

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CONTAMINAÇÃO CRUZADA NO AMBIENTE DOMÉSTICO: CAPACIDADE
DE FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E
DESINFETANTES DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SUPERFÍCIES
DE CORTE DE MADEIRA E PLÁSTICO**

JANAINA PRIETO DE OLIVEIRA

Botucatu - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CONTAMINAÇÃO CRUZADA NO AMBIENTE DOMÉSTICO: CAPACIDADE
DE FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E
DESINFETANTES DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SUPERFÍCIES
DE CORTE DE MADEIRA E PLÁSTICO**

JANAINA PRIETO DE OLIVEIRA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Sossai Possebon

O48c

Oliveira, Janaina Prieto de

Contaminação cruzada no ambiente doméstico: capacidade de formação de biofilme, resistência a antibióticos e desinfetantes de microrganismos isolados de superfícies de corte de madeira e plástico / Janaina Prieto de Oliveira. -- Botucatu, 2024

97 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Juliano Gonçalves Pereira

Coorientador: Fábio Sossai Possebon

1. Microbiologia. 2. Doenças transmitidas por alimentos. 3. Contaminação cruzada. 4. Tábuas de corte. 5. Saúde pública. I. Título.

Nome do Autor: Janaina Prieto de Oliveira

Título: CONTAMINAÇÃO CRUZADA NO AMBIENTE DOMÉSTICO: CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES, RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E DESINFETANTES DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SUPERFÍCIES DE CORTE DE MADEIRA E PLÁSTICO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira - Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” FMVZ – UNESP – Botucatu- SP

Prof. Dr. Marcus Vinicius Coutinho Cossi - Membro Titular

Departamento - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia FAMEV – Uberlândia - MG

Prof^a. Dr^a. Julia Arantes Galvão - Membro Titular

Departamento de Medicina veterinária - Universidade Federal do Paraná UFPR – Curitiba – PR

Prof. Dr. Felipe Fornazari - Membro Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” FMVZ – UNESP – Botucatu- SP

Prof^a. Dr^a. Camila Michele Appolinario - Membro Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” FMVZ – UNESP – Botucatu- SP

Data da defesa: 24 de novembro de 2023

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Amilton de Oliveira (*in memoriam*) e minha mãe Maria de Lourdes Prieto de Oliveira, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Você não precisa ter sucesso para ser feliz, mais precisa ser feliz para ter sucesso

(Shawn Achor)

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por ter me dado forças de chegar até aqui, por não ter olhado minhas fraquezas e vindo ao meu encontro nos momentos difíceis, me provendo de resiliência e sabedoria.

À minha **mãe, Lourdes e meu pai Amilton** (*in memoriam*) que me deixou a poucos meses de ver a concretização deste sonho. Sou grata por sempre acreditarem nas minhas escolhas, por me proporcionarem acesso à educação, por apoiarem os meus sonhos.

Às minhas **irmãs Célia e Vitória** pela paciência nos momentos de dificuldades, conselhos, compreensão durante minha ausência.

Ao meu esposo **Thassio** pelo companheirismo e conselhos cheios de amor e sabedoria, por abdicar dos seus afazeres para me ajudar com este trabalho.

À minha **Tia Fátima**, segunda mãe, que mesmo distante sempre apoiou e sonhou este e muitos outros sonhos ao meu lado.

À minha **sogra e cunhados** que apoiam e compartilham boas energias nesta trajetória.

Ao meu **orientador, Prof. Juliano Gonçalves Pereira**, pelos ensinamentos, amizade e acolhimento nestes anos trabalhando juntos. Sou grata por todo conhecimento transmitido, por confiar no meu trabalho.

Ao meu **co-orientador, Prof. Fábio Sossai Possebon**, nosso querido **CID**, pelo aprendizado profissional, paciência e amizade.

Aos amigos que a **pós-graduação** me proporcionou, eles foram grandes incentivadores diários, **Carolina Toledo, Evelyn Brito, Iasmin Calaça, Lucas Lopes, Roberto Roça, Jéssica Cruvinel, Marconi Italo, Pedro Garcia**.

Aos colegas do **laboratório SOAP**, funcionários, estagiários e residentes em especial a **Dionice, Emanoelli, Aryele, Leonardo, Larissa, Otávio, Catarina, Desacato, Beatriz, Mirella**, pela parceria, ensinamentos, amizade e conselhos nos momentos difíceis.

Ao **Prof. Otávio Augusto Martins** pelos diversos conselhos, ensinamentos e paciência.

Aos colegas da **Igreja CCB** pelo acolhimento, amizade e espiritualidade.

À **CAPES** pelo apoio desta pesquisa com a concessão da bolsa de doutorado processo **88887.514122/2020-00**.

A **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / FMVZ - UNESP**, seu corpo docente, discente e técnico.

A todos que passaram por minha vida durante essa jornada, em especial as pessoas difíceis que tive que enfrentar.

Muito obrigada!

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO III

Quadro 1 - Sanitizantes utilizados na avaliação do perfil de resistência de <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> isoladas de tábuas de corte, princípio ativo, tempo de ação e forma de utilização de acordo com a indicação do fabricante... ..	65
Quadro 2 - Pesquisa de genes de virulência e de formação de biofilmes para <i>L. monocytogenes</i> isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	68
Quadro 3 - Pesquisa de genes de virulência e de formação de biofilmes para <i>Escherichia coli</i> isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table I. Count of aerobic mesophilic, <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Pseudomonas</i> spp. and presence of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Escherichia coli</i> on wooden and plastic cutting boards residences	46
Table II. Time of use of wooden and plastic cutting boards in relation to counts of aerobic mesophilic, <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Pseudomonas</i> spp. and presence of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Escherichia coli</i>	47

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Sorotipificação de <i>L. monocytogenes</i> e confirmação de gênero e espécie de <i>Escherichia coli</i> isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	67
Tabela 2 - Perfil da capacidade de adesão de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	70
Tabela 3 - Perfil de resistência antimicrobiana de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	71

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Formação de biofilmes, fixação reversível (etapa 1), fixação irreversível (etapa 2), maturação do biofilme (etapas 3 e 4) e dispersão (etapa 5).....	21
--	----

CAPÍTULO II

Figure 1. Removal of fragments for microbiological evaluation (a) and scanning electron microscopy - SEM (b) of wooden and plastic cutting boards.....	42
Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) of plastic boards used in homes for food manipulation. Surface topography (A, B); Aspects of EPS matrix deposition and presence of microorganisms adhered to the surface (C, D, E, F, G, H, I).. ..	48
Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) of wooden boards used in homes for food handling. Surface topography (J, K); Presence of attached microorganisms (L, M, N and O) and formation of EPS matrix (P, Q and R).....	49

CAPÍTULO III

Figura 1 - Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> antes a depois do tratamento com sanitizantes.....	72
Figura 2 - Enumeração de <i>E. coli</i> antes a depois do tratamento com sanitizantes.....	72

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR (DOA)	19
2.2 BIOFILMES.....	20
2.3 CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM TÁBUAS DE CORTE	23
2.3.1 Formação de biofilmes em tábuas de corte.....	24
2.3.2 Resistência bacteriana aos antimicrobianos	26
2.3.3 Resistência bacteriana aos sanitizantes.....	27
3. OBJETIVO	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. REFERÊNCIAS.....	30

CAPÍTULO II

Artigo científico	38
Abstract	39
Introduction.....	40
Material and Methods.....	41
Experimental design.....	41
Application of the Survey	42
Collecting cutting boards.	42
Removal of fragments for analysis.....	43
Calculation of the area of the fragments	44
Microbiological evaluation.....	44
Count of aerobic mesophilic, <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Pseudomonas</i> spp.....	43
Detection of <i>Listeria monocytogenes</i>	44
Detection of <i>Escherichia coli</i>	44
Scanning electron microscopy (SEM).....	45
Data analyses	44
Results.....	45
Survey evaluation	45
Microbiological analysis of cutting boards.....	45
Scanning electron microscopy (SEM).....	48
Discussion	49

Conclusion	52
Funding.....	52
Declaration of competing interests	52
Declaration of generative AI in scientific writing	52
Acknowledgments.....	52
References.....	53
CAPÍTULO III	
Artigo científico	58
Resumo	58
1. Introdução	59
2. Material e Métodos.....	60
2.1 <i>Obtenção dos isolados de Listeria monocytogenes e Escherichia coli</i>	<i>60</i>
2.2 <i>Caracterização molecular para genes de virulência e formação de biofilmes de L. monocytogenes.....</i>	<i>61</i>
2.3 <i>Caracterização molecular para genes de virulência e formação de biofilmes de Escherichia coli.....</i>	<i>62</i>
2.4 <i>Potencial de adesão de Listeria monocytogenes e Escherichia coli.....</i>	<i>62</i>
2.5 <i>Resistência a antibióticos de Listeria monocytogenes e Escherichia coli.....</i>	<i>63</i>
2.6 <i>Resistência a sanitizantes de Listeria monocytogenes e Escherichia coli.....</i>	<i>64</i>
3. Resultados.....	65
4. Discussão	73
5. Referências	77
CAPÍTULO IV	
Conclusões Gerais	86
ANEXOS	
CAPÍTULO II	
Supplementary Data A – Survey.....	87
Supplement Data B – Terms of Consent	89
Supplementary Table I - Profile of handlers in the use of wooden and plastic cutting boards in homes.....	91
Supplementary Table II - Microbiological evaluation in the use of wooden and plastic cutting boards in homes, count of aerobic mesophilic, Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. and presence of Listeria monocytogenes and Escherichia coli.....	93

CAPÍTULO III

Quadro 4 - Primers, anelamento e tamanhos de produtos de PCRs usados para identificação e sorotipagem de <i>Listeria</i> spp. e confirmação de gênero e espécie de <i>Escherichia coli</i> isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	95
Quadro 5 - Primers, anelamento e tamanhos de produtos de PCRs usados para caracterizar genes de virulência e formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.....	96

OLIVEIRA, JANAINA PRIETO. Contaminação cruzada no ambiente doméstico: capacidade de formação de biofilmes, resistência a antibióticos e desinfetantes de microrganismos isolados de superfícies de corte de madeira e plástico. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 97 p.

Resumo

Práticas inadequadas no uso e higiene de tábuas de corte utilizadas na manipulação de alimentos podem permitir a permanência de microrganismos e formação de biofilmes, contribuindo para a contaminação cruzada em residências. O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de manipulação e a presença de microrganismos em tábuas de corte de madeira e plástico, obtidas do ambiente doméstico. Um total de 100 tábuas (n=50 de madeira e n=50 de plástico) foram coletadas na cidade de Botucatu-SP, acompanhadas de um questionário. Para realização das análises microbiológicas foram retirados fragmentos de 44 mm de diâmetro. A remoção das bactérias aderidas foi conduzida por imersão e lavagem dos fragmentos em banho-ultrassônico, os cálculos foram realizados para área (cm²/ml) e os resultados apresentados em log UFC/cm² para contagem de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp e presença/ausência de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Um fragmento de 22 mm de diâmetro foi utilizado para avaliação da microscopia eletrônica de varredura (MEV). O estudo realizou ainda a pesquisa de genes de virulência e genes envolvidos na produção de biofilmes, avaliação da capacidade de adesão dos isolados e perfil de resistência a antibióticos e sanitizantes comerciais. Para *L. monocytogenes* foram pesquisados os genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA* e de biofilmes *prfA*, *flaA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *luxS*. Para *E. coli* os genes de virulência *int 1*, *stx1* e *stx2* e os de biofilmes *wcaA*, *wza* e *luxS*. Os dados foram tratados estatisticamente associando os achados laboratoriais e informações obtidas do questionário. As tábuas de plástico apresentaram valores superiores para a contagem de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* (p<0,05), quando comparada as tábuas de madeira. O estudo encontrou a presença de 3% (3/100) para *Listeria monocytogenes*, 5% (5/100) *Escherichia coli* e (0%/100) para *Salmonella* spp. sem diferença entre a madeira e o plástico. Valores superiores foram observados para a contagem de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* (p<0,05) em tábuas de madeira com tempo de uso de 0 a 1 ano. As imagens de microscopia exibiram a presença de microrganismos aderidos as tábuas e estruturas semelhantes a biofilmes. A caracterização dos isolados de *L. monocytogenes* e *E. coli* demonstrou a presença de genes de virulência e genes envolvidos na produção de biofilmes. A capacidade de adesão foi classificada como fracamente aderente. O perfil de resistência dos isolados revelou um cenário de multirresistência para as classes testadas e a presença de 60% para ESBL em *E. coli*. Os sanitizantes comerciais avaliados foram eficientes no controle de *L. monocytogenes* e *E. coli*, seguindo a indicação de uso do fabricante. O estudo observou que independentemente do material tábuas de corte podem servir como veículos para microrganismos com potencial para causar doenças, contribuindo para contaminação cruzada em cozinhas doméstica. O estudo destaca a importância das condições higiênico-sanitárias no manuseio de alimentos crus antes do preparo bem como a substituição frequente do utensílio.

Palavras-chave: Saúde pública, Doenças transmitidas por alimentos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, Tábuas de corte, MDR

OLIVEIRA, JANAINA PRIETO. Cross-contamination in the domestic environment: biofilm forming capacity, resistance to antibiotics and disinfectants of microorganisms isolated from wood and plastic cutting boards. Dissertation P.h.D - School of Veterinary Medicine and Animal Science, *Campus de Botucatu*, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 97 p.

Abstract

Inadequate practices in the use and hygiene of cutting boards used in food manipulation can allow microorganisms to remain and form biofilms, contributing to cross-contamination in homes. The objective of the study was to evaluate the manipulation profile and the presence of microorganisms on wooden and plastic cutting boards, obtained from the domestic environment. A total of 100 boards (n=50 wooden and n=50 plastic) were collected in the city of Botucatu-SP- Brazil, accompanied by a survey. To carry out microbiological analyzes, fragments measuring 44 mm in diameter were removed. The removal of adhered bacteria was carried out by immersing and washing the fragments in an ultrasonic bath, calculations were carried out for area (cm²/ml) and the results were presented in log CFU/cm² for aerobic mesophilic count, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. and presence/absence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. A 22 mm diameter fragment was used for scanning electron microscopy (SEM) evaluation. The study also carried out research on virulence genes and genes involved in the production of biofilms, evaluating the adhesion capacity of the isolates and the resistance profile to antibiotics and commercial sanitizers. For *L. monocytogenes*, the virulence genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* and *actA* and the biofilm genes *prfA*, *flaA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* and *luxS* were investigated. For *E. coli* the virulence genes *int 1*, *stx1* and *stx2* and the biofilm genes *wcaA*, *wza* and *luxS*. The data were treated statistically by associating laboratory findings and information obtained from the survey. Plastic boards showed higher values for the count of aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* (p<0.05), when compared to wooden boards. The study found the presence of 3% (3/100) for *Listeria monocytogenes*, 5% (5/100) for *Escherichia coli* and (0%/100) for *Salmonella* spp. no difference between wood and plastic. Higher values were observed for the count of aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* (p<0.05) on wooden boards with a period of use of 0 to 1 year. The microscopy images showed the presence of microorganisms adhered to the boards and structures similar to biofilms. The characterization of *L. monocytogenes* and *E. coli* isolates demonstrated the presence of virulence genes and genes involved in biofilm production. The adhesion capacity was classified as weakly adhering. The resistance profile of the isolates revealed a multidrug resistance scenario for the classes tested and the presence of 60% of ESBL in *E. coli*. The commercial sanitizers evaluated were efficient in controlling *L. monocytogenes* and *E. coli*, following the manufacturer's instructions for use. The study noted that regardless of material, cutting boards can serve as vehicles for microorganisms with the potential to cause disease, contributing to cross-contamination in home kitchens. The study highlights the importance of hygienic-sanitary conditions when handling raw foods before preparation, as well as frequent replacement of the utensil.

Keywords: Public health, Foodborne illnesses, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, Cutting boards, MDR

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar (DOA) são definidas como enfermidades infecciosas ou tóxicas causadas pelo consumo de água ou alimentos contaminados, de importância nacional e global são consideradas um dos maiores problemas mundiais de saúde pública (BESHEARSE et al., 2021). Podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia alimentícia desde da produção, distribuição e preparo para o consumo (OMS, 2023a).

Todos os anos uma em cada 10 pessoas no mundo adoece após ingerir alimentos contaminados levando a mais de 420.000 mortes, nos Estados Unidos aproximadamente 9,4 milhões de pessoas são acometidas das quais 56.000 necessitam de hospitalização e 1.351 morrem (OMS, 2023b).

No Brasil dados do Ministério da Saúde apontam que de 2013 a 2022 ocorreram 6.523 surtos de DOA com 107.513 pessoas doentes e cerca de 609.660 pessoas expostas, com um total de 112 mortos neste período. Neste cenário 35,1% dos surtos ocorreram a partir de alimentos manipulados e ingeridos nas próprias residências, sugerindo números ainda maiores, justificado pela baixa identificação e notificação de casos pelas autoridades de saúde brasileira (BRASIL, 2023).

As principais falhas durante a manipulação estão relacionadas às condições de higiene dos locais e superfícies onde alimentos são manipulados, falta de higiene pessoal e contaminação cruzada entre utensílios utilizados no ambiente doméstico (OKPALA; EZEONU, 2019). A contaminação cruzada é a transferência de microrganismos de um material ou alimento contaminado para outro, tendo como principais vias de contaminação carnes cruas, tábuas de corte, embalagens sujas e as mãos (CARDOSO et al., 2021; OKPALA; EZEONU, 2019).

As tábuas de cortes são utensílios amplamente utilizados no preparo e manipulação de alimentos, sejam crus ou prontos para o consumo e à medida que os manipuladores desconhecem medidas adequadas de higiene, armazenamento e conservação destas tábuas, a matéria orgânica e os microrganismos presentes em alimentos crus podem permanecer aderidos junto a essas servindo como fonte de contaminação (AVIAT et al., 2020; CARDOSO et al., 2021; RAVISHANKAR; ZHU; JARONI, 2010).

A permanência e adesão de microrganismos patogênicos pode ocorrer em qualquer tipo de superfície como tábuas de madeira, vidro e plástico (DANTAS et al., 2018; SOARES et al., 2012; TOMIČIĆ et al., 2020). Alguns materiais como a madeira e

o plástico oferecem condições favoráveis (maior porosidade) para o crescimento, desenvolvimento e estabelecimento de microrganismos, com capacidade de produzir biofilmes (DANTAS et al., 2018).

Os biofilmes são comunidades de células sésseis constituídas por uma ou várias espécies bacterianas incluídas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), aderidas em uma superfície inerte ou viva (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SINGH et al., 2021). A formação de biofilmes e sua permanência em tábuas de corte pode comprometer a qualidade microbiológica de alimentos manipulados neste utensílio, expondo as pessoas ao risco biológico através da biotransferência de microrganismos patogênicos presente (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Nos últimos anos pesquisadores buscam informações sobre a ocorrência e prevalência de patógenos em diferentes categorias de materiais que caracteriza tábuas de cortes (DANTAS et al., 2018; KUSUMANINGRUM et al., 2003b; MOORE; BLAIR; MCDOWELL, 2007; RAVISHANKAR; ZHU; JARONI, 2010; SOARES et al., 2012; TOMIČIĆ et al., 2020). A maioria desses estudos demonstraram que os processos de higienização utilizando água, detergente e sanitizante podem não serem eficientes para eliminar patógenos, permitindo a sua permanência e posterior transferência para alimentos manipulados nestas superfícies.

Grande parte destes estudos avaliaram tábuas de corte relacionando a contaminação cruzada, persistência de microrganismos e capacidade de adesão e produção de biofilmes em cenários simulados, podendo não refletir com fidelidade perfis de uso do utensílio na manipulação de alimentos, já que uma multiplicidade de parâmetros é determinante para a persistência de microrganismos em superfícies de cortes (POSSAS et al., 2017).

Assim o presente estudo objetivou avaliar o perfil de manipulação, caracterização e a presença de microrganismos em tábuas de corte de madeira e plástico, obtidas do ambiente doméstico em cenário natural de uso do utensílio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR (DOA)

Geralmente o desenvolvimento de uma doença de origem alimentar se deve a condições específicas como a virulência do microrganismo presente, a carga microbiana

no alimento e as condições do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso a possível presença de outros tipos de contaminantes, além dos microbianos, podem trazer implicações para a saúde dos consumidores (GALLO et al., 2020).

Vários são os fatores que contribuem para a emergência de doenças entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala (BRASIL, 2010). Podemos adoecer a qualquer momento de diferentes maneiras e a alimentação se tornou uma origem muito comum para diversas doenças (BESHEARSE et al., 2021).

Alguns agentes etiológicos são apontados com maior frequência em surtos dentre eles: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Shigella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp, Norovírus e Rotavírus tendo o alimento como fonte de introdução desses microrganismos (BESHEARSE et al., 2021; BRASIL, 2023; SCALLAN et al., 2011). Os sintomas mais comuns dessas doenças são diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, falta de apetite, febre, diarreia sanguinolenta e desidratação grave (SALAHSHOURI et al., 2020).

Durante a manipulação e preparo dos alimentos em cozinhas domésticas a falta de aplicação de procedimentos corretos de manipulação e higienização podem potencializar a introdução e contaminação de tábuas por microrganismos, além de outros utensílios, mão e alimento manipulado, aumentando assim o risco de contaminação cruzada nesses locais (COGAN et al., 2002; GORMAN; BLOOMFIELD; ADLEY, 2002).

As exposições podem ser reduzidas mudando nosso próprio comportamento e hábitos em resposta a esses fatores, bem como removendo fatores de risco o tanto quanto pudermos. Boas práticas de manipulação, inspeção, monitoramento e educação visam manter ambientes saudáveis e reduzir a incidência de doenças, possibilitando agregar informações relevantes de segurança dos alimentos à população, uma vez que os consumidores estão cada vez mais atentos as práticas que proporcionem uma melhora na qualidade de vida e não traga riscos à saúde.

2.2 BIOFILMES

Definidos como células microbianas aderentes a uma superfície ou interface cobertas por uma matriz de substância exopolimérica, os biofilmes são frequentemente

um modo significativo de crescimento bacteriano em ecossistemas naturais e patogênicos (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2019; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

A formação de biofilmes (Figura 1) é um processo de desenvolvimento iniciado por organismos planctônicos (vida livre), formando agregados e/ou fazendo a transição para um estilo de vida associado à superfície (células sésseis). É concluído quando as células escapam da estrutura do biofilme em um processo conhecido como dispersão para retornar ao modo de crescimento planctônico, com estágios de desenvolvimento correspondendo a padrões únicos de produção de proteínas e expressão gênica (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

A dispersão é geralmente caracterizada como o estágio terminal do desenvolvimento do biofilme muitas vezes referida como dispersão de sementeira, pois supõe-se que a dispersão leve à translocação de bactérias para novos locais de colonização (RUMBAUGH; SAUER 2020).

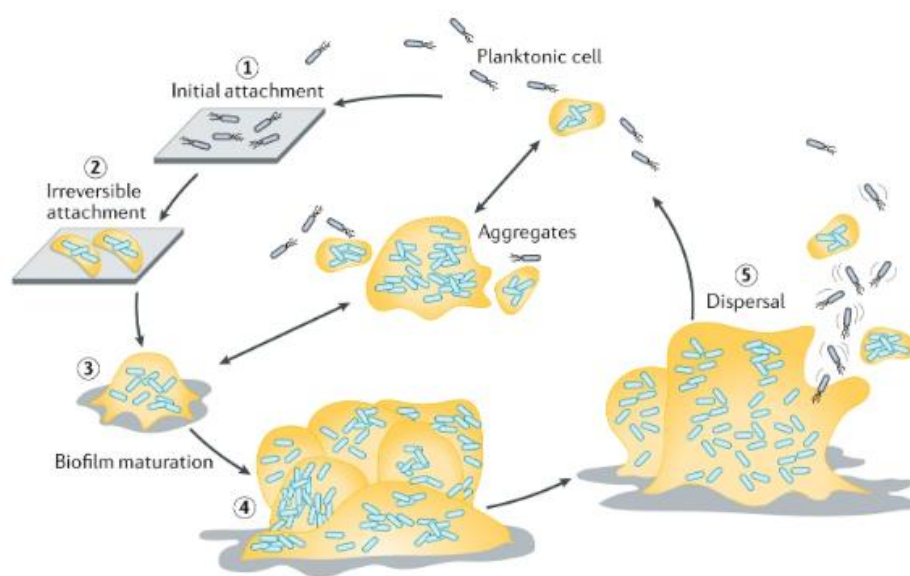


FIGURA 1 - Formação de biofilmes, fixação reversível (etapa 1), fixação irreversível (etapa 2), maturação do biofilme (etapas 3 e 4) e dispersão (etapa 5) (RUMBAUGH; SAUER 2020).

A estrutura da matriz de substância polimérica extracelular (EPS) dos biofilmes é composta por um ou mais polissacarídeos extracelulares, DNA e proteínas (RABIN et al., 2015). A auto-organização das moléculas de EPS na matriz é baseada nas interações intermoleculares entre os componentes do EPS, que também determinam as propriedades

mecânicas da matriz e a atividade fisiológica dos organismos no biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Esta matriz fornece abrigo para as células internas e contribui para o recrutamento de nutrientes, bem como para a adesão à superfície associada (FLEMMING et al. 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis, com maior resistência às defesas imunológicas do hospedeiro e maior tolerância ao estresse incluindo falta de nutrientes, desidratação e resistência a agentes antimicrobianos (FLEMMING et al., 2016; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

As principais características relacionadas ao modo de crescimento sésil incluem perda da expressão gênica do flagelo, produção de componentes da matriz do biofilme, indução de mecanismos de resistência a antibióticos (incluindo bombas de efluxo) mesmo quando os biofilmes foram cultivados na ausência de antibióticos e aumento dos níveis de fatores de virulência (HEACOCK-KANG et al., 2017; LIAO; SCHURR; SAUERA, 2013; WILLIAMSON et al., 2012).

Flutuações na capacidade de formação de biofilme entre espécies ou cepas de diferentes genótipos e sorotipos foram identificadas, o que revela a evolução da formação de biofilme aprimorada de várias origens genéticas. Isso permite a troca de metabólitos, moléculas sinalizadoras, material genético e compostos defensivos os quais ditam as interações entre os microrganismos (RABIN et al., 2015).

Uma vez introduzidos os patógenos podem crescer nas superfícies ou simplesmente persistir ali e ficarem cercados por material de biofilme proveniente do crescimento de não patógenos, presentes no ambiente (RAYNER; VEEH; FLOOD, 2004). As propriedades emergentes dos biofilmes são a razão para o sucesso evolutivo dos mesmos e fundamentam o papel dos biofilmes como formadores de habitat global (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

A contaminação de alimentos não se limita a instalações de grande escala, outros ambientes como as casas e uso de utensílios como esponjas, tábuas de corte, panos de prato, balcões e outras superfícies representam áreas onde patógenos microbianos podem ser depositados e, portanto, surge a necessidade de avaliar se esses organismos encontrarão condições e formarão biofilmes.

2.3 CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM TÁBUAS DE CORTE

Muitos casos de surtos alimentares são originários do ambiente doméstico e podem estar associados ao manuseio inadequado de alimentos e condutas de higienização ineficaz (ALVES et al., 2022; BRASIL, 2023; HAYSOM; SHARP, 2005). O risco de doença de origem alimentar associado à contaminação cruzada depende de dois fatores: o nível de contaminação e a probabilidade de sua transferência para os alimentos consumidos (GORMAN; BLOOMFIELD; ADLEY, 2002; KUSUMANINGRUM et al., 2003a; POSSAS et al., 2017).

Práticas inadequadas no uso de utensílios e manuseio de alimentos levam à introdução e disseminação de contaminantes bacterianos no ambiente domiciliar, com ênfase para cozinha, apresentando riscos de contaminação com diversos alimentos e microrganismos descritos como responsáveis na ocorrência de doença (ALVES et al., 2022; CARRASCO; HAYSOM; SHARP, 2005; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Quando uma bactéria encontra nutrientes e condições adequadas como pH, atividade de água e temperatura, podem multiplicar-se rapidamente nos alimentos com ênfase para alimentos crus como ovos e carnes (ALVES et al., 2022; CARRASCO et al., 2012). Esses alimentos são apontados pelo Ministério da Saúde como responsáveis em média 9,9% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos, registradas no Brasil, preocupando as autoridades de saúde (BRASIL, 2023).

As principais falhas durante a manipulação de alimentos no ambiente doméstico estão relacionadas a falta de higiene com os utensílios e ambiente de manipulação, falta de higiene pessoal e contaminação cruzada (ALVES et al., 2022; CARDOSO et al., 2021; SOARES et al., 2012). A contaminação cruzada acontece com a transferência de microrganismos de um material contaminado para outro que anteriormente apresentava-se inócuo, sendo uma das principais causas desencadeadora e multiplicadora de doenças de origem alimentar em residências (GORMAN; BLOOMFIELD; ADLEY, 2002; VAN ASSELT et al., 2008).

Considerada um dos utensílios mais contaminado por bactérias heterotróficas na cozinha a tábua de corte é de interesse de estudo, pois apresenta riscos constante de contaminação cruzada no ambiente doméstico (CARDOSO et al., 2021; DANTAS et al., 2018; KUSUMANINGRUM et al., 2003b; SOARES et al., 2012; VAN ASSELT et al., 2008).

Durante o processo de higienização as falhas na remoção de bactérias dessas superfícies aumentam a possibilidade de contaminação devido ao contato do alimento com a superfície contaminada, onde a ingestão de pequenos números de alguns microrganismos patogênicos pode ser suficiente para causar doenças (COGAN et al., 2002; RAVISHANKAR; ZHU; JARONI, 2010; SEKOAI et al., 2020).

Práticas inadequadas e o uso da mesma superfície de corte para manipulação de alimentos crus como carnes, folhas e vegetais são responsáveis por 40 a 60% dos casos de doenças de origem alimentar nesse ambiente (DE JONG et al., 2008), alimentos preparados ou consumidos em residências podem representar até 87% dos surtos notificados (VAN ASSELT et al., 2008). Esses dados têm motivado uma série de pesquisas com o objetivo de avaliar como práticas de manipulação de alimentos, em ambientes domésticos, se relacionam com a ocorrência de casos/surtos de DOA.

Nos últimos anos a necessidade de conhecer como os microrganismos são transmitidos por toda a cadeia alimentar levou os microbiologistas a observar outros processos bacterianos além do crescimento e da morte de microrganismos e a contaminação cruzada começa a ser avaliada utilizando modelos dinâmicos além de estudos observacionais (CARDOSO et al., 2021; POSSAS et al., 2017).

A quantificação do risco de contaminação cruzada associada a várias etapas nos processos de preparação, higienização e armazenamento de utensílios utilizados para manipulação e preparo dos alimentos podem fornecer informações para o aprimoramento e gerenciamento de riscos em ambientes domiciliares (ALVES et al., 2022; CARDOSO et al., 2021; CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Assim estudos buscam por informações dos vários aspectos da disseminação de patógenos dentro do ambiente de preparação de alimentos, de forma a fornecer subsídios aos consumidores sobre práticas seguras que evitem a contaminação cruzada e a adoção de medidas educativas e preventivas no controle de DOA neste âmbito.

2.3.1 Formação de biofilmes em tábuas de corte

As características de um organismo e seu ambiente circundante estão entre os fatores importantes que podem afetar a sobrevivência de células bacterianas nas superfícies permitindo a persistência bacteriana em diferentes tipos de tábuas, devido a uma maior resistência ao meio, estresse ambiental e a produtos químicos utilizados nos processos de higienização (KUMAR et al., 2017; RABIN et al., 2015; RAYNER; VEEH;

FLOOD, 2004). Uma vez introduzido os biofilmes podem abrigar patógenos que crescem e se multiplicam nestas superfícies ou simplesmente persistirem no local instalado, protegidos por biofilmes pré-existentes proveniente do crescimento de outros microrganismos não patogênicos (KUMAR et al., 2017).

Nesse microambiente podem-se destacar duas porções facilmente distinguíveis: O interior do biofilme em que as condições são mais favoráveis ao controle e o exterior deste em que o controle nutricional é dificultado, com células nas duas porções, denominando-se células sésseis aquelas que se localizam na porção interna e células planctônicas as exteriorizadas flutuantes (FLEMMING et al., 2016; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

As propriedades da superfície de fixação como hidrofobicidade, carga eletrostática, rugosidade da interface e topografia afetam a formação do biofilme e, portanto, afetam o estado geral de higiene da superfície (ARAÚJO et al., 2010; TANG et al., 2011). O estado de desgaste e conservação de uma superfície também pode influenciar na formação do biofilme, pois depósitos porosos e irregulares são regiões propensas ao crescimento bacteriano (DHOWLAGHAR et al., 2018; DONLAN, 2002; TANG et al., 2011).

Alguns estudos revelaram que a adesão bacteriana é mais provável de acontecer em superfícies mais ásperas (DHOWLAGHAR et al., 2018; TANG et al., 2011), enquanto outros não encontraram nenhuma associação entre rugosidade e adesão bacteriana (JINDAL et al., 2018). Superfícies hidrofóbicas tendem a atrair mais bactérias (DANTAS et al., 2018), mas estudos que testaram o efeito da hidrofobicidade observaram resultados opostos (ALVARADO, 2012; GOMES et al., 2015; VELUZ; ALVARADO, 2012) e outros estudos indicaram que superfícies hidrofílicas permitiram mais aderência bacteriana do que os equivalentes hidrofóbicos (DHOWLAGHAR et al., 2018; JINDAL et al., 2018).

Flutuações na capacidade de formação de biofilme entre espécies ou cepas de diferentes genótipos e sorotipos foram identificadas o que revela a evolução da formação de biofilme, aprimorada de várias origens genéticas (WANG; KALCHAYANAND; BONO, 2015; YUAN et al., 2018). Espécies semelhantes também podem impactar umas às outras em uma comunidade microbiana mista que culmina na co-colonização de certas espécies (CARRASCO et al., 2021).

Mesmo com tantos estudos ainda se faz necessário maior compreensão de como estes eventos acontecem, quais mecanismos envolvidos na adesão, desenvolvimento e

maturação de biofilmes em tábuas de corte como tábuas, contribuindo com informações sobre microrganismos, práticas de uso como o armazenamento, higienização e vida útil.

2.3.2 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência a antibióticos tem sido alvo de estudos e apontado como um importante problema principalmente com o aparecimento de bactérias multirresistentes, consideradas atualmente um problema global emergente em saúde pública (CANIÇA et al., 2019; ROCA et al., 2015).

Uma variedade de antimicrobianos são utilizados em condições terapêuticas e profiláticas em seres humanos e animais, o que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a recomendar o controle e restrição no uso destes agentes nos últimos anos (ROCA et al., 2015).

Infecções por estirpes resistentes apresentam dificuldades de tratamento e podem levar ao óbito pela inatividade de grupos de antimicrobianos administrados, na tentativa de debelar uma doença (ROCA et al., 2015; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

A emergência de microrganismos resistentes seja por mutações ou pela aquisição de elementos genéticos móveis, portadores de genes de resistência, pode ocorrer independentemente da presença de agentes antibacterianos, é a exposição a essas drogas que fornece a pressão seletiva necessária para o surgimento e disseminação de patógenos resistentes (CANIÇA et al., 2019; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Além disso as estratégias evolutivas de resistência antimicrobiana de bactérias, especialmente patógenos de origem alimentar, que incluem impermeabilidade celular, mutação no local alvo, efluxo de drogas e inativação de drogas, resultaram em um grande desafio devido ao surgimento de bactérias altamente resistentes a diferentes antimicrobianos nos últimos anos (LAVILLA-LERMA et al., 2013; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Os antibióticos anteriormente eficazes estão perdendo seu poder em todos os fins para os quais foram usados (pessoas, animais e plantas) o que leva a falhas no tratamento e aumento da morbidade, mortalidade, tempo de hospitalização e custo dos cuidados de saúde (KOCH; HUNGATE; PRICE, 2017; MANAFI et al., 2020), com a disseminação de genes de resistência em humanos via alimentos documentada em diferentes alimentos (CANIÇA et al., 2019; DE BEEN et al., 2014; KOCH; HUNGATE; PRICE, 2017).

O fato de microrganismos resistentes poderem sobreviver em uma ampla gama de nichos e se adaptarem a hospedeiros alternativos é preocupante, o que pode ampliar sua capacidade de adquirir novos determinantes, tanto em termos de virulência quanto de resistência, mantendo simultaneamente sua aptidão (DA COSTA; LOUREIRO; MATOS, 2013).

É importante o conhecimento de aspectos de resistência, transferência e disseminação de microrganismos patogênicos em saúde pública, o que ocorre após a colonização ou infecção do hospedeiro suscetível com a transferência de genes de resistência as bactérias presentes na microbiota do novo hospedeiro (DA COSTA; LOUREIRO; MATOS, 2013).

Gerenciar a disseminação da resistência a antibióticos requer entender as interações ecológicas de bactérias resistentes em toda a microbiosfera, o conhecimento do risco de exposição a patógenos presentes no ambiente doméstico pode contribuir com informações importantes em saúde pública, além de permitir estratégias futuras.

2.3.3 Resistência bacteriana aos sanitizantes

A busca por um produto desinfetante de uso doméstico não é uma tarefa fácil, atualmente encontra-se uma grande escala de opções relacionadas a marca, preço e princípio ativo do produto e em grande parte a escolha é baseada em critérios subjetivos ou recomendações do fabricante atrelada ao preço.

A desinfecção é um dos mais importantes aspectos de prevenção de enfermidades no ambiente doméstico principalmente relacionado a contaminação de alimentos, atuando na prevenção de microrganismos causadores de doenças (MENINI et al., 2022).

Para uma desinfecção eficaz o fabricante apresenta informações no rótulo consideradas necessárias para total ação do produto tais como diluição, tempo de ação, tipo de material a ser desinfetado e a retirada prévia de sujidades para uma melhor ação do produto (MØRETRØ et al., 2012).

O conhecimento de sistemas e testes desinfetantes para alvos microbianos ganhou relevância no ambiente doméstico no controle de micro-organismos (COGAN et al., 2002; DEVERE; PURCHASE, 2007; DJEBBI-SIMMONS et al., 2019); MEDRANO-FÉLIX et al., 2011; RUTALA et al., 2000). Vários produtos desinfetantes e antimicrobianos estão disponíveis comercialmente atuando contra uma variedade de

micro-organismo, sugerindo eficácia que incluem ação em biofilmes e patógenos (DJEGBI-SIMMONS et al., 2019; FAGERLUND et al., 2017; LINEBACK et al., 2018; MØRETRØ et al., 2009). No entanto embora as partículas de alimentos sejam geralmente limpas quando boas práticas de higiene são aplicadas, as bactérias ligadas a essas superfícies não são visíveis aos olhos podendo não ser removidas (KUSUMANINGRUM et al., 2003a).

A eficácia de produtos antibacterianos em patógenos alimentares como por exemplo líquidos a base de hipoclorito e amônio quaternário, foram sugeridos como responsáveis pela redução significativa de microrganismos em tábuas de corte (DJEGBI-SIMMONS et al., 2019; FAGERLUND et al., 2017; KUSUMANINGRUM et al., 2003a; LINEBACK et al., 2018) .

Porém outros pesquisadores concluíram que agentes antimicrobianos rotineiramente utilizados, considerados eficazes no controle de patógenos, quando não aplicado a regimes de higienização sanitária adequada pode não remover completamente patógenos de tábuas de corte, ocorrendo posterior contaminação cruzada na manipulação de alimentos (DJEGBI-SIMMONS et al., 2019; MEDRANO-FÉLIX et al., 2011; SOARES et al., 2012).

A maioria dos relatos na literatura sobre habitats tais como tábuas de corte, simulam o potencial de transferência de micro-organismos para alimentos através da inoculação artificial de culturas patogênicas, sugerindo que áreas de superfície com alta exposição repetida à umidade e nutrientes são habitats ideais para a concentração, crescimento e disseminação de bactérias (RAYNER; VEEH; FLOOD, 2004).

Estes estudos podem não refletir com fidelidade o comportamento de patógenos encontrados no ambiente doméstico, além da eficácia de produtos bactericidas e bacteriostáticos estarem sendo realizada com baixa representatividade, já que uma multiplicidade de parâmetros como o tempo de uso da superfície, desgaste, umidade, exposição, potencial de absorção, tipo de material e forma de higienização são fatores importantes para determinar o comportamento de microrganismos. A avaliação da efetividade de agentes utilizados nos processos de higienização de tábuas de corte pode contribuir com informações mais resolutas no controle de microrganismos neste ambiente.

3. OBJETIVO

Avaliar o perfil de manipulação e a presença de microrganismos em tábuas de corte de madeira e plástico obtidas do ambiente doméstico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*;
- Realizar a contagem de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp.;
- Relacionar o material da superfície com a contagem e presença de microrganismos;
- Pesquisar genes envolvidos na formação de biofilmes e virulência dos isolados;
- Avaliar a capacidade de adesão dos isolados;
- Avaliar o perfil fenotípico de resistência a antibióticos e sanitizantes dos isolados.

4. REFERÊNCIAS

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Annual Review of Food Science and Technology Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. **Annu. Rev. Food Sci. Technol**, v. 10, p. 173–195, 2019.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30653351/>

ALVES, Â. et al. From chicken to salad: Cooking salt as a potential vehicle of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cross-contamination. **Food Control**, v. 137, 1 jul. 2022.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713522001529?via%3Dihub>

ARAÚJO, E. A. et al. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p.321-332, jun. 2010. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-009-0290-z>

AVIAT, F. et al. Comparative study of microbiological transfer from four materials used in direct contact with apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 16 nov. 2020.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160520302749>

BESHEARSE, E. et al. Attribution of illnesses transmitted by food and water to comprehensive transmission pathways using structured expert judgment, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 182–195, 1 jan. 2021.

<https://doi.org/10.3201/eid2701.200316>

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil Informe 2023**. Brasília: 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/@download/file>. Acesso em: 20 dez. 2023.

BRASIL. **Manual Integrado de vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília: 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-integrado-de-vigilancia-e-controle-de-doencas-transmitidas-por-alimentos.pdf/view> . Acesso em: 23 mar. 2023.

CANIÇA, M. et al. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v. 4, p. 41-44, 1 fev. 2019.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417303953>

CARDOSO, M. J. et al. Cross-contamination events of *Campylobacter* spp. in domestic kitchens associated with consumer handling practices of raw poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, 2 jan. 2021.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160520304785>

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research**

International, v. 45, n. 2, p. 545–556, mar. 2012.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911006260>

CARRASCOSA, C. et al. Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n.4, p. 1-31, 2 fev. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7922197/>

COGAN, T. A. et al. Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 885–892, 1 maio 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11972693/>

DA COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 278–294, 2013.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564142/>

DANTAS, S. T. A. et al. Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* on Various Cutting Boards. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 81–85, 1 fev. 2018.

<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2017.2341>

DE BEEN, M. et al. Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between *Escherichia coli* Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2014.

<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004776>

DE JONG, A. E. I. et al. Cross-contamination in the kitchen: effect of hygiene measures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 615–624, 1 ago. 2008.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18341559/>

DE OLIVEIRA, D. C. V. et al. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 6, p. 478–483, 1 jun. 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24720488/>

DEVERE, E.; PURCHASE, D. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 425–430, 1 jun. 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17189769/>

DHOWLAGHAR, N. et al. Scanning electron microscopy of *Salmonella* biofilms on various food-contact surfaces in catfish mucus. **Food Microbiology**, v. 74, p. 143–150, 1 set. 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017311474>

DJEBBI-SIMMONS, D. et al. Survival and inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases. **Food Microbiology**, v. 84, p. 103272, dez. 2019.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002019301145>

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 9 set 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194761/>

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n.9, p.623-633, set. 2010.
<https://www.nature.com/articles/nrmicro2415>

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 1 set. 2016.
<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>

FAGERLUND, A. et al. Cleaning and Disinfection of Biofilms Composed of *Listeria monocytogenes* and Background Microbiota from Meat Processing Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 17, p. e-01046-17, set 2017.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667108/>

GALLO, M. et al. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. **Food Research International**, v. 137, p.109414, 1 nov. 2020.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920304397>

GOMES, L. C. et al. *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 4, p. 1414–1423, 1 abr. 2015.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25044887/>

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 143–150, 2002.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502000284>

HAYSOM, I. W.; SHARP, A. K. Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hour period. **British Food Journal**, v. 107, n. 7, p. 453–466, 2005.
<https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070700510606873/full/pdf?title=bacterial-contamination-of-domestic-kitchens-over-a-24hour-period>

HEACOCK-KANG, Y. et al. Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 976–985, 1 dez. 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29030956/>

JINDAL, S. et al. Short communication: A comparison of biofilm development on stainless steel and modified-surface plate heat exchangers during a 17-h milk pasteurization run. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2921–2926, 1 abr. 2018.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218300390>

KOCH, B. J.; HUNGATE, B. A.; PRICE, L. B. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, n. 6, p.309-318, 1 ago. 2017.
<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fee.1505>

KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n.8, p.481-489, 1 dez. 2017.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422117300280>

KUSUMANINGRUM, H. D. et al. Tolerance of *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to Surface Cleaning and Household Bleach. **Journal of Food Protection**, v.66, n.12, p.2289-2295, 2003a.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22033531?via%3Dihub>

KUSUMANINGRUM, H. D. et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 227–236, 25 ago. 2003b.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502005408>

LAVILLA LERMA, L. et al. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 97–106, 1 fev. 2013.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512006198>

LIAO, J.; SCHURR, M. J.; SAUERA, K. The merR-like regulator brlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 15, p. 3352–3363, ago. 2013.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719540/>

LINEBACK, C. B. et al. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 17 dez. 2018.

<https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-018-0447-5>

MANAFI, L.; ALIAKBARLU, J.; DASTMALCHI SAEI, H. Antibiotic resistance and biofilm formation ability of *Salmonella* serotypes isolated from beef, mutton, and meat contact surfaces at retail. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 8, p. 2516–2522, 1 ago. 2020. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15335>

MEDRANO-FÉLIX, A. et al. Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 463–471, fev. 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21143709/>

MENINI, A. et al. The Critical Role of Consumers in the Prevention of Foodborne Diseases: An Ethnographic Study of Italian Families. **Foods**, v. 11, n. 7, 1 abr. 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35407093/>

MOORE, G.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. Recovery and Transfer of *Salmonella Typhimurium* from Four Different Domestic Food Contact Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2273–2280, 2007.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17969608/>

MØRETRØ, T. et al. 2009. “Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry”. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1005–12, mar. 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19191969/>

MØRETRØ, T. et al. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532–544, mar. 2012.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911000895>

OMS. Organização Mundial da Saúde. Foodborne diseases. Disponível em:
https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1 . Acesso em: 24 mar. 2023. (a)

OMS. Organização Mundial da Saúde. Foodborne diseases: impacts. Disponível em:
https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2 . Acesso em: 24 mar. 2023. (b)

OKPALA, C. O. R.; EZEONU, I. M. Food Hygiene/Microbiological Safety in the typical Household Kitchen: Some basic ‘must knows’ for the general public. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 697–713, 2019.
<https://microbiologyjournal.org/food-hygiene-microbiological-safety-in-the-typical-household-kitchen-some-basic-must-knows-for-the-general-public/>

POSSAS, A. et al. Models of microbial cross-contamination dynamics. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 43-49, 1 abr. 2017.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799317300097>

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 1 mar. 2015.
<https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.15.6>

RAVISHANKAR, S.; ZHU, L.; JARONI, D. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella* enterica from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 791–794, set. 2010.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010000857>

RAYNER, J.; VEEH, R.; FLOOD, J. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 29–39, 15 ago. 2004.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504000820>

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22-29, 1 jul. 2015.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297515000293>

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 1 out. 2020. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0385-0>

RUTALA, W. A. et al. Antimicrobial Activity of Home Disinfectants and Natural Products Against Potential Human Pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 33–38, 2 jan. 2000.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10656352/>

SALAHSHOURIA, A. et al. Investigation of the Outbreak of Food- and Water-borne Diseases in Khansar, Isfahan in 2018. **Archives in Hygiene Science**, v. 9, n. 4, p. 325–330, 2020. <https://jhygiene.muq.ac.ir/article-1-420-en.html>

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, jan. 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375761/>

SEKOAI, P. T. et al. Insights into the microbiological safety of wooden cutting boards used for meat processing in Hong Kong's wet markets: A focus on food-contact surfaces, cross-contamination and the efficacy of traditional hygiene practices. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32316436/>

SINGH, S. et al. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 140, 1 dez. 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34557983/>

SOARES, V. M. et al. Transfer of *Salmonella Enteritidis* to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 453–456, jun. 2012. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201100311X>

TANG, L. et al. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. **Biofouling**, v. 27, n. 1, p. 111–121, jan. 2011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21181571/>

THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial resistance in agriculture. **mBio**, v. 7, n. 2, 19 abr. 2016. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02227-15>

TOMIČIĆ, R. et al. Factors influencing adhesion of bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and yeast *Pichia membranifaciens* to wooden surfaces. **Wood Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1663–1676, 1 nov. 2020. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00226-020-01222-0>

VAN ASSELT, E. D. et al. Cross-contamination in the kitchen: Estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 5, p. 1392–1401, nov. 2008. <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/105/5/1392/6719968?redirectedFrom=fulltext&login=true>

VELUZ, G. A.; PITCHIAH, S.; ALVARADO, C. Z. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria Monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. **Poultry Science**, v. 91, n. 8, p. 2004–2010, 2012. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119396531>

WANG, R.; KALCHAYANAND, N.; BONO, J. L. Sequence of colonization determines the composition of mixed biofilms by *Escherichia coli* O157:H7 and O111:H8 strains3. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 8, p. 1554–1559, 1 ago. 2015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23056867>

WILLIAMSON, K. S. et al. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2062–2073, abr. 2012.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343293/>

YUAN, L. et al. Insights into Bacterial Milk Spoilage with Particular Emphasis on the Roles of Heat-Stable Enzymes, Biofilms, and Quorum Sensing. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 10, p. 1651-1660, 2018.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22087506>

CAPÍTULO II

Perfil de manipulação e avaliação microbiológica de tábuas de corte de madeira e plástico obtidas do ambiente doméstico

Artigo enviado a revista *Journal of Food Protection* -ISSN: 0362-028X

Manipulation profile and microbiological evaluation of wooden and plastic cutting boards
obtained from the domestic environment

Short-title: Cross-contamination at the use cutting boards when manipulation food

Janaina Prieto de Oliveira¹, Dionice Capistrano da Silva¹, Leonardo Ereno Tadielo¹, Emanoelli
Aparecida Rodrigues dos Santos¹, Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio¹, Fábio Sossai
Possebon^{1,2}, Juliano Gonçalves Pereira^{1*}

¹São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science,
Botucatu. Prof. Dr. Walter Mauricio Correa st, 18.618-681, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² São Paulo State University (Unesp), Biotechnology Institute. Tecomarias Av., 18.607-440,
Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding author: juliano.pereira@unesp.br

Highlights

- 87% of handlers were using the same cutting board for all foods.
- Worn cutting boards showed structures characteristic of biofilms.
- Wooden boards with up to one year of use had bigger counts for *Enterobacteriaceae* and aerobic mesophilic.
- Cutting boards harbored *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Inadequate practices in the use of cutting boards when manipulation food, can allow microorganisms to remain and the risk of cross-contamination. The aim of this study was to evaluate the manipulation profile and microbiological characterization in the use of wooden and plastic cutting boards in homes. A total of 100 boards were collected, accompanied by a survey on manipulation and usage practices of the utensil. Microbiological analyzes were performed to aerobic mesophilic count (AMC), *Enterobacteriaceae* (EB) and *Pseudomonas* spp. and research of *Listeria monocytogenes* (LM) and *Escherichia coli* (EC). The removal of bacteria adhered to the boards was carried out by removing fragments measuring 44mm in diameter, sonicated for 20 minutes in ultrasonic cleaning equipment. Calculations were performed for area (cm²/ml) and the results presented in log CFU/cm² and presence/absence. A 22mm diameter fragment was used for scanning electron microscopy (SEM) evaluation. As results, we highlight that 87% (87/100) of food handlers stated that they use the same board to handle all food and 75% (75/100) had the utensil in use for more than two years. The microbiological evaluation found higher values for aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* in plastic boards ($p < 0.05$), although, when evaluating the time of use and the material of the boards, higher values for aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* ($p < 0.05$) were observed on wooden boards with less time of use. The study found the presence of 3% (3/100) for *Listeria monocytogenes* and 5% (5/100) for *Escherichia coli*, with no differences between wooden and plastic boards. The study highlights the importance of cutting boards in cross-contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in this utensil, reinforcing the importance of good manipulation practices when using this utensil in food preparation.

Keywords: Foodborne Disease, Surfaces, Biofilms, *Listeria monocytogenes*

Introduction

The epidemiology of foodborne diseases changes over the years, new and unexpected pathogens emerge on a national or global scale, posing a significant threat to human health, with approximately 600 million cases of foodborne illness (FD) occurring annually (FAO, 2022). In this scenario, we highlight the importance of good practices in food manipulation and how they promote safety and awareness in the control of foodborne diseases in everyday domestic life.

During the manipulation food in home kitchens, the main hygienic and sanitary problems are related to the conditions of the places and surfaces where these foods are handled, lack of personal hygiene and cross-contamination between utensils used during food preparation (Okpala & Ezeonu, 2019). In this environment, cross-contamination plays an important role in the occurrence of foodborne diseases, through the transfer of microorganisms from one contaminated place or food to another, the main routes of contamination being raw meats, cutting surfaces, dirty packaging, utensils and hands (Cardoso et al., 2021; Okpala & Ezeonu 2019).

Cutting boards are utensils widely used in preparing food, whether raw or ready to eat and hygiene failures during the process of removing dirt from these surfaces and inappropriate use practices can increase the risk of disease (Cogan et al., 2002; Ravishankar et al., 2010; Sekoai et al., 2020). The lack of knowledge of good manipulation, hygiene, storage and conservation practices for this utensil, the organic matter and microorganisms present in raw foods can remain attached to these surfaces, serving as a source of constant contamination (Aviat et al., 2020; Cardoso et al., 2021; Ravishankar et al., 2010).

Bacteria as *Listeria monocytogenes* can remain on manipulation surfaces such as cutting boards, complicating the identification of sources of contamination due to their nature, incubation periods, adaptation to changes in environmental conditions, ability to proliferate in different food matrices and grow in a wide spectrum of temperatures, in addition to creating mechanisms for the formation and establishment of biofilms (Cordero et al., 2016; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021).

The permanence and adhesion of microorganisms can occur on any type of surface, such as wood, glass and plastic (Dantas et al., 2018; Soares et al., 2012; Tomićić et al., 2020) and some

materials such as wood and plastic, offer favorable conditions (greater porosity) for the growth, development and establishment of microorganisms with the capacity to produce biofilms (Dantas et al., 2018).

Biofilms are communities of sessile cells, made up of one or several bacterial species, included in a matrix of extracellular polymers (exopolysaccharides - EPS) adhered to an inert or living surface (Flemming & Wingender, 2010; Singh et al., 2021). The formation of biofilms and their permanence on cutting boards can compromise microbiological quality in manipulated foods in this utensil, exposing people to biological risk, through the biotransfer of pathogenic microorganism's present (Alvarez-Ordóñez et al., 2019; De Oliveira et al., 2014).

Studies seek information on the occurrence and transmission of microorganisms in different categories of materials that characterize cutting surfaces for manipulation of food (Dantas et al., 2018; Kusumaningrum et al., 2003a; Moore et al., 2007; Ravishankar et al., 2010; Soares et al., 2012; Tomičić et al., 2020). Most of these studies are carried out in simulated scenarios, and may not accurately reflect the use of these boards, given that a multiplicity of parameters associated with various stages in the food preparation process are decisive for contamination and persistence of microorganisms on cutting boards used in home kitchens (Possas et al., 2017).

Understand the risk of contamination of cutting boards used in daily household use, associated with food manipulation steps, can provide information for risk management in domestic and food service kitchens (Kusumaningrum et al., 2003a; Possas et al., 2017) contributing to the control of cross-contamination. This way, the present study had as objective to evaluate the use profile and microbiological characterization of wooden and plastic cutting boards used in home kitchens.

Material and Methods

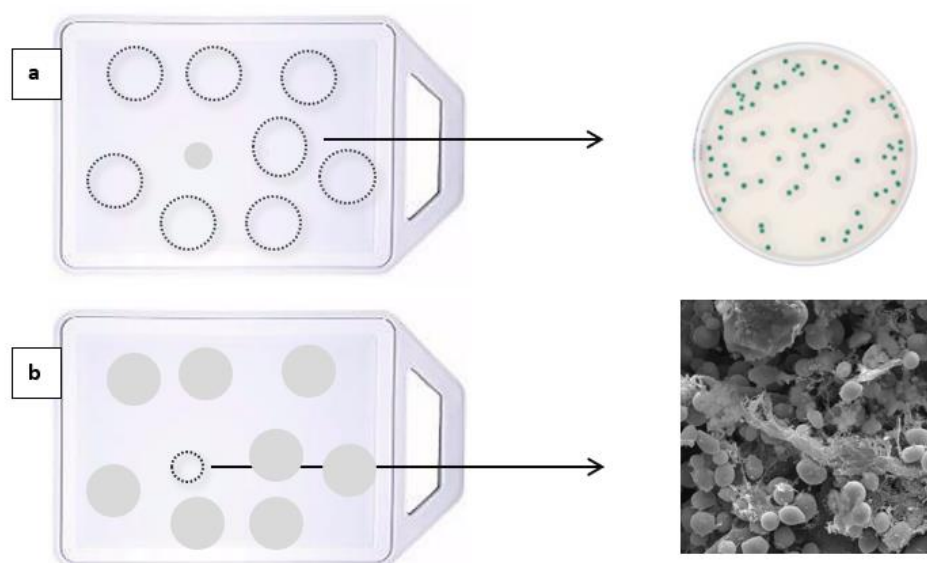
Experimental design. The study was carried out in the state of São Paulo, Brazil, the dissemination of the study it was carried out using the digital media channels Instagram and WhatsApp and, after contact with the volunteer, the boards were collected from homes.

Application of the Survey. Before collection, a survey was administered to assess the consumer's profile in the use of cutting boards, a “Terms of Consent” was presented to the interviewee with explanations about the research and their form of participation (Supplementary Data A and Supplementary Data B).

Collecting cutting boards. Two types of materials (wood and plastic) were selected for the study, a total of 100 boards (wood=50 and plastic=50) were collected for laboratory analysis.

Removal of fragments for analysis. Fragments were removed from the surfaces using a BOSCH® manual drill (Gerlingen, Germany) and an MTX® hole saw drill (Hamburg, Germany). From each board, fragments measuring 44mm in diameter were removed from the central and peripheral portions and a fragment measuring 22mm in diameter for scanning electron microscopy (SEM) (Figure 1 a and b).

Figure 1. Removal of fragments for microbiological evaluation (a) and scanning electron microscopy - SEM (b) of wooden and plastic cutting boards.



Calculation of the area of the fragments. For each microbiological analysis to be performed, two fragments were used. Each fragment was 44 mm in diameter, totaling an area of 60.76 cm². The calculations were conducted considering both sides of the boards. The results were presented in log CFU/cm² for the counts of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and

Pseudomonas spp., for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* presented only as presence/absence.

Examples of how the calculations were performed

- 1 fragment with 44 mm in diameter = Radius of 2.2 cm²
- $A = \pi r^2 \rightarrow 15, 20 \text{ cm}^2$ (for one side of the circle)
- 1 fragment has two sides, it will have an area of 30.4 cm²
- 2 fragments will have an area of 60.8 cm²
- Area (cm²/mL) = 60.8 cm² ÷ 100 mL of pre-enrichment broth solution
- Area cm²/mL = 0.6080 cm²/mL
- CFU/mL count: 30 CFU/mL
- CFU/cm² = CFU/mL ÷ Area (cm²/mL)
- CFU/cm² = 30 CFU/mL ÷ 0.6080 cm²/mL
- CFU/cm² = 49.34
- $\log \text{CFU/cm}^2 = \log (49.34)$
- $\log \text{CFU/cm}^2 = 1.7$

Microbiological evaluation. The removal of bacteria adhered to the fragments removed from the cutting boards was conducted by washing the fragments, stored in sterile plastic bags containing 100 mL of pre-enrichment broth, according to the methodology used for each microorganism. To remove the microorganisms, a conjugated ultrasonic bath was used, model Solidsteed® (Piracicaba, Brazil) at 25 kHz, containing distilled water in its tank at room temperature, the fragments were sonicated for 20 minutes, thus allowing the passage of frequency waves with cavitations, promoting the removal of microorganisms adhered to the fragments.

Count of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. To count aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp., two fragments were stored in a plastic bag containing 100 mL 0.85% NaCl (w/v) with 5 mL Tween 80 (0.5%). Aerobic mesophilic counting was performed using ISO 4833-1:2013 (ISO, 2013). The *Enterobacteriaceae* count used the American Public Health Association method - APHA 9.62:2015 (Kornacki et al.,

2015) and for *Pseudomonas* spp. the ISO 13720:2010 method (ISO, 2010), the results were presented as log colony-forming unit per cm² (log CFU/cm²).

Detection of *Listeria monocytogenes*. The search for *Listeria monocytogenes* was carried out based on ISO 11290-1: 2017 (ISO, 2017). Isolates identified as *L. monocytogenes* by phenotypic testing were subjected to a multiplex PCR protocol for confirmation (Doumith et al., 2004). The result was expressed as presence or absence.

Detection of *Escherichia coli*. The detection of *Escherichia coli* was carried out based on ISO 16649-2: 2001 (ISO, 2001), the isolates were subjected to molecular confirmation by PCR, targeting the *uspA* gene according to the protocol described by Chen & Griffiths, 1998. result was expressed as presence or absence.

Scanning electron microscopy (SEM). The images were generated from fragments measuring 22mm in diameter removed from the surfaces, fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 at 4 °C for 4 h, washed three times for 5 minutes with distilled water. The material was immersed in 0.5% osmium treoxide and distilled water for 30 to 40 minutes, the material was washed three times in distilled water and dehydration began in an increasing series of alcoholic concentrations (7.5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 90% and 100%) at 25 °C for 10 to 15 minutes. Then, the evaluation of the critical point (final drying) was carried out using 12 cycles of CO₂ exchange for 3 min with stub assembly and gold metallization (180 s), the reading was carried out on a scanning electron microscope FEI Company™ QUANTA 200 (Oregon, United States).

Data analyses. For quantitative results, normality was assessed with graphical analyzes (histogram and Quantile-Quantile graph) and normality tests (Shapiro-Wilk), being considered non-parametric. The median counts for aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. were compared between materials (wood and plastic), as well as between survey categories, using non-parametric tests (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis). The association between the presence of *L. monocytogenes* and *Escherichia coli* and the type of material (wood and plastic) was assessed using Fisher's test. A statistical difference was

considered when $p < 0.05$ using the SAS[®] 3.81 software (SAS[®] Institute, North Carolina, United States).

Results

Survey evaluation. To evaluate the survey, we highlighted as the main results that 87% (87/100) of food handlers used the same cutting board to handle meat, fruits and vegetables. We observed that 75% (78/100) of those interviewed had the same utensil in use for more than 2 years. When asked about cleaning the boards, 96% said sanitize, 73% used only detergent in the cleaning process and 27% used detergent with hypochlorite (Supplementary Table I).

Microbiological analysis of cutting boards. The values show that for the counts of aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae*, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the materials, with no statistical difference for *Pseudomonas* spp. For the presence of *Escherichia coli* we observed 6% (3/50) in wood and 4% (2/50) for plastic boards. The study found a percentage of 2% (1/50) in wood and 4% (2/50) in plastic for *Listeria monocytogenes*, with no differences between the materials evaluated (Table I).

Evaluating the way of cleaning fruits and vegetables, described in the survey, the study found significant values ($p < 0.05$) for reductions in *Enterobacteriaceae* counts ($P < 0.0305$) for sanitation using water with acetic acid, on boards where these foods were manipulated, without difference in materials (wood and plastic). The presence of *L. monocytogenes* (3/100) and *E. coli* (5/100) was observed on cutting boards where the handlers declared that they used the same board to handle any type of food (Supplementary Table II).

Evaluating the time of use of the boards and the count of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp., we did not observe statistical differences (Supplementary Table II). When performing stratification by material (wood and plastic) we observed that wooden boards with a shorter period of use (0 to 1 year) we observed that wooden boards with a shorter period of use (0 to 1 year) showed differences for the count of aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae*. The evaluation of the time of use of the boards also

demonstrated that boards used for more than 2 years contained *L. monocytogenes* (3/100) and *E. coli* (5/100) (Table II).

Table I. Count of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. and presence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on wooden and plastic cutting boards residences.

Microorganisms	Cutting boards		p-value
	Wooden	Plastic	
¹ Aerobic mesophilic	2.1 (0 – 7.3) ^b	3.5 (0 – 8.2) ^a	0.0014*
¹ <i>Enterobacteriaceae</i>	0.11 (0 – 5.7) ^b	2.6 (0 – 10.4) ^a	0.0024*
¹ <i>Pseudomonas</i> spp.	0 (0 – 6.3)	0 (0 – 8.8)	0.0752
² <i>Listeria monocytogenes</i>	1/50	2/50	
² <i>Escherichia coli</i>	3/50	2/50	
² Total	50	50	100

* a,b values with different letters in the line are different when the result differs statistically as 95% significance $p < 0.05$: ¹(log CFU/cm²) median (minimum - maximum); ² values %

Table II. Time of use of wooden and plastic cutting boards in relation to counts of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. and presence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

¹ Parameter	² Presence		Cutting boards					
	LM	EC	Wood (n=50)			Plastic (n=50)		Total (n=100)
			AMC	EB	PS	AMC	EB	PS
Use time								
0 to 1 year		1/100	3.9 (2.0 – 7.4) ^a	3.0 (0.2 – 5.8) ^a	0 (0 – 5.9)	3.1 (0 – 3.6)	0 (0 – 3.4)	0 (0 – 4.2)
1 to 2 years		1/100	2.3 (0 – 6.2) ^{ab}	0.3 (0 – 5.1) ^{ab}	0 (0 – 6.4)	3.4 (2.8 - 7.0)	3.5 (2.6 – 4.7)	3.4 (0 – 5.5)
More than 2 years	3/100	3/100	2.1 (0 – 7.2) ^b	0 (0 – 4.4) ^b	0 (0 – 6.4)	3.6 (0 – 8.2)	2.6 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.8)
P valor			0.0066*	0.0018*	0.0782	0.3763	0.2131	0.4729

*a,b values with different letters in the line are different when the result differs statistically as 95% significance $p < 0.05$: ¹(log CFU/cm²) median (minimum - maximum); AMC: aerobic mesophilic count; EB: Enterobacteriaceae count; PS: *Pseudomonas* spp. count; ² values % LM: *Listeria monocytogenes*; EC: *Escherichia coli*.

Scanning electron microscopy (SEM). The presence of attached bacteria and structures characteristic of biofilms and exopolysaccharide matrix (EPS) was observed between the cracks present in the boards, especially the wood (Figures 2 and 3).

Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) of plastic boards used in homes for food manipulation. Surface topography (A, B); Aspects of EPS matrix deposition and presence of microorganisms adhered to the surface (C, D, E, F, G, H, I).

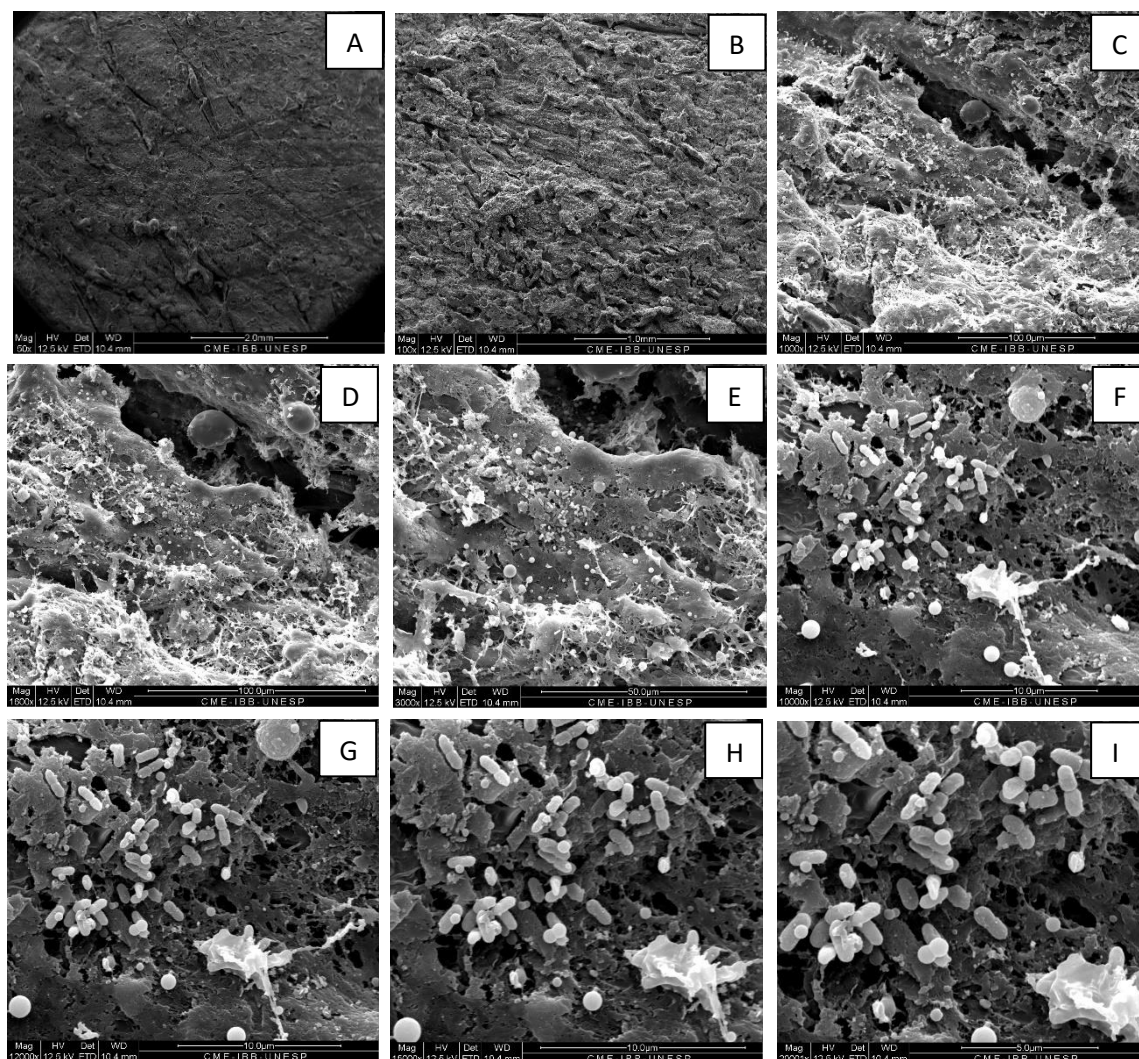
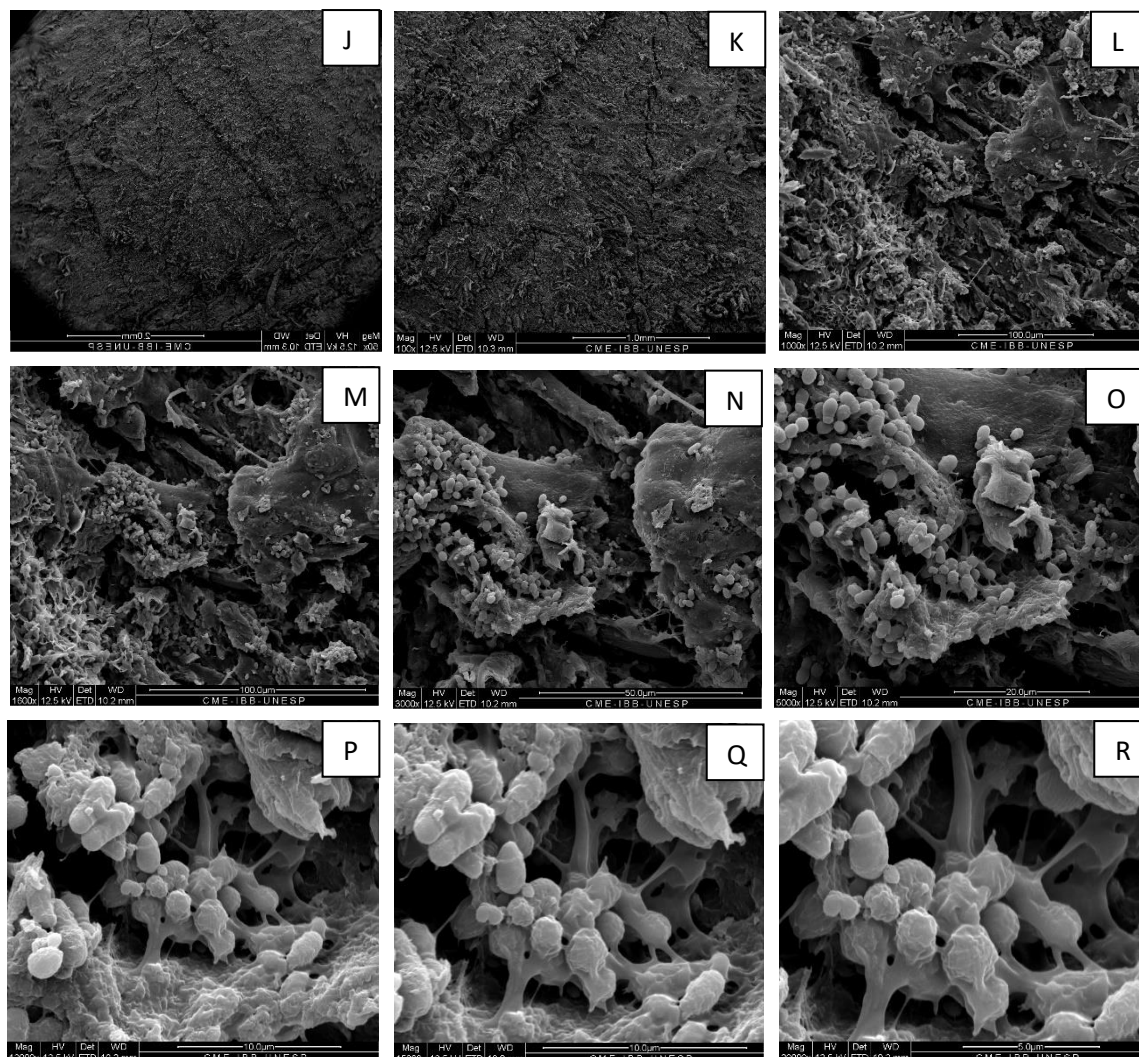


Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) of wooden boards used in homes for food handling. Surface topography (J, K); Presence of attached microorganisms (L, M, N and O) and formation of EPS matrix (P, Q and R).



Discussion

The risk of foodborne illness associated with cross-contamination depends on factors such as: level of contamination, probability of transfer to food and level of knowledge of handlers. Inadequate practices in the use of utensils such as cutting boards can lead to the introduction and dissemination of microbiological contaminants in the home environment, with an emphasis on the kitchen. (Alves et al., 2022; Gorman, Bloomfield & Adley, 2002; Kusumaningrum et al., 2003a).

Evaluating the profile and practices of handlers in the use of cutting boards in homes, the study found that the vast majority of participants used the utensil daily when preparing their food, declaring to use the same board to handle meat, fruits and vegetables. Yap et al. (2016) & Gong et al. (2016) also observed in their studies characterizing safe practices in the use of cutting boards in homes of the United States and China results equal to this study, where 87% of handlers said they use the same cutting board to manipulate meat, fruits and vegetables. Accordingly, Frewer et al. (1994) & Freitas et al. (2014) highlight the knowledge contributed to the perception of risk in food manipulation, enabling improvements in the control and spread of foodborne diseases.

Is hygiene food is a preventive measure that helps control diseases. When selecting the food to be consumed, it is important to observe the hygienic and sanitary conditions in which it is found (Ssemanda et al., 2018). Half of the participants in this study declared that they sanitized their fruits and vegetables before handling them with just water. Lower values were observed for the count of *Enterobacteriaceae* on cutting boards where handlers used water and acetic acid in the process of sanitizing their raw food. Ssemanda et al. (2018) & Amoah et al. (2007) observed the reduction in the number of *Enterobacteriaceae* in vegetables sanitized with water and acetic acid before preparation.

Some materials such as wood and plastic offer favorable conditions (higher porosity) for the growth and adhesion of microorganisms on cutting boards (Dantas et al., 2018; Tomičić et al., 2020; Soares et al., 2012). This study observed that for plastic cutting boards counts aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* were superior when compared to wood. Studies address bacterial adhesion on wooden boards to woody matrix and elements of xylem vegetative tissue (Abrishami et al., 1994 & Ak et al., 1994) and highlight the efficient recovery of viable bacteria on plastic cutting boards, when compared to wooden boards, after vigorous rinsing, consistent with the concept that because wood is porous and absorbent it will retain more bacteria than plastic.

The properties of cutting boards such as hydrophobicity, electrostatic charge, roughness of the interface and topography, affect the adhesion and presence of microorganisms, in addition to the general state of surface hygiene (Araújo et al., 2010; Tang et al., 2011). This study observed

that wooden boards with shorter use time (0 to 1 year and 1 year to 2 years) presented higher counts for aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae*, when compared to plastic boards. The length of time use cutting boards can contribute to the adhesion and presence of microorganisms, irregularities can negatively influence cleaning capacity and increase susceptibility to bacterial adhesion, resulting from the interaction of forces, including Van der Waals, electrostatic and hydrophobic interactions, making treatment with sanitizers and removal and/or inactivation of microorganisms difficult (Beltrame et al., 2014; Abrishami et al., 1994).

The study also observed the presence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* with no differences between wooden and plastic boards. The presence of bacteria on cutting board surfaces can lead to the transmission of bacteria to food and cause foodborne illness. *Listeria monocytogenes* is recognized as a cross-contaminant on kitchen cutting boards, as it can be transmitted through food. Goh et al. (2014) evaluating the transfer of *L. monocytogenes* from plastic and wooden boards, in a simulated scenario, concluded that this microorganism successfully fixed on plastic and wooden boards, serving as cross-contamination when handling ready-to-eat foods. Kennedy et al. (2011), studying determinants of cross-contamination during food preparation in homes, found *E. coli* isolated from food manipulated on cutting boards, when the same surface was used to handle meat and vegetables.

Scanning electron microscopy (SEM) assessments this study reveals the presence of microorganisms in the deep cracks marks present in the utensil, suggesting that the wear of the cutting boards evaluated may have favored the permanence of microorganisms in these locations, with characteristic EPS matrix structures of biofilms. Dantas et al. (2018) observed the formation of biofilms on wooden boards (60%), plastic (40%) and glass (10%), demonstrating that bacteria adhered more to a hydrophobic material. Rayner et al. (2004) suggests the permanence of microorganisms on cutting boards and biofilms, showing that biofilms may be important for the prevalence of microorganisms in this utensil. Carpentier, (1997) also highlights in his review the role of deep cracks in cutting boards, providing a suitable environment for the survival of microorganisms.

Conclusion

As shown in this study cutting boards can be potential vehicles for the presence of microorganisms in the domestic environment, regardless of the material of the boards, observed by the presence of microorganisms frequently involved in cases of foodborne illnesses. The study highlights the importance of hygienic-sanitary conditions when handling raw foods before preparation, as well as the frequent replacement of boards when they show deep cracks, providing a suitable environment for microbial adhesion, contributing with information about the profile of handlers in the use of cutting boards in homes and factors involved in cross-contamination processes, in a natural scenario of use of the utensil.

Funding

This study was carried out

with funding from the Public Health Food Service Laboratory of the State University of São Paulo, UNESP, and partially funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

Declaration of competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Declaration of generative AI in scientific writing

The authors declare that no artificial intelligence was used in the preparation of this paper.

Acknowledgments

We would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil for providing a scholarship to the first author (CAPES, Brasília, DF, Brazil – Code 001).

References

- Abrishami, S. H., Tall, B. D., Bruursema, T. J., Epstein, P. S., & Shah, D. B. (1994). Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces. *Journal of Food Safety*, 14(2), 153-172. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1994.tb00591.x>
- Ak, N. O., Cliver, D.O., Kaspar, C.W. (1994). Decontamination of plastic and wooden cutting boards for kitchen use. *Journal of Food Protection* 57(1): 23–30. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-57.1.23>
- Alvarez-Ordóñez, A. et al. Annual Review of Food Science and Technology Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, v. 10, p. 173–195, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30653351/>
- Alves, Â., Santos-Ferreira, N., Magalhães, R., Ferreira, V., & Teixeira, P. (2022). From chicken to salad: Cooking salt as a potential vehicle of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cross-contamination. *Food Control*, 137, 108959. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108959>
- Amoah, P., Drechsel, P., Abaidoo, R.C., Klutse, A. (2007). Effectiveness of common and improved sanitary washing methods in selected cities of West Africa for the reduction of coliform bacteria and helminth eggs on vegetables. *Tropical Medicine and International Health* 12(SUPPL. 2): 40–50. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01940.x>
- Araújo, E.A., de Andrade, N.J., da Silva, L.H.M., de Carvalho, A.F., Silva, C.A.S., Ramos, A.M. (2010). Control of Microbial Adhesion as a Strategy for Food and Bioprocess Technology. *Food Bioprocess Technol*, 3, 321–332. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0290-z>
- Aviat, F., Le Bayon, I., Federighi, M., & Montibus, M. (2020). Comparative study of microbiological transfer from four materials used in direct contact with apples. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108780. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108780>
- Beltrame, C. A., Martelo, E. B., Mesquita, R. A., Barbosa, J., Steffens, C., Toniazzi, G., Valduga, E., T., & Cansian, R. L. (2015). Adhesion of *Listeria monocytogenes* to cutting board surfaces and removal by different sanitizers. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(1), 41-47. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-014-0923-7>
- Cardoso, M. J., Ferreira, V., Truninger, M., Maia, R., & Teixeira, P. (2021). Cross-contamination events of *Campylobacter* spp. in domestic kitchens associated with consumer handling practices of raw poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108984>
- Carpentier, B. (1997). Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study *Food Microbiology*, 14 (1), 31-37. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002096900611>
- Chen, J. & Griffiths, M.W. (1998). PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in Applied Microbiology* 27(6): 369–71. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1998.00445.x>
- Cogan, T. A., Slader, J., Bloomfield, S.F. & Humphrey, T.J. (2002). Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 885–892. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01598.x>

- Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Aravena, A., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., Figueroa, G., González, M., Latorre, M., & Reyes-Jara, A. (2016). Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00229>
- Dantas, S.T., Rossi, B.F., Bonsaglia, E.C.R., Castilho, I.G., Hernandez, R.T., Júnior, A.F. & Rall, V.L.M. (2018). Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* on Various Cutting Boards. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(2), 81–85. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2341>
- De Oliveira, D. C. V. et al. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 11, n. 6, p. 478–483, 1 jun. 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24720488/>
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
- FAO. (2022). *Food safety and quality - Background: FAO's work on food safety and quality*. <http://www.Fao.Org/Food-Safety/Background/En>
- Flemming, H. C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n.9, p.623-633, set. 2010. <https://www.nature.com/articles/nrmicro2415>
- Freitas, J. F., Calazans, D. L. M. S., Alchieri, J.C. (2014). Food handlers' occupational and professional training characterization. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(6), 1000325. <http://doi.org/10.4172/2155-9600.1000325>
- Frewer, L. J., Shepherd, R., & Sparks, P. (1994). The interrelationship between perceived knowledge, control and risk associated with a range of food-related hazards targeted at the individual, Other people and society. *Journal of Food Safety*, 14(1), 19-40. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1994.tb00581.x>
- Goh, S. G., Leili, A., Kuan, C. H., Loo, Y. Y., Lye, Y. L., Chang, W. S., Soopna, P., Najwa, M. S., Tang, J. Y. H., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., & Son, R. (2014). Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. *Food Control*, 37, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.030>
- Gong, S., Wang, X., Yang, Y., & Bai, L. (2016). Knowledge of food safety and handling in households: A survey of food handlers in Mainland China. *Food Control*, 64, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.006>
- Gorman, R., Bloomfield, S., & Adley, C. C. (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 143-150. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00028-4)
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO 16649-2:2001. International Organization for Standardization. Geneva: 2001.

- ISO. International Organization for Standardization. Meat and meat products — Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. ISO 13720:2010 (E). International Organization for Standardization. Geneva: 2010.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms—Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. ISO 4833-1:2013(E). International Organization for Standardization. Geneva: 2013.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. ISO 11290-1:2017. International Organization for Standardization. Geneva: 2017.
- Kennedy, J., Nolan, A., Gibney, S., O'Brien, S., McMahon, M.A.S., McKenzie, K., Healy, B., McDowell, D., Fanning, S., Wall, P.G. (2011). Determinants of cross-contamination during home food preparation. *British Food Journal* 113(2): 280–97.
<http://dx.doi.org/10.1108/00070701111105349>
- Kornacki, J.L., Gurtler, J.B. & Stawick, B.A. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. (2015). In: Salfinger, Y. & Tortorello, M.L., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed, Chapter 9, pp.103-120. Washington, DC: American Public Health Association (APHA).
<https://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/MBEF.0222.014>
- Kusumaningrum, H., Riboldi, G., Hazeleger, W., & Beumer, R. (2003a). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. International. *Journal of Food Microbiology*, 85(3), 227-236. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00540-8)
- Moore, G., Blair, I. S. & McDowell, D. A. (2007). Recovery and Transfer of *Salmonella Typhimurium* from Four Different Domestic Food Contact Surfaces. *Journal of Food Protection*, 70(10), 2273-2280. <http://doi.org/10.4315/0362-028x-70.10.2273>
- Okpala, C.O.R. & Ezeonu, I.M. (2019). Food Hygiene/Microbiological Safety in the Typical Household Kitchen: Some Basic ‘Must Knows’ for the General Public, *J Pure Appl Microbiol.*, 13(2): 697-713 <https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.2.06>
- Possas, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R., & Valero, A. (2017). Models of microbial cross-contamination dynamics. *Current Opinion in Food Science*, 14, 43-49.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.006>
- Ravishankar, S., Zhu, L., & Jaroni, D. (2010). Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiology*, 27(6), 791-794. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.011>
- Rayner, J., Veeh, R., & Flood, J. (2004). Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 29-39.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.019>
- Sekoai, P. T., Feng, S., Zhou, W., Ngan, W.Y., Pu, Y., Yao, Y., Pan, J. & Habimana, O. (2020). Insights into the microbiological safety of wooden cutting boards used for meat processing in Hong Kong’s wet markets: A focus on food-contact surfaces, cross-contamination and the efficacy of traditional hygiene practices. *Microorganisms. Food Microbiology*, 8(4).
<http://doi.org/10.3390/microorganisms8040579>

- Singh, S. et al. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 140, 1 dez. 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34557983/>
- Soares, V. M., Pereira, J. G., Viana, C., Izidoro, T. B., Bersot, L. D. S., & Pinto, J. P. D. A. N. (2012). Transfer of *Salmonella Enteritidis* to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. *Food Microbiology*, 30(2), 453-456. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.028>
- Ssemenda, J. N., Joosten, H., Bagabe, M. C., Zwietering, M. H., & Reij, M. W. (2018). Reduction of microbial counts during kitchen scale washing and sanitization of salad vegetables. *Food Control*, 85, 495-503. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.004>
- Tang, L., Pillai, S., Revsbech, N.P., Schramm, A., Bischoff, C., Meyer, R.L. (2011). Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling*. 27(1):111-21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21181571/>
- Tomičić, R., Tomićić, Z., Thaler, N., Humar, N. & Raspor, P. (2020). Factors influencing adhesion of bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and yeast *Pichia membranifaciens* to wooden surfaces. *Wood Sci Technol* 54, 1663–1676. <https://doi.org/10.1007/s00226-020-01222-0>
- Yap, L., Francis, S. L., Shelley, M., Lillehoj, C., Montgomery, D., & Winham, D. M. (2016). Risky Food Handling Practices among Community-Residing Older Adults. *The FASEB Journal*, 30,674-7. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.674.7
- Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałęcka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085>

CAPÍTULO III

Caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte do ambiente doméstico: Pesquisa de genes de virulência e formação de biofilmes, capacidade de adesão e perfil de resistência a antibióticos e sanitizantes

Artigo a ser enviado a revista *Food Microbiology* - ISSN: 0740-0020

Caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte do ambiente doméstico: Pesquisa de genes de virulência e biofilmes, capacidade de adesão e perfil fenotípico de resistência a antibióticos e sanitizantes

Janaina Prieto de Oliveira¹, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos¹, Leonardo Ereno Tadielo¹, Dionice Capistrano da Silva¹, Aryele Nunes da Cruz Encide Sampaio¹, Fábio Sossai Possebon^{1,2}, Juliano Gonçalves Pereira¹

¹*Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*

²*Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*

*Autor correspondente: e-mail: juliano.pereira@unesp.br

Resumo

Os microrganismos podem sobreviver em uma ampla gama de nichos potenciais e se adaptarem a hospedeiros alternativos, ampliar sua capacidade de adquirir novos determinantes tanto em termos de virulência quanto de resistência. O estudo objetivou avaliar a presença de genes de virulência e genes envolvidos na produção biofilmes, capacidade de adesão e perfil fenotípico de resistência a antibióticos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico. Um total de 16 isolados de *L. monocytogenes* e 15 *E. coli* foram avaliadas. Para *L. monocytogenes* as reações foram preparadas para pesquisa dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA* e genes envolvidos na formação de biofilmes *prfA*, *flaA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *luxS*. Para *E. coli* foram pesquisados os genes de virulência *int 1*, *stx1* e *stx2* e os genes de biofilmes *wcaA*, *wza* e *luxS*. A avaliação da capacidade de adesão dos isolados foi verificada em placas de poliestireno e o perfil de resistência a antibióticos utilizou o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), com confirmação de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) para *E. coli*. A avaliação de resistência a sanitizantes testou quatro produtos comerciais com os respectivos princípio ativo, Hipoclorito de sódio 2% a 2,5% p/p/ a 0,28%; Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio a 0,28%; Cloreto de Benzalcônio a 0,52% e Lauril Éter Sulfato de Sódio e Linear Aquil Benzeno Sulfonato de Sódio 20,7% p/pv, levando em consideração a indicação de uso do fabricante. A caracterização dos isolados de *L. monocytogenes* e *E. coli* demonstrou a presença de genes de virulência e genes envolvidos na produção de biofilmes. A capacidade de adesão foi classificada como fracamente aderente e o perfil de resistência dos isolados revelou um cenário de multirresistência para as classes testadas, com 60% das *E. coli* apresentando produção de ESBL. Os sanitizantes comerciais avaliados foram eficientes no controle de *L. monocytogenes* e *E. coli*, seguindo a indicação de uso do fabricante. O estudo observou a presença de fatores genéticos e características fenotípicas de *L. monocytogenes* e *E. coli* isoladas do ambiente doméstico de interesse em saúde pública, no controle e tratamento de doenças de origem alimentar, destacando a importância dos processos higiênico-sanitários no uso de tábuas de corte no preparo de alimentos em residências.

Palavras-chave: Biofilmes, ESBL, MDR, Desinfecção, Superfícies

1. Introdução

Muitos casos de surtos alimentares são originários do ambiente doméstico e pode estar associado ao manuseio inadequado de alimentos e condutas de higienização ineficaz (Alves et al., 2022; Haysom and Sharp, 2005). Geralmente o desenvolvimento de uma doença de origem alimentar se deve a condições específicas, como a virulência do microrganismo presente, a carga microbiana no alimento e as condições do sistema imunológico do hospedeiro (Gallo et al., 2020).

Uma vez introduzidos estes patógenos podem crescer ou simplesmente persistir em uma superfície e ficarem cercados por material de biofilme, proveniente do crescimento de não patógenos, permanecendo no ambiente (Rayner et al., 2004). As propriedades emergentes dos biofilmes são a razão para o sucesso evolutivo dos mesmos e fundamentam seu papel como formadores de habitat global (Rumbaugh and Sauer, 2020).

A maioria dos relatos na literatura sobre habitats tais como tábuas de corte simulam o potencial de transferência de microrganismos para alimentos através da inoculação artificial de culturas patogênicas, sugerindo que áreas de superfície com alta exposição repetida à umidade e nutrientes são habitats ideais para a concentração, crescimento e disseminação de bactérias (Rayner et al., 2004).

As características de um organismo e seu ambiente circundante estão entre os fatores importantes que podem afetar sua sobrevivência, permitindo a persistência de células bacterianas em diferentes tipos de tábuas devido a maior resistência ao meio, estresse ambiental e a produtos químicos utilizados nos processos de higienização (Kumar et al., 2017; Rabin et al., 2015; Rayner et al., 2004).

A emergência de microrganismos resistentes seja por mutações ou pela aquisição de elementos genéticos móveis, portadores de genes de resistência e virulência, pode ocorrer independentemente da presença de agentes é a exposição a esses agentes que fornece a pressão seletiva necessária para o surgimento e disseminação de patógenos resistentes (Caniça et al., 2019; Thanner et al., 2016).

As estratégias evolutivas de resistência antimicrobiana de bactérias, especialmente patógenos de origem alimentar, que incluem impermeabilidade celular, mutação no local alvo, efluxo de drogas e inativação de drogas, resultaram em um grande desafio devido ao surgimento de bactérias altamente resistentes a diferentes antimicrobianos nos últimos anos (Lavilla Lerma et al., 2013; Thanner et al., 2016).

A disseminação de genes de resistência para humanos via alimento é documentada em diferentes alimentos (Caniça et al., 2019; De Been et al., 2014; Koch et al., 2017). O fato de microrganismos resistentes poderem sobreviver em uma ampla gama de nichos potenciais e se adaptarem a hospedeiros alternativos é preocupante, o que pode ampliar sua capacidade de adquirir novos determinantes tanto em termos de virulência quanto de resistência, mantendo simultaneamente sua aptidão (Da Costa et al., 2013).

O conhecimento de sistemas e testes desinfetantes para alvos microbianos ganhou relevância no ambiente doméstico no controle de microrganismos (Cogan et al., 2002; Devere and Purchase, 2007; Djebbi-Simmons et al., 2019; Medrano-Félix et al., 2011; Rutala et al., 2000). Vários produtos estão disponíveis comercialmente atuando contra uma variedade de microrganismo, sugerindo eficácia que incluem ação em biofilmes e patógenos (Djebbi-Simmons et al., 2019; Fagerlund et al., 2017; Lineback et al., 2018; Møretrø et al., 2009).

Estes estudos podem não refletir com fidelidade as características dos patógenos encontrados rotineiramente no ambiente doméstico e a eficácia de produtos pode não estar sendo desafiada com representatividade. Uma multiplicidade de parâmetros como o tempo de uso da tábua, desgaste, umidade, exposição, potencial de absorção, tipo de material e forma de higienização são fatores importantes para determinar a persistência e evolução de microrganismos em tábuas de corte (Møretrø et al., 2012; Possas et al., 2017b; Rayner et al., 2004).

Dada a importância do assunto o estudo teve como objetivo pesquisar genes de virulência e biofilmes, avaliar a capacidade de adesão, perfil de resistência a antibióticos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico utilizadas no ambiente doméstico.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos isolados de Listeria monocytogenes e Escherichia coli

Os isolados utilizados neste trabalho foram provenientes de tábuas de corte de madeira e plástico, naturalmente contaminadas, obtidas em ambiente domiciliar. Um número amostral de 100 tábuas sendo madeira (n=50) e plástico (n=50) utilizadas em cozinhas de residências, foram coletas para a avaliação microbiológica. A remoção das bactérias aderidas às tábuas foi conduzida através da retirada de fragmentos de 44 mm de

diâmetro das porções centrais e periféricas das tábuas, os fragmentos foram acondicionados em sacos plásticos estéreis 3M™ (11 x 30 cm) contendo caldo de pré-enriquecimento.

Para a remoção dos microrganismos foi utilizado banho-ultrassônico conjugado, modelo Solidstead® (Piracicaba, Brasil) de 25khz contendo água destilada em sua cuba de depósito em temperatura ambiente, os sacos plásticos contendo o líquido e a amostra eram fechados e dispostos horizontalmente no banho ultrassônico, distribuídos em ambas as bordas do equipamento, as amostras eram sonicadas durante 20 minutos, permitindo assim a passagem de ondas de frequência, gerando cavitações e promovendo a remoção dos microrganismos aderidos aos fragmentos.

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada com base na ISO 11290-1: 2017 (ISO, 2017). As colônias que apresentaram morfologia e características fenotípicas para *Listerias* spp. foram submetidos a um protocolo de PCR multiplex para sorotipagem, visando genes *prs*, *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819* e *ORF2110* (Doumith et al. 2004). Para *Escherichia coli* a detecção foi realizada com base na ISO 16649-2: 2001 (ISO, 2001), a confirmação molecular (gênero e espécie) foi por PCR, visando o gene *uspA* de acordo com o protocolo descrito por (Chen; Griffiths, 1998).

2.2 Caracterização molecular para genes de virulência e formação de biofilmes de *L. monocytogenes*

As reações foram preparadas para avaliar a presença de genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA*) e genes relacionados a formação de biofilmes (*prfA*, *flaA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *luxS*). As reações compreenderam um volume final de 25 µl envolvendo 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix 2x Promega®, 1,0 µl de cada primer forward e 1,0 µl de cada primer reverse (1 pmol), 6,5 µl de Nuclease-free water - Promega® e 4 µl de DNA extraído. A incubação foi realizada em um Thermo Cycler T100 - Bio-Rod®. Uma cultura de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi usada como controle positivo e Nuclease-free water Promega® como controle negativo. A eletroforese foi realizada para caracterização molecular com intercalante Safedye Nucleic Acid Stain 1000 pb Cellco Biotech® e gel de agarose Sigma Aldrich™ 2,0% (p/v) visualizados em transiluminador de Led K33-333 Kasvi®. Sequências de primers, condições de PCR e tamanhos dos produtos são detalhados no Quadro 2 (Anexo).

2.3 Caracterização molecular para genes de virulência e formação de biofilmes de *Escherichia coli*

As reações foram preparadas para avaliar a presença de genes de virulência (*int 1*, *stx1* e *stx2*). Para *stx1* e *stx2* as reações compreenderam um volume final de 25 µl envolvendo 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix 2x Promega® 1,0 µl de cada primer forward e 1,0 µl de cada primer reverse (1 pmol), 3,5 µl de Nuclease-free water - Promega® e 5 µl de DNA extraído e, a reação para *int 1* compreendeu um volume final de 25 µl envolvendo 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix 2x Promega®, 1,25 µl de cada primer forward e 1,25 µl de cada primer reverse (1 pmol), 5,0 µl de Nuclease-free water - Promega® e 5 µl de DNA extraído. Para os genes relacionados a formação de biofilmes (*wcaA*, *wza* e *luxS*), as reações compreenderam um volume final de 25 µl envolvendo 12,5 µl de GoTaq Cellco Biotech® 1,0 µl de cada primer forward e 1,0 µl de cada primer reverse (1 pmol), 5,5 µl de Nuclease-free water - Promega® e 5 µl de DNA extraído. A incubação foi realizada em um Thermo Cycler T100 - Bio-Rod®. Uma cultura de *E. coli* ATCC 8739 foi usada como controle positivo e Nuclease-free water Promega®) como controle negativo. A eletroforese foi realizada para caracterização molecular com intercalante Safedye Nucleic Acid Stain 1000 pb Cellco Biotech® e gel de agarose Sigma Aldrich™ 1,5% (p/v) visualizados em transiluminador de Led K33-333 Kasvi®. Sequências de primers, condições de PCR e tamanhos dos produtos são detalhados no Quadro 2 (Anexo).

2.4 Potencial de adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

Os isolados de *L. monocytogenes* (n=16) e *Escherichia coli* (n=15) foram submetidos a um ensaio fenotípico para avaliar seu potencial de produção de biofilmes e adesão em microplacas de poliestireno segundo Stepanović et al. (2000), com algumas modificações. Os isolados de *L. monocytogenes* foram cultivados em caldo Tryptic Soy Broth – TSB Oxoid™ suplementado com 0,6% de Yeast Extract – YE Oxoid™ e os de *E. coli* foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion - BHI Oxoid™, incubados a 36 ± 1 °C por até 24 horas.

Após esse período os caldos das culturas foram diluídos até atingir aproximadamente 10⁸ UFC/mL correspondendo a 0,5 da escala de McFarland. Alíquotas triplicadas 200µl

de cada suspensão bacteriana foram transferidas para três poços de microplacas de poliestireno de 96 poços com tampa e fundo plano Nest Scientific® (Nova Jersey, Estados Unidos) incubados a 36 ± 1 °C por até 24 horas. Após o período de incubação as microplacas foram lavadas com solução salina tamponado com fosfato de pH 7,2 – PBS (250µl/poço) para remover as células bacterianas sésseis e fixadas com 200µl metanol a 99% Synth® (São Paulo, Brasil) por 15 minutos, submetidas a secagem em temperatura ambiente.

Em seguida, as células bacterianas fixadas foram coradas com 200µl de cristal violeta 1% Synth® por 15 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção do corante, deixadas em temperatura ambiente para secagem. Para a leitura, foram adicionados 160µl por poço de álcool etílico 99% Synth®. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida ($\lambda = 595$ nm) em um leitor de microplaca Multiskan MS 352 LabSystems™ (Massachusetts, Estados Unidos). Para cada placa de micro-titulação preparada três poços foram inoculados como controle negativo, para os controles positivos foram utilizados *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 8739.

A classificação de adesão dos isolados foi realizada com base na avaliação da absorbância do valor de densidade óptica da amostra (DOa) comparado com a média da absorbância dos controles negativos, acrescidos de três vezes o desvio padrão da densidade óptica do controle (DOcn). Para determinar o grau de adesão foi utilizado a seguinte classificação: não aderente ($DOa \leq DOcn$); fracamente aderente ($DOcn < DOa \leq 2xDOcn$); moderadamente aderente ($2xDOcn < DOa \leq 4xDOcn$) e fortemente aderente ($4xDOcn < DOa$) de acordo com Stepanović et al. (2000), todos os testes foram realizados em duas repetições e os resultados expressos em média.

2.5 Resistência aos antibióticos de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

Para a identificação de resistência aos antibióticos foi realizado o método de disco-difusão em ágar, com a escolha dos antimicrobianos e concentrações baseadas no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Os isolados com perfil de resistência intermediário foram considerados resistentes. Cepas com resistência a três ou mais classes simultaneamente foi considerada multirresistente (MDR) (Magiorakos et al., 2011).

A detecção e confirmação de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) para *E. coli* seguiu a triagem com os isolados que apresentaram halos de inibição menores que 22 mm para CAZ (ceftazidima) - 30 µg e 20 mm para CTX (cefotaxima) - 30 µg, submetidos ao Teste de Sinergismo de Disco Duplo. Isolados que apresentaram alargamento do halo de inibição as cefalosporina testadas (cefotaxima 30 µg, ceftazidima 30 µg e cefepima 30 µg) em direção amoxicilina com ácido clavulânico 30 µg, foram estabelecidos como positivos para produção de ESBL.

Um painel de onze antibióticos de nove classes foram avaliados para *L. monocytogenes* (n=16) sendo: 1) β-lactâmicos: Penicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg) e Amoxi+clavulanato (30 µg), 2) Aminoglicosídeos: Gentamicina (10 µg), 3) Fenicol: Cloranfenicol (30 µg), 4) Inibidores da via do folato: Sulfa+Trimetopim (25 µg), 5) Tetraciclina: Tetraciclina (30 µg), 6) Glicosaminas: Clindamicina (2 µg), 7) Ansamicinas; Rifampicina (5 µg), 8) Macrolídeos: Eritromicina (15 µg), 9) Glicopeptídeos: Vancomicina (30 µg).

Para *Escherichia coli* (n=15) foram utilizados onze antibióticos de oito classes sendo: 1) β-lactâmicos: Ampicilina (10 µg), Amoxicilina (10 µg), 2) Carbapenemico: Imipenem (10 µg), 3) Cefalosporinas: Cefotaxima (30 µg), Ceftadizima (30 µg). 4) Fenicol: Cloranfenicol (30 µg), 5) Quinolonas: Ciprofloxacina (5 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg); 6) Aminoglicosídeos: Gentamicina (10 µg), 7) Inibidores da vida do folato: Sulfa+Trimetopim (25 µg) e 8) Tetraciclina: Tetraciclina (30 µg).

2.6 Resistência aos sanitizantes de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

O perfil de resistência aos sanitizantes de *L. monocytogenes* (n=16) e *Escherichia coli* (n=15) utilizou quatro produtos comerciais. O princípio ativo, tempo de ação e indicação na higienização de superfícies são apresentados no Quadro 1.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram cultivados em caldo Tryptic soy Broth – TSB Oxoid™ suplementado com 0,6% de Yeast Extract – YE Oxoid™, para *E. coli* foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion - BHI Oxoid™. Os isolados eram incubados a 36 ± 1 °C por até 24 horas com posterior padronização da turbidez em tubos contendo solução salina - NaCl a 0,85% (p/v), utilizando a escala McFarland para a obtenção de suspensões bacterianas correspondendo a $0,5 (10^8 \text{ UFC/mL})$.

A partir da padronização de 10^8 UFC/mL novas diluições seriadas foram realizadas em tubos de 9 ml contendo solução salina - NaCl a 0,85% (p/v) até a obtenção 10^3

UFC/mL. Alíquotas triplicadas 1000 µl de cada suspensão bacteriana foram transferidas para microplacas de poliestireno de 12 poços com tampa e fundo plano Nest Scientific®, contendo 1000 µl de cada sanitizante (S1,S2,S3 e S4) distribuídos verticalmente. Após a homogeneização e período de ação (indicação do fabricante) uma alíquota de 1000 µl da mistura (v/v) era plaqueado por profundidade (*pour plate*) em ágar padrão para contagem – PCA - Oxoid™. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C por 72 h, as colônias enumeradas e os resultados apresentados como log unidades formadoras de colônias por ml (log UFC/ml).

Quadro 1

Sanitizantes utilizados na avaliação do perfil de resistência de *L. monocytogenes* e *E. coli* isoladas de tábuas de corte, princípio ativo, tempo de ação e forma de utilização de acordo com a indicação do fabricante.

Sanitizante	Princípio ativo	Tempo ação/min	Indicação
S1	Hipoclorito de sódio 2% a 2,5% p/p; 0,28%	10	Contato direto
S2	0,28% de Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio	5	Contato direto
S3	Cloreto de Benzalcônio 0,52% p/p	5	Contato direto
S4	Lauril Éter Sulfato de Sódio e Linear Aquil Benzeno Sulfonato de Sódio 20,7% p/p	5	Contato direto

3. Resultados

Os isolados de *L. monocytogenes* (n=16) foram provenientes de três tábuas de corte, sendo uma de madeira com 5 isolados e duas de plástico com 11 isolados. Quatro isolados oriundos de tábuas de madeira foram classificados como do sorotipo 1/2a e um do sorotipo 4b; Para as tábuas de plástico oito isolados foram classificados como do sorotipo 1/2b e 3 como do sorotipo 4b. Os isolados de *Escherichia coli* (n=15) foram provenientes de cinco tábuas de corte, sendo três de madeira com 9 isolados e duas de plástico com 6 isolados, confirmados para genes *uspA* gênero/espécie como descrito na Tabela 1.

A avaliação global dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA*, *actA* pesquisados para *L. monocytogenes* demonstrou um percentual de 96% de isolados positivos oriundos de tábuas de corte de plástico e 84% para isolados oriundos de tábuas de madeira. Para a pesquisa de genes envolvidos na produção de biofilmes *prfA*, *flaA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *luxS* observamos em média 91% de positividade para os isolados oriundos de tábuas de plástico e 94% para isolados de tábuas de madeira, como descrito no Quadro 2.

A avaliação global dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *int1* pesquisados para *E. coli* demonstrou um percentual de 22% de isolados positivos oriundos de tábuas de corte de plástico e 3,6% para isolados oriundos de tabuas de madeira. Para a pesquisa de genes envolvidos na produção de biofilmes *wcaA*, *wza* e *luxS* observamos em média 100% de positividade para os isolados oriundos de tábuas de plástico e 92,6% para isolados de tábuas de madeira, como descrito no Quadro 3.

A caracterização da adesão 12% (2/16) dos isolados de *L. monocytogenes* foram caracterizados como não aderente e 87% (14/16) como fracamente aderente. Para *E. coli* observamos 13% (2/15) dos isolados não aderentes e 86% (13/15) classificados como fracamente aderentes (Tabela 2).

As frequências de isolados de *L. monocytogenes* e *E. coli* que apresentaram resistência aos antibióticos testados no teste de disco-difusão são apresentadas na Tabela 3. Para *L. monocytogenes* observamos um percentual de 37% (6/16) dos isolados oferecendo resistência para três ou mais classes de grupos de antimicrobianos avaliados. Para *E. coli* observamos 86% (13/15) dos isolados apresentando resistência para três ou mais classes. Dos isolados de *E. coli* avaliados 60% (9/15) foram produtores de enzima ESBLs (β -lactamases de espectro estendido).

Os sanitizantes avaliados demonstraram ser eficientes no controle de *L. monocytogenes* e *E. coli* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico, com redução em log UFC/ml (Figura 1 e 2).

Tabela 1

Sorotipificação dos isolados de *L. monocytogenes* e confirmação de gênero e espécie de *Escherichia coli* isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

Isolado	Tábua	Gene alvo	Sorogrupo	Sorotipo	Resultado
<i>L. monocytogenes</i> (n=16)					
<i>L. monocytogenes</i> (n=4)	madeira	<i>lmo0737</i>	Sorogrupo 1	1/2a	+
<i>L. monocytogenes</i> (n=0)	-	<i>lmo0737</i> + <i>lmo1118</i>	Sorogrupo 2	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (n=8)	plástico	<i>ORF2819</i>	Sorogrupo 3	1/2b	+
<i>L. monocytogenes</i> (n=1)	madeira	<i>ORF2819</i> + <i>ORF2110</i>	Sorogrupo 4	4b	+
<i>L. monocytogenes</i> (n=3)	plástico	<i>ORF2819</i> + <i>ORF2110</i>	Sorogrupo 4	4b	+
<i>Escherichia coli</i> (=15)					
<i>Escherichia coli</i> (=6)	plástico	<i>uspA</i>	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> (=9)	madeira	<i>uspA</i>	-	-	+

Quadro 2

Pesquisa de genes de virulência e de formação de biofilmes para *L. monocytogenes* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

<i>L. monocytogenes</i> Total Geral (n=16)	Material	Total <i>L. monocytogenes</i>	Gene alvo pesquisado	Resultado +	Valores %
Tábuas					
2 1	plástico madeira	11 5	inlA	11 4	100% 80%
2 1	plástico madeira	11 5	inlB	9 4	82% 80%
2 1	plástico madeira	11 5	inlC	11 4	100% 80%
2 1	plástico madeira	11 5	hlyA	11 5	100% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	actA	11 4	100% 80%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>prfA</i>	11 5	100% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>flaA</i>	9 4	82% 80%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>agrA</i>	10 5	91% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>agrB</i>	10 5	91% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>agrC</i>	10 5	91% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>agrD</i>	10 5	91% 100%
2 1	plástico madeira	11 5	<i>luxS</i>	10 4	91% 80%

Quadro 3

Pesquisa de genes de virulência e de formação de biofilmes para *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

<i>Escherichia coli</i> Total Geral (n=15)	Material	Total <i>Escherichia coli</i>	Gene alvo pesquisado	Resultados	Valores %
Tábuas					
2 3	plástico madeira	6 9	<i>stx1</i>	3 0	50% 0%
2 3	plástico madeira	6 9	<i>stx2</i>	0 1	0% 11%
2 3	plástico madeira	6 9	<i>intl1</i>	1 0	17% 0%
2 3	plástico madeira	6 9	<i>wcaA</i>	6 7	100% 78%
2 3	plástico madeira	6 9	<i>wza</i>	6 9	100% 100%
2 3	plástico madeira	6 9	<i>luxS</i>	6 9	100% 100%

Tabela 2

Perfil da capacidade de adesão de *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

Isolados	Tábua	Nº de isolados mostrando			
		Não aderência (+)	Fraca aderência (++)	Moderado aderência (+++)	Forte aderência
<i>L. monocytogenes</i> (n=16)	plástico (n=11)	2	9	0	0
	madeira (n=5)	0	5	0	0
<i>Escherichia coli</i> (n=15)	plástico (n=6)	2	4	0	0
	madeira (n=9)	0	9	0	0

Tabela 3

Perfil de resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico

Isolados	nº de isolados <i>L. monocytogenes</i> (n=16)	Tábua	Resistência	
			Perfil	nº classes
<i>L. monocytogenes</i> 4b	2	Plástico	PEN+TET+CLI	3
<i>L. monocytogenes</i> 4b	1	Plástico	PEN+CLI+RIF+ERI	4
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	1	Plástico	PEN+CLI+ERI	3
<i>L. monocytogenes</i> 4b	1	Madeira	PEN+GEN+CLI+RIF+ERI+VAN	6
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	1	Madeira	PEN+AMP+GEN+CLO+TET+CLI+RIF+ERI	7
<i>Escherichia coli</i>(n=15)				
<i>Escherichia coli</i>	1	Plástico	AMP+AMO+CLO+CIP+NAL+SUT+TET	6
<i>Escherichia coli</i>	1*	Plástico	AMP+AMO+IPM+CTX+CAZ+CIP+NAL+GEN+TET	7
<i>Escherichia coli</i>	2	plástico/madeira	AMP+AMO+CIP+TET	3
<i>Escherichia coli</i>	1*	Plástico	AMP+IPM+CAZ+CIP+TET	5
<i>Escherichia coli</i>	1*	Plástico	AMP+AMO+IPM+CTX+CAZ+NAL+GEN+TET	6
<i>Escherichia coli</i>	1*	Madeira	AMP+AMO+CTX+CTZ+CIP+NAL+SUT+TET	6
<i>Escherichia coli</i>	3*	Madeira	AMP+AMO+IPM+CTX+CAZ+CLO+CIP+NAL+GEN+TET	8
<i>Escherichia coli</i>	2*	Madeira	AMP+AMO+CTX+CAZ+CIP+NAL+TET	5
<i>Escherichia coli</i>	1	Madeira	AMP+AMO+NAL+TET	3

*Foram produtoras de enzima ESBLs (β -lactamases de espectro estendido)

Figura 1- Enumeração de *L. monocytogenes* antes a depois do tratamento com sanitizantes

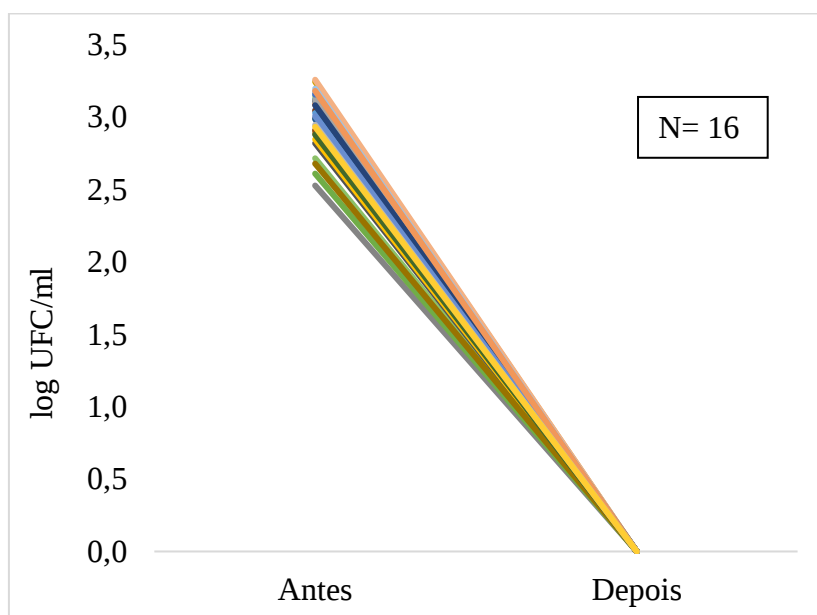
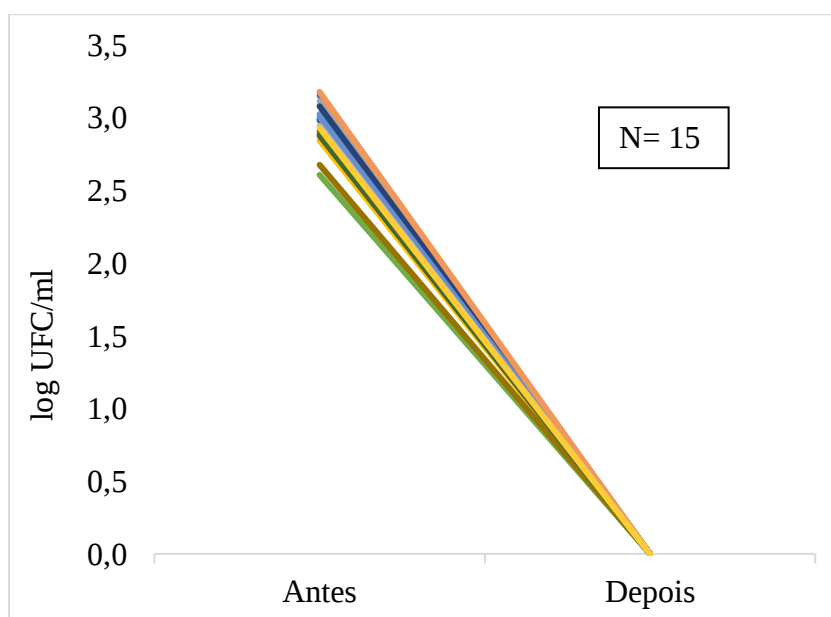


Figura 2- Enumeração de *E. coli* antes a depois do tratamento com sanitizantes



4. Discussão

Muitos casos de surtos alimentares são originários do ambiente doméstico e podem estar associado ao manuseio inadequado de alimentos, utensílios e condutas de higienização ineficaz (Alves et al., 2022; Haysom and Sharp, 2005). Uma vez introduzidos os patógenos podem crescer em superfícies e persistir, desenvolver mecanismos de sobrevivência como grau de aderência e formação de biofilme, resistência por mutações ou pela aquisição de elementos genéticos móveis (Caniça et al., 2019; Rayner et al., 2004; Thanner et al., 2016).

L. monocytogenes e *Escherichia coli* podem estar associados a surtos de origem alimentar em todo o mundo (Lee and Yoon, 2021) e a presença dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios é um problema de saúde pública, pois esses sorotipos estão frequentemente associados a surtos e casos de listeriose humana (Korsak et al., 2012; Orsi et al., 2011).

O estudo observou a presença dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b nos isolados de *L. monocytogenes*. Korsak et al. (2012) avaliando diferentes tipos de alimentos encontrou a presença destes sorotipos entre cepas de *L. monocytogenes*. Orsi, et al. (2011) destaca a ocorrência predominante do sorotipo 1/2a, 1/2b e 4b a características como boa aptidão ecológica, disseminação em ambientes naturais e agrícolas, além de serem os sorotipos mais comumente associados a alimentos e casos clínicos em humanos.

A patogênese de *L. monocytogenes* está relacionada a muitos genes de virulência. As proteínas internalinas codificadas pelos genes *inlA*, *inlB*, *inlC* desempenham um papel importante na invasão das células hospedeiras e nos estágios subsequentes da infecção (Engelbrecht et al., 1996; Liu et al., 2007; Sabet et al., 2005). Os genes LIPI-1 (*actA*, *hlyA*) estão associados a diferentes estágios de infecção através da codificação e deslocamento bacteriano no citoplasma das células hospedeiras (Vázquez-Boland et al., 2001; Vázquez-Armenta et al., 2020).

Encontramos neste estudo a presença de *inlA* mais frequente do que *inlB*, em que 68% dos isolados (11/16) abrigavam o gene *inlA* e 56% (9/16) o gene *inlB*, colaborando com estudos de Montero et al. (2015) e Ramires et al. (2021). Observamos também a presença de dos genes *actA*, *hlyA*, sugerindo o potencial de virulência dos isolados avaliados. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente nos estudos de Figueroa-López et al. 2019; Osman et al. 2020; Ramires et al. 2021; Sereno et al. 2019 & Zhang et al. 2019).

Considerando o comportamento de persistência e sua habilidade para aderir e produzir biofilmes, *L. monocytogenes* podem persistir em superfícies e locais de difícil higienização, uma vez estabelecidos os biofilmes eles atuam como fontes permanentes de contaminação cruzada e dispersão no ambiente, (Bonsaglia et al., 2014; Møretrø and Langsrud, 2004).

O presente estudo observou genes relacionados a produção de biofilmes com capacidade de adesão fraca dos isolados de *L. monocytogenes*. Riedel et al. (2009) avaliou o sistema de detecção de peptídeo *agr* de *L. monocytogenes* criando um mutante de deleção *agrD* e observou que o mutante apresentou formação de biofilme significativamente reduzida e nível de internalina (*inlA*) diminuída, sugerindo que a mutação gênica diminuiu a capacidade de adesão.

Embora seja conhecido o impacto do sistema *agr* na formação do biofilme de *L. monocytogenes* (Garmyn et al., 2012; Rieu et al., 2007), Pinheiro et al. (2018) relataram a presença do gene *actA* com a diminuição na capacidade de formação de biofilme em comparação a cepas sem esta mutação. Esses podem ser alguns fatores que contribuíram para a fraca adesão e produção de biofilmes dos isolado de *L. monocytogenes* avaliados em nosso estudo.

As configurações domésticas e a vida cotidiana contribuem para disseminação de patógenos, podendo apresentar algum grau de resistência aos tratamentos antimicrobianos e produtos utilizados nos processos de higienização (Maillard et al., 2020). Muitos estudos abordam um padrão crescente e contínuo de cepas do ambiente doméstico, alimentos e meio ambiente, resistentes/multirresistentes a tratamentos antimicrobianos (Du et al., 2017; Korsak et al., 2012; Lotfollahi et al., 2017; Maillard et al., 2020; Poyart-Salmeron et al., 1990).

O estudo observou multirresistentes para *L. monocytogenes* isoladas de tábuas de corte do ambiente doméstico. Nos últimos pesquisas encontraram alta variação nas taxas de resistência para *L. monocytogenes*, principalmente para as drogas mais usuais, adotadas no tratamento da listeriose como ampicilina, penicilina e sulfametoxazol associado ao trimetoprim (Du et al., 2017; Korsak et al., 2012; Lotfollahi et al., 2017; Sereno et al., 2019), demonstrando um cenário preocupante para o tratamento da doença.

Nosso estudo avaliou também *Escherichia coli* isoladas de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico. A *E. coli* é uma bactéria distribuída na natureza tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal (Carvalho et al., 2023; Denamur et al., 2021; Paton and Paton, 1998). Existem seis categorias patogênicas

de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* patogênicas (diarreio gênicas) diferenciadas pela presença de fatores de virulência.

Este estudo pesquisou a presença de fatores de virulência para resistência antimicrobiana *intl 1* e fatores de virulência relacionados a produção de shiga toxina *stx1* e *stx2*, sendo este último responsável por complicações graves em humanos, capazes de causar doenças gastrointestinais (Paton and Paton, 1998). A presença de genes *intl1* é associado aos mecanismos que desempenham papel importante para a prevalência de resistência bacteriana aos medicamentos (Ishikawa, 2011). Malek et al. (2015) concluíram que os *integrons* carregam genes que codificam resistência antimicrobiana e estão significativamente presentes entre as *Enterobacteriaceae*, associado a resistência a múltiplas drogas.

O estudo encontrou a presença desse gene para um isolado (1/15) e resistência a três ou mais classes para a maioria os isolados de *E. coli* avaliados com produção de ESBLs (β -lactamases de espectro estendido). O aumento do número de resistência bacteriana através da produção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) tem sido reconhecida como um problema terapêutico (Dolejská et al., 2009). Bezabih et al. (2021) observou uma crescente presença de *E. coli* produtoras de enzima ESBLs em pessoas saudáveis e destaca o risco, sinalizando que o mundo pode estar caminhando para a pior fase de uma “era pós-antibiótica” onde infecções comuns que costumavam ser facilmente tratados podem não responder aos medicamentos existentes.

Observamos também em quatro isolados fatores de virulência relacionados a produção de shiga toxina *stx1* (n=3) e *stx2* (n=1). Ludwig et al. (2002) avaliando a presença de anticorpos em humanos, para estes fatores de virulência, destacou que cepas de STEC humanas podem produzir variantes de *stx1* e *stx2* e que infecções assintomáticas de STEC em pessoas saudáveis representa uma fonte potencial de infecção, com transmissão de pessoa para pessoa. Os autores destacam a necessidade de implementar medidas higiênicas rigorosas entre os membros da família e outros contatos domésticos para evitar a disseminação e ocorrência de casos secundários. Keshav et al. (2015) pesquisando *E. coli* em panos de prato em residências observou a presença de fatores de virulência *stx1* e *stx2* em seus isolados e destacou a presença destes fatores em casos de doenças neste ambiente.

A persistência de *E. coli* no ambiente doméstico pode ser vinculada a presença de biofilmes e a capacidade de adesão da bactéria (Wang et al., 2020). Nosso estudo encontrou genes envolvidos na formação de biofilmes para os isolados de *E. coli* e

capacidade de adesão fraca. Os genes avaliados *wza* e *wcaA* atuam na biossíntese do ácido colânico (exopolissacarídeos) e os genes *luxS* na regulação do quorum sensing. Alguns estudos relatam que o ácido colânico pode prejudicar a adesão bacteriana inicial e inibir a formação de biofilmes em *E. coli*, mascarando proteínas autotransportadoras como o antígeno Ag43, as quais tem importante papel na formação e maturação dos biofilmes (Beloin et al., 2008; Castelli and Vécovi, 2011; Vogeleer et al., 2014; Wang et al., 2020).

Como conclusão o estudo contribui com informações de *L. monocytogenes* e *E. coli* isoladas de tábuas de corte do ambiente doméstico e observa a presença de fatores genéticos e características fenotípicas importantes para casos de doenças de origem alimentar em humanos, com destaque para o grau de resistência dos isolados as classes de antibióticos testados. O estudo destaca a importância dos processos higiênico-sanitários no uso de tábuas de corte no preparo de alimentos em residências.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil pelo fornecimento de bolsa à primeira autora (CAPES, Brasília, DF, Brasil – Código- 001).

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesse

5. Referências

- Alves, Â., Santos-Ferreira, N., Magalhaes, R., Ferreira, V., & Teixeira, P. (2022). From chicken to salad: Cooking salt as a potential vehicle of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cross-contamination. *Food control*, 137, 108959. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713522001529>
- De Been, M., Lanza, V. F., de Toro, M., Scharringa, J., Dohmen, W., Du, Y., ... & van Schaik, W. (2014). Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS genetics*, 10(12), <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004776>
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Bacterial biofilms*, 249-289. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-75418-3_12
- Bezabih, Y. M., Sabiiti, W., Alamneh, E., Bezabih, A., Peterson, G. M., Bezabhe, W. M., & Roujeinikova, A. (2021). The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 22-29. <https://academic.oup.com/jac/article/76/1/22/5919862?login=false>
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, 35(1), 386-391. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713513003708?via%3Dihub>
- Canica, M., Manageiro, V., Abriouel, H., Moran-Gilad, J., & Franz, C. M. (2019). Antibiotic resistance in foodborne bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 84, 41-44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417303953?via%3Dihub>
- Carvalho, D., Chitolina, G. Z., Wilsmann, D. E., Lucca, V., de Emery, B. D., Borges, K. A., ... & do Nascimento, V. P. (2023). Adhesion capacity of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* on polystyrene, stainless steel, and polyethylene surfaces. *Food Microbiology*, 104280. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002023000679?via%3Dihub>
- Castelli, M. E., & Vécovi, E. G. (2011). The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 193(1), 63-74. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00839-10>
- Chen, J., & Griffiths, M. W. (1998). PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in applied microbiology*, 27(6), 369-371. <https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/27/6/369/6708022?redirectedFrom=fulltext&login=false>

- Cogan, T. A., Slader, J., Bloomfield, S. F., & Humphrey, T. J. (2002). Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 885-892. <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/92/5/885/6722192?login=false>
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). M100-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M. P. Weinstein, J. S. Lewis II, A. M. Bobenchik, S. Campeau, S. K. Cullen, M. F. Galas, H. Gold, R. M. Humphries, T. J. K. Jr., B. Limbago, A. J. Mathers, T. Mazzulli, M. Satlin, A. N. Schuetz, P. J. Simner, & P. D. Tamma, Eds.; 30th ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Da Costa, P. M., Loureiro, L., & Matos, A. J. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International journal of environmental research and public health*, 10(1), 278-294. <https://www.mdpi.com/1660-4601/10/1/278>
- Datta, A. R., & Burall, L. S. (2018). Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. *Food microbiology*, 75, 18-27. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002017303118?via%3Dihub>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37-54. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>
- DeVere, E., & Purchase, D. (2007). Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*, 24(4), 425-430. . <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000200600164X?via%3Dihub>
- Djebbi-Simmons, D., Xu, W., Janes, M., & King, J. (2019). Survival and inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases. *Food microbiology*, 84, 103272. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002019301145?via%3Dihub>
- Dolejska, M., Bierošová, B., Kohoutova, L., Literak, I., & Čížek, A. (2009). Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 1941-1950. <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/106/6/1941/6719704?login=false>
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>

- Du, X. J., Zhang, X., Wang, X. Y., Su, Y. L., Li, P., & Wang, S. (2017). Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. *Food Control*, 74, 9-16. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351630648X?via%3Dihub>
- Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Molecular microbiology*, 21(4), 823-837. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.1996.541414.x>
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsrud, S. (2017). Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 83(17), e01046-17. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.01046-17>
- Figueroa-López, A. M., Maldonado-Mendoza, I. E., López-Cervantes, J., Verdugo-Fuentes, A. A., Ruiz-Vega, D. A., & Cantú-Soto, E. U. (2019). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, 817-824. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-019-00073-7>
- Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D., & Naviglio, D. (2020). Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. *Food Research International*, 137, 109414. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996920304397?via%3Dihub>
- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A. L., & Piveteau, P. (2012). *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043154>
- Haysom, I. W., & Sharp, A. K. (2005). Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hour period. *British Food Journal*. <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070700510606873/full/pdf?title=bacterial-contamination-of-domestic-kitchens-over-a-24hour-period>
- Ishikawa, S. (2011). Simultaneous PCR detection of multiple classes of integron integrase genes for determining the presence of multidrug-resistant bacteria in environmental samples. *Current microbiology*, 62, 1677-1681. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-011-9913-5>
- Keshav, V., Kruger, C. A., Mathee, A., Naicker, N., Swart, A., & Barnard, T. G. (2015). *E. coli* from dishcloths as an indicator of hygienic status in households. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, 5(3), 351-358. <https://iwaponline.com/washdev/article-abstract/5/3/351/30383/E-coli-from-dishcloths-as-an-indicator-of-hygienic>

- Koch, B. J., Hungate, B. A., & Price, L. B. (2017). Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(6), 309-318.
<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fee.1505>
- Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., & Pappelbaum, K. (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 158(3), 203-208.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160512003790?via%3Dihub>
- Kovacevic, J., Sagert, J., Wozniak, A., Gilmour, M. W., & Allen, K. J. (2013). Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. *Food microbiology*, 34(2), 319-327.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002013000038?via%3Dihub>
- Lerma, L. L., Benomar, N., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International journal of food microbiology*, 161(2), 97-106.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160512006198?via%3Dihub>
- Lineback, C. B., Nkemngong, C. A., Wu, S. T., Li, X., Teska, P. J., & Oliver, H. F. (2018). Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 1-7.
<https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-018-0447-5>
- Lee, H., & Yoon, Y. (2021). Etiological agents implicated in foodborne illness world wide. *Food science of animal resources*, 41(1), 1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7810395/>
- Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W., & Ainsworth, A. J. (2007). A multiplex PCR for species-and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 71(2), 133-140.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701207002849?via%3Dihub>
- Lotfollahi, L., Chaharbalesh, A., Rezaee, M. A., & Hasani, A. (2017). Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 107, 425-429.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401016305617?via%3Dihub>

- Maillard, J. Y., Bloomfield, S. F., Courvalin, P., Essack, S. Y., Gandra, S., Gerba, C. P., ... & Scott, E. A. (2020). Reducing antibiotic prescribing and addressing the global problem of antibiotic resistance by targeted hygiene in the home and everyday life settings: A position paper. *American journal of infection control*, 48(9), 1090-1099. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655320302091>
- Malek, M. M., Amer, F. A., Allam, A. A., El-Sokkary, R. H., Gheith, T., & Arafa, M. A. (2015). Occurrence of classes I and II integrons in *Enterobacteriaceae* collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. *Frontiers in microbiology*, 6, 601. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00601/full>
- Medrano-Félix, A., Martínez, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., Peraza-Garay, F., Gerba, C. P., & Chaidez, C. (2011). Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. *Journal of applied microbiology*, 110(2), 463-471. <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/110/2/463/6720458?login=false>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapiere, L., Gaggero, A., Vidal, R. M., & Vidal, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in microbiology*, 6, 384. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00384/full>
- Møretrø, T., Vestby, L. K., Nesse, L. L., Storheim, S. E., Kotlarz, K., & Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 1005-1012 <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/106/3/1005/6719578?login=false>
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107-121. <https://www.cambridge.org/core/journals/biofilms/article/abs/listeria-monocytogenes-biofilm-formation-and-persistence-in-foodprocessing-environments/F65FA6ADB73031D6341A38D6EB4BA5BD>
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422110000615?via%3Dihub>

- Osman, K. M., Kappell, A. D., Fox, E. M., Orabi, A., & Samir, A. (2019). Prevalence, pathogenicity, virulence, antibiotic resistance, and phylogenetic analysis of biofilm-producing *Listeria monocytogenes* isolated from different ecological niches in Egypt: Food, humans, animals, and environment. *Pathogens*, 9(1), 5. <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/1/5>
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx 1, stx 2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. *Journal of clinical microbiology*, 36(2), 598-602. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
- Pinheiro, J., Lisboa, J., Pombinho, R., Carvalho, F., Carreaux, A., Brito, C., ... & Cabanes, D. (2018). MouR controls the expression of the *Listeria monocytogenes* Agr system and mediates virulence. *Nucleic Acids Research*, 46(18), 9338-9352. <https://academic.oup.com/nar/article/46/18/9338/5052370?login=false>
- Possas, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Valero, A. (2017). Models of microbial cross-contamination dynamics. *Current Opinion in Food Science*, 14, 43-49. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799317300097?via%3Dihub>
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courvalin, P., & Courtieu, A. L. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *The Lancet*, 335(8703), 1422-1426. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0140673690914471>
- Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M. A., Vitola, H. R. S., Nuncio, A. S. P., Kroning, I. S., ... & da Silva, W. P. (2021). Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. *Food Research International*, 140, 109871. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920308966?via%3Dihub>
- Rayner, J., Veeh, R., & Flood, J. (2004). Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *International journal of food microbiology*, 95(1), 29-39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504000820?via%3Dihub>
- Riedel, Christian U. et al. 2009. “c”. *Molecular Microbiology* 71(5): 1177–89.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2007). Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6125-6133. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.00608-07>

- Rutala, W. A., Barbee, S. L., Aguiar, N. C., Sobsey, M. D., & Weber, D. J. (2000). Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 21(1), 33-38. https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0195941700071782/type/journal_article.
- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., & Bierne, H. (2005). LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infection and immunity*, 73(10), 6912-6922. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005>
- Sereno, M. J., Viana, C., Pegoraro, K., da Silva, D. A. L., Yamatogi, R. S., Nero, L. A., & dos Santos Bersot, L. (2019). Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. *Food microbiology*, 84, 103-234. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002019301285>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701200001226?via%3Dihub>
- Thanner, S., Drissner, D., & Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio*, 7(2), e02227-15. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.02227-15>
- Troxler, R., Von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., & Stock, I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria species*: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(10), 525-535. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1463161X>
- Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Oñate, M. A., Martinez-Tellez, M. A., Lopez-Zavala, A. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2020). Quercetin repressed the stress response factor (*sigB*) and virulence genes (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. *Food microbiology*, 87, 103377. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002019309876?via%3Dihub>
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584-640. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 5, 317. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00317/full>

- Wang, C., Zhang, H., Wang, J., Chen, S., Wang, Z., Zhao, L., & Wang, X. (2020). Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability. *Microbiological Research*, 239, 126527. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501320303955>
- Yao, H., Kang, M., Wang, Y., Feng, Y., Kong, S., Cai, X., ... & Yin, Y. (2018). An essential role for hfq involved in biofilm formation and virulence in serotype 4b *Listeria monocytogenes*. *Microbiological research*, 215, 148-154. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131830301X>
- Zhang, Y., Dong, S., Chen, H., Chen, J., Zhang, J., Zhang, Z., ... & Mei, L. (2019). Prevalence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* from retail foods in bulk in Zhejiang Province, China. *Frontiers in microbiology*, 10, 1710. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01710/full>

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Muita gente não sabe mais o simples ato de cortar um frango cru e utilizar a mesma faca ou tábua de corte sem lavar para fatiar outro alimento cru ou pronto para o consumo, pode ser um risco a saúde. Essas falhas durante a manipulação de alimentos podem levar a contaminação cruzada com a transferência de microrganismos de um material ou alimento contaminado para outro, causando danos à saúde. A dificuldade na remoção de sujidades pode favorecer a formação de biofilmes em superfícies, apontado como um aspecto importante para ocorrência de contaminação cruzada durante o preparo de alimentos.

A avaliação do perfil de uso das tábuas de corte na manipulação de alimentos em residências observou a presença de microrganismos frequentemente envolvidos em casos de doenças vinculadas por alimentos, sugerindo que o uso do utensílio pode estar sendo feito sem as devidas práticas de manipulação e higienização. Para o tipo de material que compõe as tábuas o estudo observou que independentemente do material, tábuas de corte podem servir como veículos para microrganismos com potencial de causar doenças. Em relação aos resultados observados podemos explorar o conceito de que a saturação da madeira com a umidade pode interferir na adesão celular em contraste as tábuas de plástico e, o desgaste do utensílio e tempo de uso favorecem a permanência de microrganismos e formação de biofilmes.

O estudo colabora ainda com informações de *L. monocytogenes* e *E. coli* isoladas de tábuas de corte utilizadas no preparo de alimentos em residências e observa a presença do sorogrupo 4b, potencial de virulência e resistência antimicrobiana em *L. monocytogenes* e *E. coli* produtoras de ESBL. Estes fatores são importantes para o controle e tratamento de doenças em humanos. As informações deste estudo sinalizam um cenário preocupante em saúde pública e destaca a importância das boas práticas nos processos de higienização do utensílio.

ANEXOS

Capítulo II

Supplementary Data A – Survey

	Public Food Guidance Service/FMVZ/UNESP
	FOOD INSPECTION LABORATORY
	Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n Bairro: Unesp - Botucatu/SP CEP:18618-681 Fone: +55 14 3880-2110
	EVALUATION THE MANIPULATION AND THE USE OF WOODEN AND PLASTIC CUTTING BOARDS IN HOMES

Name:	
Evaluator:	
Address:	
Date:	

Mark the answer:

SURVEY- INFORMATION
1) What is your education? ☐ Elementary School ☐ High school ☐ University education
2) Who cooks in the house? ☐ Yourself ☐ Another person
3) Where do you buy fruits and vegetables? ☐ Supermarkets ☐ Greenmarket ☐ Both
4) How do you sanitize your fruits and vegetables? ☐ Water only ☐ Water and detergent ☐ Water and hypochlorite ☐ Water and acetic acid
5) Do you use the same cutting board to manipulate all food? ☐ Yes ☐ No
6) Which of these foods do you manipulate on your board? ☐ Meat ☐ Fruits and vegetables ☐ Both ☐ Other foods

7) Which of these foods do you manipulate first? () Meat () Fruits and vegetables () Indifferent COLLECTED CUTTING BOARD INFORMATION:
8) What is the cutting board material? () Wood () Plastic
9) How long have do you been using the cutting board? () 0 to 1 year () 1 year to 2 years () More than 2 years
10) How often do you use the cutting board? () Daily () Sporadically
11) You sanitize do your cutting board? () Sim () Não
12) Among the options, which one do you use to sanitize your cutting board? () Water and detergent () Water as detergent and hypochlorite

Supplement Data B – Terms of Consent

Ethics Committee Resolution 466/2012 - (participant over 18 years old)

This study was submitted to ethical evaluation on the Brazil Platform of the Brazilian Ministry of Health (<http://conselho.saude.gov.br/plataforma-brasil-conep?view=default>) and registered under CAAE 57892622.1.0000.5411 with ethical opinion favorable no. 5,382,335.

I INVITE you to participate in the Research Project entitled “Cross-contamination in the domestic environment: Biofilm formation capacity, antibiotic and disinfectant resistance of pathogens isolated from wooden and plastic cutting boards” which will be developed by me Janaina Prieto de Oliveira, Veterinary Doctor and Postgraduate student of the Doctorate course in the postgraduate program from the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of Botucatu - FMVZ under the guidance of Professor Dr. Juliano Gonçalves Pereira, Veterinarian and Professor at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Botucatu (UNESP)

The research consists of evaluating the characteristics and possible presence of microorganisms on cutting boards in homes. In order for the study to have representativeness and statistical power, a sample number was pre-determined, a representative sample number of 100 boards, 50 of which were made of wood and 50 of plastic.

There is no risk for research collaborators. The estimated time to respond to the form is 10 minutes. The benefit of participating in this study is that you are contributing to the donation of material for scientific research, and in return you will receive another (new) utensil according to the donated material (wood or plastic), in addition to providing important information on the manipulation and use of boards, information that may contribute to the understanding and objectives proposed by the study.

Please be aware that your participation is voluntary and your identification will not be disclosed. The individual traceability of each participant will be through a number that will become an investigation code for each sample, without personal identification. This code will only be used for control in the study. Same after you have given your consent to participate in the research, you can withdraw it at any time, without any personal harm.

This Free and Informed Consent Form will be prepared in 2 copies of equal content, 01 copy will be delivered to you duly initialed, and the other copy will be archived and kept by the researchers for a period of 2 years after the end of the research.

If you have any additional questions, you can contact the Research Ethics Committee by calling +55 14 3880-1608 or 3880-1609, which is open from Monday to Friday from 8:00 am to 12:00 pm and from 1:30 pm to 5:00 pm, at Chácara Butignolli s/nº in Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. The location data of the researchers are described below:

Name: Janaina Prieto de Oliveira Address: Prof. doctor Walter Maurício Correa s/n Botucatu/São Paulo. Phone: +55 44 999636042 E-mail: janaina.prieto@unesp.br

Name Juliano Gonçalves Pereira Address: Prof. doctor Walter Maurício Correa s/n Botucatu/São Paulo. Phone: +55 14 3880-2258 E-mail: juliano.pereira@unesp.br

After all my doubts regarding this study have been resolved, I AGREE to participate voluntarily, being aware that all my data will be safeguarded through the secrecy that the researchers have committed to. I am aware that the results of this study may be published in scientific journals.

Botucatu- SP, ____/____/____

Researcher

Participating

Supplementary Table I - Profile of handlers in the use of wooden and plastic cutting boards in homes

Parameter		Cutting boards		
		Wood (50)	Plastic (50)	Total % (100)
weighted average age		37	26	31
Sex	Female sex	36	36	72%
	Male sex	14	14	28%
What is your education?				
Elementary School		6	1	7%
High school		18	12	30%
University education		26	37	63%
Who cooks in the house?				
Yourself		39	26	65%
Another person		11	24	35%
Where do you buy fruits and vegetables?				
Supermarkets		29	29	58%
Greenmarket		1	0	1%
Both		20	21	41%
How do you sanitize your fruits and vegetables?				
Water only		27	26	53%
Water and detergent		7	9	16%
Water and hypochlorite		6	11	17%
Water and acetic acid		10	4	14%
Do you use the same cutting board to manipulate all food?				
Yes		44	43	87%
No		6	7	13%
Which of these foods do you manipulate on your board?				
Meat		5	1	6%
Fruits and vegetables		2	3	5%
Both		41	44	85%
Other foods		2	2	4%

Which of these foods do you manipulate first?

Meat	13	6	19%
Fruits and vegetables	20	28	48%
Indifferent	17	16	33%

Collected cutting board information

How long have you been using the cutting board?

0 to 1 year	9	3	12%
1 year to 2 years	8	5	13%
More than 2 years	33	42	75%

How often do you use the cutting board?

Daily	37	41	78%
Sporadically	13	9	22%

You sanitize do your cutting board?

Yes	50	50	100%
No	0	0	0%

Among the options, which one do you use to sanitize your cutting board?

Water and detergent	38	35	73%
Water as detergent and hypochlorite	12	15	27%

Supplementary Table II - Microbiological evaluation in the use of wooden and plastic cutting boards in homes, count of aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. and presence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

¹ Parameter	Microorganisms			² Presence	
Total (100)	AMC	EB	PS	LM (3/100)	EC (5/100)
Where do you buy fruits and vegetables?					
Supermarkets (n=58)	3.1 (0 – 7.8)	2.0 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.5)		2/100
Greenmarket (n=1)	3.4 (3.4 – 3.4)	1.4 (1.4 – 1.4)	4.1 (4.1 – 4.1)		
Both (n=41)	3.5 (0 – 8.2)	2.0 (0 – 6.7)	0 (0 – 8.8)	3/100	3/100
p-value	0.9896	0.8607	0.1687		
How do you sanitize your fruits and vegetables?					
Water only (=53)	3.4 (0 – 8.2)	1.5 (0 – 10.4) ^{ab}	0 (0 – 8.5)	1/100	3/100
Water and detergent (n=16)	3.4 (0 – 7.8)	2.6 (0 – 7.7) ^{ab}	0 (0 – 5.7)	1/100	2/100
Water and hypochlorite (n=17)	3.7 (0 – 7.4)	3.2 (0 – 6.7) ^a	0 (0 – 8.8)	1/100	
Water and acetic acid (n=14)	2.1 (0 – 6.2)	0 (0 – 4.7) ^b	0 (0 – 6.4)		
p-value	0.2623	0.0305*	0.8503		
Do you use the same cutting board to manipulate all food?					
Yes (n=87)	3.2 (0 – 8.2)	1.9 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.8)	3/100	5/100
No (n=13)	3.4 (0 – 4.8)	3.2 (0 – 4.0)	0 (0 – 4.3)		
p-value	0.8098	0.4129	0.6473		

Which of these foods do you manipulate on your board?

Meat (n=6)	1.6 (0 – 3.7)	0 (0 – 3.8)	0 (0 – 0)		
Fruits and vegetables (n=5)	4.0 (2,1 – 4.8)	3.3 (0 – 4.0)	2.9 (0 – 3.9)		
Both (n=85)	3.4 (0 – 8.2)	1.9 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.8)	3/100	4/100
Other foods (n=4)	3.5 (2 – 7.8)	2.9 (0 – 7.7)	0 (0 – 4.5)		1/100
p-value	0.3192	0.3124	0.3420		

Which of these foods do you manipulate first?

Meat (n=19)	3.1 (0 – 7.2)	0 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.5)		1/100
Fruits and vegetables (n=48)	3.5 (0 – 8.2)	2.1 (0 – 6.8)	0 (0 – 8.8)	2/100	1/100
Indifferent (n=33)	2.8 (0 – 7.8)	2.1 (0 – 7.7)	0 (0 – 5.7)	1/100	3/100
p-value	0.5300	0.5510	0.5017		

Among the options, which one do you use to sanitize your cutting board?

Water and detergent (n=73)	3.2 (0 – 7.8)	2.1 (0 – 7.7)	0 (0 – 6.4)	2/100	4/100
Water as detergent and hypochlorite (n=23)	3.5 (0 – 8.2)	1.8 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.5)	1/100	1/100
p-value	0.4008	0.7797	0.2398		

How long have do you been using the cutting board?

0 to 1 year (n=12)	3.6 (0 – 7.4)	2.7 (0 – 5.8)	0 (0 – 5.9)		1/100
1 year to 2 years (n=13)	3.4 (0 – 7.0)	2.7 (0 – 5.1)	0 (0 – 6.4)		1/100
More than 2 years (n=75)	3.1 (0 – 8.2)	1.7 (0 – 10.4)	0 (0 – 8.8)	3/100	3/100
p-value	0.3598	0.1727	0.1535		

¹(log CFU/cm²) median (minimum - maximum): *a, b values with different letters in the line are different when the result differs statistically as 95% significance p<0.05; AMC: aerobic mesophilic count; EB: Enterobacteriaceae count; PS: *Pseudomonas* spp. count. ² values % LM: *Listeria monocytogenes*; EC: *Escherichia coli*.

Capítulo III

Quadro 4

Primers, anelamento e tamanhos de produtos de PCRs usados para identificação e sorotipagem de *Listeria* spp. e confirmação de gênero e espécie de *Escherichia coli* isolados de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

PCR	Gene alvo	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Função	Referência
Isolado					
multiplex <i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Identificação	(Doumith et al. 2004)
	<i>lmo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	sorotipagem	
	<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	906	sorotipagem	
	<i>ORF2819</i>	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	sorotipagem	
	<i>ORF2110</i>	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: ATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	sorotipagem	(Chen e Griffiths 1998)
<i>Escherichia coli</i>	<i>uspA</i>	F: CCGATACGCTGCCAATCAGT R: ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	884	Confirmação	

As condições das reações foram: *L. monocytogenes*: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/0,4 min, 53°C/1,15 min, 72°C/1,15 min e 72°C/7 min; *E. coli* 95 °C/60s; 30 ciclos de 95°C/30s, 62°C/30s e 72 °C/2 min; extensão final de 72 °C/2 min

Quadro 5

Primers, anelamento e tamanhos de produtos de PCRs usados para caracterizar genes de virulência e formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *E. coli* de isolados obtidos de tábuas de corte de madeira e plástico do ambiente doméstico.

Reação PCR	Gene alvo	Sequência (5´- 3´)	Tamanho (pb)	Função	Referência
<i>L. monocytogenes</i> 1 multiplex	<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	800	Internalização celular	(Liu et al., 2007)
	<i>inlB</i>	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	884		
	<i>inlC</i>	F: AATTCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCTACTA	517		
2 multiplex	<i>hlyA</i>	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	Síntese de listeriolisina	(Paziak-Domanska et al., 1999)
	<i>actA</i>	F: CGCCGCGGAAATTAAAAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839	Polimerização de actina	Suarez and Vazquez-Boland (2001)
3 multiplex	<i>prfA</i>	F: GGAAGCTTGGCTCTATTTGC R: ACAGCTGAGCTATGTGCGAT	145	Produção de fímbrias, adesão	(Autret et al., 2003)
	<i>flaA</i>	F: GTAAGCATCCAAGCGTCTGA R: AAGAATCAGCATCAGCAACG	148		
	<i>agrA</i>	F: CGGGTACTTGCCTGTATGAA R: TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	149		
	<i>agrB</i>	F: AGGTACATTTGGATTTATACTGCTCAAC R: TCTTCACCGATTAAAGGCCAACT	81	Formação de biofilme	
	4 multiplex	<i>agrC</i>	F: ATTGACAAGATTTTCGATGGATAGTATAGATT		
	<i>aqrD</i>	R: CACAAGTTAACGCCGCTTCA	113		

		F: AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTAG R: AATGGACTTTTTGGTTCGTATACA			(Rieu et al., (2007)
	<i>luxS</i>	F: AAGCACCTTTTGTGAGACTGG R: CCGTTAGTGTTGTAGCGATGA	273	Quorum sensing e formação de biofilme	(Jiang et al., 2021)
<i>Escherichia coli</i> 1 multiplex	<i>stx1</i>	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Produção de toxina	(Ishikawa, 2011)
	<i>stx2</i>	F: GGCACCTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCG	255		
	<i>intl 1</i>	F: GTCAAGGATSTGGATTTTCTGA R: ACATGCGGTGTARATCATCGT	890	Resistência antimicrobiana	(Panton and Panton, 1998)
2 multiplex	<i>wcaA</i>	F: ATTGGCAACCAGGTCTTTA R: CGTCGCCTCTTCTACTTTC	141	Biofilmes e codificação de reguladores na síntese de ácido colânico	(Yu et al., 2021)
	<i>wza</i>	F: GAGCACCTGAAAATGGA R: AGCGGACGAATGACAAAG	114		(Yu et al., 2022)
	<i>luxS</i>	F: CAGATGAGCAGCGTGTTG R: GCAGTGCCAGTTCTTCGT	201	Quorum sensing e formação de biofilme	(Yu et al., 2023)

As condições das reações foram: *L. monocytogenes*: reação 1: 94 ° C por 2 min; 30 ciclos de 94 ° C/20 s, 55 ° C/20 s e 72 ° C/50 s; extensão final 72 ° C/2 min; reação 2: 94°C/2 min, 35 ciclos a 94°C/30s, 60°C/1 min e extensão a 72°C/1 min. Extensão final 72°C/10 min; reação 3: 95 °C/60s; 30 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30s e 72 °C/2 min; extensão final de 72 °C/2 min; reação 4: 95 °C/60s; 30 ciclos de 95°C/30s, 56°C/30s e 72 °C/2 min; extensão final de 72 °C/2 min e para *luxS*: 95 °C/60s; 30 ciclos de 95°C/30s, 60°C/30s e 72 °C/2 min; extensão final de 72 °C/2 min. As condições das reações foram: *E. coli*: reação1: 95 °C/10 min; 30 ciclos de 94°C/1 min, 59°C/1min e 72 °C/30 seg.; extensão final de 72 °C/10 min; para *intl 1*: 94 °C/5 min; 30 ciclos de 94°C/30 seg., 60°C/30 seg e 72 °C/1 min; extensão final de 72 °C/8 min e reação 2: 95 °C/60s; 30 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30s e 72 °C/2 min; extensão final de 72 °C/2 min