

# Microorganismos de interés higiénico-sanitario en alimentos precocinados ultracongelados

R. Pérez Grana<sup>1</sup>*Med Mil (Esp) 2002; 58 (2): 13-17*

## RESUMEN

**Antecedentes y objetivos:** Debido al consumo frecuente de alimentos precocinados ultracongelados en las Unidades, se estudian los microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria. **Lugar de realización:** AALOG-61. **Material y métodos:** Muestreo aleatorio de cinco unidades de muestra del mismo lote de alimento. Las muestras se transportan al laboratorio en un maletín isotermo y se mantienen en estado congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Se utilizan las técnicas recomendadas en la bibliografía, y se investigan los siguientes grupos de microorganismos: aerobios mesófilos totales, Enterobacteriaceae totales, Streptococcus del Grupo D de Lancefield, sulfitorreductores, coliformes totales, E. Coli, Staphylococcus aureus, Salmonella y Shigella. **Resultados:** Un 44,44% (20/45) de las muestras analizadas (3 de croquetas de bacalao, 3 de croquetas de jamón, 4 de empanadillas de bonito, 3 de mejillones, 2 de palitos de merluza, 2 de pizza y 3 de sanjacobo) superan las tolerancias microbiológicas utilizadas como referencia. El grado de incumplimiento afecta a los siguientes parámetros: microorganismos aerobios mesófilos totales, el 2,22% (1/45); Enterobacteriaceae, el 15,55% (7/45); y Streptococcus del grupo D de Lancefield, el 26,66% (12/45). **Conclusiones:** Streptococcus del grupo D de Lancefield, es el microorganismo índice que más supera los límites microbiológicos de referencia, y se detecta en mayor número de muestras que los coliformes totales. En ninguna de las muestras se ha detectado la presencia de Salmonella y Shigella.

**PALABRAS CLAVE:** Alimentos precocinados ultracongelados. Microorganismos.

## INTRODUCCIÓN

Los alimentos precocinados ultracongelados son aquellos que se someten a una serie de manipulaciones culinarias en la industria antes de aplicar una técnica de conservación mediante ultracongelación. Abarcan a numerosas formas comerciales y alcanzan una vida media larga, dependiendo de la composición química. Son con frecuencia un sistema de reserva de materia prima y suponen un ahorro de tiempo y mano de obra en la preparación de las dietas alimenticias en los comedores colectivos de las Unidades.

Con la ultracongelación se consigue que la temperatura del alimento atraviese la zona comprendida entre  $-1^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  en menos de 30 minutos, dando lugar a la formación de numerosos y pequeños cristales de hielo, con lo que se prolonga la vida útil del alimento al reducir el valor de la actividad de agua ( $A_w$ ) y las moléculas de agua no intervienen en reacciones químicas en el metabolismo microbiano (1). Se considera alcanzada la ultracongelación en el momento en que tras la estabilización térmica la temperatura en el centro geométrico del producto sea como mínimo de  $-18^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura se considera el cese total de la multiplicación de microorganismos.

Los recuentos microbianos que presentan este grupo de alimentos es variable dependiendo del constituyente básico, contaminación inicial de las materias primas, manipulación y tecnología de

procesado (2). En pescados, mariscos y derivados, la disminución de los recuentos como consecuencia de la congelación y su almacenamiento, hace difícil en algunos casos establecer su calidad previa a la congelación (3), aunque no es previsible que los microorganismos presentes mueran rápido mientras se mantienen en estado congelado (4).

El efecto del frío sobre los microorganismos produce desnaturalización y floculación de las proteínas celulares debido a la concentración de solutos en el agua que queda sin congelar, dando lugar a lesión subletal (5), lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos para la promulgación de normas y especificaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudian los microorganismos de interés higiénico-sanitario en un total de 45 muestras de alimentos precocinados ultracongelados (Tabla 1), que se consumen frecuentemente en las Unidades.

Para la obtención de muestras se establece un muestreo aleatorio (6), y se toman 5 unidades de muestra del mismo lote de alimentos.

Las unidades de muestra se introducen en bolsas estériles, se transportan al laboratorio en refrigeración en un maletín isotermo, y se mantienen en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

Al no existir legislación específica para este grupo de alimentos, en cuanto a selección de parámetros y valores de referencia, se han empleado las normas higiénico-sanitarias para industrias dedicadas a la preparación y distribución de comidas para consumo en colectividades y medios de transporte (7) (Tabla 2).

<sup>1</sup> Cte. Veterinario. AALOG-61.

Dirección para correspondencia: AALOG-61. Paseo de Zorrilla, 141. 47008 Valladolid. Tel. 983 27 55 54. Fax 983 22 04 36.

Aceptado: 30 de enero de 2001.

**Tabla 1.** Distribución de muestras de alimentos precocinados ultracongelados.

Alimentos precocinados ultracongelados	N.º de muestras
Canelones	5
Croquetas de bacalao	5
Croquetas de jamón	5
Empanadillas de bonito	5
Mejillones	5
Menestra de verduras	5
Palitos de merluza	5
Pizza	5
Sanjacobo	5
Total	45

**Tabla 2.** Límites microbiológicos de referencia para industrias dedicadas a la preparación y distribución de comidas para consumo en colectividades y medios de transporte.

Microorganismos	Con ingredientes sin tratamiento culinario
Salmonella	Ausencia en 50 g de producto
Shigella	Ausencia en 50 g de producto
Otras enterobacteriaceas	Menos de 1000 gérmenes por gramo de producto
Escherichia coli	Menos de 1000 gérmenes por gramo de producto
Estreptococos D de Lancefield	Menos de 100 gérmenes por gramo de producto
Estafilococos coagulasa positivos	Menos de 50 gérmenes por gramo de producto
Anaerobios sulfitorreductores	Menos de 1.000 gérmenes por gramo de producto
Gérmenes aerobios mesófilos	Menos de 10 <sup>6</sup> gérmenes por gramo de producto

Siguiendo las recomendaciones de Harrigan y MacCance (8), se permite que la muestra ablande ligeramente tomando a continuación 10 gramos de alimento de diferentes partes del mismo, y se diluye con 90 ml de agua de peptona tamponada (Microkit, España), para efectuar la homogeneización. El tiempo de revitalización es de 2 horas a temperatura ambiente de laboratorio.

Para el análisis microbiológico, se siguen los métodos recomendados en la bibliografía (9-13).

#### Recuento de flora aerobia mesófila

Partiendo de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se toman alícuotas de 1 ml, y se siembran por duplicado en placas de Petri estériles, a las que se añaden transcurridos menos de 10 minutos, 15 ml de agar para recuento en placa (PCA, Oxoid, England). Se incuban a  $31 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 72 horas. La media aritmética de las colonias contadas en dos placas de Petri se multiplica por el factor de dilución, y el resultado que se obtiene son los microorganismos por gramo de alimento.

#### Recuento de Enterobacteriaceae totales

A partir de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se toman alícuotas de 1 ml, y se siembran por duplicado en masa en agar bilis rojo violeta glucosa (VRBG,

Oxoid, England). Una vez solidificado el medio de cultivo, se añaden 10 ml del mismo medio en la superficie para evitar el excesivo crecimiento y extensión de las colonias y facilitar el recuento. Se incuba a  $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Se cuentan las colonias rojo violeta con halo de igual color. Se halla la media aritmética y, se multiplica por el factor de dilución para obtener los microorganismos totales por gramo de alimento.

#### Recuento de Streptococcus del Grupo D de Lancefield

A partir de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se siembra 1 ml de cada de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , en tres series de tres tubos que contienen 10 ml de caldo kanamicina aesculina azida ( KAA, Oxoid, England). Se incuba a  $37^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Los tubos que presentan ennegrecimiento se confirman sembrando 1 ml en placas de Petri con agar kanamicina aesculina azida (agar KAA, Oxoid, England). Se incuba a  $37^\circ \text{C}$  24 horas. Se consideran positivas las colonias rodeadas de halo color negro por hidrólisis de la esculina. Se leen en la tabla del número más probable (NMP), los tubos positivos que han sido confirmados en el medio sólido y se obtiene el número de Streptococcus D de Lancefield por gramo de alimento (NMP/g).

#### Recuento de formas esporuladas y vegetativas de anaerobios sulfitorreductores

A partir de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se siembra por duplicado 1 ml de cada una de las diluciones en tubos con agar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS, Oxoid, England). Se coloca una capa de parafina estéril y se incuba a  $37^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Se cuentan las colonias de color negro, que se multiplican por el factor de dilución y se obtiene el número de microorganismos por gramo de alimento.

#### Recuento de coliformes totales

A partir de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se siembra 1 ml de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , en tres series de tres tubos que contienen 10 ml caldo lactosado biliado verde brillante (Oxoid, England) con campana de Durham. Se incuba a  $31^\circ \text{C}$  durante 48 horas. Se consideran tubos positivos los que presentan gas en la décima parte del volumen de la campana y, se calcula el número de coliformes totales por gramo de alimento (NMP/g), a partir de la lectura en la tabla del número más probable (NMP) para tres series de tubos.

#### Recuentos de Escherichia coli

Los tubos positivos en el recuento de coliformes totales se re-siembran en el mismo medio de cultivo incubando a  $44,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Los tubos que presentan gas se siembran en agar Levine (Oxoid, England). Las colonias que presentan centro negro y brillo metálico al observarlas con luz refleja, se consideran presuntivamente E coli, y se someten a pruebas bioquímicas. Se seleccionan varias colonias y se subcultivan en agua de peptona (Microkit, España), y se incuban a  $44,5^\circ \text{C}$  24 horas. Se añaden 0,5 ml de reactivo de Kovacs. La reacción positiva se manifiesta por una coloración rojiza en la parte superior del tubo. El número de E. Coli por gramo de alimento (NMP/g), se obtiene mediante lectura en la tabla del número más probable (NMP) para series de tres tubos, te-

# Microorganismos de interés higiénico-sanitario en alimentos precocinados ultracongelados

niendo en cuenta los tubos que han producido gas, el aspecto típico de las colonias en agar Levine y reacción positiva a la prueba de indol.

## Investigación de *Staphylococcus aureus*

A partir de la serie de diluciones decimales en agua de peptona (Microkit, España), se siembra 1 ml de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , en tubos con 10 ml con caldo Giolitti Cantoni (Oxoid, England). Cada tubo se cubre con una capa de parafina estéril para evitar el crecimiento de microorganismo del género micrococcus y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  48 horas. En los tubos donde se produce reducción del telurito, y que por tanto presentan ennegrecimiento, se consideran presuntivos de *Staphylococcus aureus*. Se lee en la tabla del número más probable (NMP) para series de tres tubos. Para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, se siembra 0,1 ml en placas de Petri con agar Baird-Parker (Oxoid, England) y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  24 horas. Las colonias que presentan una coloración negro brillante con halo translúcido a su alrededor se resiembran en caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, Oxoid, England), y se confirman bioquímicamente mediante prueba de coagulasa y/o proteína A (Staphaurex Wellcome diagnostics, England) (14). Los tubos que han sido confirmados mediante pruebas bioquímicas, se leen de nuevo en la tabla del número más probable (NMP), y los resultados se expresan por gramo de alimento (NMP/g).

## Investigación de *Salmonella*

Se toman 50 gramos de alimento que se añaden a 225 ml de agua de peptona tamponada (Microkit, España), y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  20 horas.

En la fase de enriquecimiento, se transfiere 1ml del caldo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (Microkit, España), y 10 ml a 100 ml de caldo selenito cistina (Oxoid, England), y se incuba a  $43^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, respectivamente. Para el aislamiento se utiliza agar verde brillante (Oxoid, England) y agar Hektoen (Oxoid, England), y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se consideran colonias presuntivas las que crecen

en el medio Hektoen de color verde azulado con centro negro y en el medio verde brillante de color rosáceo translúcido.

Las colonias sospechosas se subcultivan en agar nutritivo, se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las pruebas bioquímicas se ensayan en el dispositivo BBL® Enterotube™ II (Becton Dickinson, Germany).

## Investigación de *Shigella*

La investigación de *Shigella* se inicia efectuando una revivificación en 225 ml de caldo EE Mossel (Difco Laboratories, USA) a partir de 50 gramos de alimento, y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas. El aislamiento se hace en el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD, Oxoid, England) y agar MacConkey (Oxoid, England), incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  24-48 horas. Las colonias presuntivas en agar MacConkey son traslúcidas y sin coloración, y en agar XLD son de color rosáceo transparente. A partir de las colonias sospechosas, se siembra en agar nutritivo (Oxoid, England) incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  24 horas, y se realizan pruebas bioquímicas mediante el dispositivo BBL® Enterotube™ II (Becton Dickinson, Germany).

## RESULTADOS

En la tabla 3 se recogen los resultados de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, Enterobacteriaceae, Streptococcus del grupo D de Lancefield, sulfitorreductores, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En la Figura 1 se representan los porcentajes de microorganismos índices e indicadores detectados con relación al total de muestras. Es de resaltar que los Streptococcus del grupo D de Lancefield se detectan en el 91,11% de las muestras y los coliformes en el 77,77%.

Un 44,44% (20/45) de las muestras analizadas (3 de croquetas de bacalao, 3 de croquetas de jamón, 4 de empanadillas de bonito, 3 de mejillones, 2 de palitos de merluza, 2 de pizza y 3 de sanjacobos) superan los límites microbiológicos utilizados como referencia. El grado de incumplimiento afecta a microorganismos aerobios mesófilos totales, el 2,22% (1/45), a Enterobacteriaceae, el 15,55% (7/45), y a Streptococcus del grupo D de Lancefield, el 26,66% (12/45) (Tabla 4). Se observan diferencias significativas (p

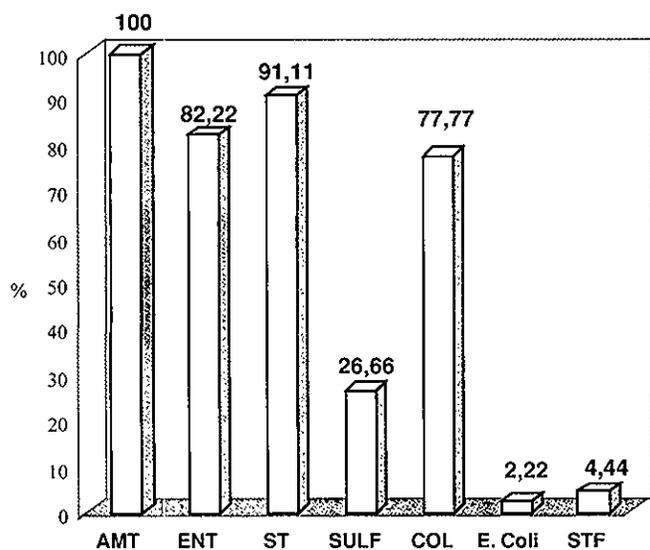
Tabla 3. Valores mínimos y máximos de microorganismos.

Muestras	AM <sup>a</sup>	ENT <sup>b</sup>	ST <sup>c</sup>	SULF <sup>d</sup>	COL <sup>e</sup>	E. COLI	STF <sup>f</sup>
Canelones	1.10 <sup>3</sup> -9,2.10 <sup>3</sup>	0-1.10 <sup>3</sup>	0-39	0	0-23	0-4	0
Croquetas de bacalao	1.10 <sup>3</sup> -1,4.10 <sup>6</sup>	0-2.10 <sup>3</sup>	14-2400	0	15-240	0	0
Croquetas de jamón	1.10 <sup>3</sup> -9.10 <sup>3</sup>	0-1,9.10 <sup>3</sup>	9-2400	0-2.10 <sup>3</sup>	0-92	0	0-4
Empanadilla de bonito	2.10 <sup>3</sup> -4,5.10 <sup>3</sup>	0-2,7.10 <sup>3</sup>	23-2400	0-3.10 <sup>3</sup>	23-150	0	0
Mejillones	6.10 <sup>3</sup> -2,4.10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>3</sup> -6.10 <sup>3</sup>	23-2400	0	43-240	0	0
Menestra	6.10 <sup>3</sup> -2,4.10 <sup>3</sup>	4.10 <sup>3</sup> -5.10 <sup>3</sup>	0-23	0	43-240	0	0
Palitos de merluza	2.10 <sup>3</sup> -5.10 <sup>3</sup>	0-2,6.10 <sup>3</sup>	23-2400	0-1.10 <sup>3</sup>	0-240	0	0-4
Pizza	4.10 <sup>3</sup> -6,4.10 <sup>3</sup>	0-1,6.10 <sup>3</sup>	0-2400	0	0-23	0	0
Sanjacobos	1,4.10 <sup>3</sup> -3,310 <sup>3</sup>	0-4,6.10 <sup>3</sup>	23-2400	0	23-2400	0	0

\* Microorganismos por gramo de alimento.

Leyenda:

- <sup>a</sup>. Microorganismos aerobios mesófilos totales.
- <sup>b</sup>. Enterobacteriaceae totales.
- <sup>c</sup>. Streptococcus del grupo D de Lancefield.
- <sup>d</sup>. Sulfitorreductores.
- <sup>e</sup>. Coliformes totales.
- <sup>f</sup>. *Staphylococcus aureus*.

**Figura 1.** Porcentajes de microorganismos índices e indicadores detectados.

Leyenda:

AMT: Microorganismos aerobios mesófilos totales.  
 ENT: Enterobacteriaceae totales.  
 ST: Streptococcus del grupo D de Lancefield.  
 SUL: Sulfitorreductores.  
 COL: Coliformes totales.  
 STF: Staphylococcus aureus.

**Tabla 4.** Distribución de muestras que superan los valores de referencia.

Muestras	AMT*	ENT*	ST*	Total
Croquetas de bacalao	1	1	2	
Croquetas de jamón		1	2	3
Empanadilla de bonito		2	2	4
Mejillones		2	1	3
Palitos de merluza			2	2
Pizza			2	2
Sanjacobo		1	2	3
Total	1	7	12	20
Grado de incumplimiento	2,22% (1/45)	15,55% (7/45)	26,66% (12/45)	44,44% (20/45)

< 0,05) mediante prueba ANOVA entre canelones y empanadillas de bonito; y entre sanjacobo y menestra, respecto a los recuentos de Streptococcus. Staphylococcus aureus se aísla en una muestra de croquetas de jamón y, en otra de palitos de merluza. En ninguna de las muestras se aísla Salmonella y Shigella.

## DISCUSIÓN

El contenido real de microorganismos presentes en los alimentos precocinados ultracongelados, puede exceder, del determinado por los métodos habituales de análisis microbiológico, cuando el tiempo de revitalización, no es suficiente para recuperar todos los microorganismos con lesión subletal. El período de revitalización utilizado en este estudio, coincide con el descrito por otros autores para el aislamiento de cepas de E coli O157:H7 de ve-

getales congelados contaminados con células de E coli dañadas (15). Se ha observado que la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  produce una reducción en el número de cepas control de 1 a 2 unidades logarítmicas por gramo después de un año (16).

Los Streptococcus del grupo D de Lancefield o enterococos, por su resistencia a la congelación, son los indicadores preferidos en la evaluación de deficiencias higiénicas y de limpieza y desinfección en las industrias de congelación de alimentos, pero su presencia guarda escasa relación con la presencia de patógenos ecológicamente relacionados, que son menos resistentes; pero se utiliza como índice de presencia o ausencia de alguno de los microorganismos patógenos eliminados por las heces (17). Al tratarse de un microorganismo resistente a las condiciones extremas de temperatura, puede considerarse un marcador fiable en este tipo de alimentos.

Además los enterococos, están más estrechamente relacionados con el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales que con el grupo coliformes, según los resultados obtenidos en este estudio. En muestras conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1-3 meses sobreviven el 81% de los enterococos y el 75% de los coliformes (18).

En la bibliografía revisada, los recuentos microbianos para este tipo de alimentos son variables. En uno de los trabajos (19) se obtienen recuentos superiores a  $106\text{ ufc/g}$  de aerobios mesófilos totales y menos de  $2.10^2\text{ ufc/g}$  de Enterobacteriaceae en camarones congelados. También en camarones congelados (20) se hallan aerobios mesófilos totales,  $2,55.10^4\text{ ufc/g}$ ; coliformes fecales,  $30,62/\text{g}$ ; recuentos bajos de Staphylococcus aureus y ausencia de Salmonella. En otro estudio sobre recuentos de aerobios mesófilos totales por gramo (21) en vegetales congelados, se obtienen  $4,5.10^3$  en coliflor,  $8,5.10^3$ , y  $6,8.10^2$  en guisantes. Algunos autores (22) proponen que el número máximo de microorganismos en las hortalizas congeladas debe estar comprendido entre  $1.10^5$  y  $5.10^5$  microorganismos viables por gramo.

En cuanto a microorganismos patógenos: Salmonella, Shigella y Staphylococcus aureus; se obtienen recuentos bajos o ausencia, y coincide con los datos bibliográficos consultados. Puede ser debido a la implantación en las industrias alimentarias, el sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC). La presencia de Staphylococcus aureus, puede ser ocasionada por una contaminación vehiculada por manipuladores de alimentos.

Se observa una escasa correlación entre la presencia de enterococos y de Escherichia coli; esto puede tener explicación, teniendo en cuenta que Escherichia coli, es un microorganismo que se considera sensible a la ultracongelación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bello Gutiérrez, J. Ciencia bromatológica. Madrid: Díaz de Santos, 2000: 395-397.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Zaragoza: Acribia, 1991: 135-167.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Ecología microbiana de los alimentos, volumen 2. Zaragoza: Acribia, 1983: 839.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Ecología microbiana de los alimentos, volumen 1. Zaragoza: Acribia, 1983: 13.
- Frazier, W.C.: Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1983: 115-127.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Métodos de muestreo para análisis microbiológico: principios y aplicaciones específicas. Zaragoza: Acribia, 1983: 119-125.

## Microorganismos de interés higiénico-sanitario en alimentos precocinados ultracongelados

7. Orden del Ministerio de la Gobernación de 21 de febrero de 1977 sobre Normas higiénico-sanitarias para la instalación y funcionamiento de industrias dedicadas a la preparación y distribución de comidas para consumo en colectividades y medios de transporte. (B.O. del Estado de 10 de marzo de 1977).
8. Harrigan WF, MacCance ME: Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. León: Academia, 1979: 209-210.
9. Mossel DAA, Moreno García, B. Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1985: 214-244.
10. Pascual Anderson MR. Microbiología alimentaria. Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989:11-121.
11. International Commission on Microbiological Specifications for foods (ICMSF). Microorganismos de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1999; 387-401.
12. Collins CH, Lyme P. Métodos microbiológicos. Zaragoza: Acribia, 1989: 179-182.
13. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia, 1983: 111-177.
14. Tsung C, Su H. Evaluation of latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from foods. *J Food Prot* 1993; 56 (9):759-762.
15. Hara-Kudo Y, Ikeda M, Kodaka H, Nakagawa H, Goto K, Masuda T, Konuma H, Kojima T, Kumagai S. Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157: H7 from foods. *Appl Environ Microbiol* 2000 Jul; 66 (7): 2866-2872.
16. Ansary SE, Darling KA, Kaspar CW. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2 degrees C, and -20 degrees C. *J Food Prot* 1999 Nov; 62 (11):1243-1247.
17. Mossel DAA, Bijker PGH, Eelderin KI. Strepococci of Lancefield groups A,B and D and those of bucal origin in foods: their public health significance monitoring and control. London, 1978: 315-325.
18. Jay, JM. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1973: 240-243.
19. Beckers HJ, van Schothorst M, van Spreckens KJ, Oosterhuis JJ. Microbiological quality of frozen precooked and peeled shrimp from South-East Asia and From the North Sea. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* 1981 Jan;172 (4-5): 401-410.
20. Seydi M, Niang PN. Hygienic and commercial quality of Senegalese frozen shrimp. *Dakar Med* 1993; 38(1): 17-22.
21. Barnard RJ, Duran AP, Swartzentruber A, Schwab AH, Wentz BA, Read RB Jr. Microbiological quality of frozen cauliflower, corn, and peas obtained at retail markets. *Appl Environ Microbiol* 1982 Jul; 44 (1): 54-58.
22. Gunther M. Microbiología de los alimentos vegetales. Zaragoza: Acribia, 1981: 70-72.
23. Splitstoeser DF, Wettergreen WD, Pederson CS. Control of microorganisms during preparation of vegetables for freezing. Green beans. *Food Technology*, 1961; 15: 329-331.
24. Mossel DAA. Microbiology of food occurrence prevention and monitoring of hazards and deterioration. 65-72. Faculty of Veterinary Medicine. The University of Utrecht. 1977.
25. Subcommittee on microbiological criteria. An evaluation of the role microbiological criteria for food and food ingredients... Washington DC.: National Academy Press, 1985: 279-298.
26. Elliot RP, Michener HD. Microbiological process report, microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods. A review *Appl. Microb.* 1961; 9S 452 bis 468.
27. Gunther M. Microbiología de alimentos vegetales. Zaragoza: Acribia, 1981: 70-71.
28. Leininger HV, Shelton LR, Lewis KH. Microbiology of frozen cream type pies frozen cooked-peeled shrimp and dry food grade gelatin. *Food technology* Champaign 1971; 25: 224.
29. Nichols G, Gillespie I, de Louvois J. The microbiological quality of ice used to cool drinks and ready-to-eat food from retail and catering premises in the United Kingdom. *J Food Prot* 2000 Jan; 63 (1): 78-82.
30. Masud T. Microbiological quality and public health significance of ice-cream. *JPMA J Pak Med Assoc* 1989 Apr; 39 (49): 102-104.
31. Wang PL, Day EJ, Chen TC. Microbiological quality of frozen fried chicken product obtained from a retail store. *Poult Sci* 1976 Jul; 55 (4):1290-1293.
32. Wilson IG, Heaney JC, Weatherup ST. The effect of ice-cream-scoop water on hygiene of ice cream. *Epidemiol Infect* 1997 Aug; 119 (1): 35-40.
33. Baer EF, Duran AP, Leininger HV, Reads RB Jr, Schwab AH, Swartzentruber A. Microbiological quality of frozen breaded fish and shellfish products. *Appl Environ Microbiol* 1976 Mar; 31 (3): 337-341.
34. Swartzentruber A, Schwab AH, Duran AP, Wentz BA, Read RB JR. Microbiological quality of frozen shrimp and lobster tail in the retail market. *Appl Environ Microbiol* 1980 Oct; 40 (4).