

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS EN ENSALADAS DE MOLUSCOS Y VEGETALES

Microbiological Evaluation and *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Detection in Shellfish and Vegetable Salads

María M. Torres

Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Estación de Investigaciones Marinas de Margarita, EDIMAR. Apdo. Postal 144, Porlamar. Estado Nueva Esparta, Venezuela, 6301. E-mail: mariafachon@yahoo.es.

RESUMEN

Un importante renglón de la pesca en el oriente de Venezuela es el de los moluscos. Las inadecuadas condiciones higiénicas cuando se preparan alimentos con estos productos y su venta en las playas señalan la importancia de ejercer un estricto control sanitario. El objetivo del trabajo fue evaluar la calidad microbiológica y detectar enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* en ensaladas de moluscos con vegetales vendidas en las playas de la Isla de Margarita, Venezuela en los años 2004-2005. Se analizaron 63 unidades de muestra pertenecientes a 21 muestras. El 47,6% de las unidades superó los 10 NMP/g de *E. coli*. El 79,3% tuvo recuentos mayores a 10^4 UFC/g de microorganismos acidúricos y el 57,1% mayor a 10^5 UFC/g de aerobios mesófilos. Se detectaron enterotoxinas estafilococcicas en el 8% de las muestras, (4,8% del tipo A y 3,2% del tipo B). En general, el 64,3% de las muestras no cumplió alguno de los requisitos internos del laboratorio de microbiología. Se halló relación significativa (*r* de Pearson) entre los recuentos de aerobios mesófilos y los de microorganismos acidúricos ($r= 0,52$; $P<0,05$), al igual que entre los coliformes fecales y *S. aureus* ($r= 0,43$; $P<0,05$), sugiriendo el incumplimiento de varias normas higiénicas, establecidas por organismos de la salud pública. Se concluye que estas ensaladas presentan un alto riesgo de generar problemas de salud a quienes las consumen.

Palabras clave: Ensalada de moluscos, enterotoxinas, *Staphylococcus aureus*, manipulación de alimentos.

ABSTRACT

Mollusks represent an important fishing product in Venezuela's eastern region. Inadequate hygienic conditions applied in its preparation and sale at the beaches indicate the importance of a strict sanitary control. The objective of this research was to evaluate the microbiological quality and detect enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in mollusks and vegetable salads sold at Margarita Island beaches during 2004-2005. Sixty three sample units were analyzed from to 21 samples, finding that 47.6% of them surpassed the 10 MPN/g of *E. coli*. 79.3% had counts higher than 10^5 CFU/g of aciduric microorganisms, and 57.1% higher than 10^4 CFU/g of mesophilic aerobic. Staphylococcal enterotoxins were detected in 8% of the samples (of 4.8% type A and 3.2% of type B). In general, 64.3% of the samples did not fulfill some of the microbiological requirements. A significant relation (*r* of Pearson) exists between the counts of mesophilic aerobic and those of aciduric microorganisms ($r= 0.52$; $P<0.05$), as well as between fecal coliforms and *S. aureus* ($r= 0.43$; $P<0.05$). These findings suggest the breach of several hygienic norms. As a conclusion, these salads convey a high risk of generating health problems to those who consume them.

Key words: Mollusks salad, enterotoxins, *Staphylococcus aureus*, food handling.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos no solo son muy apetecidos e importantes dentro de una dieta equilibrada, pues su composición en proteínas y minerales es alta [21]. Además, es uno de los renglo-

nes de la pesca que más se consume en la región oriental de Venezuela.

Pero también muchos son los factores asociados a enfermedades transmitidas por su consumo, destacando los moluscos crudos o apenas cocidos, cuyo almacenamiento y comercialización han sido inadecuado. Una de las formas de presentación de este alimento, las ensaladas de moluscos y vegetales, se convierte en un medio favorable para la proliferación de agentes patógenos para la salud pública, que dan origen a brotes de enfermedades y también, de otras bacterias que causan el deterioro o alteración del producto [27].

Las causas por las que en un alimento se desarrollen las bacterias patógenas en números significativos pueden ser varias, entre las cuales están el mantenimiento de los alimentos a temperaturas que permiten el crecimiento de los microorganismos potencialmente peligrosos [2], cocción y/o recalentamiento insuficientes, equipos de cocinas contaminados, deficiente higiene del personal y preparación de alimentos con un día o más tiempo de antelación. Todo ello debido principalmente, a manipuladores de alimentos que no conocen las normas respectivas [19].

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden generarse a partir de un alimento o de aguas contaminadas. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas. Una bacteria que produce una sustancia tóxica, denominada enterotoxina, es el *Staphylococcus aureus* [28].

Las enterotoxinas son proteínas de cadena simple no ramificada, solubles en agua y con un peso molecular relativamente bajo. Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas muy específicas, sin embargo una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo. Actualmente se diferencian por su actividad serológica no menos de 7 enterotoxinas que se designan A, B, C1, C2, C3, D, E y F. La producción de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* depende de la calidad del sustrato, el pH, además de otros compuestos químicos y de los microorganismos competidores. Los alimentos asociados con los brotes de intoxicaciones alimentaria son las ensaladas frías, productos avícolas, dulces de crema, productos lácteos entre otros [18]. Luego de una a seis horas de ingerida se presentan náuseas, dolores abdominales, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, sudoración y en casos severos, postración, deshidratación y shock, pero raramente resultan fatales [4].

La venta de alimentos en las calles puede constituir un factor positivo si se toma en cuenta la capacidad de generar empleo, movilizar recursos y satisfacer la obtención de comidas rápidas. Sin embargo, las frecuentemente inadecuadas condiciones higiénicas en la preparación y venta hacen importante mantener el control sanitario de esta actividad [29].

Varios alimentos preparados se expenden de manera ambulante en las calles y balnearios de la Isla de Margarita; uno de ellos es la ensalada de moluscos con vegetales, que

es consumida, tanto por la comunidad local como por los turistas. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la calidad microbiológica y detectar la presencia de toxinas producidas por *S. aureus* en ensaladas de moluscos y vegetales, conocidas popularmente con el apelativo de "siete potencias", que se expenden en las playas de la región. La información obtenida dará a conocer a las autoridades sanitarias si este producto acata las normas higiénicas conocidas como buenas prácticas de manipulación de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de Muestras

Las muestras de ensaladas de moluscos con vegetales, del tipo denominado "siete potencias" se preparan con varios moluscos, previamente sometidos a una cocción para extraerlos de las conchas. Entre ellos están: mejillón verde (*Perna viridin*), pepitona (*Arca zebra*), tripa perla (*Pinctada imbricata*), vaquitas (*Strombus pugilis*), botuto (*Strombus gigas*) y otros, aderezados con vinagre, pimentón, cebolla y ají. Las ensaladas analizadas se adquirieron directamente a un total de 16 vendedores ambulantes que comercializaban su producto en ocho playas de la Isla de Margarita durante los años 2004-2005. En varias oportunidades, y por vendedores, se capturaron tres unidades de muestra, cada una con un peso aproximado de 100 g. Inmediatamente después de adquiridas, se trasladaron hasta el laboratorio en una cava de plástico con hielo. Se analizaron un total de 63 unidades de muestra pertenecientes a 21 tomas de muestras del producto.

Métodos de Análisis

Para la preparación de las muestras se siguieron los procedimientos de acuerdo a la normativa vigente [10]. Se llevaron a cabo determinaciones del número más probable (NMP/g) de coliformes fecales y de *Escherichia coli* [14]. También se hicieron recuentos (UFC/g) de aerobios mesófilos a 32°C [9], de *S. aureus* [11], de mohos y levaduras [12] y microorganismos acidúricos [13]. Por otra parte se determinó el pH [8] y se detectó la presencia de enterotoxinas de *S. aureus* A, B, C y D, mediante el inmunoensayo de aglutinación látex [15] (Kit Reversed Passive Latex Agglutination de la Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido).

Análisis estadísticos

Los datos fueron transformados a log base 10 y luego se aplicó un análisis de varianza (ANOVA de una sola vía) con $\alpha \leq 0,05$ para determinar si existían diferencias significativas en cada uno de los parámetros evaluados. En aquellos donde existían diferencias significativas se realizó la prueba *a posteriori* de rango múltiple y se aplicó un análisis de coeficiente de correlación de Pearson (r de Pearson) para verificar si había o no relación entre las diferentes variables evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se expone la distribución porcentual de la determinación del número más probable (NMP/g) de coliformes fecales y *E. coli*. En lo que se refiere a este último grupo de microorganismos, un 47,6%, excedió el valor límite (m) de 10 (NMP/g) [16]. Esto revela una inadecuada manipulación del alimento durante la preparación y/o comercialización, pues la misma se realiza a temperaturas que contribuyen a la multiplicación de las bacterias. En la normativa venezolana se especifica que esta temperatura debería ser inferior a 7°C [23], para minimizar el crecimiento de las bacterias. Tanto de las patógenas como las de deterioro. La *E. coli* es un microorganismo cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente. La presencia de esta bacteria en un alimento se interpreta generalmente como contaminación directa o indirecta de origen fecal [26]. Sin embargo, puesto que los coliformes pueden multiplicarse fuera del cuerpo animal, su presencia en alto número en un producto alimenticio puede indicar no una contaminación inicial intensa, sino más bien, un manejo inapropiado que permitió la multiplicación de estos organismos [2], particularmente debido a la temperatura ambiente de la región neoespartana que es de unos 26°C [22].

En la TABLA II se presenta la distribución porcentual de los recuentos (UFC/g) de microorganismos acidúricos, aerobios mesófilos, mohos, levaduras y *S. aureus*. Se encontraron recuentos de acidúricos superiores a 10⁴ UFC/g en un 79,3% de las unidades de muestra analizadas y mayores a 10⁵ UFC/g de aerobios mesófilos en un 57,1% de las mismas [5, 26]. Un recuento de aerobios mesófilos por encima de los valores permitidos no significa necesariamente que se hallen presentes bacterias patógenas. No obstante, una operación que produce alimentos que exceden a un estándar de calidad particular, más a menudo de lo que es esperado, pudiera ser visto como falta de control y como tal, presentar un alto riesgo de preparar alimentos que contengan patógenos [25]. Además son poco aconsejables recuentos superiores de 10⁶ - 10⁷ UFC/g pues suelen ser ya inicio de descomposición del alimento [30].

Aunque los hongos toleran mejor la acidez que las bacterias [7], los recuentos, tanto de mohos como de levaduras,

no superaron a los de aerobios mesófilos. En un 69,8% de las muestras no crecieron mohos (<10 UFC/g, recuento estimado), mientras que en solo el 19% de los recuentos de levaduras superó la cifra de 10⁴ UFC/g. Generalmente, las levaduras suelen crecer mejor bajo las condiciones intrínsecas que se dan en el producto analizado, particularmente por los valores de pH obtenidos (de 4,1 a 7,7, con un promedio de 5). Una de las causas de los altos recuentos de aerobios mesófilos y microorganismos acidúricos pudiera haber sido, que estos grupos de bacterias encontraron los nutrientes y el medio ambiente requeridos para su desarrollo y por tanto se multiplicaron en mayor cantidad que los mohos y las levaduras [17]. Como es de conocimiento general, la tasa de crecimiento de las bacterias es mayor que la de levaduras o mohos. Solo cuando existen condiciones que restringen el crecimiento de las bacterias, por ejemplo, una actividad de agua reducida, o valores de pH extremos, es que los hongos (mohos y levaduras) suelen multiplicarse y llegan a ser dominantes [2].

En el caso de los recuentos de *S. aureus*, todos los recuentos fueron menores de 10² UFC/g y en el 75,5% de las muestras, no creció este organismo. Entre las bacterias patógenas, se estima que *E. coli* y *S. aureus* suelen ser las más resistentes cuando se someten a ambientes con bajos valores de pH. La bacteria *S. aureus*, aunque resiste un pH de 4,2, sufre una fuerte reducción de su crecimiento [7]. Se conoce que el pH óptimo para el desarrollo de esta bacteria se encuentra entre 6 y 7, con valores extremos de 4 y 10; aunque la producción de toxinas se lleva a cabo entre unos valores de pH más limitados, y escasamente en valores por debajo de 6 [20]. Se ha sugerido que *S. aureus* enterotoxigénico no compite bien contra la microflora normal presente en muchos tipos de productos agrícolas [3] y ésta podría ser la causa de que esta bacteria no haya obtenido altos recuentos en las muestras analizadas.

Las detección de enterotoxinas estafilocócicas (FIG. 1) en la mayoría de los reportes es del tipo A [17]. En el presente trabajo, solo el 8% de las muestras evaluadas fueron positivas para la prueba 4,6% para el tipo A y 3,2% del tipo B. La ingesta de alimentos contaminados con toxinas de *S. aureus* puede generar un cuadro de intoxicación. Muchas veces, al analizar

TABLA I
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP/G) DE COLIFORMES FECALES Y *E. COLI* EN 63 UNIDADES DE MUESTRA DE ENSALADA A BASE DE MOLUSCOS Y VEGETALES (DE MAYO 2004 A MARZO 2005) / ECAL COLIFORMS AND *E. COLI* DISTRIBUTION (MPN/G) IN 63 SAMPLE UNITS OF SHELLFISH AND VEGETABLE'S SALAD (FROM MAY 2004 TO MARCH 2005).

Análisis	< 10	>10 a < 100	Normativa 1 m M
Coliformes fecales ²	36,5%	63,5%	- -
<i>Escherichia coli</i> ²	52,4%	47,6%	10 100

¹ Laboratorio de Microbiología, especificaciones internas.

² Expresado en NMP/g.

TABLA II
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS RECUELTOS (UFC/G) DE MICROORGANISMOS ACIDÚRICOS, AEROBIOS MESÓFILOS (32°C), MOHOS, LEVADURAS Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN 63 UNIDADES DE MUESTRA DE ENSALADAS A BASE DE MOLUSCOS Y VEGETALES (DE MAYO 2004 A MARZO 2005) / PERCENTAGE DISTRIBUTION OF THE COUNTS (CFU/G) OF ACIDÚRIC MICROORGANISMS, MESOPHILIC (32°C), MOULDS, YEASTS AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN 63 SAMPLE UNITS SHELLFISH AND VEGETABLE'S SALAD (FROM MAY 2004 TO MARCH 2005).

Recuentos	Microorganismos Acidúricos ^{1,2}	Aerobios ^{1,2} mesófilos a 32°C	Mohos ^{1,2}	Levaduras ^{1,2}	<i>S aureus</i> ^{1,2}	Normativa ¹ m M
< 10	0,0%	0,0%	69,9%	1,6%	75,5%	10 ⁴ —
≥10 a ≤10 ²	0,0%	0,0%	30,1%	3,2%	24,5%	10 ⁵ 10 ⁶
≥10 ² a ≤10 ³	0,0%	0,0%	0,0%	22,3%		10 ⁴ —
≥10 ³ a ≤10 ⁴	20,6%	21,6%	0,0%	53,9%		10 ⁴ —
> 10 ⁴	79,4%	7,9%	0,0%	19,0%		10 10 ²
≥10 ⁴ a ≤10 ⁵		13,4%				
≥ 10 ⁵		57,1%				

1. Laboratorio de Microbiología, especificaciones internas. 2. Expresado en UFC/g.

los alimentos sospechosos, no es posible detectar células viables de esta bacteria pues, suelen eliminarse por la cocción, lo que conduce a confusión cuando se quiere confirmar su origen [28]. Se observó que las muestras en las que se detectaron enterotoxinas, fueron las que reportaron los menores recuentos de *S. aureus*.

Está comprobado que varias especies de *Staphylococcus* son capaces de crecer en condiciones que no favorecen la producción de enterotoxinas. Aunque se cree que la producción de enterotoxinas generalmente está relacionada con cepas de *S. aureus* productoras de coagulasa y termonucleasa (TNasa), se ha comprobado que algunas especies de *Staphylococcus* que no producen ni coagulasa ni TNasa, si son capaces de producir enterotoxinas [17].

A pesar de que la incidencia de *S. aureus* en el producto analizado no fue alta, la detección de las enterotoxinas A y B alerta acerca del peligro directo que representan para la salud de los consumidores.

A través de los análisis de varianza (ANOVA, una vía) se constató la existencia de diferencias significativas ($P < 0,05$) para las variables microbianas entre las 8 playas evaluadas, a excepción de los mohos, que no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$). Esto pudiera ser el resultado de diferencias en las fuentes de las materias primas utilizadas, variaciones en las condiciones de almacenamiento, en la forma de manipulación, así como diferencias en el tiempo que llevaban preparadas las ensaladas al momento de ser recolectadas para los análisis correspondientes.

En el análisis de correlación de Pearson (*r* de Pearson) para cada uno de los parámetros estudiados se determinó, que existía una relación directa ($r = 0,52$; $P < 0,05$) entre los recuentos de microorganismos acidúricos y los de aerobios mesófilos, es decir que pudieran ser parte del mismo grupo de bacterias capaces de desarrollarse a diferentes valores de pH.

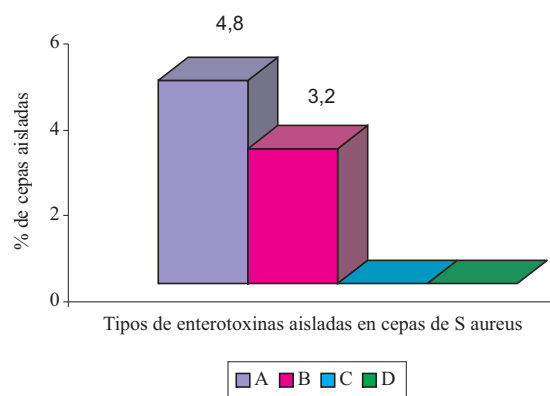


FIGURA 1. INCIDENCIA DE LAS ENTEROTOXINAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TIPOS A, B, C Y D EN CEPAS AISLADAS EN 63 UNIDADES DE MUESTRA DE ENSALADAS A BASE DE MOLUSCOS Y VEGETALES ANALIZADAS DURANTE LOS MESES DE MAYO 2004 A MARZO 2005 / INCIDENCE OF ENTEROTOXINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TYPES A, B, C AND D IN STRAINS ISOLATED IN 63 SAMPLE UNITS SHELLFISH AND VEGETABLE'S SALAD (FROM MAY 2004 TO MARCH 2005).

También se observa otra relación, esta vez entre los números de coliformes fecales y los de *E. coli* ($r = 0,47$; $P < 0,05$). Esto era de esperarse, por cuanto la *E. coli* es parte del grupo de los coliformes fecales. Pero al mismo tiempo también se halló correlación entre los coliformes fecales y *S. aureus* ($r = 0,43$; $P < 0,05$), lo cual revela que las normas o costumbres de higiene personal de los preparadores y expendedores de estas ensaladas de moluscos son inadecuadas. Por un parte, la *E. coli* es un indicador de contaminación fecal y por otra, el *S. aureus* se encuentra en la piel, la saliva, la comisura de la nariz, entre otros lugares. Esto hace sospechar que las ensaladas bajo estudio fueron contaminadas por ambas vías, mientras se preparaban y se comercializaban, y por ende, señalaría

que las personas que las prepararon cometieron faltas importantes en lo que se refiere a las buenas prácticas de manipulación en la elaboración de las ensaladas de moluscos con vegetales, siendo posiblemente una, la correspondiente al lavado de manos.

Un deficiente lavado de manos es un factor de riesgo importante en los brotes de ETAs. Esto incluye las fallas referidas propiamente a la forma de lavárselas, como también al momento en que debe hacerse tal operación [1]. Varios autores consideran que el mejorar el lavado de manos sea quizás la tarea educativa más difícil, y que son necesarios esfuerzos repetitivos e infatigables por parte de los supervisores de los manipuladores de alimentos, así como de salud pública [6].

Pero además del lavado incorrecto de manos, otras fallas que generalmente se presentan en la preparación de alimentos, que pudieran haber sido la causa de los resultados microbiológicos hallados en el presente estudio suelen ser la contaminación cruzada, al igual que la utilización de superficies de corte y/o utensilios que se encontraban sucios o no habían sido lavados y desinfectados correctamente [24].

CONCLUSIONES

Las muestras de ensaladas de moluscos y vegetales estudiadas no cumplieron con algunos de los requisitos microbiológicos contemplados en un 64,3% de los casos.

Las enterotoxinas (tipos A y B) de *S. aureus* sólo se detectaron en un 8% de las muestras, señalando un peligro directo para la salud de los consumidores.

Se encontró una relación significativa (*r* de Pearson) entre los recuentos de aerobios mesófilos y microorganismos ácido-dúricos ($r = 0,52$; $P < 0,05$) al igual que entre coliformes fecales y *S. aureus* ($r = 0,43$; $P < 0,05$) indicando que al momento de preparar las ensaladas los manipuladores incumplieron varias normas de higiene.

Este tipo de producto tal y como se vende en las playas de la Isla de Margarita presenta un alto riesgo de generar problemas de salud a los turistas que lo consumen.

RECOMENDACIONES

Se recomienda crear programas de educación sanitaria dirigidos a los manipuladores y/o vendedores y que contemplen, cada una de las etapas necesarias para la obtención de la materia prima, elaboración y distribución.

Establecer un control o programa permanente de las condiciones higiénico-sanitarias durante su comercialización, particularmente las referidas a las temperaturas en las que se mantiene las ensaladas.

AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento al personal del laboratorio de Microbiología del Dpto. de Control de Calidad. Este trabajo corresponde a la Contribución N° 344, de la Estación de Investigaciones Marinas de Margarita (EDIMAR), Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Campus de Margarita.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLWOOD, P.B.; JENKINS, T.; PAULUS, C.; JOHNSON, L.; HEDBERG, C.W. Hand washing compliance among retail food establishment workers in Minnesota. **J Food Prot.** 67 (12): 2825–2828. 2004.
- [2] BANWART, G.J. Microorganisms associated with food. En: **Basic Food Microbiology**. 2nd Ed. An Avi Book, New York. 49-100 pp. 1989.
- [3] BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J. Food Prot.** 59: 204 – 216. 1995.
- [4] BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. En: Doyle, M.P. (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, New York. 463-523 pp. 1989.
- [5] BUCHHOLZ, V.; RUN, G.; KOOL, J.; FIELDING, J.; MASCOLA, L.A risk- based restaurant inspection system in Los Angeles County. **J. Food Prot.** 65 (2): 367–372. 2002.
- [6] CASP, A.; ABRIL, J. Métodos industriales de conservación de alimentos. En: **Procesos de conservación de alimentos**. Coedición A. Madrid Vicente Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 73-89 pp. 1999.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1315-82. Alimentos. Determinación de pH. 5 pp. 1982.
- [8] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 902-87. Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placa de Petri. (1^a Rev.). 4 pp. 1987.
- [9] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (1^a Rev.). 7 pp. 1989.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1292-89. Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* (1^a Rev.). 10 pp. 1989.
- [11] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1337-90. Alimentos. Método para recuento de mohos y levaduras. 6 pp. 1990.

- [12] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 3123-94. Alimentos. Recuentos de microorganismos acidúricos. 3 pp. 1994.
- [13] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1104-96. Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. (2ª Rev.). 12 pp. 1996.
- [14] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Staphylococcal enterotoxins: Micro-slide double diffusion and ELISA –based methods. 2001 En: **Bacteriological Analytical Manual**. En línea: <http://www.Cfsan.fda.gov/ebam/ban-13a.html>. 09/05/2005.
- [15] FUNDACIÓN LA SALLE DE CIENCIAS NATURALES. Laboratorio de Microbiología. Especificaciones microbiológicas para ensaladas de moluscos de venta ambulante. Dpto. de Control de Calidad- EDIMAR - Campus de Margarita, Venezuela. 3 pp. 2004.
- [16] JAY, J. Indicadores de la calidad e inocuidad microbianas de los alimentos. En: **Microbiología Moderna de los Alimentos**. 4a Ed. Editorial Acribia, S. A, Zaragoza, España. 363-378 pp. 2002.
- [17] HALPIN-DOHNALEK I., M.M. *Staphylococcus aureus*. Production of extracellular compounds and behavior in foods. **J Food Prot.** 52: 267-82. 1989.
- [18] IRIARTE, M.; FERMIN, O. Evaluación del conocimiento sobre buenas prácticas de manipulación de alimentos de cocina de los hoteles 5 estrellas, Isla de Margarita. **Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"** 34 (1): 17-22. 2003.
- [19] LARRAÑAGA, I.J.; CARBALLO, J.M.; RODRÍGUEZ, M.M.; FERNÁNDEZ, J.A. Variables significativas en microbiología alimentaria. **Control e higiene de los alimentos**. McGraw Hill, Interamericana de España S.A.V. 62-76 pp. 1999.
- [20] MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION. Tabla de Composición de Alimentos. para Uso Practico. Series Cuadernos Azules. Publicación N° 52. Caracas, Venezuela. 38-39 pp. 1999.
- [21] MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Norma Sobre Buenas Prácticas de Fabricación, Almacenamiento y Transporte de Alimentos para Consumo Humano (Resolución SG-457-96). Gaceta Oficial de la República de Venezuela, 36.081, noviembre 07. 1996.
- [22] MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES Y FONDO PARA EL DESARROLLO DEL EDO. NVA. ESPARTA (MARNR-FONDENE. Atlas básico del Estado Nueva Esparta. 1997.
- [23] MITAKAKIS, T.Z.; SINCLAIR, M.I.; FAIRLEY, CH.K.; LIGHTBODY, P.K.; LEDER, K.; HELLARD, M. E. Food safety in family homes in Melbourne, Australia. **J. Food Prot.** 67 (4): 818–822. 2004.
- [24] MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D.W. Statistical distribution describing microbial quality of surfaces and foods in food service operations. **J. Food Prot.** 67 (1): 162–167. 2004.
- [25] MOSSEL, D.; MORENO, B. Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos. En: **Microbiología de los alimentos**. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y calidad de los alimentos. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. 4-52 pp. 1985.
- [26] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Aspectos microbiológicos de la higiene de los alimentos. Serie de Informes Técnicos # 598. Ginebra-Suiza. 114 pp. 1976.
- [27] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD .Enfermedades transmitidas por alimentos. 2006.En línea: <http://www.panalimentos.org/panalimentos/educación>. 13/09/2006.
- [28] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina. 1994 En línea: www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol_11_2_97/ali01297.htm. 23/04/2005.
- [29] PASCUAL, A.; CALDERÓN, V. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (31+1°C) Revivificables. En: **Microbiología alimentaria**. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª. Ed. Editorial Díaz de Santos, S.A., Madrid, España. 13-15 pp. 2000.
- [30] STATISTICAL GRAPHICS SYSTEMS CORPORATION. User s guide Statgraphics. Versión 6,0. STSC. Inc, U.S.A. 1992.