

Eficiência dos métodos microbiológicos e de ATP-bioluminescência na detecção da contaminação de diferentes superfícies

Efficiency of microbiological and ATP-bioluminescence methodologies for detecting contaminants on different surfaces

RIALA6/1316

Talita de OLIVEIRA^{1*}, Antonio Carlos Victor CANETTIERI²

*Endereço para correspondência: ¹Rua Baltazar, 145, Jardim Colonial, São José dos Campos/SP, Brasil. CEP 12234-360. Fone: (12) 3966-1351. E-mail: talitao@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Recebido: 08.02.2010 – Aceito para publicação: 05.10.2010

RESUMO

Nos últimos 30 anos, novas técnicas de análise da limpeza de superfícies, como ATP-bioluminescência, têm sido desenvolvidas. Este trabalho comparou a eficácia dos métodos de análise microbiológica de superfície, utilizando-se placas RODAC® e a contagem padrão em placas pela técnica do *swab* com a técnica de ATP-bioluminescência. Analisou-se a contaminação em quatro tipos de material: laminado melamínico, vidro, plástico e aço inox. As coletas das amostras foram realizadas em quatro períodos, e em cada período, após a desinfecção com álcool 70%, e após sete dias de contaminação pela exposição ao ambiente de laboratório de microbiologia. Houve total concordância entre as metodologias após a assepsia com álcool 70%. Após a contaminação da superfície dos materiais no ambiente de laboratório microbiológico, houve 63,6% de concordância entre o método clássico e das placas RODAC® ($p = 0,006$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais analisados quanto à contaminação após a exposição ao ambiente. Ao efetuar a análise de contaminação de superfícies, os métodos microbiológicos (clássico e placa RODAC®) não podem ser substituídos pela técnica de ATP-bioluminescência, apesar desta metodologia ser rápida em indicar se uma superfície está adequadamente limpa.

Palavras-chave. estudos de avaliação, análise microbiológica, contaminação, desinfecção.

ABSTRACT

In the last 30 years new technologies to analysis the surface cleaning procedures based on rapid technique have been developed. This study compared the efficacy of classic methodologies for microbiological analysis on surfaces, using RODAC® plates and swab, and ATP-bioluminescence technique. The microbiological burden was evaluated on four materials: melaminic laminate, glass, plastic and stainless steel. Samples were collected in four different periods, and at each period the samples were collected from the surfaces after applying a cleaning procedure using alcohol 70% and after being exposed to the in a microbiology laboratory for seven days. A concordance of 100% was found between the classic methodologies and the ATP-bioluminescence technique after cleaning procedure; after the atmosphere exposition, 63,6% of agreement was found between the classic methodology and the RODAC® plates technique ($p = 0,006$). No significant differences was observed in CFU among four materials after being exposed to atmosphere for seven days. For conducting contaminants analysis on surfaces the classic microbiological methods cannot be replaced by ATP-bioluminescence technique; although the last one can rapidly indicate whether a surface is clean or not, but it should be used along with classic methodologies.

Key words. validation studies, microbiological analysis, contamination, disinfection.

INTRODUÇÃO

O estudo de organismos bioluminescentes tem trazido avanços muito significativos nas áreas de biotecnologia¹. O sistema de ATP-bioluminescência, para a validação de limpeza em superfícies, é um dos benefícios obtidos através de pesquisas realizadas com organismos bioluminescentes. Esse sistema utiliza a enzima luciferase, derivada de vaga-lumes, que é altamente sensível à presença de ATP².

A contagem padrão em placas pela técnica do *swab* foi muito utilizada de 1900 até a década de 80³. Ainda hoje a técnica de esfregaço em superfície tem se mostrado uma importante ferramenta na validação de limpeza em diversas áreas, como a indústria de alimentos⁴, porém novas técnicas de análise, utilizando métodos mais rápidos, têm sido desenvolvidas desde então³.

Pode-se definir como “rápido” qualquer método destinado à detecção, contagem e caracterização de micro-organismos do qual se obtém resultados de maneira simples, confiável e em menor tempo do que com os métodos convencionais⁵. Estes novos métodos detectam resíduos de matéria orgânica (dejetos alimentares, micro-organismos) oriundos de uma limpeza deficiente, e os resultados são obtidos em tempo real, indicando se a superfície está limpa ou não⁶.

As moléculas de ATP reagem com o complexo enzimático luciferina-luciferase e esta reação irá gerar luz. A intensidade desta luz será medida através de um luminômetro, pois para cada molécula de ATP consumida será gerado um fóton de luz². Portanto, quanto maior a concentração de ATP na superfície, maior será a intensidade de luz emitida, expressa em URL (Unidade Relativa de Luz)⁷.

As placas de contato RODAC[®] têm sido recomendadas em muitos estudos para quantificar a contaminação microbiana de superfícies, como chão, parede, mesa, cama e pele humana. O seu método de aplicação é simples, rápido e ideal para mensurar a contaminação de grandes áreas onde muitas amostras são necessárias para validação estatística⁸.

Costa et al³ afirmaram que análises microbiológicas tradicionais da água e dos alimentos são trabalhosas e requerem um período de tempo longo, tornando mais difícil controlar procedimentos de limpeza e sanitização. Para atender a demanda das indústrias alimentícias, métodos rápidos e sensíveis têm sido desenvolvidos, estes métodos são baseados em crescimento ou

metabolismo microbiano e utilizam princípios de ATP-bioluminescência, biofísica, radiometria entre outros⁷. A rapidez da leitura dos resultados do método de ATP-bioluminescência é uma das principais vantagens para sua aplicação, conforme relatado por Oliveira et al⁹.

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficácia do método microbiológico clássico (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*), do método das placas RODAC[®] e do método de ATP-bioluminescência na análise da contaminação de 4 diferentes superfícies de materiais (laminado melamínico, vidro, plástico e aço inox), geralmente encontrados na composição de bancadas, equipamentos e outros objetos utilizados em análises microbiológicas, expostas ao ambiente de um laboratório de microbiologia, por 7 dias, antes e após a desinfecção das mesmas com álcool 70%.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostragens e análises deste trabalho foram realizadas em um laboratório de Microbiologia na cidade de São José dos Campos/SP.

Para comparar a eficiência entre o método de ATP-bioluminescência (utilizando o sistema Lightning[®] da Biocontrol) e os métodos de análise microbiológica de superfície (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*, denominado de método clássico; e com placas RODAC[®]), foram utilizados quatro tipos de material: 1 placa de laminado melamínico (Formica[®]) de 20 cm X 60 cm; 1 placa de vidro de 20 cm X 60 cm; 1 placa de aço inox de 20 cm X 60 cm e 3 placas de Petri de plástico (esterilizadas) de 150 mm X 15 mm.

Foram realizadas 4 amostragens, com as mesmas placas de materiais, em intervalos de 3 meses entre as coletas. Em cada amostragem, coletou-se material em duas situações: após desinfecção das superfícies com álcool 70%, e após 7 dias de exposição das mesmas superfícies ao meio ambiente, representando a contaminação dessas superfícies expostas ao ambiente de trabalho de um laboratório de microbiologia.

As placas de laminado melamínico, vidro e aço inox foram divididas em três partes iguais, de 20 cm X 20 cm cada parte, para uma análise de superfície: uma para o método clássico, outra para a análise com placas RODAC[®] e mais uma para o método de ATP-bioluminescência. O mesmo foi feito com as placas de Petri (plástico esterilizado), uma placa para cada método de análise.

As placas sofreram desinfecção com álcool 70%. O álcool foi borrifado nas placas até que toda a superfície das mesmas estivesse coberta por ele. Deixou-se então o álcool 70% agir durante 15 minutos. Após, amostragens utilizando *swab*, placas de contato RODAC® e *swab* de ATP-bioluminescência foram coletadas em todos os materiais estudados.

Método clássico (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*)

A coleta da amostra foi realizada em uma área central de 25 cm² em cada material. Logo após a utilização dos *swabs*, umedecidos em solução salina esterilizada, nas superfícies estudadas, estes foram inseridos em tubo de ensaio, quebrando-se a extremidade que entrou em contato com os dedos. A solução foi homogeneizada em agitador Vortex®, durante 10 a 15 segundos. Em fluxo laminar uma alíquota de 1 mL foi pipetada em placa de Petri estéril e, a seguir, foram vertidos os meios de cultura fundidos e resfriados a 45°C, TSA (Tryptone Soya Agar, OXOID) com o corante TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride), para facilitar a contagem das colônias bacterianas e SDA (Sabouraud Dextrose Agar, OXOID) para pesquisa de bolores e leveduras. As placas foram incubadas a 30-35°C, por 48h, e 20-25°C, por 5 dias, respectivamente. Após a incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizado. O resultado individual foi multiplicado por 4 e expresso em UFC/25 cm², de acordo com Aguiar¹⁰.

Método das placas RODAC®

Em cada amostragem foram utilizadas oito placas RODAC®, duas placas para cada tipo de material, uma placa contendo meio de cultura TSA e outra com SDA, para pesquisa de bolores e leveduras. Cada placa foi submetida ao contato direto de seu meio de cultura com a superfície avaliada através de uma leve pressão por 10 segundos. As placas de TSA e SDA foram incubadas a 30-35°C, por 48h, e a 20-25°C, por 5 dias, respectivamente. Após a incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o cálculo das UFC.

Método de ATP-bioluminescência

Nas amostragens com o método de ATP-bioluminescência foi utilizado o sistema Lightning® (BIOCONTROL). O *swab* de bioluminescência foi removido de seu tubo e uma área central de 25cm² foi

avaliada em cada material. Após, o *swab* foi ativado pressionando o êmbolo totalmente para baixo e depois inserido no luminômetro Lightning® e a leitura foi realizada. O resultado da leitura foi exibido após 10 segundos na tela do aparelho. A interpretação dos resultados foi feita e expressa em valores relacionados às zonas de limpeza definidas no aparelho.

Coleta de amostras após exposição ao meio ambiente

Logo após a essa primeira coleta, as superfícies dos 4 materiais foram limpas com uma gaze umedecida em álcool 70% e expostas ao ambiente de um laboratório microbiológico por 7 dias, sem o contato direto dos analistas, mas recebendo todo material particulado gerado durante a rotina de trabalho no laboratório de Microbiologia.

Os materiais estudados foram acomodados em cima de um armário, a 2,30m do chão, e não receberam nenhum tipo de limpeza durante o período em que ficaram expostos. Após os 7 dias de exposição, os materiais foram submetidos as análises microbiológicas descritas anteriormente.

Interpretação dos resultados

As médias de UFC, obtidas após as quatro etapas de coletas, foram comparadas com valores padrões e classificadas em categorias: aceitável, inadequado e inaceitável (Tabela 1). Esses valores de UFC de referência foram baseados em dados obtidos nos últimos 2 anos, em monitoramentos prévios realizados no laboratório (dados não apresentados).

Os resultados obtidos no método de ATP-bioluminescência foram medidos em fótons e convertidos em zonas de limpeza. As zonas de limpeza são expressas em intervalos de 0 a 7,5 URL (Unidade Relativa de Luz). Esta escala é a conversão dos fótons em uma escala logarítmica base 10, que utiliza a fórmula da escala Richter: ML (Magnitude Local) = logA - logAo, onde A representa a amplitude máxima medida no sismógrafo e Ao uma amplitude de referência. Os valores de referência para classificação dos resultados em categorias se encontram na Tabela 1.

O grau de concordância entre as técnicas, após a divisão dos resultados em categorias (aceitável, inadequado, inaceitável), foi medido pelo índice de concordância de Kappa. Utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar os quatro tipos de materiais em cada uma das três técnicas avaliadas. O intervalo de confiança das análises estatísticas foi de 95% (p < 0,05).

Tabela 1. Valores limítrofes para a classificação em categorias dos resultados obtidos das análises das diferentes superfícies

Método	Aceitável	Inadequado	Inaceitável
Clássico (UFC/25cm ²)	Menor de 25	Entre 25 - 50	Mais de 50
RODAC® (UFC)	Menor de 25	Entre 25 - 50	Mais de 50
ATP-bioluminescência (URL/25cm ²)	Menor de 2,6	Entre 2,6 - 3,0	Mais de 3,0

RESULTADOS

Não houve crescimento de micro-organismos nos meios de cultura após a desinfecção com álcool (método clássico e método da placa RODAC®) e culturas microbianas apenas foram observadas nas análises realizadas após a exposição dos materiais por 7 dias ao ambiente. Apresentamos a contagem total de UFC, representando a somatória das UFC bacterianas e fúngicas.

Para a técnica de ATP-bioluminescência, após a desinfecção, obteve-se que todas as superfícies estavam limpas (menos de 2,6 URL/ cm²). Pôde-se observar nas quatro amostragens, então, que após a desinfecção com álcool 70%, houve concordância total entre o método clássico, método da placa RODAC® e o método de ATP-bioluminescência.

Os resultados numéricos obtidos após exposição dos diferentes materiais ao meio ambiente estão apresentados na Tabela 2, juntamente com a classificação dos dados nas categorias apresentadas na Tabela 1.

Tabela 2. Resultados obtidos pelas técnicas (método clássico, método da placa RODAC® e ATP-bioluminescência) em quatro amostragens, após exposição ao ambiente de laboratório por 7 dias, classificados em categorias (aceitável, inadequado e inaceitável)

Amostragens	Material	Clássico (UFC/cm ²)	RODAC® (UFC)	ATP-biol. (URL/cm ²)
1ª	Laminado	4■	12■	1,6■
	Aço inox	4■	24■	1,6■
	Vidro	8■	24■	3,8•
	Plástico	24■	42◉	3,9•
2ª	Laminado	0■	12■	3,0◉
	Aço inox	8■	17■	3,3•
	Vidro	24■	23■	3,1•
	Plástico	16■	24■	3,6•
3ª	Laminado	60•	70•	2,6◉
	Aço inox	68•	51•	3,0◉
	Vidro	84•	84•	2,8◉
	Plástico	48◉	40◉	3,1•
4ª	Laminado	20■	23■	2,2■
	Aço inox	8■	17■	1,8■
	Vidro	4■	22■	2,2■
	Plástico	24■	24■	1,9■

Categorias: ■ – aceitável; ◉ – inadequado; • – inaceitável

Tabela 3. Concordância entre os métodos clássico, da placa RODAC® e de ATP-bioluminescência

Comparações	Kappa	IC	p
RODAC® / Clássico	63,6%	36,4%	0,006
RODAC® / ATP	-2,9%	29,4%	Não se aplica
Clássico / ATP	-12,7%	21,2%	Não se aplica

A Tabela 3 mostra que existiu 63,6% de concordância estatisticamente significativa entre a técnica Clássica e a de RODAC (p = 0,006). Notou-se que a técnica ATP-bioluminescência discordava dos outros métodos de análise de superfícies, não sendo possível calcular os p-valores com os índices de kappa negativos, não se aplicando o teste de significância

nessas comparações (clássico/ATP-bioluminescência, placas RODAC®/ATP- bioluminescência).

Após a análise estatística de Kruskal-Wallis observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os quatro tipos de materiais avaliados, para os métodos clássico, das placas RODAC® e ATP-bioluminescência (p = 0,640; p = 0,498; p = 0,304; respectivamente (tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre os resultados obtidos para os quatro tipos de materiais pelo método clássico, da placa RODAC® e de ATP-bioluminescência

Método	Parâmetro	Aço inox	Laminado	Plástico	Vidro
Método clássico	Média	22,0	21,0	28,0	30,0
	Mediana	8,0	12,0	24,0	16,0
	Desvio Padrão	30,7	27,4	13,9	37,0
	N	4	4	4	4
	IC	30,1	26,8	13,6	36,3
	p-valor			0,640	
Placas RODAC®	Média	27,3	29,3	32,5	38,3
	Mediana	20,5	17,5	32,0	23,5
	Desvio Padrão	16,2	27,7	9,8	30,5
	N	4	4	4	4
	IC	15,8	27,1	9,7	29,9
	p-valor			0,498	
ATP-bioluminescência	Média	2,4	2,4	3,1	3,0
	Mediana	2,4	2,4	3,4	3,0
	Desvio Padrão	0,8	0,6	0,9	0,7
	N	4	4	4	4
	IC	0,8	0,6	0,9	0,7
	p-valor			0,304	

DISCUSSÃO

Nesse trabalho procurou-se estabelecer uma relação direta entre os métodos quantitativos microbiológicos e a técnica de ATP-bioluminescência. Oliveira et al⁹ avaliaram a eficiência dos procedimentos de higienização de superfícies de equipamentos através da contagem de micro-organismos em placas e da técnica de ATP-bioluminescência (considerado um método rápido) e concluíram que os resultados obtidos eram comparáveis. Em nosso trabalho também foi observado a praticidade e rapidez da técnica de ATP-bioluminescência, quando comparada aos métodos microbiológicos utilizados.

Obtivemos, também, 100% de concordância nos resultados entre as técnicas utilizadas após desinfecção com álcool 70%, o que demonstrou uma efetiva desinfecção. Costa et al⁷ obtiveram concordância entre os métodos de ATP-bioluminescência e de contagem de mesófilos aeróbios e coliformes totais na análise da qualidade microbiológica da água em uma indústria de laticínios, com ambos dos métodos indicando que a água estava em boa condição de higiene.

De acordo com Griffith⁶, as análises com URL são mais indicadas para refletir como a limpeza foi realizada, indicando se a superfície foi limpa adequadamente. Do mesmo modo, Zottola¹¹ demonstrou que a técnica de ATP-bioluminescência deve ser utilizada como um indicador da condição higiênica, indicando se há matéria orgânica na superfície. Costa et al³ sugeriram que a técnica de ATP-bioluminescência é uma ferramenta apropriada para monitorar a eficiência da limpeza e desinfecção de equipamentos industriais.

Nesta pesquisa, após a exposição das superfícies dos diferentes materiais ao ambiente de trabalho do laboratório, não houve relação direta entre os três métodos (índice de Kappa), o que nos leva a inferir que não se pode relacionar a presença de micro-organismos viáveis com a quantidade de ATP mensurada pelo método de ATP-bioluminescência.

Tal fato foi observado também por Mueller et al¹² que ao compararem o método convencional (contagem em placa) com o de ATP-bioluminescência, dentre outras técnicas, verificaram uma fraca correlação entre ambas, sendo o método com ATP pouco sensível para contagens baixas de UFC.

Uma interferência na técnica de ATP-bioluminescência é a presença de matéria orgânica. Costa et al³ sugeriram que os resíduos de matéria

orgânica presentes em superfícies podem influenciar na reação enzimática que produz o sinal de luz medido pelo luminômetro e que se deve considerar que testes químicos rápidos não são substitutos diretos para os testes microbiológicos convencionais, indicando que não há relação direta entre URL e UFC.

Tal fato foi observado neste trabalho (Tabela 2). Na maioria das vezes, o método ATP-bioluminescência considerou as superfícies como inadequadas ou inaceitáveis. Isso pode ser explicado pela detecção através do aparelho de ATP oriundo de detritos orgânicos e não de micro-organismos viáveis.

Na terceira amostragem, os métodos microbiológicos consideraram as superfícies mais contaminadas que a técnica ATP-bioluminescência, sendo esses resultados discrepantes dos encontrados nas outras observações. Assim como Krysinski et al¹³ analisando superfícies na indústria de laticínios por ATP-bioluminescência e pela contagem de mesófilos aeróbios, demonstraram que o método convencional indicou 44 superfícies com contaminação, contra 17 pelo método ATP-bioluminescência, sendo o método de contagem microbiana considerado mais sensível pelos autores.

Costa et al⁷ relataram também que a técnica de ATP-bioluminescência pode detectar ATP microbiano de células somáticas, de origem vegetal ou animal, porém este método não identifica as espécies microbianas envolvidas na contaminação. Simm et al¹⁴ afirmaram que a determinação de ATP em superfícies deve ser usada como uma técnica auxiliar no monitoramento dos procedimentos de higienização, mas que deve estar associada a outros métodos como o da contagem microbiana.

Sendo assim, a técnica de ATP-bioluminescência deve ser utilizada numa sondagem rápida do nível de limpeza de certa superfície, mas não substitui os métodos microbiológicos clássicos, que devem ser usados num intuito diferente, como por exemplo, no isolamento de espécies patogênicas e determinação de uma cadeia de contaminação cruzada.

Não foi possível comparar quantitativamente o método clássico, a técnica da placa RODAC[®] e o método de ATP-bioluminescência, pois os resultados obtidos nas amostragens geraram dados numéricos, mas em unidades diferentes (UFC/cm², UFC e URL/cm², respectivamente), não comparáveis entre si.

Foi utilizada, então, a categorização em aceitável, inadequado e inaceitável, o que possibilitou a aplicação do índice de concordância de Kappa. Na comparação

da quantidade de UFC obtida em todas as superfícies através do método clássico e da placa RODAC® houve uma concordância de 63,6% ($p = 0,006$) no isolamento da carga microbiana das superfícies, mas deve-se ressaltar que todas as superfícies eram planas, o que possibilitou o uso das placas RODAC®. Esses dados sugerem que se pode utilizar uma ou outra técnica para o estudo microbiológico de um dado material, desde que a superfície seja plana.

Deve-se destacar a diferença que ocorreu entre essas duas técnicas na primeira amostragem com o material plástico, sendo a superfície aceitável pelo método clássico, e a técnica das placas RODAC® indicava que a mesma estava inadequada.

Nesse estudo não encontramos um tipo de material (laminado, aço inox, vidro ou plástico), que permitisse uma maior aderência microbiana. Pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis não se observou diferença estatística entre os quatro materiais utilizados, para cada tipo de técnica. Essa análise foi baseada em um teste estatístico não paramétrico, pois, primeiramente, a amostra era pequena e, depois, as suposições iniciais para se utilizar testes paramétricos, como a distribuição de normalidade, não foram consideradas satisfeitas (dados não apresentados).

Jorge¹⁵ citou que o álcool etílico tem sido utilizado, tradicionalmente, na desinfecção das superfícies. Os resultados obtidos com o uso de álcool 70%, neste trabalho, reforçam a importância da desinfecção de superfícies, que devem ocorrer no ambiente de trabalho, assim como, o cuidado que devemos ter com o manuseio de microorganismos em um laboratório de Microbiologia, no intuito de diminuir a geração de aerossóis contaminados que se depositarão nas diversas superfícies de um laboratório, como foi constatado em nosso trabalho, que utilizou quatro tipos de materiais diferentes expostos ao meio ambiente a 2,30 m do solo.

CONCLUSÃO

Após a desinfecção da superfície com álcool 70% houve total concordância entre as três técnicas aplicadas, demonstrando que o método ATP-bioluminescência pode ser utilizado para a validação da limpeza e desinfecção de uma superfície, por se tratar de um método mais rápido que os microbiológicos convencionais.

Álcool 70% foi eficiente na desinfecção de superfícies neste trabalho.

Após a exposição ao meio ambiente por 7 dias, os 4 tipos de materiais analisados não apresentaram diferenças em relação à carga microbiana existente em suas superfícies, baseado na análise das técnicas isoladamente.

Na comparação das técnicas entre si houve apenas concordância (63,6%) entre os resultados obtidos pelo método clássico e de placas RODAC®, e não existiu concordância entre estes e o método ATP-bioluminescência.

REFERÊNCIAS

1. Nunes-Halldorson VS, Duran NL. Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *Braz J Microbiol*. 2003;34(2):91-6.
2. SOVNET®. Monitoramento de ATP Lightning®. [Acesso 26 set 2009]. Disponível em: [http://www.sovnet.com.br].
3. Costa PD, Andrade NJ, Brandão SCC, Passos FJV, Soares NFF. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Braz J Microbiol*. 2006;37(3):345-9.
4. Hartmann W. Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes* [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009.
5. Leotta GA. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(2):63-4.
6. Griffith C. Improving surface sampling on detection of contamination. In: Lelieveld HLM, Mosterte A, Holah J. Handbook of hygiene control in the food industry. Cambridge (UK): Woodhead Publishing; 2005.p.588-618.
7. Costa PD, Andrade NJ, Passos FJV, Brandão SCC, Rodrigues CGF. ATP-bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. *Braz Arch Biol Technol*. 2004;47(3):399-405.
8. Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev Saude Publica*. 2000;34(2):4-9.
9. Oliveira CAF, Moreno JFG, Mestieri L, Germano PML. Avaliação comparativa das condições higiênicas de equipamentos utilizados na fabricação de embutidos, através das técnicas de bioluminescência de ATP e contagem global de microrganismos. *Hig Aliment*. 1998;12(58):58-63.
10. Aguiar JA. Efetividade de um programa de higiene alimentar implantado em um serviço de alimentação escolar do sistema público [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2003.
11. Zottola EA. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry? *Food Technol*. 1994;48:107-44.

12. Mueller SA, Anderson JE, Kim BR, Ball JC. Comparison of plate counts, Petrifilm, dipslides, and adenosine triphosphate bioluminescence for monitoring bacteria in cooling-tower waters. *Water Environ Res*. 2009;81:401-6.
13. Krysinski EP, Brown LJ, Marchisello TJ. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J Food Prot*. 1992;55:246-51.
14. Simm EM, Andrade NJ, Mendonça RCS, Passos FJV, Chaves, JBP. Interference of some organic substances and microorganisms adhered to stainless steel in ATP-bioluminescence measurement. *Braz Arch Biol Technol*. 2008;51:587-93.
15. Jorge AOC. *Princípios de microbiologia e imunologia*. 1 ed. São Paulo: Santos; 2006.p.281.