticas (β -hemólise). O experimento foi realizado em duplicata em experimentos independentes.

3 Resultados

3.1 Quantificação microbiana e eficiência dos métodos de desinfecção pela UAN

Primeiramente, foi aplicado um *check-list* para verificar as condições higiênico-sanitária da UAN hospitalar, por meio do qual observou-se que o Manual de Boas Práticas (MBP) e POP são executados na UAN sob a supervisão da nutricionista responsável pela produção. Além disso, foi relatado que os procedimentos de higienização e sanitização eram executados conforme a legislação vigente (Portaria nº. 78/2009).

3.1.1 Panos de limpeza

De acordo com a Portaria nº. 78/2009, os panos de limpeza quando utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, devem ser substituídos a cada 2h, não excedendo 3h, podendo serem utilizados novamente, após a higienização. Já os panos de limpeza descartáveis (multiuso) quando utilizados em superfícies que entram em contato com

alimentos, devem ser descartados a cada 2h, não excedendo 3h, sem serem utilizados novamente. Por este motivo, no presente estudo, os panos multiuso descartáveis (Perfex®) não foram analisados quanto a eficiência de higienização.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que nas amostras de panos de prato higienizados pela própria UAN, foi encontrada contagem de coliformes totais e termotolerantes na amostra proveniente da louça dos pacientes (Tabela 1). Da mesma forma, quando analisados os panos de prato e panos multiuso descartáveis coletados após o uso no turno, foi observada a presença de coliformes totais e termotolerantes (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem de coliformes totais e termotolerantes em panos de pratos e multiuso descartáveis provenientes da utilização na produção (funcionários e pacientes) em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS. Os dados foram expressos em média de Log UFC/cm² ± desvio padrão.

Amostra	Panos higienizados e sanitizados pela UAN		Panos após o uso no turno		Panos fervidos		Panos sanitizados de acordo com a legislação	
	CT**	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
	----- UFC / cm ² -----							
PF*	0,00±0,0	0,00±0,00	5,56x10 ² ±0,00	5,73x10 ² ±0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
PP	3,78x10 ² ±0,05	5,14x10 ² ±0,00	5,97x10 ² ±0,00	5,79x10 ² ±0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
P MDF	NC****	NC	5,98x10 ² ±0,00	NC	NA****	NA	NA	NA
PMDP	NC	NC	5,98x10 ² ±0,00	NC	NA	NA	NA	NA

*PF: pano de prato funcionário; PP: pano de prato paciente; P MDF: pano multiuso descartável funcionário e PMDP: pano multiuso descartável paciente.

**CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes termotolerantes

***NC: não coletado por ser um item descartável na UAN.

****NA: não analisado

Foi realizada também a higienização e a sanitização dos panos de prato de acordo com a legislação vigente (Portaria nº. 78/2009): higienização por 10 min e após imersão em solução clorada por 15 min (200 ppm) e, por fervura em forno micro-ondas (15 min). Por meio dos resultados obtidos observou-se que

não houve crescimento de nenhum dos micro-organismos analisados (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os resultados provenientes dos materiais higienizados pela própria UAN. Por meio dos dados obtidos pode-se observar que não houve presença de mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva. No entanto, após o uso no turno de trabalho, foi observada contagem destes, em ambos os panos analisados (Tabela 2).

Quando analisados no presente estudo os panos higienizados e sanitizados de acordo com a legislação vigente (Portaria nº. 78/2009) não foi observada contagem de nenhum dos micro-organismo avaliado.

Tabela 2. Contagem de mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva em panos de pratos e multiuso descartáveis provenientes da utilização na produção (funcionários e pacientes) em uma UAN hospitalar da cidade de Pelotas-RS. Os dados foram expressos em média de Log UFC/cm² ± desvio padrão.

Amostra	Panos higienizados pela UAN				Panos após o uso no turno			
	PF*	PP	PMDF	PMDP	PF	PP	PMDF	PMDP
	---- UFC / cm ² ----							
Mesófilos	0,0±0,0 0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	4,02x10 ¹ ±0,0 1	4,33x10 ¹ ±0,2 3	6,33x10 ³ ±0,0 4	5,42x10 ² ±0,0 7
S. coagulase positiva	0,0±0,0 0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	2,70x10 ¹ ±0,0 0	2,70x10 ¹ ±0,0 0	3,40x10 ¹ ±0,2 8	3,92x10 ¹ ±0,2 5

*PF: pano de prato funcionário; PP: pano de prato paciente; PMDF: pano multiuso descartável funcionário e PMDP: pano multiuso descartável paciente.

3.1.2 Esponjas

Conforme os resultados obtidos no presente estudo, observou-se a contagem de coliformes totais nas esponjas após a higienização e sanitização pela própria UAN, não sendo observada a presença para coliformes termotolerantes (Tabela 3).

Porém, ao analisar ambas as esponjas (higienização de louças oriundas dos pacientes e funcionários) após o uso no turno, foi observada presença

significativa de coliformes totais e termotolerantes, conforme resultado demonstrado na Tabela 3.

Conforme os dados descritos na Tabela 4, não foi observada a presença de micro-organismos mesófilos e *ECP* quando analisadas as esponjas higienizadas e sanitizadas pela própria UAN. Diferentemente, após o uso no turno, observou-se presença de micro-organismos aeróbios mesófilos tanto nas esponjas oriundas da higienização de louças utilizadas pelos pacientes quanto dos funcionários. Quando analisada a presença de *ECP* observou-se baixa contagem de células ($4,10 \times 10^1$) em ambas as esponjas.

Tabela 3. Contagem de coliformes totais (CT) e termotolerantes (CF) em esponjas de limpeza utilizadas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS. Os dados foram expressos em média de Log UFC/cm² ± desvio padrão.

Amostra	Esponjas higienizadas e sanitizadas pela UAN		Esponjas após o uso no turno	
	CT**	CF	CT	CF
	----- UFC / cm ² -----			
EP*	3,85x10 ² ±0,00	0,00±0,00	5,98x10 ² ±0,00	5,67x10 ² ±0,00
EF	3,81x10 ² ±0,05	0,00±0,00	5,98x10 ² ±0,00	5,73x10 ² ±0,00

*EP: esponja de higienização louças pacientes; EF: esponja de higienização louças funcionário

**CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes fecais

Tabela 4. Contagem de mesófilos e *S. aureus* em esponjas de limpeza utilizadas em uma unidade de Alimentação e Nutrição hospitalar da cidade de Pelotas-RS. Os dados foram expressos em média de Log UFC/cm² ± desvio padrão.

Amostra	Esponjas higienizadas e sanitizadas pela UAN		Esponjas após o uso no turno	
	EP*	EF	EP	EF
	----- UFC / cm ² -----			
Mesófilos	0,00±0,00	0,00±0,00	6,10x10 ³ ±0,00	6,40x10 ³ ±0,06
<i>S. coagulase positiva</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	4,10x10 ¹ ±0,00	4,10x10 ¹ ±0,16

*EP: esponja de higienização louças pacientes; EF: esponja de higienização louças funcionário

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De acordo com os resultados obtidos por meio das análises eletromicroscópicas verificou-se elevada adesão bacteriana após o uso dos

materiais de limpeza (panos de algodão e poliuretano) no período de um turno na UAN. As figuras apresentam imagens de materiais utilizados como controle, ou seja, higienizados e provenientes da louça da copa e utilizadas pelos pacientes, representado pela letra A (figuras 1, 2 e 3).

A Figura 1 apresenta as imagens referentes as análises realizadas em amostras de esponjas de limpeza (poliuretano). Conforme analisado na Figura 1A (controle) não foi observada adesão de micro-organismos na superfície de poliuretano. Porém, nas Figuras 1B; 1C e 1D provenientes da higienização de louças da copa e 1E; 1F e 1G provenientes da higienização de louças dos pacientes após um turno (manhã), observou-se a adesão de micro-organismos, com características de formação de biofilme. Observa-se que a superfície do material (poliuretano) mostra-se porosa e com fendas típicas de sua estrutura, que são propícias para o abrigo de micro-organismos.

A Figura 2 apresenta imagens referentes as análises realizadas em amostras de panos de prato (100% algodão). Conforme demonstrado na Figura 2A (controle) não foi observada adesão e formação de biofilme por micro-organismos na superfície de poliuretano. Porém, nas Figuras 2B; 2C e 2D provenientes da higienização de louças da copa e 2E; 2F e 2G provenientes da higienização de louças dos pacientes após o turno (manhã), observou-se a adesão de micro-organismos.

Resultados semelhantes foram observados na Figura 3 a qual apresenta as imagens referentes as análises realizadas em amostras de panos multiuso descartáveis (Perfex®). Conforme analisado na Figura 3A (controle) não foi observada adesão microbiana na superfície do material analisado, composto em sua maioria por algodão. Porém, nas Figuras 3B; 3C e 3D provenientes da higienização de louças da UAN, observou-se a adesão de micro-organismos, com características de formação de biofilme.

Observou-se que nas amostras oriundas dos panos de prato, panos multiuso descartáveis (Perfex®) e esponjas, oriundos da higienização de louças de pacientes e da copa, verificou-se a presença de um espesso biofilme recobrendo a superfície do material. Em aumentos maiores, observa-se que o biofilme é composto por numerosas bactérias, provavelmente exsudada por esses micro-organismos. Sob aumento de 5.000 vezes, as bactérias

apresentam-se com distintas formas e arranjos, bacilares e em cocos, dispostos em cadeias.

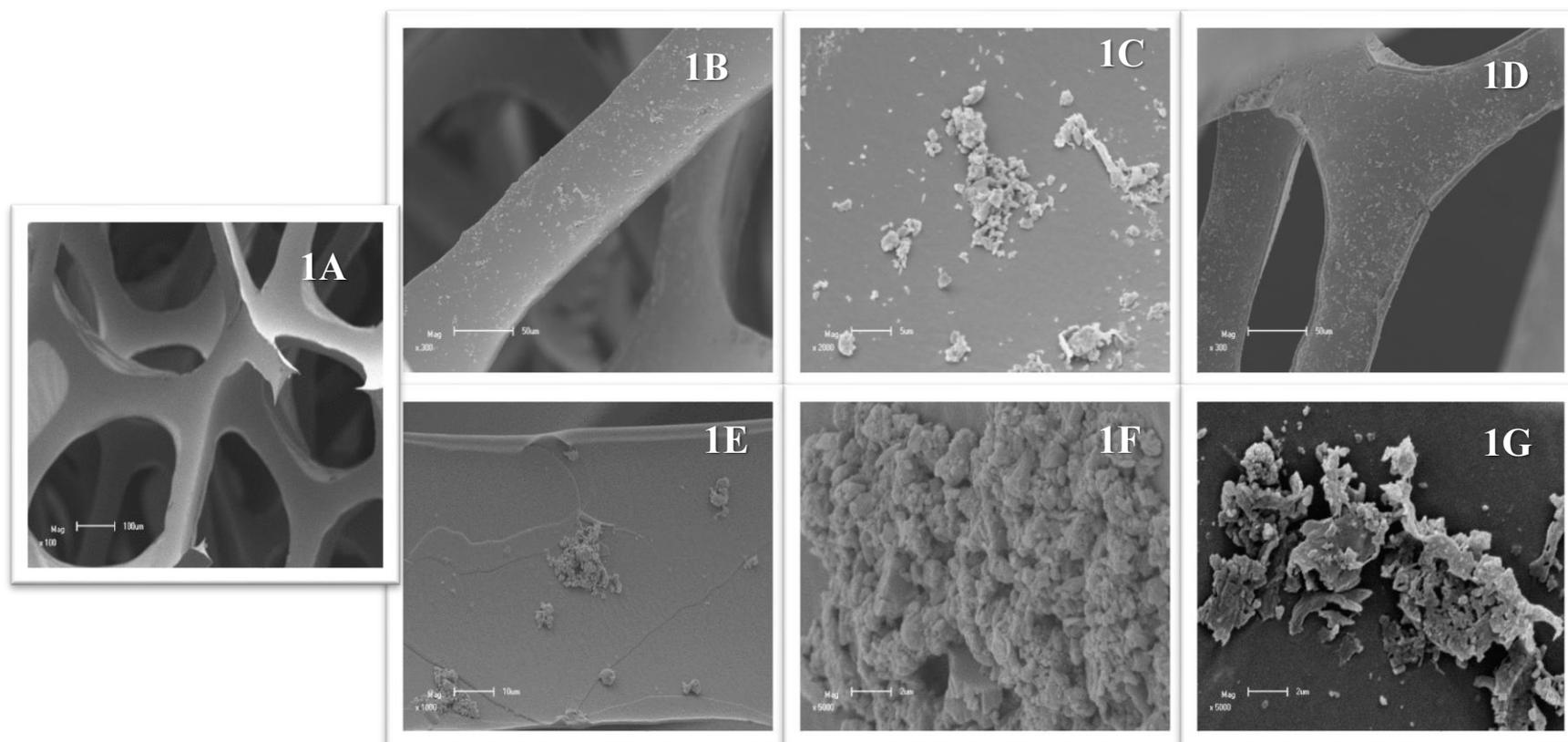


Figura 1. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de esponja utilizada na produção de alimentos na área hospitalar. (A): esponja controle; (B, C e D): esponja proveniente da louça da copa; (E, F e G): esponja proveniente da louça dos pacientes.

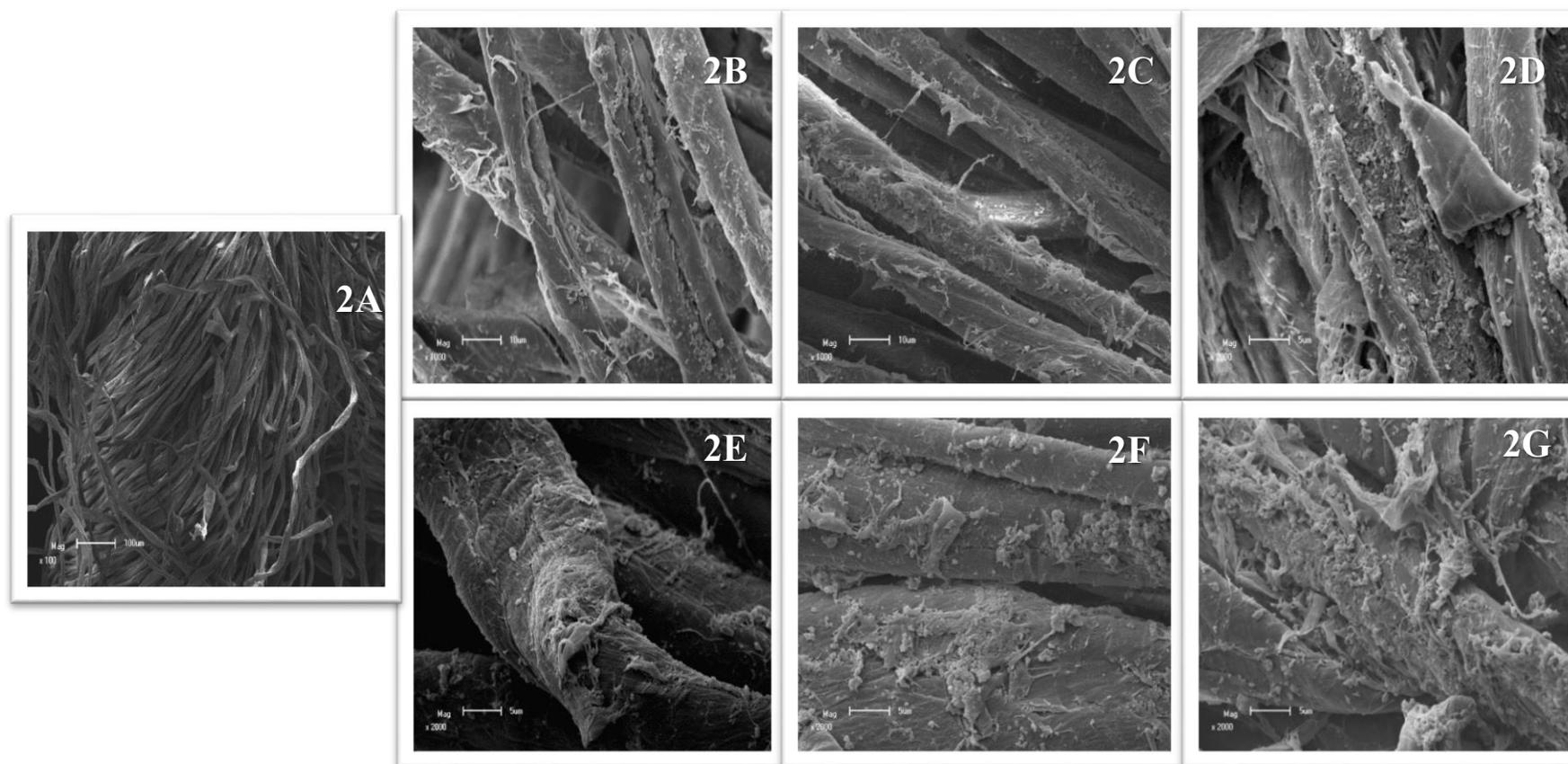


Figura 2. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de pano utilizado na produção de alimentos na área hospitalar. (A): pano controle; (B, C e D): pano proveniente da secagem de louças da copa; (E, F e G): pano proveniente da secagem de louças dos pacientes

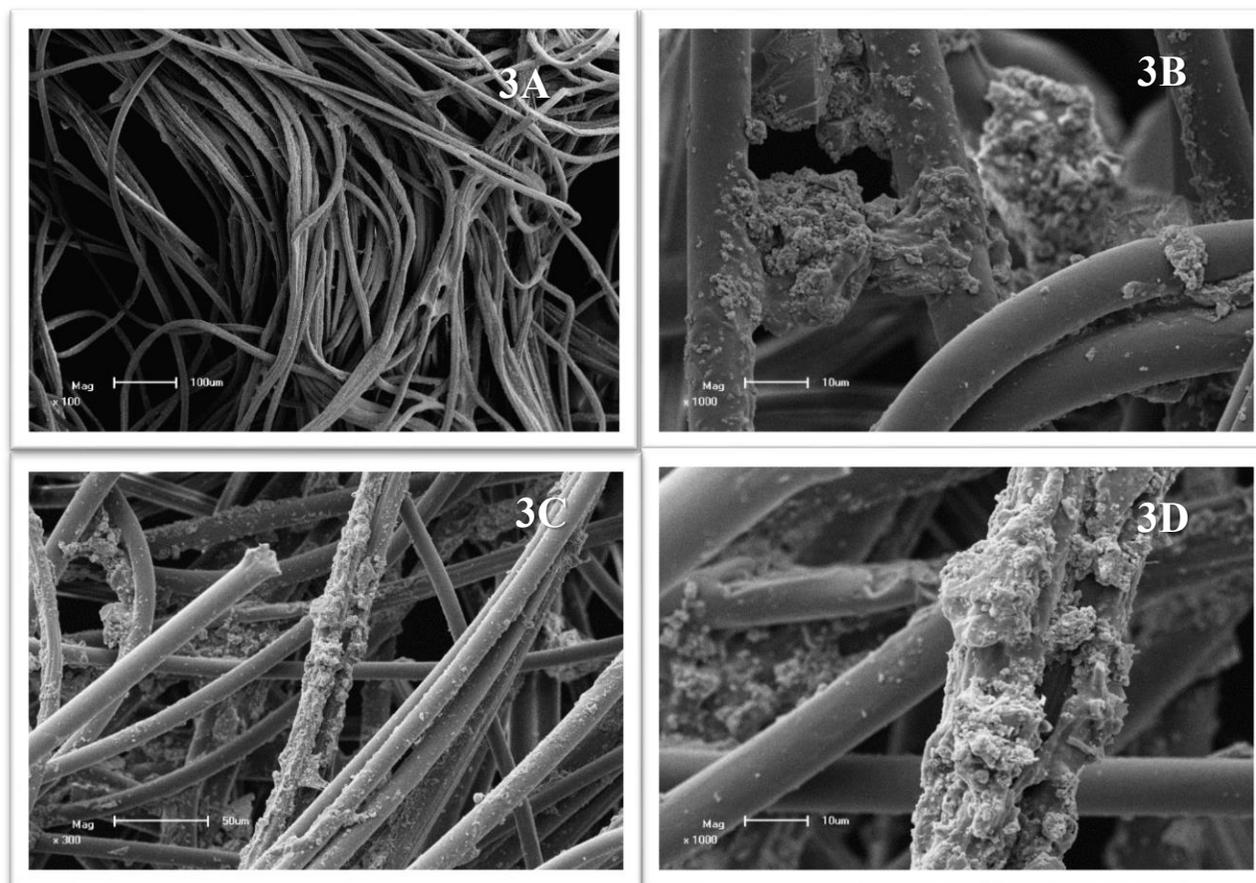


Figura 3. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras biológicas de pano multiuso descartável utilizado na produção de alimentos na área hospitalar. (A): pano multiuso descartável controle; (B, C e D): pano multiuso descartável utilizado na UAN.

3.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Um total de 30 isolados foi submetido à análise de susceptibilidade aos antimicrobianos. Estes foram classificados de acordo com a medida em mm do halo de inibição gerado pelo micro-organismo de acordo com CLSI (2019), sendo assim, foram considerados como: Sensível - micro-organismo que pode ser tratado adequadamente com a dose recomendada para esse tipo de infecção e patógeno; Intermediário - micro-organismo que pode ser erradicado, dependendo das concentrações de antimicrobiano que alcançam o sítio infeccioso; Resistente - aqueles em que não houve inibição do micro-organismo pelas concentrações de antimicrobiano obtidas por meio de doses habituais e por consequência, existe maior chance de falha terapêutica.

De acordo com os resultados obtidos e após a classificação de acordo com o CLSI (2019) foi possível observar que todos os isolados mostraram-se resistentes ao antimicrobiano penicilina; o mesmo pode ser observado quando utilizado o antimicrobiano clindamicina, com exceção do isolado referente ao pano de prato da louça da cozinha, o qual foi classificado como intermediário. Vale ressaltar que o micro-organismo mesófilo isolado do pano multiuso descartável da louça da cozinha apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, com exceção do cloranfenicol, o qual foi classificado como intermediário. Da mesma forma, o isolado de *Staphylococcus* pano da louça proveniente dos pacientes apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, com exceção do antimicrobiano meropenem, o qual apresentou-se sensível. Observou-se ainda, resistência do isolado mesófilo pano de prato proveniente da louça dos funcionários à vancomicina, eritromicina e clindamicina, e esponja da louça da cozinha com resistência à vancomicina, cloranfenicol e clindamicina.

3.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Para esta análise e as relacionadas aos fatores de virulência, foram selecionados dois isolados de *E. coli* (esponja da louça dos pacientes e pano multiuso descartável da louça dos pacientes), de *Salmonella* (pano de prato da louça dos pacientes e esponja da louça dos funcionários), de *Staphylococcus*

(esponja da louça dos funcionários e pano multiuso descartável da louça dos funcionários) e de mesófilos (esponja da louça da cozinha e pano multiuso descartável da louça da cozinha). Por meio dos resultados obtidos, apenas um dos isolados de mesófilo (pano multiuso descartável da louça da cozinha) foi classificado como não produtor de biofilme, sendo este proveniente do pano multiuso utilizado na higienização da louça dos funcionários, e os demais foram classificados como fracos produtores de biofilme (Tabela 5). Dentre estes, os maiores valores para produção de biofilme foram identificados nas amostras provenientes de esponjas (esponja da louça da cozinha de isolado de *Staphylococcus* (OD 0,082) e esponja da louça da cozinha de *Salmonella* (OD 0,085)); e de pano multiuso (pano multiuso da louça da cozinha de isolado de *Staphylococcus* (OD 0,084)).

Tabela 5. Classificação dos isolados de acordo com a produção de biofilme.

ISOLADO	AMOSTRA	CLASSIFICAÇÃO
<i>E. coli</i>	EP	Fraco produtor
	PMP	Fraco produtor
<i>Staphylococcus</i>	E	Fraco produtor
<i>Coag. Pos.</i>	PMP	Fraco produtor
<i>Salmonella</i>	PPP	Fraco produtor
<i>spp.</i>	E	Fraco produtor
<i>Mesófilos</i>	E	Fraco produtor
	PM	Não produtor

*EP: esponja da louça dos pacientes; PMP: pano multiuso descartável da louça dos pacientes; E: esponja da louça dos funcionários; PPP: pano de prato da louça dos pacientes; PM: pano multiuso descartável da louça dos funcionários

3.5 Análises fenotípicas

3.5.1 Gelatinase

Os isolados foram submetidos ao teste para detecção da produção de gelatinase de acordo com a metodologia previamente estabelecida. Apenas quatro isolados apresentaram resultado positivo (esponja da louça dos funcionários – *Salmonella*; esponja da louça dos pacientes - *E. coli*; esponja e pano de prato da louça dos funcionários - *Staphylococcus*), sendo que destes, dois eram provenientes de esponja utilizada na higienização da louça dos

funcionários, um proveniente da higienização da louça dos pacientes e um proveniente de pano dos funcionários. Ressalta-se que todos os isolados classificados como gelatinase positiva, foram coletados após o período de uso de turno.

3.5.2 DNase

A atividade de DNase foi testada de acordo com a metodologia previamente descrita. Após período de incubação, ao recobrir as placas com ácido clorídrico, foi possível identificar a formação de halos em torno das colônias de cinco das amostras analisadas (esponja da louça da cozinha e pano de prato da louça dos pacientes - *Salmonella*; esponja e pano multiuso descartável da louça dos pacientes - *E. coli*; esponja da louça da cozinha - *Staphylococcus*).

Os isolados de *E. coli* de ambos materiais, esponja e pano multiuso, proveniente da louça dos pacientes, foram classificados como positivo; enquanto no que se refere aos isolados de *Staphylococcus*, apenas a esponja proveniente da louça dos funcionários apresentou resultado positivo. Ao analisar os isolados de *Salmonella*, a esponja da louça dos funcionários e o pano da louça dos pacientes, mostraram-se positivos ao teste de DNase. Salienta-se que todas as amostras com resultado positivo foram coletadas após o período de uso do turno.

3.5.3 Atividade Hemolítica

Os oito isolados selecionados foram testados quanto à atividade hemolítica, após o período de incubação de 48 h, como previsto na metodologia utilizada. Por meio dos resultados pode-se inferir que cinco amostras foram classificadas como β -hemólise (pano de prato da louça dos pacientes – *Salmonella*; esponja e pano multiuso descartável da louça dos pacientes - *E. coli*; esponja e pano multiuso descartável da louça da cozinha - *Staphylococcus*), sendo estas provenientes de pano da louça dos pacientes (isolado de *Salmonella*), esponja e pano multiuso referente a louça dos pacientes para *E. coli* e, esponja e pano multiuso utilizados na higienização da

louça dos funcionários para *Staphylococcus*, materiais estes coletados após o período de uso no turno. Desta forma, os isolados mencionados anteriormente apresentaram lise com ruptura da membrana plasmática.

Os isolados analisados quanto aos micro-organismos mesófilos e os isolados de *Salmonella* proveniente de esponja utilizadas na higienização da louça dos pacientes, foram classificadas como γ -hemólise, ou seja, ausência de hemólise, visto que não foram identificadas zonas de lise no meio de cultura ágar sangue.

4 Discussão

É comum a prática do uso de panos e esponjas nas técnicas e procedimentos empregados para limpeza de bancadas, utensílios e equipamentos na maioria dos serviços de alimentação. O material de composição dos panos e esponjas facilita o acúmulo de resíduos de alimentos, o que favorece a contaminação por micro-organismos. Por este motivo, recomenda-se a higienização adequada dos mesmos de acordo com a legislação estadual (Rio Grande do Sul, 2009).

No presente estudo foram coletadas amostras de pano de prato, panos multiuso e esponja. Todos os materiais de limpeza coletados foram utilizados em separado para louças e utensílios dos funcionários e dos pacientes na UAN. Deste modo, os panos e esponjas foram coletados antes e após o período de uso no turno, com o objetivo de analisar os materiais já utilizados e os que foram higienizados pela própria UAN de acordo com os POP do local. De acordo com a nutricionista da unidade, os panos multiuso não são higienizados, pois são descartados logo após o período de uso no turno e por este motivo, apenas as amostras referentes a louça dos pacientes e dos funcionários foram analisados no presente estudo, com a finalidade de avaliar a contaminação dos mesmos por mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *E. coli*.

No que se refere aos padrões microbiológicos para superfícies e equipamentos, não há uma legislação brasileira específica, por este motivo, os valores encontrados foram comparados com a legislação vigente, RDC nº. 12/2001 (BRASIL, 2001) que apresenta os valores padrões de referência

permitidos para alimentos prontos para consumo, onde referencia o valor de 5×10^2 para coliformes. No presente estudo, foram obtidos valores de 10^2 em todas as amostras analisadas.

Diversos estudos demonstram elevada contagem de micro-organismos em materiais semelhantes aos analisados neste estudo (DE WIT et al., 1979; COGAN et al., 1999; BARTZ, 2008). Scott e Bloomfield (1990), indicaram panos de limpeza como possível fonte ou reservatório de micro-organismos, visto que estes demonstraram em seu estudo contagens de 10^2 a 10^6 UFC/cm² de pano. Davis et al. (1968) relatam cerca de 10^8 a 10^9 UFC/cm² em amostras de pano; Bartz (2008), verificou contagem microbiana de 10^4 a 10^8 UFC/cm² de pano, resultado este que se assemelha aos demais estudos citados.

Diversos fatores atrelados ao manuseio incorreto de panos e de esponjas pelos colaboradores durante a preparação dos alimentos, aliados a ausência ou ineficiência de procedimentos de sanitização adequados e conservação dos materiais sob umidade a temperatura ambiente, pode ser uma elucidação para a contagem de micro-organismos encontrada no presente estudo. A facilidade de dispersão de micro-organismos por meio de panos de algodão e pelo contato das mãos com alimentos, foi relatada por Scott (1997).

No presente estudo foi encontrada contagem de micro-organismos nos panos de prato sanitizados pela UAN, fato este preocupante, visto que demonstra a ineficiência no processo de higienização e sanitização dos panos utilizados pela UAN. A presença de coliformes nas amostras de pano analisados merece ênfase, principalmente pelo fato da contaminação ter sido encontrada nas amostras de pano de prato oriundos das louças dos pacientes (PP) higienizado pela UAN. Este fato deve ser levado em consideração uma vez que a presença destes não é esperada em panos de limpeza adequadamente sanitizados e, por se tratar de amostras oriundas de ambiente hospitalar, estas podem trazer inúmeros riscos para a saúde dos pacientes internados, principalmente os imunodeprimidos. Além disso, observou a contagem de coliformes totais em esponjas após a higienização pela própria UAN, não sendo observada a contagem para coliformes termotolerantes. Ao analisar ambas as esponjas (higienização de louças oriundas dos paciente e funcionários) após o turno (manhã) (sem higienização), foi observada presença

significativa de coliformes totais e termotolerantes em ambas esponjas analisadas.

Quando analisada a presença de micro-organismos mesófilos, as amostras dos panos de prato e esponjas higienizados pela UAN não apresentaram contagem microbiana, indicando desta forma, eficiência na higienização e na sanitização executadas pela UAN. Em contrapartida, contagem do micro-organismo foi observada nos panos multiuso descartáveis e esponjas analisados após o uso no turno.

No que se refere a estes materiais, não existem valores de referência de padrão microbiológico. Silva (2005), apresenta como valor de referência classificado como satisfatório para contagem de mesófilos em bancadas e superfícies de 50 UFC/cm² (5×10^1 UFC/cm²). Os valores encontrados no presente estudo foram comparados a APHA (1992), onde são considerados limpos os equipamentos que possuem ≤ 2 UFC/cm² ($0,2 \times 10^1$ UFC/cm²).

Os panos de prato utilizados para louças dos funcionários e também os utilizados para louça dos pacientes, apresentaram valores entre $4,02 \times 10^1$ e $4,33 \times 10^1$ UFC/cm² após o período de uso no turno. Ao comparar estes valores com as referências citadas anteriormente, pode-se perceber que os valores não estão em acordo com o padrão exigido pela APHA (1992), porém, aceitável de acordo com Silva (2005). Em contrapartida, ao analisar os panos de prato, os panos multiuso e as esponjas, todas as amostras provenientes da higienização das louças dos pacientes e também dos funcionários, as contagens foram consideradas acima do valor permitido por ambas as referências.

No presente estudo, ainda, foram encontrados valores entre $2,70 \times 10^1$ a $3,92 \times 10^1$ UFC/cm² para *Staphylococcus* coagulase positiva nos panos de prato e multiuso descartáveis e, $4,10 \times 10^1$ UFC/cm² para esponjas, após o uso no turno. De acordo com a RDC nº. 12/ 2001, o limite permitido para alimentos prontos para consumo é de até 10^{-3} para *Staphylococcus* coagulase positivo /g de alimento. Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com o estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001). Não foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva quando analisadas as esponjas higienizadas pela própria UAN.

Esta bactéria é comumente disseminada no ambiente hospitalar, devido à presença de *Staphylococcus* na nasofaringe e na pele. A disseminação ocorre de maneira fácil por contato direto ou por meio de qualquer utensílio capaz de absorver e transportar micro-organismos infecciosos (LIMA, 2015).

A adesão bacteriana pode ser observada sobre os materiais que constituem os panos tanto de prato (algodão) quanto multiuso descartáveis (Perfex®) e esponjas (poliuretano). Sob determinadas condições, estes micro-organismos aderidos, interagem com as superfícies e iniciam o processo de crescimento celular (KASNOWISKI et al., 2010).

Segundo Flash (2006), o poliuretano que constitui a esponja, apresenta pequenas fissuras em sua estrutura, da mesma forma, o algodão dos panos, possui fendas e poros. Estas características facilitam o depósito residual dos alimentos e servem como facilitador para a aglomeração de micro-organismos em suas estruturas, juntamente com fatores ambientais como umidade e temperatura adequadas, tornando-os propícios ao desenvolvimento de micro-organismos, com possível multiplicação e formação de biofilme pelos mesmos (MORAES et al., 2013).

O biofilme adere-se facilmente a diversos tipos de materiais e superfícies, além disso, quando submetido ao calor, pode formar um depósito ou crosta muito aderente que protege novos micro-organismos e dificulta o processo de higienização (PARIZZI et al., 2004).

As eletromicrografias de varredura obtidas no presente estudo mostraram a diversidade dos micro-organismos encontrados na superfície das amostras nos diferentes materiais analisados e, ainda, a formação de biofilmes que acumularam-se sobre a matriz extracelular em múltiplas camadas e culminaram em uma comunidade bacteriana que se mantém e, pode ainda, disseminar-se sobre a superfície do material, por meio do descolamento de alguns micro-organismos desta colônia e transporte para área adjacente (MAKINO et al., 2012; MORAES et al., 2013).

Os dados apresentados referentes a contagem de micro-organismos nos materiais analisados corroboram com os encontrados nas análises de MEV, no qual observou-se elevada adesão microbiana nos panos de prato (algodão), panos multiuso descartáveis (perfex®) e esponjas de limpeza. Ressalta-se ainda que, quando os materiais de limpeza foram submetidos ao processo de

sanitização por hipoclorito de sódio (200 ppm) e por fervura (em micro-ondas por 15 min), realizados de acordo com a portaria nº. 78/2009, não foi detectado crescimento de nenhum dos micro-organismos analisados, fato este que justifica a não realização da análise de MEV nos panos e esponjas de limpeza, sanitizados pela própria UAN.

No presente estudo foram realizadas ainda a análise de susceptibilidade a antimicrobianos e a formação de biofilme. Por meio dos resultados obtidos observou-se que, de modo geral, a maioria dos isolados foram sensíveis ao Cloranfenicol e Meropenem. Estes antimicrobianos possuem amplo espectro, sendo eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo onde 76% de isolados da família *Enterobacteriaceae* foram sensíveis ao antimicrobiano. Usualmente, o Cloranfenicol possui uma ação bacteriostática, mas também pode agir como bactericida em altas concentrações ou contra alguns micro-organismos com alta sensibilidade (BERALDO-MASSOLI et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos foi tema do Dia Mundial da Saúde em 2011, sendo selecionada pela World Health Organization (WHO, 2011) levando em consideração a importância da mesma para prática médica e da saúde pública, caracterizando-se como uma ameaça para ambas.

Diversas pesquisas analisaram a resistência aos antimicrobianos (PEREZ et al., 2013; TAVARES, 2010), visto que esta impõe grandes custos à sociedade e desafia o controle de doenças infecciosas colocando em risco o progresso nos resultados da saúde por meio do aumento da morbidade e da mortalidade.

Os resultados do presente estudo alertam para capacidade de formação de biofilme exercida pelos micro-organismos, mesmo que a maioria tenha sido classificado como fraco formador, levando em consideração o fato de que os materiais analisados foram coletados de uma UAN hospitalar. Sendo assim, é importante levar em consideração no momento da escolha, o tipo de material mais apropriado para ser utilizado neste ambiente, bem como os produtos químicos mais adequados para a correta higienização (PUFFAL, 2013).

Algumas bactérias apresentam genes relacionados a resistência e esses são passados de bactéria para bactéria por meio de plasmídeos, por isso o uso inadequado dos antimicrobianos pode levar a resistência bacteriana a médio e

longo prazo, o que preocupa cada vez mais os pesquisadores, pois a cada ano aparecem novas resistências. Diante disso, a administração dos antimicrobianos deve ser realizada com precaução, de maneira cada vez mais controlada e com indicação precisa (BERALDO-MASSOLI et al., 2012).

Para garantir a segurança, é importante determinar o potencial de virulência (FAO/WHO, 2002). Os resultados referentes às análises de virulência revelaram que apenas quatro isolados (esponja da louça da cozinha *Salmonella*, esponja da louça dos pacientes *e. coli* e esponja e pano de prato da louça da cozinha para *Staphylococcus*) apresentaram resultado positivo para gelatinase, sendo que destas, três eram provenientes de esponjas, coletadas após o período de uso de turno.

Peptídeos bioativos como caseína, gelatina, colágeno, hemoglobina e outros, são hidrolisados pela gelatinase (WANG et al., 2011). Um estudo analisou oito amostras contendo isolados de alimentos brasileiros e não encontrou atividade da enzima gelatinase em nenhuma delas (FRANCO, 2016). O mesmo ocorreu em um estudo onde 17 amostras provenientes de produtos fermentados contendo isolados de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico mostraram-se negativos para atividade da gelatinase (MAHASNEH et al., 2015).

A infecção do hospedeiro pela enzima DNase ocasiona a degradação do ácido nucleico (DNA), este fator de virulência é pouco observado quando se utilizam amostras oriundas de alimentos e superfícies, sendo mais comuns em amostras clínicas (BARBOSA et al., 2010). Almeida Júnior et al. (2015) e Luiz et al. (2015) isolaram amostras a partir de alimentos e observaram que nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima DNase. Estes resultados corroboram com a maioria dos isolados do presente estudo, diferindo-se apenas em cinco amostras (esponja e pano de prato da louça dos pacientes para *Salmonella*, esponja e pano multiuso da louça dos pacientes para *E. coli* e esponja da louça da cozinha *Staphylococcus*) os quais mostraram atividade de degradação do DNA.

No que se refere a atividade hemolítica, classificou-se como β -hemólise cinco das amostras (pano de prato da louça dos pacientes *Salmonella*, esponja e pano multiuso da louça dos pacientes para *E. coli* e esponja e pano multiuso da louça da cozinha para *Staphylococcus*), coletadas após o período de uso no

turno. Hemólise é o processo onde os eritrócitos do sangue são lisados por enzimas que possuem esta capacidade (BARBOSA et al., 2010).

Na literatura, diferentes estudos mostram que muitos isolados de diferentes alimentos não apresentam os fatores de virulência citados acima, mesmo assim, recomenda-se que sejam submetidos a esses testes para excluir a possibilidade de indicativo de patogenicidade e que possam, desta forma, futuramente, serem aplicados em alimentos (BARBOSA et al., 2010).

Os resultados dos testes fenotípicos obtidos no presente estudo, corroboram com os demais resultados encontrados na literatura, visto que a contagem microbiológica foi detectada em amostras de esponjas, e os resultados positivos aos fatores de virulência foram encontrados em esponjas e panos multiuso descartáveis, demonstrando a alta capacidade dos materiais ao acúmulo e crescimento microbiano.

5 Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que os panos e esponjas de limpeza utilizados no serviço de alimentação hospitalar apresentaram contaminação, porém se adequadamente higienizados, a contaminação poderá ser significativamente reduzida. Os materiais que constituem os panos e esponjas analisados propiciam um meio favorável ao desenvolvimento e crescimento de micro-organismos que podem ser patogênicos a pacientes atendidos pela UAN hospitalar. Ressalta-se ainda que, é essencial a adoção e execução dos procedimentos de boas práticas pelo serviço de alimentação.

6 Referências

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. **Adesão e formação de biofilmes microbianos**. São Paulo: Varela, 2008.

ALMEIDA, J. W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. **Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk**. Food Control, 2015.

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association: Washington, DC, 1992.

BARTZ, Sabrina. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação**. 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. **Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal**. Food Control, 2010.

BERALDO-MASSOLI MC, NARDI CPP, MARKINO LC, SCHOCKEN-ITURRINO RP. **Prevalência de Infecções Urinárias em Pacientes Atendidos pelo Sistema Único de Saúde e sua Suscetibilidade aos Antimicrobianos**. Rev Med (Ribeirão Preto), 2012.

BOARI, A. C., ALVES, M. P., TEBALDI, V. C. R., Villela SAVIAN, T.V., PICCOLI, R. H. **Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus usando leite e diferentes condições de cultivo**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos (DTA)**. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2018.

BRASIL. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº. 12, 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2001.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition**. CLSI, Wayne, PA, 2009.

COGAN, T.A.; BLOOMFIELD, S.F.; HUMPHREY, T.J. **The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen.** Letters of Applied Microbiology, 1999.

DANTAS, Stéfani. **Transferência de Salmonella Enteritidis por contaminação cruzada e formação de biofilme em diferentes superfícies de corte.** Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, 2014.

DAVIS, J.G., BLAKE, J.R. and WOODALL, C.M. **A survey of hygienic condition of domestic dish-cloths and tea-towels.** Medical Officer, 1968.

DE WIT, J.C.; BROCKHUIZEN, G.; KAMPELMACHER, E.H. **Cross-contamination during the preparation of frozen chickens in the kitchen.** Journal of Hygiene, 1979.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2000.

FAO / WHO. **Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação.** London, 2002.

FARIAS, J. K. R.; PEREIRA, M. M. S.; FIGUEIREDO, E. L. **Avaliação de boas práticas e contagem microbiológica das refeições de uma unidade de alimentação hospitalar, do município de São Miguel do Guamá – Pará.** Alimentos e Nutrição, 2011.

FLACH, J. **Formação de biofilmes em diferentes materiais utilizados na indústria de processamento de leite.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. **Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos.** Acta Scientiae Veterinariae, 2005.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; DE VUYST, L. **Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources.** Journal of Applied Microbiology, 2003.

FRANCO, B. **Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and Escherichia coli O157:H7 Biofilms Formation.** Frontiers in Microbiology, 2016.

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, 2010.

GORMEZANO, L. **Desenvolvimento e implantação de sistema para avaliar a cinética de remoção de resíduos presentes no interior de tubular.** São Caetano do Sul, 2007.

HÁRSI, C.M. **Patogênese Viral.** Instituto de Ciências Biomédicas Departamento de Microbiologia, 2009.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes,** 2005.

ICMSF – International Commission on the Microbiological Especifications for Foods. **Microorganisms in Foods.** Toronto, 2002.

KASNOWSKI, M.C., MANTILLA, S. P. S., OLIVEIRA, L.A.T., & FRANCO, R.M. **Formação de Biofilme na Industria de Alimentos e Métodos de validação de superfícies.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 2010.

KUSUMANINGRUM, H. D. et al. **Effects of dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges.** Journal of food protection, 2002.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos,** 2008.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. **Survival of foodborne pathogens on satainless steel surfaces cross-contamination to foods.** International Journal of Food Microbiology, 2003.

LIMA, M. **Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares – revisão de literatura.** Revista Uningá Review, 2015.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. **What food professionals should know about bacteria biofilms.** British Food Journal, 2006.

LUBER, P. **Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first?** International Journal of Food Microbiology, 2009.

LUIZ, W.; ALMEIDA, G. D. E.; FERRARI, S.; SOUZA, J. V.; DAIANE, C.; MATIUZZI, M.; DIAS, F. S. **Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk.** Food Control, 2015.

MANSFELD, F. **The interaction of bacteria and metal surfaces.** Electrochimica Acta, 2007.

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, 2003.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A.; BUSATO, M. A. **Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó,**

Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 2011.

MARGUET, ROGELIO, E. Vallejo, OLIVERA, M., LILA, N. **Factores de virulencia de cepas de Enterococcus aisladas de quesos ovinos.** Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 2008.

MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A. J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T. D.; **Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy.** Diagnostic Microbiology, 2007.

MARTINELLI, C. **Avaliação microbiológica de produtos cárneos distribuídos aos pacientes em um hospital particular de Volta Redonda – RJ. 2007.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

MAKINO, L.C.; FAUSTINO, F.; PAES, M.C.F.; BERALDO-MASSOLI, M.C.; CARDOZO, M.V.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NAKAGHI, L.S.O. **Morfologia e quantificação da microbiota intestinal do curimatá (*Prochilodus lineatus*) e do cascudo cinza.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2012.

MAHASNEH, A. M.; HAMDAN, S.; MAHASNEH, S. A. **Probiotic Properties of Lactobacillus Species Isolated from Local Traditional Fermented Products.** Jordan Journal of Biological Sciences, 2015.

MORAES, M.N., SILVEIRA, W.C., TEIXEIRA, L.E., & ARAÚJO, I.D. **Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials.** Revista Médica de Minas Gerais, 2013.

PARIZZI, S.Q.F., ANDRADE, N.J., SILVA, C.A.S., SOARES, N.F.F., & SILVA, E.A.M. **Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method.** Brazilian Archives of Biology Technology, 2014.

ROSADO, M. S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes.** Universidade Estadual de Campinas, SP, 2009.

PEREZ KK, OLSEN RJ, MUSICK WL, CERNOCH PL, DAVIS JR, TERRA GA, et al. **Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs.** Arch Pathol Lab Med., 2013.

PUFFAL J. **Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella enteritidis*.** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2013.

ROSSI, Eliandra. **Avaliação da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de esponjas utilizadas em serviços de alimentação.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

- SARTER, S.; SARTER, G.; GILABERT, P. **A Swot analysis of HACCP implementation in Madagascar.** Food Control, 2010.
- SCOTT, E. **Food-borne disease and other hygiene issues in the home.** Journal of Applied Bacteriology, 1997.
- SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S.F. **Investigation of the effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths.** Journal of Applied Bacteriology, 1990.
- SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S.F. **The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils.** Journal of Applied Bacteriology, 1990.
- SETA, M. H.; O'DWYER, G.; HENRIQUES, P.; SALES, G. L. P. **Nutritional care in public hospitals of four Brazilian states:** contributions of health evaluation to health surveillance services. Ciência e Saúde Coletiva, 2010.
- SERVIÇO SOCIAL DO COMÉRCIO (SESC). **Banco de Alimentos e Colheita Urbana:** Manipulador de Alimentos I – Perigos, DTA, Higiene Ambiental e de Utensílios. Rio de Janeiro: Sesc/DN, 2003.
- SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Portaria nº. 78/2009.
- SCOTT, E. **Food-borne disease and other hygiene issues in the home.** Journal of Applied Bacteriology, 1997.
- SILVA, J. R. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação.** Varela, São Paulo, 2005.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** São Paulo: Varela; 2010.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC I, SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods, 2000.
- SHARMA, M.; EASTRIDGE, J.; MUDD, C. **Effective household disinfection methods of kitchen sponges.** Food Control, 2009.
- SOUSA, C. L.; NEVES, E. C. A.; LOURENÇO, L. F. H.; COSTA, E. B.; MONTEIRO, R.C. **Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de empresas fornecedoras de comidas congeladas light na cidade de Belém/PA.** Alimentos e Nutrição, Araraquara, 2009.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA, N. A.
Enterotoxigenicidade de Staphylococcus spp. isolados de leite in natura.
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006.

TAVARES W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Rev Soc Bras Med Trop., 2010.

TORTORA, G.J, FUNKE, B. R, CASE, C. L. **Microbiologia – 8 ed.**-Porto Alegre: Artmed, 2005.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W.
Relationship of biofilm formation and gelE Gene expression in Enterococcus faecalis recovered from Root canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. Journal of Endodontics, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO policy package to combat antimicrobial resistance.** Genebra: WHO, 2011.

U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (USFDA). Center for Food Safety Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online. **Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria.** Rockville, 2002.

7 Anexos

ANEXO 1 - *Check-list* do controle higiênico-sanitário

Hospital: _____

Setor: _____

Nutricionista Responsável: _____

Contato: _____

- 1- Descreva, resumidamente o método de higienização de Esponjas e Panos de prato. Qual produto, tempo de ação e frequência?
- 2- Qual a periodicidade de trocas das esponjas? Em qual dia é feita? Onde é armazenado?
- 3- Quantas áreas de higienização existem e quantas esponjas e panos de pratos são utilizadas?
- 4- Qual a rotina de higienização dos panos de limpeza descartáveis (perfex)? Qual a frequência de descarte?
- 5- Panos de limpeza descartáveis (perfex), quando utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, são utilizados novamente antes de serem descartados?
() Sim () Não
- 6- Panos de prato, quando utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, são trocados com que frequência?
- 7- Higienização de panos de prato utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos é realizada em local próprio para esse fim, em recipiente exclusivo para essa atividade, separado de outros panos utilizados para outras finalidades?
- 8- Onde é realizada a secagem dos panos de prato?
- 9- Os produtos saneantes são regularizados pelo Ministério da Saúde? Marca, número registro.
() Sim () Não
- 10- Existe um responsável pela operação de higienização comprovadamente treinado?
() Sim () Não
- 11- Produtos saneantes são identificados e guardados em local reservado para essa finalidade, sem contato com os alimentos?
() Sim () Não
- 12- Diluição, tempo de contato e modo de uso/aplicação dos produtos saneantes, obedecem instruções recomendadas pelos fabricantes?
() Sim () Não. Qual a fórmula?
- 13- Utensílios, equipamentos e materiais utilizados na higienização, próprios para a atividade, são conservados limpos em número suficiente e guardados em local reservado para essa atividade?
() Sim () Não