

Listeria monocytogenes en vegetales mínimamente procesados

María Luisa de Curtis, Olgamar Franceschi y Norma De Castro

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Caracas- Venezuela

RESUMEN. La demanda de vegetales mínimamente procesados se ha incrementado debido en parte al auge de los servicios de comida, donde las ensaladas siempre están incluidas en los menús diarios. Las nuevas técnicas de procesamiento y envase que permiten utilizar el producto listo para servir, han aumentado el riesgo asociado con microorganismos patógenos emergentes, tales como *Listeria monocytogenes*. En el presente trabajo se determinó la presencia de esta especie en 120 muestras de vegetales con procesamiento mínimo (ready-to-use), utilizados en servicios masivos de comida, y adicionalmente, se evaluó la calidad microbiológica a través de la numeración de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, e investigación de la presencia de *Shigella* spp y *Vibrio cholerae*. Para la investigación y detección de *L. monocytogenes* se utilizó la técnica TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, el sistema BCM® *Listeria monocytogenes*, el sistema API LISTERIA y los métodos de detección moleculares AccuProbe™ y GENE-TRAK®. *E. coli* se detectó en aproximadamente el 30,3% de los vegetales usados en este estudio. El género *Listeria*, se evidenció en el 25% de las muestras en estudio: 30% correspondió a *L. monocytogenes*. Estos resultados permiten reafirmar la importancia del control microbiológico de los vegetales para el aseguramiento de la calidad de los mismos.

Palabras clave: Calidad microbiológica, alimentos, vegetales mínimamente procesados, *Listeria monocytogenes*.

SUMMARY. *Listeria monocytogenes* in vegetables minimally processed ready-to-use. The demand of vegetables minimally processed (ready-to-use) has increased partly due to the frequent use of the food services, where the salads are always included in the daily menus. The use of new technologies for processing and packaging has made possible to obtain a product ready to serve. Nevertheless the associated risk of the presence of emergent pathogens, such as *Listeria monocytogenes* seems to be involved. The aim of this work was to assess the microbiological quality of this kind of food. 120 samples of vegetables minimally processed ready-to-use were analyzed for their content of aerobic mesophilic bacteria, total and fecal coliforms and *E. coli*, and the presence of *Shigella* spp, *Vibrio cholerae* and *Listeria monocytogenes*. The TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, the BCM® *Listeria monocytogenes* and the API LISTERIA systems, and the methods of molecular detection AccuProbe™ and GENE-TRAK® were used for isolation and identification. *E. coli* was detected in approximately 30,3% of the vegetables used in this study. The genus *Listeria* was evidenced in 25% of the samples; 30% corresponded to *L. monocytogenes*. *Shigella* spp and *Vibrio cholerae* were not isolated. The findings of this study suggest the need of the microbiological control of the vegetables minimally processed ready-to-use to assure their quality and safety.

Key words: Microbiological control, vegetables minimally processed, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCION

A pesar de que el desarrollo tecnológico ha permitido extender la vida útil de los productos refrigerados como los vegetales enteros, procesados, pre-cortados, ensaladas preparadas, frutas y vegetales de larga duración, ha hecho surgir la preocupación con relación a que en estos nuevos tipos de presentación de productos, aumente el peligro microbiológico asociado con patógenos emergentes. Tal es el caso de algunas especies del género *Listeria*.

El género *Listeria* comprende seis especies, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*; la presencia de cualquier especie se considera como indicador de una higiene deficiente (1). La *Listeria monocytogenes*, produce una enfermedad conocida como Listeriosis, de allí que existe un gran interés en excluir a este microorganismo de la cadena de producción de

alimentos, mientras sea posible, y mantener las condiciones que inhiban su multiplicación en los alimentos en que pueda multiplicarse. En infecciones severas se observa septicemia, meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central y posiblemente muerte; estos síntomas pueden ser precedidos por síntomas gastrointestinales tales como náuseas, vómito, diarrea, fiebre o dolor de cabeza (2). Esto es más significativo en grupos comprometidos, como ancianos, mujeres embarazadas, pacientes inmunocomprometidos y pacientes VIH positivos (3).

La *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo, produce β -hemólisis en agar sangre de diversos animales, oxidasa negativo, crece entre 2,5 y 42°C, motilidad positiva (20-25°C) tipo "tumbling" (4). Está presente comúnmente en aguas de desecho, fluviales, afluentes y hasta en plantas de tratamiento de aguas servidas, en el suelo, en el ambiente; en aves, pescado.

moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales. Específicamente en estos últimos, ha sido aislada a partir de repollo, apio (celery), perejil, lechuga y jugo de lechuga, pepino, rábano, hongo, cebollín, y pimentón (5,6,7). Se ha encontrado en vegetales que están contaminados con la tierra o el estiércol usado como fertilizante. Puede sobrevivir por largos períodos en los alimentos, en las plantas de procesamiento y en ambientes refrigerados por lo que puede ser transmitida al humano a través de la ingestión de alimentos que se contaminan durante cualquier paso de la cadena de producción (8).

Entre los años 80 y 90, la presencia de la *Listeria monocytogenes* se comenzó a considerar como un problema de salud pública en los Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa como lo señalan Ho y col. (9) y Farber y Peterkin (10), quienes describen brotes importantes de Listeriosis que se identificaron en Europa y Norte América. Ciertas Agencias Reguladoras de diferentes países (11,12), han adoptado estándares en relación con *Listeria monocytogenes* en productos específicos listos para comer. En Venezuela, no está disponible ninguna información epidemiológica de Listeriosis pero hay reportes sobre vegetales frescos en los que se ha encontrado *Listeria monocytogenes* (13-15).

La demanda de vegetales crudos mínimamente procesados se ha incrementado debido en gran parte al auge de los servicios de comida, donde las ensaladas forman parte de los menús diarios y como se señaló anteriormente, las nuevas técnicas de procesamiento y envase que permiten el uso de vegetales listos para servir, han aumentado el riesgo asociado con *Listeria monocytogenes*.

Actualmente en Venezuela no existen datos recientes publicados de la calidad microbiológica de vegetales listos para servir, razón por la cual el objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de *Listeria monocytogenes* en mezclas de vegetales con procesamiento mínimo (ready-to-use), utilizados en servicios masivos de comida, y adicionalmente, evaluar su calidad microbiológica a través de la numeración de bacterias aerobias mesófilas, recuento de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, e investigación de la presencia de *Shigella* spp y *Vibrio cholerae*.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se analizó por quintuplicado, un total de 120 muestras de vegetales mínimamente procesados, en envases de tamaño institucional (1 kg), seleccionadas antes de la fecha de vencimiento del producto, procedentes de los servicios de comida, constituidas por 50 muestras de lechuga picada (tipo americana), 50 de una mezcla de repollo morado, repollo

blanco y zanahoria y 20 de una mezcla de lechuga (tipo americana), zanahoria y repollo morado.

Numeración de aerobios mesófilos

Se prepararon las muestras de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN 1126-89 (16). Para el recuento se siguieron dos técnicas: la descrita en las Normas Venezolanas COVENIN 902-87 (17) utilizando placas con agar para recuento y la descrita en la Norma Venezolana COVENIN 3338-1997 (18) utilizando placas específicas Petrifilm™ (St. Paul MN). Los resultados de los recuentos se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Determinación del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*

Se siguieron las técnicas descritas en las Normas Venezolanas COVENIN 1126-89 (16) y 1104:1996 (19) con el caldo lauril sulfato triptosa (Difco®, Detroit MI) para tres tubos. Los coliformes totales se confirmaron en agar Levine (Difco®, Detroit MI) y los fecales en caldo para enriquecimiento de coliformes (EC Difco®, Detroit MI). El aislamiento de *E. coli* se realizó a partir de los tubos positivos de caldo EC, en agar Levine (Difco®, Detroit MI). Los resultados se expresan como NMP por gramo de muestra.

Investigación de *Shigella* spp

Se siguió la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual, de la Administración de Alimentos y Drogas (20). Se identificó por pruebas convencionales: fermentación de glucosa y lactosa, motilidad y prueba de lisina decarboxilasa y por el sistema API 20E.

Investigación de *Vibrio cholerae*

Se siguió la técnica del Manual de Procedimientos Analíticos y Medidas Sanitarias Especiales, en prevención a la entrada del cólera en Venezuela (21). Se identificó mediante las pruebas bioquímicas correspondientes: agar triple azúcar hierro (TSI Difco® Detroit MI), metabolismo oxidativo o fermentativo (Hugh y Leifson), descarboxilación de la lisina, arginina y ornitina, oxidasa (Difco®, Detroit MI), y pruebas serológicas con el antisuero polivalente O para *V. cholerae* (Difco®, Detroit MI).

Investigación del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

Se procesaron las muestras según la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual de la Administración de Alimentos y Drogas (20), usando caldo tamponado de enriquecimiento para *Listeria* (BLEB). Se aisló en placas de agar Palcam (Merck®, Darmstadt Alemania) y se incubó por 48 horas a 30°C. Adicionalmente se utilizó el sistema de detección BCM® *Listeria monocytogenes* (Biosynth®,

Naperville IL). Paralelamente, a partir del caldo de enriquecimiento tamponado BLEB (Difco®, Detroit MI) se realizó la prueba TECRA® UNIQUE™ LISTERIA para la detección del género *Listeria*.

Identificación del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

A las colonias características del género *Listeria* (verde gris con halo negro-marrón), provenientes del agar Palcam, se les realizó coloración de Gram y se determinó la movilidad (medio SIM Difco®, Detroit MI). También se utilizó la Iluminación de Henry, sembrando en agar soya caseína y observando mediante el método de Iluminación oblicua de Henry (22), utilizando un Illuminator Baush & Lomb Nicholas. Adicionalmente se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas para su identificación: prueba de la catalasa, fermentación de ramnosa, xilosa y manitol en caldo púrpura bromo cresol al 0,5% y se aplicó el sistema API LISTERIA.

La actividad hemolítica fue determinada mediante punción en placas de agar sangre base Columbia (Difco®, Detroit MI), con sangre de carnero al 5%, incubadas a 37°C por 24-48 horas. Se realizó la prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson test), de acuerdo a la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual de la Administración de Alimentos y Drogas (20), utilizando un cultivo de *S. aureus* hemolítico ATCC 25923 y uno de *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

Se utilizaron los métodos de detección e identificación moleculares para *L. monocytogenes*: GENE-TRAK® y AccuProbe™, utilizando como control positivo *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 y como control negativo *Listeria grayi* ATCC 19120.

Cepas de referencia

Shigella dysenteriae y *Vibrio cholerae* (Cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la U.C.V.), *E. coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 43256, *Listeria monocytogenes* LM82 (FDA), *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria grayi* ATCC 19120, *S. aureus* hemolítico ATCC 25923, *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando los promedios; la significación se determinó mediante la prueba chi cuadrado (χ^2) utilizando el valor de $p < 0,05$ como límite de la significación. Se utilizó el análisis de regresión en los recuentos de aerobios mesófilos, para calcular los coeficientes de correlación.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la distribución porcentual de las

muestras de vegetales mínimamente procesados según los rangos de contaminación con bacterias aerobias mesófilas; solamente en las muestras de lechuga picada se encontró el 5,0% por encima de 10^4 UFC/g.

TABLA 1

Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados según rangos de contaminación con bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)

Vegetales procesados	< 10^3 UFC/g %	10^3 - 10^4 UFC/g %	> 10^4 UFC/g %
Lechuga picada	30,8	64,2	5,0
MRbRmZ	17,5	82,5	—
MLZRm	18,3	81,7	—

MRbRmZ: Mezcla de repollo blanco, repollo morado y zanahoria
MLZRm: Mezcla de lechuga, zanahoria y repollo morado n= 120

En las Tablas 2 a 4 se muestran las distribuciones porcentuales de las muestras de vegetales procesados según rangos de contaminación con coliformes. Si se considera como rango de aceptabilidad para *E. coli* = 3 NMP/g, un 69,66% de las muestras está fuera de los límites; si el punto de corte es =150 NMP/g, *E. coli* se detectó en aproximadamente el 30,3% de los vegetales usados en este estudio. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las muestras de vegetales procesados. En ninguna de las muestras analizadas se detectó *Shigella* spp ni *V. cholerae*.

TABLA 2

Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Lechuga picada) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	6,0	42,0	42,0
3-93	36,0	26,0	26,0
150-240	26,0	10,0	10,0
460-1100	—	14,0	14,0
≥ 1100	32,0	8,0	8,0

n=50 ; NMP/g: Número más probable/gramo

TABLA 3
Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Mezcla de repollo blanco, repollo morado y zanahoria) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	14,0	24,0	24,0
3-93	20,0	52,0	52,0
150-240	24,0	10,0	10,0
460-1100	16,0	10,0	10,0
≥ 1100	26,0	4,0	4,0

n=50 ; NMP/g: Número más probable/gramo

TABLA 4
Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Mezcla de lechuga, zanahoria y repollo morado) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	—	25,0	25,0
3-93	25,0	40,0	40,0
150-240	20,0	25,0	25,0
460-1100	15,0	5,0	5,0
≥ 1100	40,0	5,0	5,0

n=20 ; NMP/g: Número más probable/gramo

Con relación al género *Listeria*, se evidenció su presencia en el 25% de las muestras en estudio, tanto por el método convencional (BLEB y Palcam), como por la técnica Mediante el Sistema de detección BCM® *Listeria monocytogenes*, aquellas colonias sospechosas de ser *L. monocytogenes*, dieron colonias color turquesa en el medio selectivo/diferencial BCM®. En el medio confirmatorio BCM® *Listeria monocytogenes* (LMCM), se observó la fluorescencia característica y produjeron ácido por fermentación de la ramnosa.

De acuerdo con la identificación de las colonias del género *Listeria* por el sistema API LISTERIA, el 30% de las colonias características provenientes del agar Palcam, correspondió a *L. monocytogenes*, el 36,5% a *L. innocua*, el 13,3% a *L. ivanovii*, el 10% a *L. welshimeri*, el 6,67% a *L. seeligeri* y el 3,33% a *L. grayi*.

L. monocytogenes y *L. seeligeri*, aumentaron la hemólisis producida por *S. aureus* hemolítico; *L. ivanovii* aumentó la

producida por *R. equi*. Todas las colonias fueron catalasa positiva y mostraron la motilidad tipo paraguas típica del género *Listeria* en el medio de movilidad (SIM). Mediante la iluminación de Henry, las colonias de *L. monocytogenes* se observaron con una tonalidad azul característica del género.

Estos resultados fueron confirmados por pruebas bioquímicas convencionales y actividad hemolítica, y se señalan en la Tabla 5. En dicha tabla se indican los códigos característicos de las diferentes especies de *Listeria*, que nos permitieron identificarlas por el sistema API LISTERIA. Así mismo se muestran los resultados obtenidos de los métodos de detección e identificación moleculares GENE-TRAK® y AccuProbe™. Con este último método los valores obtenidos fueron desde 342.765 hasta 364.330 RLU (Relative Light Units).

TABLA 5
Identificación del género *Listeria* con las pruebas bioquímicas convencionales, actividad hemolítica, los métodos de detección e identificación moleculares AccuProbe™ y GENE-TRAK® y el sistema API LISTERIA

<i>Listeria</i> spp	Resultados en						Código API
	β Hem	Ram	Xil	Man	AccP	G-T	
<i>Listeria monocytogenes</i> (N=9)	+	+	-	-	+	+	6510 6450 6010
<i>L. innocua</i> (N=11)	-	V	-	+	-	-	7510 7110
<i>L. ivanovii</i> (N=4)	++	-	+	-	-	-	3330 3340 3350 3330
<i>L. welshimeri</i> (N=3)	-	V	+	-	-	-	7710 7711
<i>L. seeligeri</i> (N=2)	+	-	+	-	-	-	3310
<i>L. grayi</i> (N=1)	-	V	-	+	-	-	7530 7530

β Hem: Beta hemólisis, Ram: Ramnosa, Xil: Xilosa, Man: Manitol, AccP: AccuProbe™ (sonda-ADN).
G-T: Gene-Trak® (sonda-ADN), Código API: Perfil numérico. V: variable.

DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación con las bacterias aerobias mesófilas, se considera que los mismos indican que no hay una elevada contaminación y concuerdan

con algunos estudios realizados en este tipo de productos, donde se señalan variados rangos de poblaciones iniciales de bacterias aerobias mesófilas, desde 10^3 hasta 10^9 (23).

No se encontró diferencia significativa entre la metodología clásica y el uso del Petrifilm™ para el recuento de aerobios mesófilos ($r=0,98$); estos resultados concuerdan con los señalados por Ríos y col. (24).

Los resultados obtenidos por el método en placa con películas secas rehidratables, nos permiten concluir que son confiables para el tipo de alimento que se seleccionó para este estudio, y coinciden con los resultados obtenidos en estudios colaborativos realizados en el país (24,25).

En cuanto a *E. coli*, consideramos que deben mantenerse altos estándares de sanitización y temperaturas apropiadas de refrigeración durante el procesamiento, transporte y almacenamiento del tipo de vegetales estudiados. Ello es de suma importancia ya que estos productos son mínimamente procesados y se consumen crudos sin tratamiento térmico alguno (26).

En el presente estudio, el género *Listeria* fue detectado en las muestras de vegetales listos para servir, tanto por el método tradicional (agar Palcam) como por la técnica TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, lo cual concuerda con los resultados señalados por Rijkelt (27), por lo que consideramos que dicha técnica, para vegetales mínimamente procesados como los utilizados en este trabajo, puede recomendarse por su economía de tiempo y la obtención de resultados confiables. Asimismo, los resultados obtenidos por el sistema API para la identificación de las diferentes especies del género *Listeria*, se pueden considerar confiables ya que fueron confirmados con los obtenidos por los métodos convencionales y en cuanto al sistema BCM® *Listeria monocytogenes*, consideramos que es una alternativa de los métodos tradicionales, ya que permite la detección e identificación de *L. monocytogenes* en alimentos, con exactitud, sensibilidad y precisión como lo señalan Rijkelt (27) y Restaino y col (28). Sin embargo, recomendamos realizar estudios colaborativos, para que sean aceptados por los organismos contralores y usados como métodos de rutina.

Los métodos utilizados en este trabajo. AccuProbe™ y GENE-TRAK®, constituyeron una herramienta valiosa para la identificación rápida de *L. monocytogenes* y nos permitieron confirmar los resultados obtenidos por los métodos convencionales y el sistema API.

Se puede concluir que la alta sensibilidad de los métodos de detección e identificación moleculares, podría afectar las especificaciones microbiológicas existentes; esto, sin ninguna duda, tendrá repercusión en los organismos contralores, en los fabricantes de alimentos y también en los consumidores (29).

El incremento en los últimos años, de brotes de Listeriosis y su asociación con el consumo de vegetales crudos, los cuales se han hecho populares en forma ya lista para servir en los

supermercados, en los autoservicios de ensaladas en los restaurantes, y como parte integral en la preparación de diversos tipos de sándwiches, ha estimulado la necesidad de un conocimiento general acerca de la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos. Como señala Farber (2), los expertos internacionales que participaron en la reunión informal de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre Listeriosis, llegaron a la conclusión de que no es posible la eliminación total de la *L. monocytogenes* de todos los alimentos; más bien el punto crítico no es cómo prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, sino cómo controlarla para minimizar sus niveles en los mismos. Las autoridades federales de los Estados Unidos, exhortan a la industria de alimentos a fin de que hagan el máximo esfuerzo en fabricar alimentos libres de *L. monocytogenes*, lo cual puede abarcar modificaciones de los equipos y los procesos, limpieza y sanitización más frecuentes de los equipos y ambientes, y mejorar los controles de temperatura (30,31). El objetivo de los organismos contralores es asegurar la toma de medidas prudentes, pero prácticas, para minimizar los posibles riesgos asociados con *L. monocytogenes* y recomendar la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (32). En los últimos años, el aumento de brotes causados por *L. monocytogenes* ha sido de gran importancia y preocupación para la salud pública y para la industria de alimentos, sobre todo dado que aún no se ha establecido la dosis infectiva de este microorganismo (33).

Tapia y Díaz (34) señalan que *L. monocytogenes* sobrevive y crece en lechuga fresca y preparada en la forma de un producto listo para servir. Farber y col. (35) realizaron un estudio en diferentes alimentos con la finalidad de detectar especies de *Listeria* y encontraron *L. monocytogenes* en 4 de 60 ensaladas preempacadas y en aproximadamente el 90% de las lechugas adquiridas al detal. Nuestros resultados señalan un 25% de muestras contaminadas con el género *Listeria* y 9% con *L. monocytogenes*, concordando con los obtenidos por Miranda (15), Brión (13) y Guevara (14); aún cuando *L. monocytogenes* esté inicialmente en bajos niveles en un producto contaminado, este microorganismo puede multiplicarse durante el almacenamiento, inclusive a temperaturas de refrigeración, ya que es psicotrófico. También es importante mantener las condiciones higiénicas y el control a través de la cadena alimentaria para continuar conservando nuestros productos en esos niveles, o lo que sería más deseable, libres de *L. monocytogenes*.

Por último, consideramos que los resultados de este trabajo contribuyen a establecer la situación en nuestro país, con relación a la presencia de la especie *L. monocytogenes* y recomendamos continuar con controles microbiológicos periódicos, dada la demanda cada vez mayor de los vegetales mínimamente procesados.

AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) y al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo financiero de este trabajo.

REFERENCIAS

- McLauchlin J. The identification of *Listeria* species. Int J Food Microbiol 1997; 38:77-81.
- Farber, JM. What food companies should know about food-borne Listeriosis. 1992.
- NACMCF. *Listeria monocytogenes*. National Advisory Commite on Microbiological Criteria for Food. Int J Food 1991; 14:185-246.
- Brackett RE. Presence and persistence of *L. monocytogenes* in food and water. Food Technol 1988; 162:173-8.
- Van Reuterghem B, Hysman F, Rygole R y Verstrate W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in agricultural ecosystem. J Appl Bacteriol 1991; 71:211-17.
- Ryu Ch, Igimi S, Inoue, S y Kumagai S. Incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. Intl J Food Microbiol 1992; 16:157-160.
- Ortiz R. Incidencia de *Aeromonas* spp. y *Listeria* spp. en frutas y vegetales. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1993.
- Loret J. Isolation and enumeration of *L. monocytogenes*. Food Technol 1988; 42:172-5.
- Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P y Fraser DW. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch Inter Med 1986; 146:520-4
- Farber JM y Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. Microbiol. Rev. 1991; 55:476-511.
- Shank FR, Elliot EL, Wachsmuth IK y Losikoff ME. U.S. position on *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control 1996; 7:229-34.
- Skinner R. *Listeria*: UK Government's approach. Food Control 1996; 7:245-8.
- Brión D. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales mínimamente procesados. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1994.
- Guevara LM. Ensaladas con mínimo procesamiento como sustrato para el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1997.
- Miranda LD, Ortiz E y Tapia M. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales de alto consumo en la región de Cojedes. Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos. Montevideo, Uruguay. 1992.
- Norma Venezolana COVENIN 1126-89. Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1989.
- Norma Venezolana COVENIN 902-87. Alimentos. Método para el Recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1987.
- Norma Venezolana COVENIN 3338:1997. Alimentos. Recuento de Aerobios. Método en placas con películas secas rehidratables (Petrifilm). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1997.
- Norma Venezolana COVENIN 1104:1996. Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1996
- FDA. Food and Drug Administration BAM . Bacteriological Analytical Manual Arlington. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA. 1995.
- Manual de procedimientos analíticos y medidas sanitarias especiales, en prevención a la entrada del cólera en Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". División de Higiene de los Alimentos-MSAS. Venezuela. 1991.
- Henry BS. Dissociation in the genus *Brucella*. J Infect Disease 1933; 52:374-402.
- Carlin F y Nguyen-The C. Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads. Lett Appl Microbiol 1993; 18:222-6.
- Ríos M, Novoa ML, Borges R, Miró A, Estrada M, Trombino V y Rodríguez C. Comparación de recuentos obtenidos para aerobios mesófilos, mohos, levaduras y coliformes en alimentos utilizando métodos de cuantificación en placas, número más probable y películas secas rehidratables. Cartel presentado en el IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Primer Simposio Peruano de Conservación de los alimentos. Lima, Perú. 1991.
- Ríos de Selgrad AM y Novoa ML. Apoyo del Departamento de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH "RR") a la investigación de las Enfermedades Transmitidas por alimentos (ETA). Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel" 1999; 30:8-13.
- Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lynch JA, Yee AJ, Wang SL, et al. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. J Food Prot 1997; 60:954-60.
- Rijkelt B. *Listeria monocytogenes*. Detection and behaviour in food and in the environment. pp 71-86. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen. Holland.1997.

28. Restaino L, Frampton EW, Irbe RM. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Food Prot* 1999; 62:244-51.
29. Feng P. Impact of Molecular Biology on the Detection of Foodborne pathogens. *Molec Biotechnol* 1997; 7:267-78.
30. Farber JM, Wang SL, Cai Y y Zhang S. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. *J Food Prot* 1998; 61:192-5.
31. FDA. Food Safety and Inspection service and Food and drug administration. Preventing Foodborne Listeriosis. 1992.
32. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Food. *Microorganisms in Foods 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality*. Blackwell Scientific Publications, London UK. 1988.
33. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition USDA/ Food Safety and Inspection Service Centers for Disease Control and Prevention. 2001.
34. Tapia MS y Díaz RV. Consideraciones ecológicas y de inocuidad alimentaria en productos de origen vegetal. *Arch Latinoamer Nutr* 1994; 44:232-41.
35. Farber JM, Sanders GW y Johnston MA. 1989. A survey of various food for the presence of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 1989; 52:453-8.

Recibido: 23-04-2001

Aceptado: 08-05-2002

FUNDACION BENGUA
para la Alimentación y Nutrición
CENTRO DE DOCUMENTACION