

Biofilms en instalaciones alimentarias militares. Comparación de técnicas rápidas de vigilancia y verificación

Carbajo-Otero A.¹, Lozano-Benito D.², Aranda-Narváez F. J.³, Cereceda-Chacón A.⁴, Ripodas-Navarro A.⁵, Zamora-Benito A.⁶, Fernández-Moreira D.⁷

Sanid. mil. 2022; 78 (2): 89-94, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Introducción: Los patógenos formadores de *biofilms* incrementan el riesgo de contaminación biológica de los alimentos en las industrias alimentarias, por lo que es necesario cuantificar y cualificar los peligros presentes en los mismos. **Objetivo:** Se pretende demostrar la presencia de *biofilms* bacterianos en las superficies de trabajo de instalaciones alimentarias militares (IAM) mediante distintas técnicas rápidas de control higiénico. **Material y métodos:** Se analizaron un total de 550 muestras entre las 10 IAM: Cada IAM contó con 5 puntos de muestreo ($n = 50$) y en cada uno de ellos se obtuvieron 11 muestras sobre una superficie de 100 cm², para poner de manifiesto la presencia de *biofilms* y establecer la correlación entre las siguientes técnicas analíticas: determinación de adenosín trifosfato (ATP) mediante luminómetro 3M *Clean-Trace*TM NG3, valoración de residuos proteicos con hisopos *Clean-Trace*TM *Surface Protein Plus*, recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (AC) mediante sistema TEMPO® y *Petrifilm*TM, y visualización de *biofilms* mediante reacción enzimática con *Biofinder*®. **Resultados:** Se encontró correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las determinaciones de ATP y la presencia de *biofilms* y de residuos proteicos. También se halló linealidad con significación estadística ($R^2 0,422$, $p < 0,05$) entre el ATP y el recuento de AC por TEMPO®. Se observó correlación y concordancia entre los recuentos de AC mediante el sistema TEMPO® y a través de *Petrifilm*TM (coeficiente de correlación intraclase 0,463, IC 95%: 0,179-0,673, $p < 0,05$). En ningún punto de muestreo (PM) se detectaron bacterias patógenas. **Conclusión:** Se detectaron *biofilms* en una tercera parte de los PM inspeccionados. Su monitorización combinando técnicas rápidas debe tenerse en consideración en los procedimientos de vigilancia del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC).

PALABRAS CLAVE: *biofilm*, contaminación cruzada, ATP, limpieza y desinfección, APPCC.

Biofilms in military food facilities. Comparison of rapid surveillance and verification techniques

SUMMARY

Introduction: Biofilm-forming pathogens increase the risk of biological food contamination in food industries, thus it is necessary to quantify and qualify the dangers present in them. **Objective:** To demonstrate the presence of bacterial biofilms on the work surfaces of military food facilities using different rapid hygienic control techniques. **Materials and methods:** An amount of 550 samples were analyzed among 10 military food facilities: Each one had 5 sampling points ($n = 50$) and in each of them 11 samples were obtained on a surface of 100 cm² to assess the presence of biofilms and to establish the correlation between different analytical techniques: determination of adenosin triphosphate (ATP) using 3M *Clean-Trace*TM NG3 luminometer, protein residue titration with *Clean-Trace*TM *Surface Protein Plus* swabs, mesophilic aerobic microorganism (AC) counts using TEMPO® and *Petrifilm*TM system, and visualization of biofilms using enzymatic reaction with *Biofinder*®. **Results:** A statistically significant correlation ($p < 0.05$) was found between ATP determinations and the presence of biofilms and protein residues. Linearity with statistical significance ($R^2 0.422$, $p < 0.05$) was also found between ATP and AC count by TEMPO®. Correlation and concordance between AC counts were observed using the TEMPO® system and through *Petrifilm*TM (intraclass correlation coefficient 0.463, 95% CI: 0.179-0.673, $p < 0.05$). At no sampling point (SP) were pathogenic bacteria detected. **Conclusion:** Combining quick techniques should be considered in surveillance procedures of *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP).

KEYWORDS: *biofilm*, cross contamination, ATP, cleaning and disinfection, HACCP.

1. Capitán veterinario. Hospital General de la Defensa en Zaragoza. Zaragoza.

2. Comandante veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

3. Capitán veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

4. Capitán veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

5. Comandante veterinario. EMAD-Mando de Operaciones. Pozuelo de Alarcón (Madrid).

6. Teniente coronel veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

7. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

Dirección para correspondencia: Alberto Carbajo Otero. Hospital General de la Defensa en Zaragoza (Servicio de Veterinaria). Vía Ibérica 1-15. 50009, Zaragoza. Telf.: 976305122. Correo: acarot1@mde.es

Recibido: 13 de octubre de 2021

Aceptado: 17 de enero de 2022

doi: 0.4321/S1887-85712022000200006

INTRODUCCIÓN

El concepto de contaminación cruzada se define como la transferencia de microorganismos, ya sean virus, bacterias, hongos, priones, etc., desde los productos contaminados a los no contaminados, de forma directa o indirecta.¹⁻⁴ Según el último informe “One Health” sobre zoonosis publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en febrero de 2021, los factores de riesgo asociados a las contaminaciones cruzadas y a las malas prácticas de los manipuladores representan una parte importante en los brotes de origen alimentario en restaurantes y cantinas (figura 1)⁵.

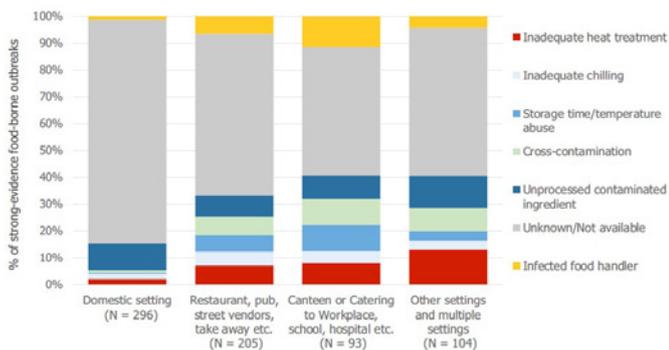


Figura 1. Factores de riesgo relacionados con los brotes de origen hídrico y alimentario en base al lugar de exposición notificados por los países miembros de la UE⁵

Los *biofilms* son agrupaciones microbianas complejas capaces de adherirse y colonizar superficies, formando películas que facilitan el crecimiento y supervivencia de las propias bacterias ante determinadas condiciones adversas del entorno, como la desecación o el uso de algunos desinfectantes, pudiendo suponer una fuente recurrente de contaminación cruzada para las materias primas y, en general, productos alimentarios que se acrecienta cuando las operaciones de limpieza y desinfección (LD) no se llevan a cabo con la frecuencia adecuada^{3,6,7}. El 85-97% del *biofilm* está constituido por agua, junto con otros elementos minoritarios como los exopolisacáridos (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), las proteínas, el ADN, los elementos de la lisis bacteriana y las bacterias⁸.

Los brotes de toxiinfecciones ocasionados en la industria alimentaria se asocian, en la mayor parte de los casos, a los siguientes microorganismos patógenos con capacidad para formar *biofilms*: *Listeria* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. y *E. coli* O157:H7^{6,9,10}. Además, una vez formados, son muy difíciles de eliminar y suponen una población bacteriana constante¹⁰, por lo que se deben replantear las estrategias encaminadas a su control.

Así pues, el objetivo principal de este estudio ha sido demostrar la presencia de *biofilms* bacterianos en las superficies de trabajo de las IAM ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) mediante distintas técnicas rápidas de control higiénico. Asimismo, como objetivos secundarios se han marcado los siguientes: relacionar los valores de ATP con los *biofilms*; medir los residuos proteicos y correlacionar estos valores con los de ATP; cuantificar microorganismos indicadores y detectar microorganismos patógenos; comparar los sistemas TEMPO® (Biomerieux) y Petrifilm® (3M) para establecer

recuentos de AC en superficies; correlacionar el recuento de AC por TEMPO® con los valores de ATP; valorar la importancia de la LD mediante la reducción de ATP, residuos proteicos y carga microbiana tras la aplicación de un tratamiento de LD con hipoclorito sódico al 2% durante 10 segundos y aclarado posterior con agua; comprobar el grado de LD de las superficies de trabajo al comparar nuestras lecturas de ATP y carga microbiana con los criterios de aceptación empleados; y proponer soluciones de mejora para los sistemas de APPCC de las IAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hemos realizado un estudio observacional descriptivo transversal relacionado con la presencia de *biofilms*. Para ello seleccionamos intencionalmente 10 IAM (5 cocinas y 5 cafeterías) localizadas en la CAM siguiendo criterios de proximidad y de representatividad, considerándose cada una de ellas como una instalación de muestreo (IM). Cada IAM contó con 5 puntos de muestreo (PM), que consistieron en una superficie de trabajo o de contacto con los alimentos de no más de 0,2 m² (40 cm de longitud x 50 de anchura). En total se obtuvieron 550 muestras, 11 por cada uno de los 50 PM, cada una sobre una superficie de 100 cm² (tabla 1). El muestreo en cada emplazamiento se efectuó en un solo día, haciéndolo coincidir con la inspección sanitaria periódica realizada por el oficial veterinario designado. Según indicaron los operarios de cada IAM, las superficies seleccionadas se encontraban limpias y desinfectadas y se seleccionaron preferentemente tablas de corte, mesas de trabajo, zonas de preparación y presentación de alimentos, y vajilla; de diversos materiales como acero inoxidable, plástico y porcelana.

Del total de muestras (n = 550), excluyendo las obtenidas con Biofinder® (n = 50), la mitad se tomaron antes de un tratamiento de LD adicional (n = 250) y la otra mitad después (n = 250) para evaluar la reducción de los valores de ATP, residuos proteicos y carga microbiana. En primer lugar, en cada PM se tomaron las 5 primeras muestras que se identificaron con la letra A (medición A). Seguidamente se pulverizó el visualizador de *biofilms* (Biofinder®) mediante spray sobre la superficie de muestreo de 100 cm² y, finalmente, se aplicó *in situ* un tratamiento de LD con hipoclorito sódico al 2% durante 10 segundos y aclarado posterior con agua y se tomaron las 5 muestras restantes, que fueron identificadas con la letra B (medición B). En todos los PM la toma de muestras para el recuento de *L. monocytogenes* (ISO 11290-2:2017 Parte 2); los recuentos de aerobios mesófilos totales, *E. coli*, coliformes totales, enterobacterias, *B. cereus* y *S. aureus* (TEMPO®); y la detección de *Salmonella* spp. (VIDAS® SLM) se llevaron a cabo con el mismo hisopo en cada medición; mientras que para la detección de *Campylobacter* spp. se empleó un hisopo distinto.

Los resultados se han expresado en las unidades correspondientes por cada 100 cm², por lo que en el caso de los recuentos obtenidos por Petrifilm™ se ha multiplicado por un factor de 5 ya que cada uno posee una superficie de 20 cm². Las respuestas al Biofinder® se han computado como positivas o negativas siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de residuos proteicos se agrupó en 4 niveles de concentración en función de la reacción colorimétrica evidenciada en el medio del hisopo (reacción de biuret): ausencia (verde), baja (mezcla de tonalidades moradas y verdes), moderada

Nº de muestras	Parámetro analizado	Muestreo	Técnica analítica
2	ATP	Hisopado con hisopos <i>Clean-Trace™ Surface ATP Test UXL100</i> (3M).	Lectura inmediata de resultados con Luminómetro 3M <i>Clean-Trace™ NG3</i> .
2	Residuos proteicos	Hisopado con hisopos <i>Clean-Trace™ Surface Protein Plus PRO100</i> (3M).	Lectura directa de resultados transcurridos 10 minutos desde la toma de muestras.
1	<i>Biofilms</i>	Reacción enzimática con spray <i>Biofinder®</i> (Itram Higiene).	Pulverización a 10-15 cm de la superficie e interpretación del resultado transcurridos 30 segundos desde la aplicación.
2	Detección de <i>Salmonella</i> spp. y recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> , AC, STA, BC, EC, EB y TC	Hisopado con hisopos estériles tamponados <i>Deltalab®</i> (DeltaSwab Amies, 304281).	Detección por VIDAS®. Recuentos por TEMPO® e ISO 11290-2:2017 Parte 2 (<i>L. monocytogenes</i>).
2	Detección de <i>Campylobacter</i> spp.	Hisopado con hisopos estériles tamponados <i>Deltalab®</i> (DeltaSwab Amies, 304281).	Detección por ISO 11272-1:2017 Parte 1.
2	Recuento de AC	Láminas <i>Petrifilm™</i> (3M)	Preparación de las láminas con al menos una de antelación siguiendo las instrucciones del fabricante, aplicación sobre la superficie e incubación a 30 °C ± 1°C / 72 h ± 2 h.

Tabla 1. Relación de muestras obtenidas en cada PM (n = 50) y parámetros analizados sobre cada muestra. AC: aerobios mesófilos totales; STA: *Staphylococcus aureus*; BC: *Bacillus cereus*; EC: *E.coli*; EB: enterobacterias; TC: coliformes totales.

(morado claro) y alta (morado oscuro). Para la interpretación de los recuentos de ATP se han seguido las especificaciones del fabricante para el luminómetro utilizado. Las muestras se han analizado en el laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa.

Para el análisis estadístico de los datos se ha empleado la versión 25 del *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) de IBM. Los estudios realizados en función del tipo de variable consistieron en análisis descriptivos univariantes y bivariantes de variables categóricas, estudios de correlación (*Pearson*, *Spearman* y coeficiente de correlación intraclass), estudios de regresión lineal y estudios de regresión logística. Como grado de significación estadística se empleó un valor de $p < 0,05$ (intervalo de confianza, IC = 95%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de *biofilms* mediante la prueba enzimática *Biofinder®* fue positiva en el 26% de los PM (el 20% se correspondió con las superficies de acero inoxidable y el 6% con las de

plástico), evidenciándose la formación peróxido de hidrógeno y burbujas de oxígeno mediante distintos grados de intensidad, tal y como se observa en la figura 2. Este porcentaje se incrementa al 60% si se considera por IM en vez de por PM.

Según el modelo de regresión logística binaria entre las variables ATP y *biofilms*, el incremento de los valores de ATP supone una *Odds Ratio* de 3,6 para la aparición de *biofilms*, es decir, con valores altos de ATP la probabilidad de presencia de *biofilms* es 3,6 veces superior en nuestro estudio ($p < 0,05$).

En lo referente a los residuos proteicos en superficie, el tratamiento de LD aplicado *in situ* (medición B) se ha mostrado eficaz para reducir los niveles de proteínas con respecto a las muestras tomadas previas al mismo (medición A). En el 80% de los casos el nivel de proteínas se redujo mientras que en el 20% restante se mantuvo igual. En ningún punto de muestreo el nivel de proteínas se incrementó después de la LD con hipoclorito al 2%, lo que sugiere que a esta concentración la lejía no actuó como factor de confusión. Asimismo, la ausencia de proteínas se presentó en un porcentaje bajo (12%) de los PM de la medición A, sin embargo este porcentaje se incrementó hasta el 54% en la medición B. Por otro lado, la presencia de alto nivel de proteínas



Figura 2. Reacción positiva del *Biofinder®*. La reacción más intensa se aprecia en la imagen de la derecha con la formación de una espuma blanca más densa.

solo se encontró en el 12% de los PM de la medición A mientras que en la B no hubo ningún caso.

Moore et al.¹¹ compararon tres métodos de medición de proteínas en superficie y todos fueron capaces de detectar concentraciones de hasta 625 µg /100 cm², aunque el más sensible fue capaz de detectar concentraciones tan bajas como 19,5 µg /100 cm² en superficies secas. La mayor eficacia para detectar altas cantidades de proteínas sugiere que esta metodología debería emplearse en industrias que produzcan o manipulen alimentos con alto contenido en proteínas.

Tras analizar los datos recabados, se puso de manifiesto la correlación entre los recuentos de ATP y la lectura de proteínas en superficie en la medición A (p < 0,05). El coeficiente de correlación igual a 0,29 indica que la correlación es positiva, por lo que el incremento en una variable se asocia al incremento de la otra, tal y como puede apreciarse en la figura 3.

Los recuentos de microorganismos de la medición A mediante TEMPO® se resumen en la tabla 2. En la medición B no se encontraron recuentos de *Staphylococcus aureus* (STA), *Bacillus cereus* (BC) ni *Escherichia coli* (EC), además el número de PM con recuentos de enterobacterias (EB) y coliformes totales (TC) se redujo de 9 (18%) y 10 (20%) en la medición A, a 1 (2%) y 2 (4%) en la medición B, respectivamente. Para AC los PM con recuentos pasaron de 22 en la medición A (44%) a 6 en la medición B (12%). Tanto en la medición A como en la B los recuentos por método automatizado han evidenciado valores superiores de 1 a 2 órdenes exponenciales con respecto a los Petrifilm™, coincidiendo con otros trabajos como el de Salas Vázquez en 2007¹². En ningún PM se detectaron las bacterias patógenas *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp.

En la medición A existe una correlación positiva entre los recuentos de AC por TEMPO® y Petrifilm™, con un coeficiente de correlación de 0,56 (p < 0,05). De igual manera, la concordancia entre ambas técnicas es suficiente y significativa según el coeficiente de correlación intraclass (0,463; IC 95%: 0,179-0,673; p < 0,05).

El estudio de regresión lineal entre la variable independiente AC (TEMPO®) y la dependiente ATP en la medición A (figura 4), puso de manifiesto la linealidad entre ambas tanto para la constante como para la variable independiente (p < 0,05). Asimismo,

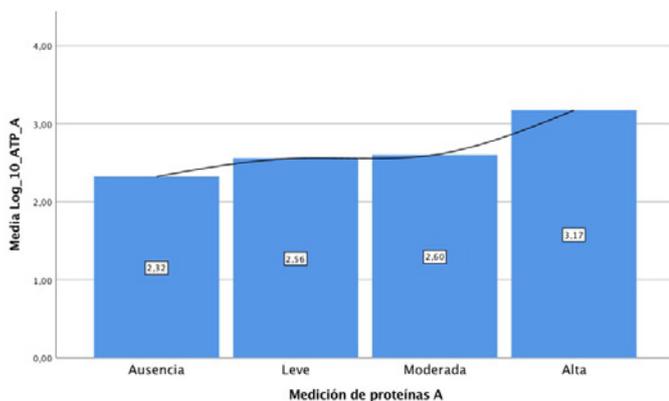


Figura 3. Relación entre los recuentos estimados por la medida de ATP y la lectura de proteínas en superficie en la medición A. En cada barra viene expresado el valor promedio del log10 ATP en URL/100 cm²

Microorganismo en medición A	Nº PM con recuentos	Porcentaje (%)	Promedio (log10 UFC/100 cm ²)
EB	9	18	2,37
EC	0	0	NA
TC	10	20	1,98
STA	3	6	1,1
BC	1	2	1,72
AC	22	44	3,82

Tabla 2. Recuentos obtenidos en los PM en la medición A mediante TEMPO®. Los promedios no incluyen los PM con ausencia de estos microorganismos. (n = 50).

NA: No aplica; EB: enterobacterias; EC: *Escherichia coli*; TC: coliformes totales; STA: *Staphylococcus aureus*; BC: *Bacillus cereus*; AC: aerobios mesófilos totales. UFC: Unidades Formadoras de Colonias

el coeficiente de determinación (R²) de 0,422 indica que los recuentos de AC explican el 42,2% de la variabilidad observada en las determinaciones de ATP. Estos datos concuerdan con los obtenidos en muestreos de varias cocinas de hospital por Aycicek et al.¹³, en los que también existió concordancia estadísticamente significativa entre las dos técnicas (kappa = 0,249, p < 0,05). Por su parte, el recuento en Petrifilm® también mostró asociación lineal con la variable ATP a pesar de ser más débil (R² = 0,240, p < 0,05). El hecho de que el 57,8% de la variabilidad de los recuentos de ATP no pueda ser explicado con el estudio de regresión lineal basado en nuestros recuentos de AC por TEMPO® en la medición A, sugiere que existen otros elementos que influyen en las determinaciones de ATP, como los restos celulares de distinta índole, las levaduras y otras especies bacterianas. Para Larson et al.¹⁴ la dificultad a la hora de relacionar las unidades formadoras de colonias (UFC) con las unidades relativas de luz (URL) radica en que la bioluminiscencia no puede identificar el origen del ATP. Por su parte, según Davidson et al.¹⁵ las lecturas altas de ATP pueden tener un origen tanto alimentario como microbiano, además son necesarios recuentos mínimos de 10⁴ UFC/100 cm² para medir ATP, situación que también indican Maukonen et al.¹⁶. Y Jasson et al.¹⁷ coinciden al afirmar que la bioluminiscencia del ATP solo puede emplearse ante recuentos bacterianos altos (>10⁴ UFC/g).

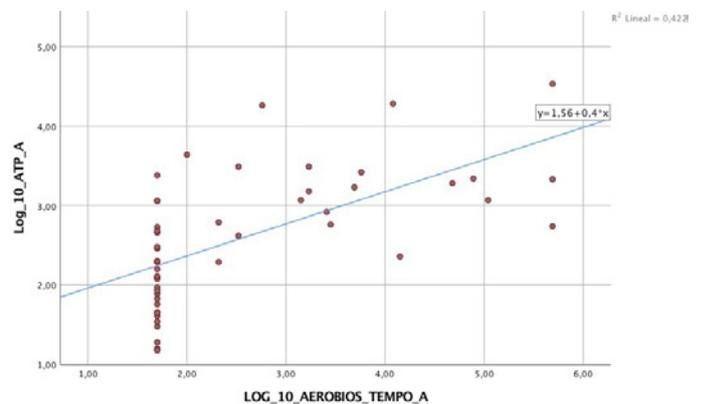


Figura 4. Dispersión simple. Correlación entre el recuento de AC mediante TEMPO® y la determinación de ATP

Agente microbiano	Bueno	Moderado	Inaceptable
Bacterias aerobias totales	180	180-500	>500
Levaduras	<100	100-500	>500
Mohos	<60	60-160	>160
Enterobacterias	<10	10-100	>100

Tabla 3. Criterios de aceptabilidad de la contaminación de microorganismos en superficies (UFC/100 cm²). Adaptado de Miettinen et al.²⁰ de un trabajo previo de Houhala et al.¹⁹

Teniendo en cuenta los criterios de aceptabilidad propuestos por Houhala et al.¹⁸ en 1996 y citados por Miettinen et al. unos años después¹⁹, que clasifican el estado de las superficies en función del nivel de determinados microorganismos (tabla 3), en la medición A, 17 PM tendrían un estado inaceptable si se tuviera en cuenta el recuento de AC (34% del total de PM y 77,3% del total de PM con recuentos viables de AC) y 5 en relación al recuento de EB (10% del total y 55,5% del total de PM con recuentos viables de EB, todos coincidentes con recuentos de AC). En la medición B solo 2 PM (4%) serían inaceptables según los AC y 1 (2%) según las EB. Para otros autores como Sneed et al.²⁰ o Marzano y Balzaretto²¹ el punto de corte que marca la aceptabilidad de una superficie de trabajo en instalaciones de catering está en < 1,3 Log₁₀ UFC/cm² aerobios totales en tablas de corte o < 1,3 Log₁₀ UFC/unidad en cuchillos, cuencos y otro tipo de equipamiento.

Los criterios de aceptación para los residuos de ATP en superficies que se han empleado en nuestro estudio han sido los de la guía rápida de interpretación de resultados publicada por la empresa I.C.T. S.L. (representante de Biotrace Ltd.) para superficies de acero inoxidable (tabla 4). Además, el umbral de aceptación de 500 URL/100 cm² coincide con el propuesto por Ríos-Castillo et al.²² en una publicación en la que se estudiaron superficies en contacto con alimentos de varios supermercados españoles. Tras considerar todos los PM como de riesgo bajo, el 36 % no fueron aceptables, aunque el tratamiento de LD con hipoclorito sódico al 2% durante 10 segundos fue capaz de reducirlos al 12%.

Todos los PM en los que se han detectado *biofilms* con Biofinder® han resultado inaceptables siguiendo los criterios de aceptación empleados para los residuos de ATP y para los recuentos de AC. Existió una coincidencia del 94,5% de los PM inaceptables según los criterios de aceptación de residuos de ATP y de recuento de AC.

	Pasa	Precaución	Falla
Superficie de alto riesgo	<300	301-599	>500
Superficie de bajo riesgo	<500	501-999	>1000

Tabla 4. Interpretación de resultados de ATP (URL) en superficies de trabajo en empresas de catering (I.C.T. S.L.)

CONCLUSIÓN

Se detectaron *biofilms* en una tercera parte de los PM inspeccionados. Las IAM analizadas presentaron un estado aceptable de LD y se pueden considerar seguras al no detectarse microorganismos patógenos en ningún PM. Asimismo, el hipoclorito sódico al 2% durante 10 segundos se ha mostrado eficaz en la reducción de ATP, de residuos proteicos y de la carga bacteriana en las superficies analizadas. Sin embargo, sería recomendable que los operadores de las IAM incluyeran el control de *biofilms* en los sistemas de vigilancia del APPCC, y sopesaran un tratamiento de LD adicional previo al uso en superficies y útiles de trabajo cuya LD se haya efectuado con cierta antelación o sean considerados de mayor riesgo; aspectos que podrían ser un elemento más a controlar por los veterinarios inspectores. A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta su rapidez y facilidad de interpretación, es recomendable el uso de visualizadores de *biofilms* como herramienta de control en las IAM. Además, las tablas de corte, los utensilios, las zonas de preparación, las bandejas y otros elementos en los que se preparen o manipulen productos cárnicos, deberían ser monitorizados de forma rutinaria mediante sistemas de medición de residuos proteicos. La determinación de ATP no puede emplearse por sí sola para estimar la carga microbiana ya que depende de más variables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aantrekker ED, Boom RM, Zwietering MH, van Schothorst M. Quantifying recontamination through factory environments - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;80(2):117 - 30.
2. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, García RM, Zurera G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;19(3):131 - 44.
3. Carrasco E, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*. 2012;45(2):545 - 56.
4. Masotti F, Cattaneo S, Stuknytė M, De-Noni I. Airborne contamination in the food industry: An update on monitoring and disinfection techniques of air. *Trends in Food Science & Technology*. 2019;90:147 - 86.
5. European Food Safety Authority (EFSA) and European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2021. Scientific report on the European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(2):6406, 286 pp.
6. Simões M, Simões L, Vieira M. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 2010;43(4):573 - 83.
7. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, van Vliet AH. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(7):2122-8.
8. Srey S, Jahid IK, Do-Ha S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013;31(2):572 - 85.
9. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20(9):407 - 13.
10. Nyenje M, Green E, Ndip R. Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:873909.
11. Moore G, Griffith C, Fielding L. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *Int J Environ Health Res*. 2002;12(4):317-29.
12. Salas Vázquez DI. Evaluación de metodologías de control higiénico de control de superficies alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.

13. Aycicek H, Oguz U, Karci K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2006;209(2):203-6.
14. Larson EL, Aiello AE, Gomez-Duarte C, Lin SX, Lee L, Della-Latta P, *et al.* Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology.* 2003;20(6):735-9.
15. Davidson CA, Griffith CJ, Peters AC, Fielding LM. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence.* 1999;14(1):33-8.
16. Maukonen J, Mättö J, Wirtanen G, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Saarela M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* 2003;30:327-56.
17. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology.* 2010;27(6):710 - 30.
18. Houhala, K., M. Rahkio, S. Levo, R. Sauna-Aho, and T. Valikyla (ed.). 1996. A guide book to monitoring surface hygiene. Vammalan Kirjapaino Oy, Vammala.
19. Miettinen H, Aarnisalo K, Salo S, Sjöberg AM. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *J Food Prot.* 2001;64(5):635-9.
20. Sneed J, Strohbehn C, Gilmore SA, Mendonca A. Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *Journal of the American Dietetic Association.* 2004;104(11):1722-4.
21. Marzano MA, Balzaretto CM. Cook-serve method in mass catering establishments: Is it still appropriate to ensure a high level of microbiological quality and safety? *Food Control.* 2011;22(12):1844-50.
22. Ríos-Castillo AG, Ripollés-Ávila C, Rodríguez-Jerez JJ. Evaluation of bacterial population using multiple sampling methods and the identification of bacteria detected on supermarket food contact surfaces. *Food Control.* 2021;119:107471.