

## Incidencia de *Listeria monocytogenes* y evaluación de la calidad sanitaria del pescado fresco fileteado del Area Metropolitana de San José

Mónica Bianchini, María Laura Arias, Carlos Herrera, Cira Zúñiga

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CIET

**RESUMEN.** El pescado forma una parte importante de la dieta humana debido a su alto contenido proteico. El pobre sistema de comercialización existente en Costa Rica para este producto es causa importante de contaminación secundaria, la cual puede incluir microorganismos como coliformes fecales, *Staphylococcus aureus* y hasta patógenos como *Listeria monocytogenes*. En Costa Rica se carece de información reciente sobre la calidad microbiológica del pescado que se distribuye en el Area Metropolitana de San José, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiarla a través de la detección de microorganismos indicadores y la incidencia de *L. monocytogenes*. Se realizaron cinco diferentes muestreos a 27 pescaderías ubicadas en dos áreas diferentes: el Mercado Central y el resto del área Metropolitana. En cada ocasión, una muestra de 500 g de pescado fresco fileteado fue tomada y transportada al Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Universidad de Costa Rica para realizar los diferentes análisis, que incluyeron la presencia/ausencia de *L. monocytogenes*, recuento total aerobio, recuento de coliformes totales y fecales y número más probable de *Staphylococcus aureus*. También, se realizó una evaluación de higiene en los diferentes expendios. De acuerdo con ésta, el 22,2% de las pescaderías fueron clasificadas como excelentes, el 14,8% como buenas, 40,8% como regulares y 22,2% como malas.

La higiene de las pescaderías es independiente de la incidencia de *L. monocytogenes* con un 95% de confianza, y no hay relación estadísticamente significativa entre higienes y los otros indicadores analizados. Sí existe una relación significativa entre la incidencia de *Listeria sp.* y la higiene del Mercado Central.

Se determinó que 96,3% y 29,6% de las pescaderías cumplen con los límites microbiológicos establecidos por la ICMSF para *S. aureus* y el recuento total aerobio, respectivamente.

*Listeria sp.* fue encontrada en el 65,2% de las muestras de pescado analizadas. De éstas, 52,3% fueron *L. monocytogenes*, 43,2% *L. innocua*, 3,4% *L. ivanovii* y 1,1% *L. seeligeri*. En el 88,9% de las pescaderías se aisló *L. monocytogenes* en al menos una ocasión.

**Palabras clave:** *Listeria sp.*, *Listeria monocytogenes*, pescado, indicadores microbiológicos, higiene.

**SUMMARY.** Incidence of *Listeria monocytogenes* and evaluation of the sanitary quality of filleted fresh fish from the Metropolitan Area of San José. Fish constitutes a very important part of human diet due to its protein content. The poor commercialization system existing in Costa Rica for this product causes an important secondary contamination that may include microorganisms such as fecal coliforms, *Staphylococcus aureus* and even pathogens such as *Listeria monocytogenes*. There is a lack of recent information about the microbiological quality of the fish that arrives to the Metropolitan Area of San José, Costa Rica, so the aim of this work was to study it through the detection of microbiological indicators and the incidence of *L. monocytogenes*.

Five different samplings were realized to 27 fisheries located in two different areas from San José, Costa Rica: the Central Market and the rest of the Metropolitan Area. Each time, a 500g sample of fresh filleted fish was taken and transported to the Food Microbiology Laboratory, Universidad de Costa Rica, for performing the different analysis, which included the presence/absence of *L. monocytogenes*, total plate count, total and fecal coliforms count and Most Probable Number of *Staphylococcus aureus*. Also, a hygiene evaluation of the different fisheries was performed. According to this, 22,2% of the fisheries were classified as excellent, 14,8% as good, 40,8% as regular and 22,2% as bad.

Fisheries hygiene is independent of the incidence of *L. monocytogenes* with a 95% confidence level, and there is no significant relationship between hygiene and the other indicators analyzed. There is a significant relationship between the incidence of *Listeria sp.* and the hygiene of the Central Market area.

It was determined that 96,3% and 29,6% of the fisheries accomplish with the microbiological limits established by ICMSF for *S. aureus* and total plate count, respectively. *Listeria sp.* was found in 65,2% of the fish samples analyzed. From these, 52,3% was *L. monocytogenes*, 43,2% *L. innocua*, 3,4% *L. ivanovii* and 1,1% *L. seeligeri*. In 88,9% of the fisheries the presence of *L. monocytogenes* was positive at least once.

**Key words:** *Listeria sp.*, *Listeria monocytogenes*, fish, microbial indicators, hygiene.

## INTRODUCCION

El pescado es un alimento de gran importancia para la humanidad dado su contenido proteico. Los índices mundiales de captura alcanzan unos 70 millones de toneladas, destacándose Perú, Japón, Unión Soviética, China y Estados Unidos como las primeras potencias mundiales pesqueras (1).

Según un estudio realizado por MERCASA en 1997, los recursos pesqueros de Costa Rica están compuestos por especies de alto valor comercial en el mercado nacional e internacional, aunque sus volúmenes de desembarque son relativamente pequeños. No obstante, su ejecución es fundamentalmente artesanal.

El mercado está constituido por la actual red de oferentes y demandantes, quienes, según los estudios, comercializan todo lo que hoy en día se produce, pero dejan una demanda insatisfecha en el ámbito nacional e internacional.

La distribución interna para el consumo local afronta dificultades de infraestructura adecuada, de cultura de manejo y presentación de los productos por parte de los comerciantes, lo cual incide en la aceptación de los consumidores.

La situación actual del sector comercial está caracterizada por altos márgenes de intermediación, que encarecen el producto a lo largo de todas sus fases de comercialización, así como por la inadecuada manipulación del mismo. Esto trae consigo una falta de calidad del producto y como consecuencia, una menor venta en la última fase del comercio detallista, donde es adquirido por el consumidor (2).

Dado el pobre sistema de comercialización existente, el pescado que se transporta desde las costas hacia el Valle Central es manipulado de una manera incorrecta y sufre contaminación secundaria durante los procesos de visceración y preparación del pescado, cuando todavía está a bordo, o durante el transporte por tierra (3).

El pescado posee una flora bacteriana normal, la cual depende de su hábitat, predominando las bacterias psicrótroficas gram negativas. Los únicos patógenos potenciales que se encuentran normalmente en la superficie del pescado son *Clostridium botulinum* y algunas especies del género *Vibrio*, incluyendo *Vibrio parahaemolyticus*. Ninguna de estas bacterias representa un riesgo mayor en los niveles naturales en que se encuentran, a menos que haya procedimientos inapropiados de manipulación y procesamiento del animal muerto. La manipulación del pescado con frecuencia incrementa la proporción de bacterias gram positivas, particularmente *Staphylococcus* e introduce las bacterias coliformes. El procesamiento del pescado en condiciones no sanitarias puede llevar a la contaminación del producto con bacterias patógenas como *Salmonella* y *Listeria*, y en el tejido muerto del pescado es posible la supervivencia de estos microorganismos a temperaturas óptimas (4).

Actualmente en Costa Rica no existen datos recientes de la calidad microbiológica del pescado que se consume en el Área Metropolitana de San José, razón por la cual el objetivo

de este trabajo es estudiar la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco fileteado que se expende en el Área Metropolitana de San José, así como la calidad sanitaria de este producto a través del recuento total aerobio, recuento de coliformes totales y fecales y número más probable de *Staphylococcus aureus*.

## MATERIALES Y METODOS

### Población

Durante el segundo semestre de 1997 y primero de 1998, se procedió a analizar, por quintuplicado, una muestra estadísticamente representativa de pescaderías de la provincia de San José. Esta estuvo compuesta por 27 establecimientos, 13 ubicados en el Mercado Central y 14 en el resto del área metropolitana de San José, incluyendo supermercados. Se evaluó el tipo de pescado clasificado comercialmente como "primera pequeña" (corvinas y róbalo con una masa menos a 2.5 kg) (1). De cada pescadería se tomó una muestra de 0,5-1.0 kg; las cuales fueron identificadas y transportadas en hielo hasta llegar al laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, donde fueron analizadas inmediatamente.

### Evaluación microbiológica

Las pruebas realizadas incluyeron el recuento total de aerobios, recuento de coliformes fecales y totales, número más probable de *Staphylococcus aureus* y aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*, las cuales se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Vanderzant y Splitstoesser (5). Para el recuento total de aerobios se utilizó agar estándar adicionado de 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium (TTC); para el recuento de coliformes fecales y totales agar bilis rojo violeta incubado a 44,5°C y 37°C respectivamente, y para el número más probable de *S. aureus* se hizo un pre-enriquecimiento en caldo salado (caldo tripticase soya (CTS) + 10%NaCl) y un aislamiento selectivo en agar Baird Parker. Para el aislamiento de *Listeria sp.* se realizó un enriquecimiento en caldo University of Vermont Modified (UVM), seguido de un aislamiento en caldo Fraser y en agar Oxford. La identificación de las especies de *Listeria* se realizó utilizando las pruebas de tinción de Gram, catalasa, movilidad, luz de Henry, prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus* y la fermentación de xilosa y ramnosa con caldo púrpura de bromocresol como base.

### Medición de la higiene de los locales

Para evaluar la higiene de los locales se usó una adaptación del cuestionario de higiene de la Guía para Diagnóstico Tecnológica Cuantitativo para productos marinos del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (6). Los resultados de este cuestionario permitieron clasificar la higiene del lugar como mala, regular, buena y excelente.

### Análisis de los resultados

Para relacionar el nivel de coliformes fecales y totales, *S. aureus* y recuento total aerobio con la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en las muestras de pescado se utilizó Correlación de Pearson con un 95% de confianza. Para comparar los niveles de las bacterias indicadoras y de *L. monocytogenes* entre el pescado que se vende en las pescaderías del Mercado Central y sus alrededores, con el que se expende en el resto del Area Metropolitana de San José, se utilizó la comparación de promedios con t de Student con un 95% de significancia, y para relacionar la calidad del pescado con la higiene del lugar donde se expende se utilizaron los coeficientes de Spearman con un 95% de confianza.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Análisis bacteriológico

La distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas en cuanto a los niveles de *S. aureus* se presenta en la Tabla 1. Únicamente el 2,2% de las muestras analizadas tiene un nivel mayor de 1000 unidades por gramo y el 26,7% presenta niveles entre 100 y 1000 unidades por gramo. El mayor porcentaje lo presentan aquellas con niveles entre 10 y 100 unidades. Lo anterior indica una adecuada manipulación del producto, dado que el *S. aureus* no se encuentra en la microflora normal del pescado, sino que su presencia es indicadora de contaminación postcaptura (7), y está dentro de los criterios establecidos por la ICMSF. Estos establecen que para 5 muestras, dos pueden tener recuentos entre  $10^3$  y  $10^4$ , pero ninguna con más de esta última cifra. El 96,3% de las pescaderías analizadas cumplen con esta norma.

TABLA 1  
Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, en cuanto a los niveles de *Staphylococcus aureus*

NMP <i>S. aureus</i> /g	Número de muestras	%
0- $10^1$	27	20
$10^1$ - $10^2$	69	51,1
$10^2$ - $10^3$	36	26,7
Mayor que $10^3$	3	2,2

En la Tabla 2 se presenta la distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, según los niveles de recuento total aerobio. La mayoría de las muestras de pescado analizadas se encuentran con valores entre  $10^6$  y  $10^7$ . Lo anterior, aunado a que el 15,5% presenta niveles superiores a  $10^7$  UFC/g, indica que el pescado analizado tiene una corta vida útil.

Según la ICMSF, recuentos tan altos como los anteriores en productos perecederos indican condiciones de tiempo-temperatura no adecuadas durante el almacenamiento (8).

Al comparar los niveles encontrados con los límites microbiológicos establecidos por la ICMSF (para 5 muestras, tres pueden tener recuentos entre  $5 \times 10^5$  y  $10^7$ , pero ninguna sobre esta cifra), únicamente el 29,6% de las muestras cumplen con esta normal. Estos datos reflejan el hecho de que la mayoría de muestras de pescado presentan una vida útil limitada por sus altos recuentos y no se recomienda su consumo.

TABLA 2  
Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, en cuanto a los niveles de recuento total de aerobios

UFC/g	Número de muestras	%
$10^3$ - $10^4$	3	2,2
$10^4$ - $10^5$	4	3,0
$10^5$ - $10^6$	41	30,4
$10^6$ - $10^7$	66	48,9
Mayor que $10^7$	21	15,5

Coincidentemente, en una investigación realizada por Quirós en 1997, en donde se realizaron análisis fisicoquímicos a partir de las mismas muestras de pescado utilizadas en este trabajo, se encontró que solamente el 22% de las mismas cumplen con la norma para bases volátiles nitrogenadas totales, la cual permite un máximo de 35mg/100g y que se utiliza como indicador de alteración del pescado marino (9).

Según se indica en la Tabla 3, un 31,8% de las muestras de pescado tiene un nivel de coliformes fecales entre  $10^3$  y  $10^4$  y un 24,4% se encuentra entre los niveles de  $10^4$  y  $10^5$ . Estos datos demuestran que existe una alta contaminación fecal en el pescado fresco.

TABLA 3  
Distribución porcentual de las muestras de pescado analizadas, en cuanto a los niveles de coliformes totales y coliformes fecales

UFC/g	Nº de muestras	% coliformes fecales	Nº de muestras	% coliformes totales
$10^2$ - $10^3$	52	38,5	12	8,0
$10^3$ - $10^4$	43	31,8	26	19,1
$10^4$ - $10^5$	33	24,4	66	48,9
$10^5$ - $10^6$	7	5,3	28	20,8
$10^6$ - $10^7$	-	-	3	2,2

El mismo cuadro muestra que un 48,9% de las muestras presentan niveles de coliformes totales entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC/g y un 20,8% entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g. Estos datos son indicadores de baja higiene en el producto, reflejando un tratamiento inadecuado por contacto con personas, suelo o agua, superficies sucias y/o utensilios y equipo en mal estado

de higiene, ya que los coliformes totales son bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza y por tanto pueden ser detectados en muchos tipos de alimentos, especialmente en los de origen animal (8).

La Tabla 4 muestra que el 65,2% de las muestras son positivas por *Listeria sp.*, de las cuales el 52,3% es *L. monocytogenes*. La presencia de esta bacteria indica que no está dando el tratamiento de higiene y manipulación correcto al pescado fresco fileteado, pues la *L. monocytogenes* es una bacteria que se ha logrado aislar del suelo, alcantarillados, dasagües, heces de humanos y ambientes de procesamiento de alimentos (8) y según indica Embarek, es poco común el aislamiento de *L. monocytogenes* en agua de mar, a menos que la costa esté sujeta a contaminación por fuentes industriales, humanas o de animales (10).

TABLA 4

Incidencia de *Listeria sp.*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* en el pescado fresco fileteado del Area Metropolitana de San José

Microorganismo	Incidencia en el total de muestras (n=135)	Incidencia dentro del total positivas por <i>Listeria sp.</i> (n=88)
<i>Listeria sp.</i>	65,2%	
<i>Listeria monocytogenes</i>	34,1%	52,3%
<i>Listeria innocua</i>	28,2%	43,2%
<i>Listeria ivanovii</i>	2,2%	3,4%
<i>Listeria seeligeri</i>	0,7%	1,1%

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 alimentaria, sobre todo dado que aún no está bien delimitada la dosis infectante de esta bacteria. Según Beckers et al. (11) ha habido un incremento real de listeriosis debido al aumento de la tasa de contaminación ambiental, los nuevos hábitos alimenticios en muchos países y el crecimiento de poblaciones de alto riesgo. Diferentes estudios en pescado demuestran una incidencia de *L. monocytogenes* entre 4% y 50%, siendo menor que la incidencia en carne roja y pollo y más alta que en leche cruda (11). Según la norma de FDA de tolerancia de *L. monocytogenes*, ésta debe estar ausente en productos de pescado listos para consumir que necesiten de mínima cocción por parte del consumidor (12).

Aunque en Costa Rica no existe ningún tipo de legislación sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, es importante tomar en cuenta que un 34,1% de incidencia de la bacteria en el pescado es significativo en el sentido que pone al descubierto un riesgo potencial para la salud de las personas inmunosuprimidas.

Al comparar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* con los restantes indicadores utilizados, no se determinó

relación estadísticamente significativa, tal y como ha sido descrito en otras investigaciones (13,14).

En el estudio se determinó que el 28,5% de las muestras presentaron *L. innocua*, 2,2% *L. ivanovii* y 0,7% *L. seeligeri*. Se ha comprobado que la *L. ivanovii* al igual que la *L. monocytogenes* son patógenas en ratones (11). Las otras especies de *Listeria sp.* encontradas no son patógenas al hombre pero su presencia de igual forma indica una mala manipulación y condiciones higiénicas de los establecimientos pues estas especies se pueden aislar de ambientes saprófitos.

Es importante señalar que el pescado analizado presentaba una temperatura promedio de 10,6°C en su punto de venta al público. Esta temperatura está dentro del rango de crecimiento de la bacteria, la cual según Doyle (15), es uno de los pocos patógenos que pueden crecer a temperaturas de refrigeración.

**Comparación de las pescaderías de la zona del Mercado Central y sus alrededores con el resto de San José**

Al hacer una comparación de las pescaderías de la zona del Mercado Central y sus alrededores con las del resto de San José, se determinó, con un 95% de confianza, que existe una diferencia significativa entre los niveles de coliformes fecales detectados, siendo mayores en la primer zona mencionada (Tabla 5).

TABLA 5

Comparación de las pescaderías del mercado central y sus alrededores con las del resto de San José, con respecto a los niveles de bacterias indicadoras analizadas y de *L. monocytogenes*

	Mercado Promedio	Desv. Std.	Alrededores Promedio	(n=70) Desv. Std.
Recuento total	3821707,6	5895142,9	5815285,7	9345184,8
Coliformes totales	166309,8	499423,2	117530,1	456961,1
Coliformes fecales	35769,4	77983,9	6446,7	11836,9*
<i>S. aureus</i>	417,9	1463,7	162,3	572,7
<i>Listeria sp.</i>	1,2	0,4	1,4	0,5
<i>L. monocytogenes</i>	1,4	0,5	1,3	0,5

\*p < 0,05

Al comparar el recuento de coliformes totales y el recuento total aerobio, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles de *S. aureus* en ambas zonas. Esto indica que en ambos sitios la manipulación del pescado es similar, ya que según la ICMSF, la presencia de esta bacteria en alimentos es un indicador de la contaminación de origen humano.

No se determinó diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre la presencia-ausencia de *Listeria sp.* y *L. monocytogenes* al comparar las pescaderías del Mercado Central y sus alrededores, con las del resto del Area Metropolitana de San José. La incidencia en el Mercado Central y sus alrededores para *Listeria sp.* es de un 75,4% mientras que para

el resto de San José es de 55,7%. La incidencia de *L. monocytogenes* fue de 36,9% en el Mercado Central y alrededores y de 31,4% en el resto de San José.

### Análisis de higiene

De acuerdo al puntaje asignado a cada pescadería mediante el cuestionario de higiene, se obtuvo que el 22,2% de las pescaderías son excelentes, el 14,8% son buenas, 40,8% son regulares y 22,2% malas. La relación entre los resultados obtenidos en esta evaluación de higiene y los indicadores analizados no fue significativa (Tabla 6). Por otro lado, la presencia de *Listeria sp.* mostró significancia en la zona del Mercado Central y alrededores. Esto comprueba que el género es un buen indicador de higiene, razón por la cual en los últimos años se ha incluido su monitoreo en plantas de procesamiento de productos lácteos para determinar la efectividad de la sanitización (16).

TABLA 6

Coefficiente de correlación de Spearman para relacionar la higiene del expendio con la calidad sanitaria del pescado

	Recuento total	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>S. aureus</i>
Higiene	0,4375	0,2662	0,0299	0,0771

El hecho de que no se encontrara una relación estadística entre la higiene y los coliformes totales puede explicarse por varias razones, entre ellas el sesgo de las mediciones en los análisis realizados, la limitación de los métodos y el posible uso de agentes desinfectantes en el pescado.

La presencia de *L. monocytogenes* en los expendios analizados mostró ser independiente de las condiciones de higiene del expendio, no obstante en el 89,9% de las pescaderías analizadas se detectó su presencia al menos en una ocasión.

Los resultados presentados en este trabajo permiten recomendar el hacer un próximo estudio de la calidad sanitaria del pescado en los centros de acopio principales del país, los transportes y los centros de comercialización para determinar los puntos de contaminación del mismo, especialmente con *L. monocytogenes*. También, hacer un llamado a las autoridades de salud con el fin de que se implemente un sistema de inspección más riguroso, se entrene al personal que manipula al pescado con buenas prácticas de manufactura y se eduque al consumidor respecto al proceso de cocción que debe darse al pescado antes de su consumo.

### REFERENCIAS

1. Amerling Q, Fernández J, Herrera L, Monester A, Pérez V y Rodríguez E. Situación actual de la actividad pesquera en Costa Rica. Tesis. San José, U.C.R., 1991.
2. Mercados Centrales de Abastecimiento S. A. (MERCASA). Anteproyecto nave de pescados CENADA. Madrid, España, 1997.
3. Soto W. La importancia de inspección del pescado desde el punto de vista de deteriorización y parasitología en salud animal. Rev Agropecuaria de Costa Rica. 1987;5(10):103-107.
4. Speck M. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA, Washington, 1976.
5. Vanderzant M & Splittstoesser R. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA, Washington, 1992.
6. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guía para el diagnóstico tecnológico del sector pesca. San José, 1984.
7. FAO. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Manual de capacitación preparado por el programa de capacitación FAO/DANICA en Tecnología pesquera y control de calidad. 1996.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods 5. Blackie Academic and Professional, United Kingdom, 1996.
9. Quirós R. Evaluación fisicoquímica preliminar de la calidad del pescado fresco en pescaderías del Area Metropolitana. Tesis, San José, UCR, 1997.
10. Embarek B. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. Int J Food Microb. 1994;23(1):17-34.
11. Beckers H, Billie J, Cox L, Gledel J, Hall S, Kampelmacher E, Rocourt J and Terplan L. Foodborne Listeriosis. Technomic Publishing Co, Pennsylvania, 1989.
12. FDA. Bacteriological analytical manual. 8th edition, AOAC, USA, 1995.
13. Oreamuno S. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su relación con el nivel de coliformes fecales durante la manufactura de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz, Turrialba. Tesis, San José, UCR, 1994.
14. Vargas E. Evaluación de la calidad sanitaria e incidencia de *Listeria monocytogenes* en camarón crudo de pescaderías del Area Metropolitana de San José. Tesis, San José, UCR, 1996.
15. Doyle M. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 1988;42(4):169-171.
16. Frank J, Gillet R and Ware G. Association of *Listeria spp.* Contamination in the dairy processing plant environment with the presence of *Staphylococci*. J Food Prot. 1990;53:141-144.

Recibido: 20-10-1998

Aceptado: 02-08-1999