

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

**UTILIZACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A  
*Pseudomonas fluorescens* PARA DETERMINAR LA CALIDAD  
HIGIENICA DE LA LECHE Y DE LA CARNE REFRIGERADAS POR  
METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)**

Memoria que para optar al grado  
de Doctor en Veterinaria presenta la  
Licenciada M<sup>a</sup> Isabel González Alonso

Madrid, mayo de 1994



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

M<sup>a</sup> DEL ROSARIO MARTIN DE SANTOS, PROFESORA TITULAR DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "**Utilización de anticuerpos policlonales frente a *Pseudomonas fluorescens* para determinar la calidad higiénica de la leche y de la carne refrigeradas por métodos inmunoenzimáticos (ELISA)**", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria M<sup>a</sup> Isabel González Alonso, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta de los catedráticos D. Bernabé Sanz Pérez y D. Pablo E. Hernández Cruza y de la que suscribe, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 23 de Mayo de 1994

Fdo: Pablo E. Hernández

Fdo: Bernabé Sanz

Fdo: M<sup>a</sup> del Rosario Martín

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Bernabé Sanz Pérez, por su cálida acogida en el Departamento que dirigía en el momento de mi incorporación al mismo. Igualmente, deseo agradecer al actual director del Departamento, Prof. Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda, el apoyo y estímulo que siempre me ha infundido.

Expreso mi gratitud al a la Prof. Dra. Rosario Martín de Santos, quien a lo largo de la realización de esta tesis ha seguido de cerca mi tarea investigadora demostrando su constante dedicación e interés por mi formación. Asimismo, agradezco al Prof. Dr. Pablo Hernández Cruza, el haberme dado la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación, así como sus valiosas orientaciones y ayuda durante todos estos años.

Mis más sinceras gracias al resto de Profesores de este Departamento, particularmente a la Dra. Teresa García, por su paciente asistencia en el inicio de mis experimentos, al Prof. Dr. José Tormo, por atender tan amablemente mis consultas y a los Profesores Dres. Carmen Casas y Lorenzo de la Hoz, por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de mis resultados.

También quiero dar las gracias a los doctorandos de este Departamento, cuya presencia y apoyo han sido muy importantes en el transcurso de mis experiencias (tanto inmunoenzimáticas como personales); en especial a Cristina y María, sufridoras más antiguas de mis ELISAs y pseudomonas y a Carmenpín, Manuela y Ana, por los muchos y buenos ratos compartidos.

Al personal facultativo y auxiliar del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar "Gómez Ulla", por su colaboración durante la inmunización de los conejos. Al personal de la Granja Diplomada

"Priégola", que nos proporcionó en repetidas ocasiones las muestras de leche cruda. Deseo agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca del Plan de Formación de Profesorado y Personal Investigador.

A mis amigos de siempre, gracias un vez más.

A mis hermanos Vicente y Pablo y muy especialmente a mis padres, por darme en todo momento su cariño, apoyo y confianza

...y a Daniel.

	PAGINA
<b>I. EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA</b>	
<b>A INVESTIGAR</b> .....	2
<b>II. INTRODUCCION</b> .....	6
<b>II.1. MICROBIOLOGIA DE LA LECHE CRUDA</b> .....	7
1.1. Flora psicotrofa .....	7
1.2. Microorganismos que integran la flora psicotrofa de la leche .....	8
1.3. Importancia de los microorganismos psicotrofos en la calidad de la leche cruda refrigerada y de los productos lácteos .....	12
1.4. Aspectos legales referentes a la calidad higiénica de la leche .....	19
<b>II.2. MICROBIOLOGIA DE LA CARNE CRUDA</b> .....	22
2.1. Importancia de los microorganismos psicotrofos en la calidad de la carne cruda refrigerada .....	22
2.2. Cambios químicos asociados al crecimiento microbiano en la carne cruda refrigerada .....	26
<b>II.3. METODOS DE DETECCION E IDENTIFICACION</b> <b>DE MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS</b> .....	30
3.1. Métodos convencionales de análisis microbiológico de los alimentos .....	30
1. Recuento estándar en placas (REP) .....	30
2. Método del número más probable (NMP) .....	32
3. Método de reducción de colorantes .....	32
4. Recuento microscópico directo (RMD) .....	33
3.2. Métodos rápidos de detección e identificación de microorganismos de los alimentos .....	34
1. Automatización de los métodos convencionales .....	34
2. Métodos fisico-químicos .....	36

1. Impedimetría .....	36
2. Microcalorimetría .....	37
3. Turbidimetría .....	38
4. Radiimetría .....	39
5. Epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT) .....	39
6. Bioluminiscencia .....	41
7. Prueba del <i>Limulus</i> .....	43
8. Prueba de la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular .....	45
3. Técnicas inmunológicas .....	46
1. Aglutinación .....	47
2. Inmunofluorescencia .....	47
3. Radioinmunoensayo (RIA) .....	48
4. Métodos inmunoenzimáticos (ELISA) .....	48
4. Métodos genéticos .....	55
1. Perfil plasmídico .....	55
2. Perfil de restricción del ADN cromosómico .....	56
3. Sondas de ADN .....	57
4. Reacción en cadena de la polimerasa .....	58
5. Aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la bioluminiscencia bacteriana .....	59
<b>III. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>III.1. MATERIALES .....</b>	<b>62</b>
1.1. Material de laboratorio .....	62
1.2. Material biológico .....	64
1. Microorganismos .....	64
2. Obtención de los inmunosueros .....	65
3. Origen de las muestras .....	65
1.3. Productos y reactivos .....	66

III.2. METODOS .....	66
2.1. Métodos microbiológicos .....	66
1. Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias psicrotrofas .....	66
2. Recuento de microorganismos psicrotrofos viables .....	66
2.2. Aislamiento de las proteínas de la membrana externa de <i>Ps. fluorescens</i> .....	67
1. Soluciones empleadas .....	67
2. Metodología .....	68
2.3. Determinación de la proteína .....	70
2.4. Caracterización de las proteínas de la membrana externa de <i>Ps. fluorescens</i> .....	71
1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico .....	71
1. Tampones, geles y soluciones .....	72
2. Preparación de las muestras .....	74
3. Preparación de los geles .....	74
4. Electroforesis .....	74
5. Tinción del gel .....	75
6. Determinación del peso molecular .....	75
2.5. Purificación de la proteína F de <i>Ps. fluorescens</i> .....	77
1. Cromatografía de filtración en geles .....	77
1. Gel y tampón de elución .....	77
2. Condiciones de trabajo .....	77
3. Determinación y caracterización de la proteína F purificada .....	78
2.6. Técnicas inmunológicas .....	78
1. Obtención de los inmunosueros .....	78
1. Extractos antigénicos utilizados .....	78
2. Pauta de inmunización .....	79
3. Sangría final .....	79
4. Obtención y conservación del suero .....	81
5. Purificación parcial de los inmunosueros .....	81
6. Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina .....	83

2. Preparación de las muestras .....	84
1. Muestras de referencia .....	84
1. Leche UHT .....	84
2. Carne cruda estéril .....	84
2. Muestras problema .....	85
1. Leche cruda refrigerada .....	85
2. Carne cruda refrigerada .....	85
3. Condiciones de utilización de las muestras .....	86
3. Técnicas inmunoenzimáticas .....	87
1. Técnica del ELISA indirecto .....	87
1. ELISA indirecto clásico .....	87
2. ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina .....	90
2. Técnica del ELISA sandwich .....	90
 <b>IV. RESULTADOS</b> .....	 94
 IV.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS PROTEINAS MAYORITARIAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE <i>Ps. fluorescens</i> .....	   95
 IV.2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA F DE <i>Ps. fluorescens</i> AH-70 .....	  96
2.1. Cromatografía de filtración en geles .....	96
2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico .....	96
 IV.3. ESTIMACION POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO DE LA CAPACIDAD DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-PROTEINA F (ANTI-PF) Y ANTI-PARED CELULAR (ANTI-PC) DE RECONOCER DIVERSAS CEPAS DE <i>Ps. fluorescens</i> .....	   101
3.1. Capacidad de reconocimiento de cepas de <i>Ps. fluorescens</i> por el inmunosuero anti-proteína F (anti-PF) .....	101

3.2. Capacidad de reconocimiento de cepas de <i>Ps. fluorescens</i> por el inmunosuero anti-pared celular (anti-PC) .....	104
 IV.4. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE <i>Ps. fluorescens</i> Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA .....	106
4.1. Técnica del ELISA indirecto .....	106
4.2. Técnica del ELISA sandwich .....	108
1. Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo .....	109
2. Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF) .....	109
3. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC) .....	117
 IV.5. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE <i>Ps. fluorescens</i> Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA CARNE CRUDA REFRIGERADA .....	123
5.1. Técnica del ELISA indirecto, utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina .....	123
1. Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo .....	123
2. Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF) .....	124
3. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC) .....	129
5.2. Técnica del ELISA sandwich .....	133
1. Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo .....	133
2. Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF) .....	133
3. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC) .....	138
 V. DISCUSION .....	142
 V.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA PROTEINA F DE LA MEMBRANA EXTERNA DE <i>Ps. fluorescens</i> .....	143

V.2. OBTENCION DE INMUNOSUEROS .....	147
2.1. Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina .....	149
V.3. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE <i>Ps. fluorescens</i> Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA .....	150
V.4. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE <i>Ps. fluorescens</i> Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA CARNE CRUDA REFRIGERADA .....	155
4.1. Detección de <i>Ps. fluorescens</i> y de otras bacterias psicrotrofas por la técnica del ELISA indirecto, utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina .....	156
4.2. Detección de <i>Ps. fluorescens</i> y de otras bacterias psicrotrofas utilizando la técnica del ELISA sandwich .....	158
V.5. COMPARACION DE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA) DESARROLLADAS CON OTROS METODOS RAPIDOS DE ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LOS ALIMENTOS .....	159
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>162</b>
<b>VII. TRABAJO FUTURO .....</b>	<b>164</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>168</b>

**CAPITULO I**

***EXPOSICION GENERAL DEL  
PROBLEMA A INVESTIGAR***

La composición química y las características biológicas de la carne y de la leche, las convierten en un excelente medio de cultivo microbiano. Bacterias, mohos y levaduras desempeñan un papel fundamental en la alteración y, por ello, la conservación de la leche y de la carne persigue minimizar o inhibir la actividad y el crecimiento microbiano. De los diversos procedimientos tecnológicos empleados para retardar los cambios alterativos y prolongar la vida útil de los alimentos (aplicación de frío, tratamientos térmicos, adición de sustancias químicas, utilización de atmósferas modificadas, irradiación, etc.), la refrigeración constituye, sin lugar a dudas, el método de conservación más generalizado (Lambert y col., 1991; Jay, 1992a).

Si bien el empleo de sistemas de refrigeración para el almacenamiento de la leche cruda en las granjas, en los centros comarcales de recogida, en el transporte e incluso en las centrales lecheras, permite prolongar su vida útil, también favorece la proliferación de bacterias psicrótrofas Gram-negativas, de las que el género *Pseudomonas* representa, generalmente, más del 50% de los aislamientos. La especie de este género más frecuentemente aislada es *Ps. fluorescens* (Cousin, 1982).

A temperaturas de refrigeración, muchas bacterias psicrótrofas producen enzimas exocelulares termoestables. Aunque las formas vegetativas se destruyen por los tratamientos térmicos, las proteasas y lipasas exocelulares permanecen activas en la leche y no se destruyen totalmente por el calor (Adams y Brawley, 1981; Patel y col., 1983). La presencia de concentraciones elevadas de estas enzimas en la leche cruda origina problemas de gelificación y de aparición de sabores amargos, tanto en las leches esterilizadas como en otros productos lácteos (Downey, 1980; Fairbairn y Law, 1986). En la leche cruda refrigerada hay una relación directa entre número de bacterias psicrótrofas y actividad enzimática (Adams y col., 1975). La presencia en la leche cruda de una concentración de bacterias psicrótrofas del orden de  $10^6$  ufc/ml, suele ser suficiente para que los exoenzimas que liberan originen defectos en las leches conservadas y en otros productos lácteos (Law, 1979; Downey, 1980; Baker, 1983).

La refrigeración durante el almacenamiento de la carne fresca prolonga su vida útil durante un tiempo generalmente suficiente para que llegue a las

industrias transformadoras o al consumidor en condiciones adecuadas. Sin embargo, la carne almacenada en refrigeración se altera inevitablemente al desarrollarse los microorganismos que proliferan a bajas temperaturas. La mayoría de los microorganismos alterantes de la carne proceden, fundamentalmente, de contaminaciones posteriores al sacrificio, debidas al contacto de las canales con el utillaje, el agua, el aire, las manos y la ropa de los manipuladores, contaminados a su vez a partir del contenido intestinal y heces durante las operaciones de carnización animal (Nottingham, 1982). En la carne fresca, se consideran índices de buena manipulación higiénica de las canales los que no exceden de  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> (Gill, 1982). Al igual que sucede con la leche, si la carne se conserva en refrigeración, son los microorganismos psicrotrofos pertenecientes al género *Pseudomonas* los principales responsables de su alteración (McMeekin, 1982; Dainty y col., 1983). La alteración en aerobiosis de la carne refrigerada se caracteriza por la aparición de olores anómalos y limosidad superficial, lo que ocurre cuando la carga bacteriana se sitúa entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> (Ayres, 1960; Ingram y Dainty, 1971).

El desarrollo y puesta a punto de un método eficaz, rápido y barato que detecte y cuantifique la flora psicrotrofa contaminante de la carne y de la leche refrigeradas tendría un interés extraordinario, no sólo para indicar la posible presencia de enzimas exocelulares alterantes, sino también para evaluar la calidad microbiológica de estos alimentos.

Las técnicas microbiológicas utilizadas en el control de calidad de los alimentos han cambiado en los últimos años. Los métodos convencionales, que incluyen fundamentalmente los recuentos microbianos en placas, presentan el inconveniente de exigir mucho tiempo para la obtención de resultados. En la actualidad, la utilización cada vez más frecuente de sistemas de control de la calidad basados en el análisis de riesgos y en la identificación y control de puntos críticos (ARICPC), así como el empleo de planes de muestreo estadísticamente correctos, requieren el análisis de un gran número de muestras y la obtención inmediata de resultados que permitan aplicar acciones correctivas rápidas en la cadena de fabricación. Estas razones han impulsado el desarrollo de nuevos métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos (Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991).

Las pruebas rápidas desarrolladas para predecir la calidad microbiológica de los alimentos utilizan técnicas de impedimetría (Bishop y col., 1984; Bishop y White, 1985), turbidimetría (Mattila, 1987; Mattila y Alivehmas, 1987), epifluorescencia (Pettipher y Rodriguez, 1982), bioluminiscencia (Bishop y White, 1986) y otras, como por ejemplo la prueba del *Limulus* (May y col., 1989) y el ensayo de la actividad aminopeptidásica bacteriana (Pérez de Castro y col., 1989). Si bien la mayoría de estas técnicas poseen una adecuada sensibilidad y reproducibilidad, requieren la utilización de equipos instrumentales sofisticados que, junto con el elevado coste de los reactivos, limitan su utilización.

Actualmente, entre las técnicas de reciente aplicación al análisis microbiológico de los alimentos se encuentran las inmunológicas. La utilidad de estas técnicas se ha demostrado en el análisis rutinario de los alimentos debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste (Candlish, 1991). Por ello, en el presente trabajo se propone el empleo de dichas técnicas para evaluar la calidad microbiológica de la leche y de la carne refrigeradas.

Las bacterias Gram-negativas poseen en su membrana externa numerosas proteínas, de las que algunas son iguales en especies de un mismo género e incluso en las de géneros distintos. Así, Geyer y col., (1979) comprobaron que los inmunosueros obtenidos frente a proteínas de la membrana externa de *Salmonella typhimurium* reconocían proteínas de *Escherichia coli* y *Shigella* sp. Además, son muchos los estudios que indican que la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* contiene una porina (proteína F), que antigénicamente muestra bastantes analogías en todas las cepas de *Ps. aeruginosa* analizadas (Woodruff y col., 1986). Basándonos en esta información, y dado que la mayor parte de los microorganismos que constituyen la flora psicrotrofa de los alimentos pertenecen al género *Pseudomonas* y que su especie más frecuente es *Pseudomonas fluorescens*, se ha procedido al aislamiento, purificación y caracterización parcial de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 (1). Una vez purificada y caracterizada, se ha inoculado a conejos para obtener los correspondientes anticuerpos policlonales anti-proteína F que permitan, mediante el desarrollo de las técnicas inmunológicas adecuadas, evaluar la calidad microbiológica de la leche y de la carne cruda refrigeradas.

(1) Se trata de una cepa aislada en nuestro Departamento por Azcona y col., en 1988.

Asimismo se sabe desde hace algunos años (Stya y col., 1984; Islam y Stimson, 1987; Paterson y Tiffin, 1988; Wong, 1990) que en la detección inmunológica de microorganismos pueden utilizarse como inmunógenos células bacterianas enteras. Por ello, otra aproximación metodológica de este trabajo ha consistido en la inmunización de un segundo lote de conejos con células activas de *Ps. fluorescens* AH-70, con el fin de obtener los correspondientes anticuerpos policlonales anti-pared celular (anti-PC). Dado que estos anticuerpos se han obtenido frente a numerosos componentes antigénicos de la pared celular bacteriana, es natural que muestren un espectro de detección más amplio.

Para alcanzar los objetivos descritos, primero se han tenido que conseguir los siguientes:

1. Aislamiento por ultracentrifugación de las proteínas mayoritarias de la membrana externa de varias cepas de *Ps. fluorescens*.
2. Caracterización de las proteínas aisladas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).
3. Purificación de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 utilizando técnicas de cromatografía de filtración en geles.
4. Inmunización de dos lotes de conejos, uno con proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 y otro con una concentración adecuada de células vivas de la misma cepa, para obtener los correspondientes inmunosueros anti-proteína F y anti-pared celular.
5. Estudio de la capacidad de los inmunosueros de reconocer distintas cepas de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas, utilizando diversas variantes inmunoenzimáticas (ELISA).
6. Utilización de los anticuerpos anti-PF y anti-PC para evaluar la calidad microbiológica de la leche y de la carne cruda refrigeradas.

**CAPITULO II**

***INTRODUCCION***

## II.1. MICROBIOLOGIA DE LA LECHE CRUDA

### II.1.1. FLORA PSICROTROFA

La capacidad de algunos microorganismos de desarrollarse a bajas temperaturas se conoce desde hace más de 100 años. En 1887, el Dr. J. Forster, profesor de bacteriología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Amsterdam, fue el primero en demostrar el crecimiento bacteriano a 0°C, al observar que algunas bacterias se multiplicaban en el agua helada de los canales de Amsterdam. En 1923, Brooks y Hansford observaron que ciertos hongos se desarrollaban en la carne almacenada a 6°C. Aunque el término "psicrófilo" no lo propuso Schmidt-Nielsen hasta 1902, la definición y la terminología empleadas para designar a los microorganismos que crecen y se multiplican a temperaturas de refrigeración y menores, ha sido objeto de polémica. A diferencia de los términos "mesófilo" y "termófilo", que definen a los microorganismos según su temperatura óptima de crecimiento, el término "psicrófilo" se ha utilizado atendiendo a numerosos criterios. Muchos autores han clasificado como psicrófilos a los que crecen a 0°C, sin tener en cuenta su temperatura óptima de crecimiento. Así, Ingraham y Stokes (1959) y Stokes (1963) definen como psicrófilos a los que se desarrollan a 0°C formando colonias macroscópicamente visibles en un periodo de una o dos semanas. Sin embargo, otros autores opinan que para denominar psicrófilos a los microorganismos, debe incluirse su temperatura óptima de crecimiento. Actualmente, y según el criterio más aceptado, se denominan microorganismos "psicrófilos" a los que tienen una temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior, crecen hasta los 20°C y se multiplican a 0°C o menos (Morita, 1975).

En 1960, Eddy sugirió la utilización del término "psicrotrofo" para definir las bacterias que crecen en la proximidad de 0°C, independientemente de cuál sea su temperatura óptima de crecimiento. De acuerdo con este criterio, se consideran psicrotrofos a los microorganismos que, aunque clasificables como mesófilos con respecto a su temperatura óptima de crecimiento, forman colonias visibles en un tiempo de 7-10 días a temperaturas comprendidas entre 0 y 10°C (Kraft y Rey, 1979).

No se conocen bien los mecanismos por los que los microorganismos

psicrófilos y psicrotrofos se desarrollan a temperaturas bajas, pero se sabe que poseen enzimas y sistemas formadores de enzimas que difieren de los de otros microorganismos al ser activos a temperaturas de refrigeración, poseyendo también membranas celulares que permiten el transporte de sustratos debido a un mecanismo adaptativo de sus lípidos a las temperaturas bajas (Russell y Fukunaga, 1990; Gounot, 1991; Jay, 1992a).

## II.1.2. MICROORGANISMOS QUE INTEGRAN LA FLORA PSICROTROFA DE LA LECHE

Los microorganismos psicrotrofos aislados de la leche y productos lácteos no constituyen un grupo taxonómico específico e incluyen bacterias, levaduras y mohos (Stokes y Redmond, 1966). En la tabla II.1 se citan los principales géneros bacterianos psicrotrofos aislados de la leche y de los productos lácteos.

### II.1.2.1. BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

La mayoría de los microorganismos aislados de la leche cruda son bacterias Gram-negativas, no esporuladas y catalasa-positivas (Thomas, 1958). Los del género *Pseudomonas* son los que se aíslan con mayor frecuencia, llegando a ser los predominantes cuando la leche se mantiene a temperaturas de refrigeración (Stadhouders, 1975; Shelley y col., 1986). Las pseudomonas poseen un metabolismo estrictamente aeróbico y aunque no hidrolizan la lactosa, pueden oxidar la glucosa y la galactosa (Lessie y Phibbs, 1984). Algunas características del género *Pseudomonas* que favorecen su selección son:

a) su versatilidad metabólica, ya que además de la glucosa utiliza eficientemente otros nutrientes como aminoácidos y ácidos orgánicos.

b) su capacidad para el almacenamiento exógeno de sustratos, oxidando la glucosa a gluconato, 2-cetogluconato y otros compuestos intermediarios que no son utilizables por la mayoría de los microorganismos.

c) la secreción de enzimas hidrolíticos extracelulares para el aprovechamiento de proteínas y lípidos.

d) la producción de sideróforos quelantes del hierro.

Dentro del género *Pseudomonas*, la especie que con mayor frecuencia se aísla de la leche cruda mantenida a temperaturas de refrigeración es *Ps. fluorescens*. Otras especies presentes son *Ps. putida*, *Ps. fragi*, *Ps. putrefaciens* y *Ps. aeruginosa* (Juffs, 1973; Suhren, 1989; Bramley y McKinnon, 1990). También se han aislado otros géneros de bacterias psicrótrofas Gram-negativas, como *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Serratia* y enterobacteriáceas como *Enterobacter* y *Klebsiella* (Milliere y Veillet Poncet, 1985; Reinheimer y col., 1985). Asimismo se han aislado otras pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Chromobacterium* y *Citrobacter*.

En un trabajo realizado por García-Collía y col., (1981) con muestras de leche cruda española, las bacterias Gram-negativas representaron un 87% de los aislamientos, de los cuales un 83,5% pertenecían al género *Pseudomonas*. Dentro de este género se observó que las especies predominantes fueron *Ps. fluorescens* (64,4%) y *Ps. putida* (19,7%). Otros datos publicados acerca de la población psicrótrofa de la leche cruda en varios países europeos coinciden con esta distribución (Suárez y Ferreiros, 1991; Gennari y Dragotto, 1992; Ternström y col., 1993).

#### II.1.2.2. BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

En los últimos años se ha prestado una gran atención a los microorganismos psicrótrofos termorresistentes (Washam y col., 1977, Weckbach y Langlois, 1977). Estos microorganismos incluyen principalmente bacterias Gram-positivas y se encuentran en la leche cruda en menor proporción que las bacterias psicrótrofas Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas que más frecuentemente se aíslan de la leche cruda pertenecen a los géneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Arthrobacter* (Cousin, 1982) (Tabla II.1). También se han descrito especies de *Microbacterium*, *Streptococcus*, y *Corynebacterium*.

La importancia de la presencia en la leche de la flora psicrótrofa Gram-positiva radica en que algunas especies, especialmente las del género *Bacillus*, son termodúricas y producen esporos termorresistentes (Collins, 1981). Los esporos, así como las formas vegetativas, pueden sobrevivir a los

Tabla II.1. Principales bacterias aisladas de la leche y productos lácteos

Géneros	Producto de origen
<b>Bacterias Gram-negativas</b>	
<i>Acinetobacter</i>	Leche cruda, pasteurizada y nata
<i>Aeromonas</i>	Leche cruda, pasteurizada y mantequilla
<i>Alcaligenes</i>	Leche cruda, pasteurizada, nata y mantequilla
<i>Chromobacterium</i>	Leche cruda
<i>Citrobacter</i>	Leche cruda y pasteurizada
<i>Cytophaga</i>	Leche cruda
<i>Enterobacter</i>	Leche cruda, pasteurizada y mantequilla
<i>Escherichia</i>	Leche cruda
<i>Flavobacterium</i>	Leche cruda, pasteurizada y mantequilla
<i>Klebsiella</i>	Leche cruda, nata, mantequilla y queso
<i>Pseudomonas</i>	Leche cruda, pasteurizada, nata y mantequilla
<i>Serratia</i>	Leche cruda
<i>Vibrio</i>	Mantequilla
<b>Bacterias Gram-positivas</b>	
<i>Arthrobacter</i>	Leche cruda y mantequilla
<i>Bacillus</i>	Leche cruda, pasteurizada y nata
<i>Clostridium</i>	Leche cruda
<i>Corynebacterium</i>	Leche cruda, pasteurizada y nata
<i>Brochothrix</i>	Leche cruda y pasteurizada
<i>Micrococcus</i>	Leche cruda y pasteurizada
<i>Sarcina</i>	Leche pasteurizada
<i>Staphylococcus</i>	Leche cruda
<i>Streptococcus</i>	Leche cruda y pasteurizada

Fuente: Cousin, 1982

tratamientos térmicos a los que se someten la leche y los productos lácteos, convirtiéndose en agentes potencialmente alterantes de las leches conservadas (Credit y col., 1972; Mikolajcik, 1979). No obstante, el número de esporos psicrotrofos de la leche suele ser escaso (Suhren, 1989).

En contraste con las bacterias psicrotrofas Gram-negativas, los psicrotrofos termodúricos tienen un tiempo de generación más largo y necesitan un almacenamiento en refrigeración más prolongado y unas condiciones más selectivas para producir alteraciones en la leche.

### II.1.2.3. MICROORGANISMOS PATOGENOS

La mayoría de los microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias no se desarrollan a temperaturas inferiores a 10°C. Sin embargo, algunos como *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* crecen a temperaturas bajas (Cousin, 1982; Fleming y col., 1985).

Griffiths y Phillips (1990) señalan que ciertas cepas de *Bacillus cereus* capaces de desarrollarse entre 4,5 y 7,5°C, podrían estar implicadas en la aparición de algunos brotes toxiinfectivos. Otro microorganismo patógeno que se desarrolla a temperaturas de refrigeración es *Y. enterocolítica*. El primer brote de esta toxiinfección alimentaria se produjo en 1976 como consecuencia del consumo de leche pasteurizada en la que se identificó la presencia de una cepa del serotipo O:8. Desde entonces, numerosas investigaciones se han centrado en el estudio de esta bacteria capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (Lee, 1977; Schiemann, 1978).

El género *Listeria* comprende siete especies, pero sólo se tiene constancia de su patogenicidad para el hombre de *L. monocytogenes*. Aunque se sabe que crece a temperaturas de refrigeración, diversos autores han estudiado y cuestionado su resistencia a los tratamientos térmicos (Farber, 1989; Mackey y Bratchell, 1989; Donnelly, 1990). Si bien son muchos los trabajos que revelan que *L. monocytogenes* no sobrevive a temperaturas de pasteurización, estudios recientes sugieren que en ciertos casos podría tolerar las temperaturas altas (Knabel y col., 1990; Farber y col., 1992). De las toxiinfecciones alimentarias atribuidas a *L. monocytogenes*, la más grave tuvo

lugar en 1985 en el sur de California y se atribuyó al consumo de queso fresco (Anon, 1985).

#### II.1.2.4. LEVADURAS Y MOHOS

De algunos productos lácteos, principalmente de la mantequilla y menos frecuentemente de la leche pasteurizada, se han aislado levaduras psicotrofas pertenecientes a los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* y *Torulopsis* (Ingraham y Stokes, 1959; Rohm y col., 1992). Asimismo, algunas alteraciones de la mantequilla y de la nata se han asociado al desarrollo en su superficie de hongos psicotrofos de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* y *Penicillium* (Thomas, 1970; Thomas y Druce, 1971). Stokes (1963) señaló que algunas especies de los géneros *Alternaria*, *Mucor* y *Rhizopus*, podían comportarse como psicotrofas y originar alteraciones en algunos productos lácteos.

#### II.1.3. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS PSICROTROFOS EN LA CALIDAD DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA Y DE LOS PRODUCTOS LACTEOS

La importancia de los microorganismos psicotrofos en la calidad de la leche cruda ha crecido en las últimas décadas, debido al mayor empleo del frío para prolongar la vida útil de la leche. Generalmente, la leche recién ordeñada se enfría a una temperatura de 5°C o inferior, con el fin de inhibir el crecimiento de los microorganismos termófilos y de la mayoría de los mesófilos. El uso generalizado de la refrigeración durante el almacenamiento de la leche cruda antes de su tratamiento térmico, ha eliminado el riesgo de deterioro asociado al crecimiento de las bacterias lácticas (responsables de los olores y sabores típicos de la leche agria) y de muchos otros microorganismos patógenos. No obstante, el empleo de las bajas temperaturas durante el almacenamiento de la leche favorece el desarrollo de las bacterias psicotrofas (Shelley y col., 1986).

Los microorganismos psicotrofos están ampliamente distribuídos en la naturaleza, encontrándose en el agua, el suelo, el aire, las plantas y los animales. Las fuentes más importantes de contaminación de la leche por estas bacterias son el interior de la ubre, la superficie externa del animal y los

equipos de ordeño, transporte y almacenamiento de la leche. El contacto de la leche con estas fuentes constituye un riesgo de contaminación que puede traducirse en recuentos bacterianos elevados en la leche recién ordeñada (Ingraham y Stokes, 1959; Witter, 1961; Stokes y Redmond, 1966; Thomas y Thomas, 1973).

El desarrollo de la flora psicrotrofa en la leche cruda es variable, dependiendo del tipo, número y características fisiológicas de cada microorganismo, así como de las condiciones higiénicas durante el ordeño, almacenamiento y procesado de la leche. La microflora de la leche cruda al abandonar la granja donde se produjo depende de su carga inicial, de la temperatura y velocidad de enfriamiento y almacenamiento de la leche y del tiempo transcurrido hasta su recogida (Bramley y McKinnon, 1990). Al disminuir la temperatura de refrigeración de la leche cruda, se restringe el crecimiento de las bacterias psicrotrofas y la actividad de sus enzimas excretados (Griffiths y col., 1987). Asimismo, y dado que la refrigeración prolonga el tiempo requerido para la multiplicación de estas bacterias, la leche que se enfría inmediatamente después de su obtención presenta un menor incremento de los recuentos durante su almacenamiento en refrigeración que la leche que se enfría después de pasadas unas horas tras el ordeño (Stadhouders, 1975; Ponce de León, 1993); ello depende también de su contaminación inicial (Tabla II.2). Actualmente, en la mayoría de los países se recomienda conservar la leche a 4°C, ya que temperaturas inferiores podrían dar lugar a fenómenos de congelación que alterarían su composición y su calidad.

Con una adecuada higiene durante el ordeño y una correcta manipulación posterior, se pueden obtener recuentos iniciales de bacterias psicrotrofas en la leche cruda del orden de  $10^4$  ufc/ml (Mabbit, 1981). Sin embargo, teniendo en cuenta que el tiempo de generación de estas bacterias a 7°C es de unas 4 horas, el recuento de psicrotrofos de la leche cruda de buena calidad higiénica puede alcanzar, al cabo de 3 días de almacenamiento, niveles de  $10^7$  ufc/ml (Law y Mabbit, 1983). Con estos recuentos, la actividad metabólica de la flora psicrotrofa origina defectos en la leche y en otros productos lácteos (Law y col., 1979; Mikolajcik, 1979; Baker, 1983).

**Tabla II.2. Evolución del contenido de microorganismos de la leche cruda durante 48 h a una temperatura de 4°C, en función de la contaminación inicial y de la velocidad de enfriamiento**

Periodo de almacenamiento	Contaminación inicial (bacterias/ml)					
	20.000		75.000		125.000	
	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.
Enfriamiento instantáneo	22.000	23.500	79.500	87.750	132.500	188.250
Enfriamiento en 3 horas	23.000	25.550	87.000	101.250	212.500	469.250
Enfriamiento en 5 horas	25.250	30.200	115.500	237.750	273.400	613.800

Fuente: Ponce de León (1993)

Por ello, para elaborar productos lácteos de buena calidad y mejorar su conservación durante el almacenamiento en refrigeración, es imprescindible la utilización de leche cruda de características óptimas.

La presencia de bacterias psicotrofas en la leche y derivados lácteos tratados térmicamente se asocia, generalmente, a una contaminación posterior al tratamiento térmico ya que, salvo excepciones, estas bacterias se destruyen por la acción del calor. No obstante, las bacterias psicotrofas producen enzimas exocelulares termorresistentes (proteasas y lipasas) que modifican las propiedades organolépticas del producto acabado, especialmente cuando el periodo de almacenamiento es largo (Law, 1979; Cousin, 1982; Fairbairn y Law, 1986; Stead, 1986; 1987).

La proteólisis y lipólisis que experimentan la leche y los productos lácteos dependen del tipo y del número de microorganismos psicotrofos presentes en la leche cruda, así como de su capacidad de producir proteasas y lipasas termorresistentes (Cousin, 1982). Se ha señalado que un alto porcentaje de las bacterias psicotrofas de la leche cruda (80-85%) poseen actividad proteolítica o lipolítica (García-Collía y col., 1981; García y col., 1989) y un 65% comparten ambas propiedades (Thomas y Blodwen, 1973). Además, el 70% de los enzimas proteolíticos y/o lipolíticos elaborados por estas bacterias presentan una gran termoestabilidad, resistiendo tratamientos térmicos de la misma intensidad que los que se aplican en la esterilización de la leche por el procedimiento UHT (Cogan, 1977; Law, 1979; Downey, 1980; Cousin, 1982; Deeth y col., 1983; Fairbairn y Law, 1986; García-Collía y col., 1988; García y col., 1989). Señalemos a este respecto que Adams y col., (1975) comprobaron que la proteasa producida por una especie de *Pseudomonas* era 4.000 veces más resistente al calor que las esporas de *Bacillus stearothermophilus*, de donde se deduce que el término "estéril" no siempre implica estabilidad durante la conservación.

A pesar de la gran termoestabilidad de las lipasas y proteasas de las bacterias psicotrofas, diversos trabajos apuntan la posibilidad de que su inactivación se alcance a temperaturas más bajas (55°C), durante tiempos más largos como 10 minutos o 1 hora (Driessen, 1983; Fairbairn y Law, 1986) o bien 85°C durante 45 segundos (Guamis y col., 1987). Sin embargo, estos tratamientos térmicos pueden originar en la leche cambios organolépticos

desagradables (Barach y col., 1976).

La población de bacterias psicrotrofas de la leche cruda necesaria para producir cambios detectables, tanto en la leche como en los productos lácteos, varía dependiendo de los géneros y de las especies presentes. No existe unanimidad en cuanto al número mínimo de microorganismos que produce alteraciones apreciables en la leche refrigerada. Mientras Adams y col., (1976) estiman que a partir de  $10^4$  microorganismos psicrotrofos/ml ya se detecta proteólisis en la leche, otros autores (Law, 1979; Driessen, 1983; Mottar, 1984) afirman que la población mínima necesaria es de  $10^7$  psicrotrofos/ml. Estas diferencias podrían deberse a las técnicas utilizadas en la detección de los enzimas, a la sensibilidad de los métodos empleados en la determinación de los productos de las proteólisis y lipólisis o a las temperaturas a la que se realizan los ensayos (Mottar, 1984). Generalmente, las modificaciones del aroma y del sabor de la leche, como consecuencia de las reacciones proteolíticas y lipolíticas que en ella acaecen, se perciben cuando el número de bacterias psicrotrofas de la leche cruda es superior a  $10^6$  ufc/ml (Ritcher, 1979; Schröder y col., 1982).

Las proteasas y lipasas actúan directamente sobre la micela de caseína y los triglicéridos de la leche, respectivamente. La mayoría de las proteasas elaboradas por las bacterias psicrotrofas degradan la k-caseína, produciendo la desestabilización de las micelas de caseína frente al  $\text{Ca}^{++}$  y la coagulación de la leche de forma análoga a la acción de la quimosina. A continuación de la k-caseína se hidroliza la  $\beta$ -caseína y, por último, la  $\alpha$ -caseína. Las proteínas séricas son menos sensibles a esta acción que las caseínas (Cousin y Marth, 1977; Law y col., 1977), posiblemente debido a su estructura globular y a un plegamiento más compacto. Los productos de degradación de las proteínas son péptidos de un peso molecular entre 5.000 y 20.000 daltones y son los responsables de la aparición de los sabores amargos de la leche y productos lácteos. La actividad de las lipasas recae principalmente en los triglicéridos, que son el componente mayoritario de la materia grasa de la leche (98%), hidrolizándolos con la consiguiente liberación de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena corta  $\text{C}_4$ - $\text{C}_8$  son los responsables del sabor a rancio, mientras los de cadena media  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{12}$  originan sabores jabonosos y los de cadena larga  $\text{C}_{14}$ - $\text{C}_{18}$  contribuyen muy poco al sabor. Muir y col., (1979) señalan que las bacterias psicrotrofas más lipolíticas son *Ps. fluorescens*, *Flavobacterium* sp. y

*Alcaligenes* sp.

En la leche pasteurizada no se han detectado cambios significativos en el aroma y sabor debidos a los enzimas exocelulares producidos por la flora psicrotrofa, ya que este producto generalmente se almacena durante un periodo corto. No obstante, la acción de las proteasas genera péptidos de bajo peso molecular responsables de la aparición de sabores amargos (Visser, 1981; Cousin, 1982). Asimismo, la actividad lipolítica origina sabor a rancio (Deeth y col., 1983) por la liberación de ácidos grasos, principalmente de cadena corta o media (C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub>). En la leche pasteurizada, las alteraciones debidas a proteolisis y lipolisis no suelen percibirse a no ser que el tiempo de almacenamiento exceda del aconsejado. En el 40% de las leches pasteurizadas almacenadas a 6-7°C aparecen defectos del sabor a los 10-11 días, cuando los recuentos son del orden de  $1,9 \times 10^7$  psicrotrofos/ml (Bandler y col., 1981).

En la leche UHT, las modificaciones organolépticas son más perceptibles debido al largo periodo de conservación de este producto. La proteolisis, además de originar sabores amargos intensos por liberación de péptidos (Bengtsson y col., 1973; McKellar y col., 1984), provoca la desestabilización de la micela de caseína llegando a producir espesamientos o gelificaciones que limitan la vida útil del producto (Bengtsson y col., 1973; Adams y col., 1976; Law y col., 1977). La actividad de las lipasas origina en la leche UHT sabor a rancio debido a la liberación de ácidos grasos, aunque la lipolisis en este producto posee una importancia secundaria (Mottar, 1989; Collins y col., 1993).

La nata obtenida de leches con un alto contenido de lipasas es más sensible al enranciamiento (Davis, 1981). La nata rancia requiere un batido más largo para obtener mantequilla, pudiendo originar problemas de separación de fases, formación de espuma y disminución del rendimiento (Dumont y col., 1977).

En el caso de la mantequilla, su bajo contenido de agua y la presencia de sal, hacen que no constituya un medio adecuado para el crecimiento de las bacterias psicrotrofas (Thomas y Druce, 1971). Además, su bajo contenido de proteína limita la actividad de las proteasas, siendo las lipasas los enzimas que desempeñan el papel más importante en el deterioro de este producto,

originando sabores a rancio y a jabón (Deeth y col., 1979; Woo y Lindsay, 1983).

Los quesos elaborados a partir de leche con un alto contenido de microorganismos psicotrofos poseen un tiempo de coagulación más corto. Esto se debe a la hidrólisis previa de parte de la caseína, que tiene lugar como consecuencia de la acción proteolítica de estos microorganismos en la leche cruda (Cousin y Marth, 1977). Asimismo, la acción de las proteasas origina mayores pérdidas de nitrógeno soluble con el suero, lo que determina una disminución en el rendimiento del producto (Law, 1979; Fairbairn y Law, 1986), una mayor dificultad en el desuerado (Juffs, 1974) y una mayor firmeza de la cuajada (Cousin y Marth, 1977). La liberación de ácidos grasos por las lipasas de la leche es importante para que se desarrollen el aroma y sabor típicos del queso. La aparición de sabores y olores anómalos (especialmente a rancio y también jabonoso, mohoso y afrutado) se atribuye a una lipólisis excesiva de la grasa durante su fabricación, con liberación de grandes cantidades de ácidos grasos libres. Para que no se detecten modificaciones organolépticas en el queso, el contenido de psicotrofos de la leche cruda utilizada para su elaboración debe situarse entre  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml, ya que recuentos superiores a  $10^7$  ufc/ml producen en este tipo de producto una rancidez temprana (Law y col., 1976; 1979).

Dado que las bacterias psicotrofas difieren en su capacidad de elaborar lipasas y proteasas termorresistentes, es difícil señalar en la leche cruda una tasa de microorganismos psicotrofos que asegure que su actividad enzimática exocelular no originará modificaciones organolépticas ni en la leche ni en los productos lácteos al prolongar mucho su vida útil. No obstante, se puede concluir que recuentos mayores de  $10^6$  microorganismos psicotrofos/ml proporcionan una materia prima de calidad cuestionable.

#### II.1.4. ASPECTOS LEGALES REFERENTES A LA CALIDAD HIGIENICA DE LA LECHE

La entrada de España en la Unión Europea y la puesta en marcha del Mercado Unico en 1993, ha significado un reto importante para las condiciones de producción de leche de nuestro país. Los estudios de los últimos años sobre calidad bacteriológica de la leche cruda española muestran un distanciamiento evidente con la del resto de la Unión (Tabla II.3). Se ha calculado que el 65% de la leche que llegaba a las centrales españolas tenía más de un millón de bacterias/ml (González de Canales, 1990). Este desfase entre la calidad higiénica de la leche producida en España y la del resto de la Unión puede atribuirse a una deficiente situación estructural, económica y técnica, así como al desconocimiento por muchos ganaderos de los principios higiénicos a seguir en la obtención de leche de buena calidad microbiológica (Rico Mansilla, 1990). Entre las medidas aplicadas al sector lácteo español en su acelerada adaptación a la Organización Común de Mercados, hay que señalar la adjudicación de primas y descuentos para el pago por composición y por nivel de bacterias, a fin de poder disponer de leche competitiva en precio y en calidad con respecto a la producida en las explotaciones de otros países de la UE.

La mejora de la calidad higiénica de la leche en nuestro país y en el resto de los países comunitarios está condicionada, además de por la demanda interna, por la Directiva del Consejo de Europa del 5 de agosto de 1985 (Directiva 85/397/CE) relativa a las características que debe reunir la leche cruda utilizada para la obtención de productos lácteos que se destinen a intercambios comunitarios. Dichas características se recogieron en el Real Decreto 362/92 de 10 de abril (BOE de 15 de abril de 1992) del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, por el que se establecieron las normas de orden sanitario y de policía sanitaria relativas a la leche cruda para tratar térmicamente, exigibles para los intercambios intracomunitarios. Posteriormente, la Directiva 92/46/CE de 14 de septiembre de 1992 estableció las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de la leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos.

**Tabla II.3. Calidad bacteriológica de la leche cruda en España y en otros países de la Unión Europea**

País	<u>Contenido en bacterias/ml</u>			
	Menos de $2 \times 10^5$	Entre $2 \times 10^5$ y $7 \times 10^5$	Entre $7 \times 10^5$ y $10^6$	Más de $10^6$
ESPAÑA	5% <sup>a</sup>	10%	20%	65%
FRANCIA	70%	20%	5%	5%
ALEMANIA	80%	15%	3%	2%
DINAMARCA	80%	15%	5%	—
HOLANDA	85%	10%	5%	—
BELGICA	70%	10%	15%	5%
REINO UNIDO	80%	10%	10%	—

a. Porcentaje de leche recogida

Fuente: González de Canales (1990)

En este sentido, la legislación establece que la leche cruda de las explotaciones, para poder ser tratada térmicamente y para la elaboración de yogur, cuajada y cremas, deberá tener una concentración de microorganismos inferior a  $10^5$  ufc/ml. Asimismo, la concentración de microorganismos de la leche cruda destinada a la elaboración de productos lácteos tratados térmicamente, distintos de los anteriormente mencionados, deberá ser inferior a  $4 \times 10^5$  ufc/ml. En las leches de cabra y oveja, el límite se sitúa en  $10^6$  ufc/ml para la leche utilizada como materia prima en la elaboración de productos lácteos tratados térmicamente y se reduce a  $5 \times 10^5$  ufc/ml para la destinada a productos no tratados por el calor. No obstante, hasta 1998 la Directiva admite excepciones para las industrias de producción limitada y para aquéllas que se abastecen de leche que no cumple los mínimos microbiológicos que establece la legislación. La concesión de las excepciones temporales y limitadas debe ir acompañada de un plan de trabajo donde se especifiquen los plazos en los que los establecimientos pueden ajustarse a los requisitos exigidos. Por todo ello, se estima que producir leche con un nivel de bacterias inferior a  $10^5$ /ml es el primer objetivo a cumplir por todas las explotaciones ganaderas.

## II.2. MICROBIOLOGIA DE LA CARNE CRUDA

### II.2.1. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS PSICROTROFOS EN LA CALIDAD DE LA CARNE CRUDA REFRIGERADA

La composición química y las características biológicas de la carne, hacen que esta constituya un excelente medio de cultivo para el desarrollo de bacterias, mohos y levaduras. Además de la riqueza en nutrientes, los valores de pH y de actividad de agua ( $a_w$ ) de la carne se encuentran dentro de los límites de crecimiento de muchos microorganismos. El bajo potencial de óxido-reducción existente en el interior de la carne, hace posible el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos y obligados. Sin embargo, los microorganismos aerobios encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo en la superficie de la carne, donde el potencial de óxido-reducción es ligeramente positivo.

La diversidad de microorganismos que pueden llegar al músculo, tanto cuando el animal está vivo, como durante el sacrificio y manipulaciones posteriores de las canales (Dainty y col., 1983), determina que la flora microbiana de la carne sea de naturaleza muy heterogénea. Aunque se ha sugerido la existencia de una flora intrínseca distinta de la flora contaminante, se ha comprobado que el interior de los músculos de los animales sanos, sacrificados en condiciones higiénicas, es prácticamente estéril (Gill, 1979). La mayoría de los investigadores coinciden en afirmar que la alteración de la carne es un fenómeno meramente superficial (McMeekin, 1982; Gill, 1983; Notermans y Kampelmacher, 1983).

Los microorganismos alterantes de la carne proceden fundamentalmente de las heces, piel y vísceras del animal, llegando a la superficie de la carne a través del utillaje, agua, aire, manos y ropa de los manipuladores. Por ello, es estrictamente necesario aplicar el sistema de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) durante la sangría, faenado y posterior manipulación de las canales (Nottingham, 1982). Una concentración de microorganismos en la carne fresca del orden de  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> se considera índice de una buena manipulación higiénica de las canales (Gill, 1982).

La mayoría de los microorganismos que alteran la carne fresca son bacterias psicrotrofas aerobias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*. También pueden encontrarse especies anaerobias facultativas como *Alteromonas putrefaciens* (Gill y Newton, 1978; Buchanan y Palumbo, 1985) y microorganismos Gram-positivos como *Lactobacillus* sp. y *Brochothrix thermosphacta* (Dainty y Hibbard, 1980).

Las bacterias mesófilas productoras de toxiinfecciones alimentarias que con mayor frecuencia se aíslan de la carne incluyen cepas de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *E. coli* enterohemorrágico 0157:H7, *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes* (Buchanan y Palumbo, 1985; Kotula y col., 1987; Lammerding y col., 1988). Aunque el crecimiento de la mayoría de estos microorganismos se inhibe a temperaturas de refrigeración, algunos como *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* pueden crecer a dichas temperaturas.

Si bien el crecimiento de mohos y levaduras se ve limitado durante el almacenamiento de la carne en refrigeración, algunas especies pueden desarrollarse en su superficie. Entre los mohos se incluyen especies de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Sporotrichum* y entre las levaduras, especies pertenecientes a los géneros *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodotorula* (Ayres, 1960). El crecimiento de mohos y levaduras en la superficie de la carne se ve favorecido por la alta disponibilidad de oxígeno, especialmente si la actividad de agua es baja (Hechelmann y Kasprowiak, 1991).

Los microorganismos juegan un papel importante en la alteración de la carne y, por ello, las prácticas de manipulación y los métodos de conservación y almacenamiento están encaminados a minimizar o inhibir la actividad y el crecimiento microbiano. De los diversos procedimientos empleados por la industria cárnica para retardar los cambios alterativos y prolongar la vida útil de sus productos (aplicación de frío, tratamientos térmicos, adición de sustancias químicas, uso de atmósferas modificadas, irradiación, etc.), la refrigeración constituye, sin lugar a dudas, el método de conservación más generalizado. Antiguamente, las canales se mantenían después del sacrificio al aire libre y en lugares sombreados, donde la temperatura podía oscilar entre

15 y 20°C. Estas temperaturas favorecían el desarrollo rápido de microorganismos mesófilos en la superficie y en el interior del músculo, limitando a 1 día o incluso a menos la vida útil de la carne (Ingram y Dainty, 1971).

Con el fin de inhibir el desarrollo de la mayoría de la flora aerobia y anaerobia mesófila, responsable de la alteración y putrefacción de la carne y productos cárnicos, ha sido necesario el empleo de sistemas de almacenamiento a bajas temperaturas. Ayres (1960) demostró que la vida útil de la carne con una carga bacteriana inicial de  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> era de 16 días a 0°C, de 5 días a 5°C y de tan sólo 2 días si se mantenía a 10°C. De ello se deduce que la temperatura de almacenamiento es de vital importancia en el control de la contaminación microbiana de la carne. Por otra parte, si bien la aplicación de temperaturas de refrigeración para el almacenamiento de la carne permite que se prolongue su vida útil durante un tiempo generalmente suficiente para que el alimento llegue a las industrias transformadoras o al consumidor en condiciones adecuadas, la carne almacenada en refrigeración termina inevitablemente alterándose debido a los microorganismos que se desarrollan a bajas temperaturas. A temperaturas de refrigeración se favorece el crecimiento selectivo de los microorganismos psicrotrofos Gram-negativos, que son los responsables de la alteración de la carne refrigerada (Ingram y Dainty, 1971; McMeekin, 1982; Dainty y col., 1983).

La evolución de la flora microbiana de la superficie de la carne a temperaturas de refrigeración varía con las condiciones de almacenamiento. En la carne refrigerada, las pseudomonas predominan a partir de los 4 días de almacenamiento y al cabo de 7 días constituyen el 95% de la población microbiana alterante (Gill y Newton, 1977; Dainty y col., 1983; Gill, 1983; Eribo y Jay, 1985). El predominio del género *Pseudomonas* se produce tanto en carne de vacuno (Ayres, 1960; Jay, 1972), como en la de cerdo (Gardner y col., 1967) y aves (Barnes e Impey, 1968; McMeekin, 1975) y no hay evidencias que indiquen que diferencias en la composición de la carne afecten a la composición de la flora alterante (Gill y Newton, 1977). Conviene señalar que hasta temperaturas de almacenamiento cercanas a los 20°C, *Pseudomonas* sigue siendo el género que con mayor frecuencia se aísla de la carne.

A las pseudomonas les siguen, por orden de importancia, bacterias aerobias de los géneros *Moraxella* (especies sacarolíticas y no sacarolíticas), *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Aeromonas*. También se ha señalado la presencia de bacterias anaerobias facultativas como algunas enterobacterias, *Alteromonas putrefaciens* y *Brochothrix thermosphacta* y de algunas especies microaerófilas del género *Lactobacillus* (Sneath y Jones, 1976; McMeekin, 1982; Dainty y col., 1983).

Como ya se ha señalado, la contribución de cualquiera de los microorganismos mencionados a la alteración de la carne, viene determinada en gran medida por las condiciones de almacenamiento. En las carnes envasadas en películas permeables, es *Pseudomonas* el género predominante (Ayres, 1960; Asensio y col., 1988), aunque también se encuentran *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp., *B. thermosphacta* y una pequeña proporción de lactobacilos (Gardner y col., 1967; Roth y Clark, 1972). En la carne envasada en atmósferas modificadas (vacío, atmósferas enriquecidas con CO<sub>2</sub>, etc.) se inhibe el crecimiento de *Pseudomonas* y proliferan bacterias psicrotrofas microaerófilas y anaerobias facultativas como *Lactobacillus* sp. (Newton y Gill, 1978), algunas enterobacteriáceas y *B. thermosphacta* (Asensio y col., 1988). Si las condiciones de refrigeración no se mantienen, pueden crecer además de lactobacilos mesófilos, clostridios potencialmente patógenos (Ingram y Dainty, 1971; Gill y Newton, 1980). Por ello, en la carne envasada en atmósferas modificadas es necesario un control estricto de la temperatura de almacenamiento (Lambert y col., 1991).

Si bien las condiciones de almacenamiento desempeñan un papel primordial en la alteración de la carne, también hay que destacar la influencia que ejerce la carga inicial de microorganismos. Ayres (1960) demostró que en las carnes con una carga inicial de 65 ufc/cm<sup>2</sup> su vida útil se prolongaba hasta los 21 días a 0°C, mientras que si la carga inicial era de 6 × 10<sup>4</sup> ufc/cm<sup>2</sup>, la alteración se ponía de manifiesto a los 11 días.

## II.2.2. CAMBIOS QUIMICOS ASOCIADOS AL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA CARNE CRUDA REFRIGERADA

En la carne refrigerada la alteración se caracteriza por la aparición de olores anómalos, que se manifiestan a tasas bacterianas algo superiores a  $10^7$  ufc/cm<sup>2</sup> y por limosidad superficial, cuando la carga bacteriana se sitúa alrededor de  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> (Ayres, 1960; Ingram y Dainty, 1971). También se producen cambios en el color de la carne que se detectan cuando la población bacteriana alcanza valores de  $10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> (Bala y col., 1977).

El grado de alteración de la carne depende del tipo y número de microorganismos que predominan y de su capacidad para producir, a partir de sustratos como glucosa, ácido láctico o aminoácidos, compuestos odoríferos como SH<sub>2</sub>, aminas volátiles, ésteres, acetoína y NH<sub>4</sub> que afectan al pH de la carne (McMeekin, 1982). La tabla II.4 muestra los sustratos utilizados por los principales microorganismos alterantes de la carne refrigerada.

El comienzo de la alteración de la carne refrigerada en aerobiosis depende del metabolismo de las pseudomonas, que utilizan la glucosa como sustrato preferente. A medida que el número de microorganismos aumenta en la superficie de la carne, la concentración de sustrato disminuye originándose un gradiente de concentración de glucosa desde el interior del tejido muscular hasta la superficie (Gill, 1976). Cuando las pseudomonas llegan a una tasa de  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup>, la glucosa ya se ha agotado en la superficie de la carne y comienzan a degradar sustratos como los aminoácidos y el ácido láctico, produciendo sulfuros odoríferos, ésteres, ácidos y aminas (Gill, 1976; McMeekin, 1982). El gluconato y el 2-cetogluconato son productos intermediarios del metabolismo de la glucosa que también son degradados cuando ésta se agota (Farber y Idziac, 1982).

Entre las especies del género *Pseudomonas*, la que más frecuentemente se aísla de la carne es *Ps. fragi* (Molin y Ternström, 1982; Shaw y Latti, 1984, 1988), que es la principal responsable de la producción de etil y metil-ésteres de ácidos grasos de cadena corta, lo que se traduce en la aparición de un olor afrutado-dulce en la carne (Dainty y col., 1983). En una etapa posterior, la actividad conjunta de las distintas cepas de *Pseudomonas* da lugar a la formación de compuestos azufrados que confieren

Tabla II.4. Sustratos utilizados por los principales microorganismos alterantes de la carne refrigerada

Microorganismo	Sustratos utilizados para el crecimiento		Productos finales del metabolismo	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Pseudomonas</i>	Glucosa <sup>1</sup> Aminoácidos <sup>2</sup> Acido láctico <sup>3</sup>	—	Sulfuros Esteres, ácidos Aminas (putrescina)	—
<i>Acinetobacter/</i> <i>Moraxella</i>	Aminoácidos <sup>1</sup> Acido láctico <sup>2</sup>	—	Esteres, nitrilos Sulfuros	—
<i>Alteromonas</i> <i>putrefaciens</i>	Glucosa <sup>1</sup> Aminoácidos <sup>2</sup> Acido láctico <sup>3</sup>	Glucosa <sup>1</sup> Aminoácidos <sup>2</sup>	Sulfuros volátiles	SH <sub>2</sub>
<i>Brochothrix</i> <i>thermosphacta</i>	Glucosa <sup>1</sup> Aminoácidos <sup>2</sup> (solo glutamato)	Glucosa <sup>1</sup>  Acido isobutírico	Acido acético Acetoína Acido isovalérico	Acido láctico Acidos grasos volátiles
<i>Enterobacter</i>	Glucosa <sup>1</sup> Glucosa 6-fosfato <sup>2</sup> Aminoácidos <sup>3</sup> Acido láctico <sup>4</sup>	Glucosa <sup>1</sup> Glucosa 6-fosfato <sup>2</sup> Aminoácidos <sup>3</sup>		SH <sub>2</sub> Aminas
<i>Lactobacillus</i>	—	Glucosa <sup>1</sup> Aminoácidos <sup>2</sup>	— Acido láctico Acidos grasos volátiles	SH <sub>2</sub> , aminas

\* El número en superíndice indica el orden de utilización de cada sustrato.

Fuente: Lambert y col., (1991)

a la carne el olor pútrido (Dainty, 1989) característico de una fase de alteración avanzada (tasas de  $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup> y superiores). Las pseudomonas producen, además, diversos tipos de hidrocarburos (Dainty y col., 1984) y amoniaco (Gill, 1976), que es el responsable del aumento del pH que se observa corrientemente en la fase que sigue a la de agotamiento de la glucosa (Dainty, 1986). Las aminas producidas en mayor cantidad son cadaverina y putrescina, tanto en la carne de cerdo como en la de vacuno y ovino (Edwards y col., 1983). El aumento de la producción de putrescina se ha atribuído a las pseudomonas y el de cadaverina a las enterobacterias (Dainty, 1986).

El grupo *Moraxella/Acinetobacter* sigue en importancia a *Pseudomonas* sp. en la alteración de la carne refrigerada. Estos microorganismos utilizan principalmente aminoácidos cuya degradación no origina olores anormales. Además, pueden potenciar la actividad de *Pseudomonas* sp. y de *Alteromonas putrefaciens* al limitar o restringir la disponibilidad de oxígeno, lo que determina que las pseudomonas degraden los aminoácidos aún en presencia de glucosa utilizable (Gill y Newton, 1977).

*Alteromonas putrefaciens* no se ha detectado en carnes de pH normal (5,5); en aerobiosis utiliza los aminoácidos cisteína y serina produciendo sulfuros orgánicos volátiles (Gill y Newton, 1979) y en anaerobiosis rinde sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>). El sulfuro de hidrógeno reacciona con la mioglobina del músculo para formar la sulfomioglobina, que es el compuesto responsable del enverdecimiento de la carne alterada por esta bacteria. Si las condiciones existentes favorecen el crecimiento de *Alteromonas putrefaciens* (pH elevado y restricción en la disponibilidad de oxígeno), puede llegar a ser el microorganismo de mayor potencial alterativo de la carne.

*Brochothrix thermosphacta* utiliza la glucosa como fuente de energía. El metabolismo en aerobiosis de este carbohidrato origina ácido acético, acetoína, diacetilo y ácidos grasos volátiles (acético, iso-butírico, iso-valérico, etc.), responsables del olor "dulce" característico que se produce cuando este microorganismo crece en la carne de vacuno (Dainty y Hibbard, 1980; Stanley y col., 1981; Dainty y Hibbard, 1983). Si *B. thermosphacta* metaboliza la glucosa anaeróbicamente, el compuesto resultante mayoritario es el ácido láctico, si bien pueden formarse además pequeñas cantidades de otros ácidos

grasos volátiles (Davidson y col., 1968). Este microorganismo es el agente alterante más significativo de las carnes envasadas a vacío que contienen oxígeno residual.

En condiciones aeróbicas, las enterobacterias utilizan como sustratos glucosa y glucosa-6 fosfato. Algunas cepas pueden degradar los aminoácidos produciendo sulfuros volátiles como  $\text{SH}_2$  y aminas, que confieren a la carne olores anómalos (McMeekin, 1982).

Aunque el género *Lactobacillus* constituye una pequeña proporción de la flora alterante inicial de la carne refrigerada (Gardner y col., 1967), se convierte en predominante cuando disminuye la tensión de oxígeno (Pierson y col., 1970; Christopher y col., 1979 a, b). Los lactobacilos utilizan la glucosa generando ácido láctico y sólo cuando se agota este azúcar degradan los aminoácidos con formación de compuestos de olor a "rancio" o a "quesería" típicos de la carne envasada a vacío (Nakae y Elliott, 1965; Gill y Newton, 1977).

Se ha demostrado que los enzimas microbianos contribuyen a la degradación tisular. Sin embargo, no está clara su participación en la alteración de la carne, tal y como ha sido definida por la mayoría de los autores. La proteólisis bacteriana que tiene lugar durante la alteración no juega un papel importante en la generación de olores anómalos ni en la aparición de limo superficial, debido a que las proteínas de la carne sólo son atacadas en una fase avanzada del desarrollo microbiano, cuando ya se han agotado los constituyentes cárnicos más sencillos. Es decir, los enzimas proteolíticos no se producen hasta que la población de bacterias psicrotrofas alcanza el final de la fase logarítmica de crecimiento (tasas de  $10^8$ - $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup>), momento en el cual ya se detectan los signos característicos de la alteración (Ingram y Dainty, 1971). En relación con las lipasas microbianas, difícilmente pueden atribuírseles los cambios que afectan a la fracción lipídica, ya que son debidos a fenómenos autooxidativos y a la lipólisis por enzimas tisulares, como han visto ciertos investigadores durante la alteración de la carne (Gill, 1982; Dainty y col., 1983).

## **II.3. METODOS DE DETECCION E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS**

Las técnicas de detección e identificación de microorganismos han evolucionado notablemente en los últimos años debido a las exigencias de la industria alimentaria dada la necesidad de reducir costes y de obtener resultados más rápidos y fiables. Los métodos tradicionales de análisis microbiológico de los alimentos requieren varios días para la obtención de resultados; son laboriosos y, generalmente, poco reproducibles. Por ello, están siendo desplazados por otros métodos más rápidos y automatizados aplicables al análisis rutinario de los alimentos (Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991).

En esta sección se abordarán tanto los métodos convencionales como las técnicas rápidas utilizadas en la detección e identificación de microorganismos de los alimentos.

### **II.3.1. METODOS CONVENCIONALES DE ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LOS ALIMENTOS**

El número total de microorganismos viables de una muestra de alimento suele determinarse para estimar su vida útil, su estado higiénico y la pérdida de calidad organoléptica. Los cuatro métodos básicos que se utilizan para el "recuento total" de microorganismos en los alimentos son (Jay, 1992b):

1. Recuento estándar en placas (REP)
2. Método del número más probable (NMP)
3. Técnicas de reducción de colorantes
4. Recuento microscópico directo (RMD)

#### **II.3.1.1. RECUESTO ESTANDAR EN PLACAS (REP)**

El REP es una técnica utilizada por numerosos investigadores (Chesbro y col., 1979; Champagne y col., 1989; Zwietering y col., 1990) y se suele emplear como referencia para estimar la fiabilidad de otros métodos analíticos. Sin embargo, presenta varios inconvenientes como son su lentitud, la necesidad de manipulaciones múltiples y la laboriosidad que supone realizar

el recuento de colonias.

El recuento de microorganismos viables consiste en la enumeración de las colonias que se desarrollan en placas de agar nutritivo inoculadas con cantidades conocidas del alimento e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Ello conlleva la preparación de homogeneizados y diluciones.

La identificación de los microorganismos desarrollados requiere su posterior siembra en medios de cultivo sólidos, selectivos del microorganismo que se pretende investigar. El REP puede aplicarse al recuento de distintos microorganismos mediante la combinación de una amplia variedad de condiciones, como composición del medio de cultivo, gases de su entorno y tiempo y temperatura de incubación.

El método estándar para enumerar los microorganismos psicrotrofos de los alimentos consiste en incubar las placas sembradas durante 10 días a una temperatura de 7°C (Frank y col., 1985). Sin embargo, por el largo periodo de tiempo necesario para obtener resultados, su interés práctico es escaso en la industria alimentaria. Por ello, se han propuesto diversas alternativas basadas en el empleo de temperaturas más altas y tiempos de incubación más cortos. En el caso de la carne, las placas se incuban a 25°C durante 24 h (Greer, 1981) y en el de la leche, a 21°C durante 25 h (Oliveira y Parmelee, 1976) o a 18°C durante 45 h (Oehlich y McKellar, 1983). En estas condiciones de incubación se forman colonias visibles de microorganismos psicrotrofos, siendo las de los microorganismos mesófilos demasiado pequeñas para ser contadas. No obstante, los recuentos suelen ser más altos que los obtenidos con el método estándar, debido al crecimiento de algunas bacterias Gram-positivas no psicrotrofas (Punch y Olson, 1962). Para la enumeración de psicrotrofos en los alimentos, también se ha propuesto la incubación preliminar de las placas a 15°C durante 24 h, seguida de otra incubación a 7°C durante 3 días (Juffs, 1970). Asimismo, las placas pueden incubarse primero a 17°C durante 17 h y después a 7°C durante 3 días (Sogaard y Lund, 1981). Estas últimas variantes presentan una mejor correlación que las anteriores con el método estándar de recuento en placa (10 días/7°C).

Dado que la mayoría de las bacterias psicrotrofas son Gram-negativas,

en la enumeración de estas bacterias también se han utilizado medios de cultivo que contienen inhibidores selectivos de las bacterias Gram-positivas. De ellos, el más utilizado es el medio "CTV", que contiene cristal violeta y cloruro de tetrazolio, incubándose las placas a 30°C durante 48 h o a 22 °C durante 5 días. El principal inconveniente del empleo de estos inhibidores selectivos es que las condiciones de incubación utilizadas generalmente permiten el crecimiento de los microorganismos mesófilos (Thomas y Thomas, 1973).

#### II.3.1.2. METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

Este método fue introducido por McCrady en 1915. La muestra del alimento se prepara como en el caso del REP y, a continuación, tres diluciones seriadas del alimento se siembran en 9 ó 15 tubos de un medio adecuado (dependiendo de que se emplee el método de los 3 o de los 5 tubos, respectivamente). El número de microorganismos de la muestra original se determina mediante tablas estándar del NMP. Este método es de naturaleza estadística y generalmente su resultado es más alto que el obtenido con el REP. Aunque Woodward (1957) duda de la precisión y fiabilidad del método del NMP, entre sus ventajas destacaremos su simplicidad y su utilidad en la detección de microorganismos o grupos microbianos específicos mediante el empleo de medios selectivos.

#### II.3.1.3. METODO DE REDUCCION DE COLORANTES

El método de la reducción de colorantes se basa en los cambios de color que experimentan determinados compuestos en solución bajo la actividad reductora de algunos microorganismos. Para su realización, se añaden a las muestras de interés soluciones patrón de azul de metileno o de resazurina, cuya coloración cambia (vira), lo que se aprecia a simple vista (el azul de metileno vira de azul a blanco y la resazurina de azul apizarrado a rosa o blanco). El tiempo necesario para la reducción del colorante depende de la actividad enzimática bacteriana y está inversamente relacionado con el número de microorganismos presentes en la muestra.

Si bien la reducción de colorantes ha sido utilizada durante muchos años para evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda (Garvie y Rowlands,

1952), en la actualidad carece de valor, dado que la refrigeración de la leche antes de su procesado determina que no sea la flora láctica la más abundante, sino la flora psicrotrofa Gram-negativa, que no elabora reductasas (Cousin, 1982). De acuerdo con este método, un tiempo de reducción corto indicaría la presencia de un número elevado de bacterias lácticas, pero un tiempo de reducción largo no significa necesariamente que la leche tenga una buena calidad microbiológica, ya que puede tener una gran carga de bacterias psicrotrofas, que no son detectables con esta técnica.

En determinados alimentos como la carne cruda, uno de los problemas que presenta la utilización de esta técnica es la existencia de sustancias con capacidad reductora inherentes al propio alimento; su aplicación es más fiable en el caso de las carnes cocinadas (Austin y Thomas, 1972). No obstante, algunos autores han señalado que triturando con agua las muestras de carne fresca, la concentración de enzimas reductores en el sobrenadante es menor que si se utiliza un homogeneizado, ya que se provoca una menor destrucción tisular. El método de la reducción de colorantes detecta en la carne cruda niveles de microorganismos mayores de  $10^7$  ufc/g (Dodsworth y Kempton, 1977; Holley y col., 1977).

Esta técnica se ha utilizado para evaluar la calidad microbiológica de productos como la carne picada (Saffle y col., 1961), helados y gambas congeladas. Entre las ventajas que presenta destacan su simplicidad, rapidez y bajo coste, aunque la variación en la capacidad reductora de unos microorganismos a otros limita su utilización. No obstante, se está avanzando en la investigación de otros métodos de reducción de colorantes como el de la citocromo-c oxidasa, mucho más rápido y específico para la detección de microorganismos psicrotrofos en la leche cruda y pasteurizada (Kroll, 1985; Pishawikar y col., 1992).

#### II.3.1.4. RECUESTO MICROSCOPICO DIRECTO (RMD)

Esta técnica, desarrollada por Breed en 1916, se basa en el recuento de las bacterias con la ayuda de un microscopio. Consiste esencialmente en contar el número de células bacterianas contenidas en un volumen conocido, depositado en un área determinada de un portaobjetos. Para ello, las células se fijan por el calor y se tiñen con un colorante adecuado. Es un método rápido,

simple y ampliamente extendido para determinar los recuentos de suspensiones de células cuyo tamaño sea lo suficientemente grande para contarlas sin dificultad. Sin embargo, no conviene utilizarlo en el caso de microorganismos formadores de cadenas, como es el caso de las bacterias lácticas (García y col., 1991). Otras desventajas que limitan su utilización son la dificultad de diferenciar las células viables de las no viables, así como las células microbianas de las pequeñas partículas de alimento, lo cual origina recuentos invariablemente más altos que los recuentos estándar en placa (Jay, 1986). Por otro lado, la falta de sensibilidad y la fatiga del operario han favorecido poco su desarrollo hasta que se ha dispuesto de nuevas técnicas analíticas como la de la epifluorescencia directa (Barcina y col., 1989).

### **II.3.2. METODOS RAPIDOS DE DETECCION E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS**

Las técnicas microbiológicas utilizadas en el control de la calidad de los alimentos han variado en la última década (Jarvis, 1982; Dziezak, 1987). Los métodos convencionales están siendo superados debido a que las ventajas de su simplicidad y bajo coste no compensan sus principales desventajas: demora en la obtención de resultados y trabajo laborioso para obtenerlos (Barcina y col., 1989; Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991; Vasavada, 1993). Los métodos rápidos de análisis microbiológico que se abordan en este apartado se han clasificado en:

- 1.- Métodos basados en la automatización de las técnicas convencionales
- 2.- Métodos fisico-químicos
- 3.- Métodos inmunológicos
- 4.- Métodos genéticos

#### **II.3.2.1. AUTOMATIZACION DE LOS METODOS CONVENCIONALES**

El método tradicional de recuento por siembra en medio sólido, que suele ser el método de referencia para estimar la fiabilidad de otros métodos analíticos, presenta varios inconvenientes como son la lentitud, la necesidad de múltiples manipulaciones y la laboriosidad que supone realizar el recuento de colonias. Para solucionar algunos de estos inconvenientes, se han propuesto

diversas técnicas que permiten la automatización de los métodos tradicionales y cuyo fin es reducir el gasto de material, facilitar el manejo y aumentar el número de muestras a analizar. No obstante, estas técnicas no evitan la necesidad de incubar las placas durante periodos de tiempo más o menos largos (24-72 horas en el más favorable de los casos), no disminuyendo por ello el tiempo necesario para completar cada ensayo.

Actualmente existen en el mercado numerosos instrumentos que permiten una automatización del proceso. Quizás el más interesante sea el "Spiral Plate System", desarrollado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU. Este aparato consta de un dispensador que deposita de forma continua un volumen decreciente de líquido en la superficie de la placa de agar, la cual gira a una velocidad adecuada mientras el dispensador se mueve desde el centro hasta el extremo. Este dispensador diluye y siembra, presentando una buena correlación con el método de recuento en placa (Hedges y col., 1978; Kramer y col., 1979). Además, requiere mucho menos material que el método de siembra convencional, ya que se eliminan las diluciones seriadas, no requiere duplicación de las siembras y permite la automatización de las mismas.

Otro instrumento interesante es el "Colworth droplet", que diluye el inóculo en agar fundido atemperado y, posteriormente, produce microcolonias dentro de pequeñas gotitas de agar facilitando el recuento. Tiene poca correlación con el método estándar. Fung y col., (1980) han desarrollado el método de la "cinta adhesiva", que permite recoger directamente los microorganismos de las superficies de alimentos como la carne y sembrarlos en placa evitando las diluciones.

Un sistema ideado para realizar diluciones automatizadas es el "Gravimetric diluter" (Spiral System, Inc., Bethesda, MD). Los diluidores gravimétricos son aparatos que llevan conectado un repartidor de líquidos a una balanza, de manera que una vez pesada una cantidad de la muestra en una bolsa estéril, se deposita en la misma el volumen necesario de diluyente para obtener una dilución prefijada.

Los "preparadores automáticos de medios de cultivo" son sistemas que se componen de un autoclave conectado a un sistema de llenado y apilado

automático de placas de Petri.

Los "contadores automáticos de colonias" son aparatos que examinan la placa, detectando las diferencias en propiedades ópticas que presentan las colonias respecto del medio de cultivo.

Otras operaciones que requieren mucho tiempo y trabajo, como la preparación de medios y la tinción de bacterias, también se han automatizado. De los equipos diseñados para esta automatización, merece citarse el "Dynastainer". Se trata de un instrumento que realiza tinciones Gram, o de otro tipo, siete u ocho veces más rápidamente que cuando se realizan de forma manual (Fung, 1975).

#### II.3.2.2. METODOS FISICO-QUIMICOS

Generalmente se basan en la detección y amplificación de las modificaciones fisico-químicas del medio, como consecuencia del crecimiento activo de los microorganismos. Entre ellos destacan la impedimetría, microcalorimetría, turbidimetría o nefelometría, radiometría, epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT), bioluminiscencia o medida del ATP, la prueba del *Limulus* y el ensayo de la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular.

##### II.3.2.2.1. **Impedimetría**

Es una de las técnicas con un mayor potencial de aplicación en la detección de microorganismos en los alimentos (Firstenberg-Eden y Zindulis, 1984). Se basa en la detección de la actividad microbiana a través de la medida de la impedancia eléctrica. La impedancia es la resistencia al paso de una corriente alterna a través de un material conductor, como puede ser un medio de cultivo. Cuando los microorganismos crecen, metabolizan sustratos no iónicos de baja conductividad (proteínas, carbohidratos y grasas) convirtiéndolos en metabolitos iónicos de una conductividad mayor (ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos). Así, los cambios de impedancia debidos al acúmulo de metabolitos resultantes del crecimiento microbiano se pueden medir colocando el medio de cultivo en unos pocillos provistos de dos electrodos de acero inoxidable y aplicando a continuación una corriente

alterna. Este método permite detectar poblaciones bacterianas de  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml en 3-5 horas y de  $10^4$ - $10^5$  ufc/ml en 5-7 horas, presentando una buena correlación con el método de recuento en placa (Wood y col., 1977).

La impedimetría se ha utilizado con éxito para predecir la vida útil de la leche (Bishop y col., 1984), quesos (Bishop y White, 1985), hortalizas y alimentos congelados (Hardy y col., 1977). También se ha empleado en la industria cárnica, permitiendo la detección en las carnes refrigeradas de niveles de microorganismos iguales o superiores a  $10^7$  ufc/cm<sup>2</sup> en menos de 2 horas (Bulte y Reuter, 1984).

Los instrumentos utilizados para medir la impedancia son el "Bactometer" y el "Bactobridge" (Firstenberg-Eden, 1986). Entre las ventajas de este método destacan una detección rápida de microorganismos específicos cuando se utilizan medios de cultivo selectivos, el bajo coste de la prueba, la simplicidad en la preparación de las muestras, la rapidez y la posibilidad de informatización de los datos obtenidos (Easter, 1985; Firstenberg-Eden, 1986). En cuanto a sus inconvenientes, merecen citarse el elevado coste del instrumental y la baja relación sensibilidad/velocidad, ya que cuanto menores son los recuentos, mayor es el tiempo necesario para la obtención de resultados (Jarvis y Easter, 1987).

#### **II.3.2.2.2. Microcalorimetría**

Se basa en la medida de los pequeños cambios de calor resultantes de la actividad catabólica celular generada durante el crecimiento microbiano (Forrest, 1972). El calor se detecta y se transforma en señales eléctricas, que son amplificadas y medidas con un microcalorímetro de Calvet. La microcalorimetría se ha utilizado con éxito para el recuento de bacterias en la masa panaria (Martínez y Rodrigo, 1987) y en conservas (Sacks y Manefee, 1972). No obstante, el método no ha alcanzado una gran difusión debido a su elevado coste y a la imposibilidad de procesar un gran número de muestras. Gram y Sogaard (1985) sugieren que un estudio más avanzado de la técnica permitiría relacionar las lecturas de producción de calor, no sólo con los recuentos totales de colonias, sino también con la modificación de las propiedades sensoriales de los alimentos.

### II.3.2.2.3. Turbidimetría

La turbidimetría o nefelometría es el método más utilizado para evaluar el crecimiento de un cultivo microbiano. Se basa en la propiedad de las partículas de pequeño tamaño de refractar la luz incidente. Así, dentro de ciertos límites, existe una relación entre la cantidad de luz que atraviesa una suspensión celular y el número de microorganismos presentes en ella. La mayoría de colorímetros y espectrofotómetros utilizados para medir la turbidez de un cultivo efectúan las lecturas en forma de absorbancia, calculándose el crecimiento microbiano por el aumento de ésta con el tiempo. Sin embargo, cuando se alcanzan valores elevados de absorbancia la relación deja de ser lineal (García y col., 1991). Para efectuar medidas directas de suspensiones densas es preciso utilizar un nefelómetro, que mide directamente la luz difractada. Si no se dispone de este instrumento, conviene efectuar diluciones del cultivo para realizar las medidas dentro del intervalo de linealidad del aparato.

Uno de los inconvenientes de este método es que, si el medio de cultivo no permanece estable, no puede establecerse una relación con el crecimiento microbiano. Otra limitación del método viene dada por su sensibilidad, ya que no es capaz de detectar concentraciones de microorganismos inferiores a  $10^5$  ufc/ml. Además, solo es aplicable si la población se considera morfológicamente homogénea y uniformemente distribuída por el medio (Lambrecht y col., 1988).

La turbidimetría se ha utilizado para el recuento de bacterias en diversos alimentos como la leche cruda (Mattila y Alivehmas, 1987), carne picada, hamburguesas y salchichas (Jorgensen y Schulz, 1985; Mattila, 1987). No obstante, la aplicación de este método se ha visto limitada por la gran cantidad de partículas presentes en los alimentos y por la opacidad de las mismas. La comercialización de un turbidímetro (Bioscreen Analysis System; Labsystems, Helsinki, Finlandia) que contiene un sistema dispensador de diluciones y una placa agitadora provista de pocillos donde se incubaba la muestra, ha permitido establecer una relación más exacta entre los datos turbidimétricos y el crecimiento microbiano en las muestras de alimentos.

#### II.3.2.2.4. Radiometría

Este método se basa en la detección del dióxido de carbono procedente de la acción metabólica de los microorganismos en los hidratos de carbono (Fung, 1984; Martínez y Rodrigo, 1987). Los microorganismos se siembran en un medio de cultivo al que se incorpora un metabolito marcado con  $^{14}\text{C}$  y, a continuación, se procede a medir la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  liberado mediante un contador de centelleo. Para los microorganismos que utilizan la glucosa, ésta se emplea generalmente marcada con  $^{14}\text{C}$  y para los que no la metabolizan, se suele utilizar el  $^{14}\text{C}$ -formiato o el  $^{14}\text{C}$ -glutamato.

Levin y col., (1956) fueron los primeros en utilizar la radiometría en microbiología clínica, aunque posteriormente se ha aplicado a los alimentos y al agua. Este método se ha utilizado para investigar en la carne la presencia de algunas bacterias patógenas como *S. aureus*, *S. typhimurium* y esporos de *Cl. botulinum* (Previte, 1972, Lampi y col., 1974; Steward y col., 1980). Asimismo, se ha utilizado en la determinación de microorganismos viables en concentrado de zumo de naranja congelado (Hatcher y col., 1977), en vegetales cocidos (Rowley y col., 1977) y como test de esterilidad para alimentos UHT. Esta técnica puede utilizarse como orientación en los alimentos que contienen elevadas concentraciones de microorganismos y precisa de 5 a 6 horas para la obtención de resultados (Lampi y col., 1974). No obstante, su elevado coste y los problemas derivados del uso de compuestos radiactivos limitan su utilización.

#### II.3.2.2.5. Epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT)

Esta técnica se desarrolló como una alternativa al método de la reducción de colorantes para la determinación de la calidad bacteriológica de la leche, si bien ha sido aplicada posteriormente a otros alimentos. El método se basa en la filtración de la muestra de alimento a través de una membrana de policarbonato que retiene mohos, bacterias y levaduras. Los microorganismos retenidos en el filtro se tiñen con el colorante fluorescente naranja de acridina, con el fin de poderlos observar y contar mediante un microscopio de fluorescencia (Pettipher, 1986). Las preparaciones, una vez teñidas, se mantienen estables durante aproximadamente un mes, permitiendo su análisis en instalaciones centrales mejor equipadas que un laboratorio microbiológico.

La DEFT es un método de detección de microorganismos rápido y sensible, con un límite de detección de  $10^3$  ufc/ml o  $\text{cm}^2$  (Pettipher y col., 1980; Pettipher y Rodríguez, 1982; Shaw y col., 1987). Además, la correlación del método DEFT con el de recuento en placa es bastante alta, llegándose a obtener en alimentos como la leche cruda coeficientes de correlación comprendidos entre 0,86 y 0,96 en el intervalo entre  $10^4$  y  $10^7$  ufc/ml (Pettipher y Rodríguez, 1982). No obstante, es una técnica cara para ser utilizada con fines rutinarios (Easter y col., 1987).

La DEFT se utilizó originalmente para determinar la calidad microbiológica de las aguas (Hobbie y col., 1977; Zimmermann y col., 1978). Sin embargo, al aplicarse por primera vez a la leche cruda (Pettipher y col., 1980), los glóbulos grasos, las células somáticas y los agregados proteicos obstruían los poros de las membranas, siendo necesario un pretratamiento enzimático de la leche con tripsina y la adición de agentes tensoactivos como el tritón X-100 (Wood y Gibbs, 1982). La utilización de detergentes y enzimas ha permitido la filtración de diversos productos lácteos como la mantequilla, crema, leche pasteurizada y leche UHT. Con el fin de paliar los inconvenientes de la baja repetitividad y de la dificultad de los recuentos debidos a las partículas de alimento retenidas en el filtro, se han desarrollado una serie de prefiltros de tamaños de poro variables que han permitido que un gran número de productos como la harina, la carne congelada y las hortalizas puedan ser analizados mediante esta técnica. (Pettipher y Rodríguez, 1982). La DEFT también se ha aplicado en alimentos irradiados (Betts y col., 1988), en la enumeración selectiva de bacterias en alimentos (Rodríguez y Kroll, 1988) y en el análisis bacteriológico de aguas en la industria farmacéutica (Newby, 1991).

En los alimentos tratados por calor, hay que tener en cuenta que algunas células no viables pueden producir fluorescencia y dar lugar en los recuentos a falsos positivos (Easter, 1985). No obstante, aunque no es una característica constante de la DEFT, las células viables suelen originar fluorescencia roja mientras que las no viables emiten un color verde.

Recientemente se han desarrollado equipos para el filtrado y la tinción que, junto con la introducción de los analizadores computerizados de imágenes, permiten el análisis de un mayor número de muestras y eliminan el

trabajo tedioso que supone al operario el efectuar los recuentos al microscopio. Sin embargo, la utilización de un analizador de imagen eleva el coste de la prueba, permitiendo únicamente una semiautomatización del método, ya que no evita determinadas operaciones manuales (Pettipher, 1986). Recientemente, una compañía francesa ha comercializado un instrumento (COBRA) que automatiza las fases de filtración, tinción, secado y recuento del DEFT. Este aparato se ha utilizado para la enumeración rápida de bacterias en cultivos puros, leche cruda, carne y pescado, obteniéndose coeficientes de correlación con el método estándar de recuento en placa de 0,99 (cultivos puros), 0,81 (leche cruda) y 0,91 (carne y pescado). El sistema es muy sencillo y un solo operador puede procesar alrededor de 100 muestras en menos de una hora (Pettipher y col., 1992).

#### **II.3.2.2.6. Bioluminiscencia o medida del ATP**

Esta técnica se basa en la visualización de reacciones enzimáticas que cursan con emisión de luz (Quesneau, 1983) y que tienen lugar en determinados seres vivos como las luciérnagas y algunos microorganismos marinos. Actualmente se están utilizando reacciones luminiscentes en el control de la calidad bacteriológica de los alimentos mediante el empleo de la luciferasa, enzima presente en la cola de la luciérnagas. Este enzima, en presencia de dos sustratos, luciferina y adenosín-trifosfato (ATP), cataliza una reacción bioluminiscente en la cual la luciferina se oxida provocando la emisión de una luz azul verdosa medible espectrofotométricamente a 560 nm (Wood y Gibbs, 1982). Así, conociendo la cantidad de ATP presente en las células bacterianas, se puede estimar el número de microorganismos existentes en la muestra.

Sharpe y col., (1970) fueron los primeros en emplear esta técnica en el análisis microbiológico de los alimentos. Estos y otros investigadores señalaron que su principal inconveniente se debía a la presencia de ATP no microbiano en los alimentos (Sharpe y col., 1970; Starker, 1984). Actualmente, este problema se ha intentado paliar por dos vías: 1) separando los microorganismos del alimento empleando métodos físicos como la filtración y 2) extrayendo y destruyendo selectivamente el ATP no microbiano mediante la adición de surfactantes y enzimas (Wood y Gibbs, 1982; Payne y Kroll, 1991). Al aplicar conjuntamente un tratamiento de

filtración diferencial y una destrucción enzimática del ATP no microbiano, Spurgash y col., (1985) observaron una alta correlación ( $r = 0,96$ ) entre el ATP y los recuentos en placa de muestras de carne de vacuno en el intervalo comprendido entre  $5 \times 10^4$  y  $2 \times 10^8$  ufc/g.

En la leche cruda, la medida del ATP permite la estimación de concentraciones bacterianas superiores a  $10^5$  ufc/ml. Sin embargo, para niveles inferiores de microorganismos, la presencia residual de ATP micelar no destruido por el tratamiento enzimático puede interferir en la detección del ATP bacteriano. Además, la presencia de *Ps. fluorescens* y otras especies psicrotrofas en la leche cruda mantenida a temperaturas de refrigeración, puede también proporcionar resultados falsos al medir el ATP bacteriano debido a la gran actividad ATPásica que poseen estas bacterias. No obstante, se ha señalado que la probabilidad de que la actividad ATPásica de la flora psicrotrofa interfiera en la determinación del ATP de la leche sólo es significativa cuando la concentración de psicrotrofos alcanza un valor de  $10^8$  ufc/ml, en cuyo caso las propias alteraciones organolépticas de la leche la hacen inadecuada para su procesamiento (Bothe y col., 1986). También pueden presentar problemas aquellas muestras de leche con un elevado número de células somáticas ( $> 10^5$ /ml), las cuales producen suficiente ATPasa para hidrolizar el ATP extraído, provocando interferencias en la detección del ATP bacteriano (Stannard, 1989).

La bioluminiscencia se ha utilizado para determinar la vida útil y la calidad bacteriológica de muchos alimentos (Stannard y Gibbs, 1986; Kricka, 1988). En la actualidad se comercializan "kits" que contienen todos los reactivos necesarios para su utilización en alimentos como la leche, cremas, carnes, alimentos preparados y bebidas.

La bioluminiscencia es probablemente la técnica más rápida y eficaz para evaluar el contenido total de microorganismos de un alimento (Wood y Gibbs, 1982), ya que proporciona los resultados en 10-20 minutos con un límite de detección de alrededor de  $10^5$  ufc/ml ó g. A pesar de su simplicidad y rapidez (Baker y col., 1992), presenta algunos inconvenientes como son la compleja preparación de las muestras, el elevado coste y la inespecificidad (Martínez y Rodrigo, 1987). Su aplicación al análisis de los alimentos es más restringida que el método DEFT y, por lo general, su correlación con los métodos de

referencia es menor (Barcina y col., 1989).

El gran avance experimentado por las técnicas de ingeniería genética ha permitido incorporar los genes responsables de la luminiscencia (genes "*lux*"), vía bacteriófagos, a los microorganismos no luminiscentes, lo que ha mejorado tanto la especificidad de la técnica de identificación de bacterias de los alimentos como la correlación con los recuentos bacterianos (Baker y col., 1992; Griffiths, 1993).

#### II.3.2.2.7. Prueba del *Limulus*

La prueba del *Limulus* se basa en la capacidad que posee una endotoxina de naturaleza lipopolisacárida de la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Westphal, 1975) de provocar la coagulación de un lisado de amebocitos procedentes del plasma del cangrejo americano (*Limulus polyphoemus*). El lipopolisacárido que compone la endotoxina (Lípido A), junto con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  de la pared celular bacteriana, provoca la activación de un enzima procoagulante (coagulina) semejante a la tripsina, que al reaccionar con una proteína del lisado de amebocitos origina la formación de un gel (Young y col., 1972).

La endotoxina lipopolisacárida sólo existe en las bacterias Gram-negativas y en cantidades relativamente constantes. Es termoestable y se libera al medio cuando las bacterias mueren, aunque en ciertas condiciones puede liberarse de las células bacterianas viables (Hansen y col., 1982). La termorresistencia de la endotoxina proporciona a la prueba del *Limulus* la capacidad de detectar bacterias psicrotrofas presentes en alimentos como la leche cruda (Südi, 1982).

La prueba se realiza añadiendo alícuotas de un homogenizado del alimento a pequeñas cantidades de un preparado de lisado de *Limulus*, incubando a continuación a 37°C durante 1 hora. La presencia de endotoxinas produce la gelificación del material lisado, lo que indica la presencia de bacterias Gram-negativas en la muestra. Por el contrario, si no se forma gel es que, o no existen bacterias Gram-negativas o están presentes en tasas bajas. El título de bacterias se considera como el inverso de la dilución más alta de muestra que produce la gelificación del lisado. Si se requiere una mayor

precisión en el resultado, la turbidez originada como consecuencia de la reacción del lisado con la endotoxina puede medirse espectrofotométricamente a 360 nm (Bishop y White, 1986).

Esta técnica se aplicó por primera vez a la carne picada (Jay, 1977), observándose que los títulos de endotoxina aumentaban proporcionalmente a los recuentos de bacterias Gram-negativas viables (Jay y col., 1979; Jay, 1981). Diversos investigadores afirman que la prueba del *Limulus* constituye un método sensible, rápido y eficaz para medir la cantidad de endotoxina en la leche cruda y pasteurizada y, en consecuencia, un buen procedimiento para determinar los antecedentes de un producto lácteo respecto de su recuento de bacterias psicrotrofas Gram-negativas (Hansen y col., 1982; Mikolajcik y Brucker, 1983).

Aunque la prueba del *Limulus* detecta concentraciones pequeñas de microorganismos ( $10^2$  ufc/ml ó g), su precisión y fiabilidad mejoran considerablemente a partir de tasas de  $10^4$  ufc/ml ó g (1 ng de endotoxina) (Mikolajcik, 1983). Este método proporciona los resultados en menos de 1,5 horas y presenta una buena correlación con los recuentos bacterianos en placa (Südi y col., 1981).

Una modificación de la prueba del *Limulus* es el método cromogénico (Iwanaga y col., 1978), que se ha utilizado para estimar la calidad microbiológica de la leche (Mottar, 1988). Al poner en contacto la leche con el lisado de amebocitos se añade también un sustrato cromogénico (arginina-p-nitroanilida), desarrollándose un color amarillo como consecuencia de la liberación de p-nitroanilina debida a la hidrólisis del sustrato. La p-nitroanilina liberada puede medirse espectrofotométricamente a 405 nm, reflejando la cantidad de endotoxina presente y, por lo tanto, la tasa de bacterias Gram-negativas. Si bien el límite de detección ( $10^3$ - $10^4$  ufc/ml) es similar, el ensayo cromogénico proporciona lecturas más precisas, reproducibles y cuantificables, así como resultados más rápidos (Svensson y Hann-Hagerdahl, 1987).

Tanto la prueba del *Limulus* como la modificación cromogénica requieren el mismo volumen de lisado de amebocitos y presentan el inconveniente de un coste excesivo. Por ello, se han desarrollado

micrométodos que reducen significativamente la cantidad de lisado necesaria y detectan concentraciones bacterianas a partir de  $10^3$ - $10^4$  ufc/ml con una elevada correlación con los recuentos bacterianos (Prior y Spagna, 1979; Gordi y Aspargaus, 1980; Südi y col., 1981; Melvaar y Fystro, 1982; May y col., 1989).

Recientemente, se ha comercializado un aparato denominado Toxinómetro ET-201 (Wako Chemical Industries Ltd., Amagasaki, Japón) que mide automáticamente el cambio de turbidez que se produce en el medio como consecuencia de la actividad de la endotoxina en el lisado de *Limulus*. Mottar y col., (1993) han evaluado la utilidad del Toxinómetro para el análisis rutinario de la leche en relación con su contenido de bacterias Gram-negativas, obteniendo un límite de detección de  $10^3$  ufc/ml con una mayor rapidez y repetitividad que el método cromogénico descrito.

#### **II.3.2.2.8. Prueba de la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular**

Se basa en la existencia en la pared celular de las bacterias Gram-negativas de un enzima con actividad aminopeptidásica (Lazdunski y col., 1975). Este enzima actúa sobre los péptidos, pero también lo hace sobre sustratos cromogénicos (pseudopéptidos) como la L-alanina-p-nitroanilida, L-lisina-p-nitroanilida, L-leucina-p-nitroanilida, etc, liberando el aminoácido correspondiente y la p-nitroanilina, un compuesto de color amarillo.

En un principio, la actividad aminopeptidásica se utilizó para diferenciar las bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas, observándose que al adicionar el sustrato a un cultivo en superficie de una placa de recuento, las bacterias Gram-negativas adquirirían un color amarillo debido a la actividad aminopeptidásica, mientras que las Gram-positivas no presentaban esta coloración por carecer de dicha actividad (Cerny, 1976).

Esta prueba ha sido utilizada por Pérez de Castro y col., (1988; 1989) y, posteriormente, perfeccionada por Alvarado y col., (1992) para la estimación de la calidad microbiológica de la carne fresca y de la leche cruda refrigeradas. Se basa en la detección de la actividad aminopeptidásica de las

bacterias psicrotrofas Gram-negativas, lo que se realiza determinando espectrofotométricamente a 390 nm la p-nitroanilina, compuesto de color amarillo liberado en la hidrólisis de un sustrato incoloro como la L-alanina-p-nitroanilida. El límite de detección es del orden de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup> en el caso de la carne y de  $5 \times 10^5$  ufc/ml en la leche; presenta una gran correlación con el método tradicional de recuento en placa y los resultados se obtienen en sólo 2,5 - 3 horas. Aunque, como hemos dicho, la tasa de p-nitroanilina se determina espectrofotométricamente a 390 nm, si su concentración es elevada se detecta a simple vista. Por lo tanto, este método permite diferenciar las muestras de buena calidad microbiológica (tasas de bacterias  $< 10^5$  ufc/cm<sup>2</sup> para la carne y  $< 5 \times 10^5$  ufc/ml para la leche) de las de baja calidad microbiológica (tasas de bacterias  $> 10^5$  ufc/cm<sup>2</sup> para la carne y  $> 5 \times 10^5$  ufc/ml para la leche) mediante la simple visualización del color amarillo desarrollado.

La prueba descrita es rápida, sencilla y económica. Su principal inconveniente para estimar la calidad microbiológica de la leche radica en que pierde sensibilidad debido a que es poco eficaz la recuperación de los microorganismos de las muestras. En el caso de la carne, una centrifugación a 2000 x g es suficiente para sedimentar el 99,9 % de los microorganismos previamente suspendidos en un medio líquido. Sin embargo, para arrastrar los microorganismos de una muestra de leche debe aplicarse una fuerza centrífuga mucho mayor (13.000 x g), ya que en el sedimento sólo se recuperan entre el 70 y el 80% de las bacterias psicrotrofas presentes, que son las que participarán en la reacción enzimática durante desarrollo de la prueba (Pérez de Castro y col., 1988; Pérez de Castro, 1989).

#### II.3.2.3. TECNICAS INMUNOLOGICAS

La investigación y desarrollo de las técnicas inmunológicas como técnicas analíticas comenzó hace aproximadamente 30 años, empleándose sobre todo en microbiología clínica. Su aplicación a los alimentos para la detección de constituyentes naturales, de plaguicidas, residuos, microorganismos etc, está adquiriendo cada día más auge debido a las ventajas que poseen frente a los métodos convencionales. Su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, las hacen especialmente útiles para la detección y cuantificación de los microorganismos de los alimentos. Además, la

disponibilidad de "kits" comerciales ahorra tiempo y trabajo y elimina la necesidad de analizar las muestras en laboratorios sofisticados (Allen, 1990; Samarajeewa y col., 1991). Las técnicas inmunológicas se diferencian de otras técnicas analíticas en que su "tecnología" reside en las moléculas (anticuerpos) y no en equipos instrumentales complejos.

Entre los métodos inmunológicos que con mayor éxito se han aplicado al análisis microbiológico de los alimentos destacan: la aglutinación, la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo (RIA) y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) (Candlish, 1991).

#### **II.3.2.3.1. Aglutinación**

La aglutinación es una técnica inmunológica basada en la detección de microorganismos mediante la utilización de inmunosueros específicos. Los anticuerpos se unen a los antígenos de la superficie de las bacterias formando una red que se pone de manifiesto por la precipitación de los microorganismos. Aunque la técnica se ha utilizado en la detección de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *S. aureus* y otros microorganismos, se considera inespecífica, ya que puede dar reacciones cruzadas con microorganismos afines. Una variante de esta técnica, empleada en estudios epidemiológicos y en la identificación de microorganismos patógenos aislados de alimentos, consiste en la utilización de partículas de látex unidas a los anticuerpos (Rose y Stringer, 1989).

#### **II.3.2.3.2. Inmunofluorescencia**

Se basa en la detección de los microorganismos mediante la utilización de anticuerpos marcados con fluoresceína. Para la visualización de esta reacción de antígeno-anticuerpo se emplea un microscopio de fluorescencia. Esta técnica se ha utilizado para la detección de bacterias patógenas como *Salmonella* sp. y su límite de detección es de  $10^5$  ufc/ml. Algunos de los inconvenientes de su empleo son la existencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos, la necesidad de disponer de personal cualificado y el trabajo tedioso asociado al exámen microscópico (Cox y col., 1987).

### II.3.2.3.3. Radioinmunoensayo (RIA)

Se basa en la utilización de antígenos marcados con isótopos radiactivos que compiten por su unión a los anticuerpos con los antígenos de la muestra problema (Van Vunakis, 1980). La concentración de antígeno unida a los anticuerpos se cuantifica en un contador de radiactividad. La separación de los complejos antígeno-anticuerpo se realiza por precipitación con sulfato amónico o polietilén-glicol, cromatografía líquida, placas de poliestireno, etc. Esta técnica se ha utilizado en la detección en productos lácteos, cárnicos y mariscos de las enterotoxinas A y B de *S. aureus* (Johnson y col., 1972; Collins y col., 1972) y también en la detección de algunas micotoxinas, como la aflatoxina M<sub>1</sub> y la ocratoxina A (Pestka y col., 1981). Los problemas derivados del uso de compuestos radiactivos, así como el elevado coste y la complejidad de la técnica, han limitado su utilización (Wolcott, 1991).

### II.3.2.3.4. Métodos inmunoenzimáticos (ELISA)

Los métodos inmunoenzimáticos ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) son, sin duda, los más empleados en la detección de microorganismos y toxinas de los alimentos. Se basan en la fijación del antígeno o anticuerpo en un soporte sólido y en la visualización objetiva de la interacción antígeno-anticuerpo mediante la conjugación de uno de los componentes de la reacción con un enzima. Para la fijación del antígeno o anticuerpo se utilizan placas de poliestireno, polivinilo, propileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y una separación más eficaz de los compuestos libres (Clark y Engval, 1980). Por lo que se refiere al enzima utilizado en la conjugación, es conveniente que esté purificado, que sea fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente cuantificable. Los enzimas más utilizados para este fin son la peroxidasa de rábano, la  $\beta$ -galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina (Voller y col., 1986)

La elección del sustrato del enzima es también importante en las técnicas de ELISA. El sustrato debe ser estable y soluble antes y después de su degradación. El enzima peroxidasa de rábano, uno de los más empleados, utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno y como donantes de hidrógeno la *o*-fenildiamina (OPD), el ácido 2,2'-azino-di (3-etil-benzotiazolina) sulfónico (ABTS), el ácido 5-aminosalicílico y la 3,3',

5,5'-tetrametilbenzidina. En el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, el sustrato más utilizado es el *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (O-NPG) y para la fosfatasa alcalina el *p*-nitrofenil (P-NPP) (Tijssen, 1985). Los donantes de hidrógeno, al oxidarse en presencia del sustrato, originan compuestos coloreados cuantificables espectrofotométricamente.

Los métodos inmunoenzimáticos permiten el diseño de diversas variantes metodológicas. De ellas, las más utilizadas son el ELISA indirecto, el competitivo y el sandwich.

En la técnica del ELISA indirecto (Fig. II.1), el antígeno se fija por adsorción pasiva a una superficie inerte (1); a continuación se adicionan los anticuerpos específicos, que reconocen al antígeno (2) y se unen a él formando un complejo que se detecta mediante la incorporación de un segundo anticuerpo marcado con un enzima (3). La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato (4), libera un compuesto coloreado.

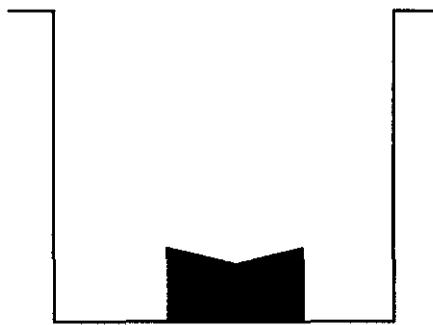
En la técnica del ELISA competitivo (Fig. II.2), el anticuerpo o antígeno específico se fija a una superficie inerte (1) y, a continuación, se añade un conjugado de enzima-antígeno o enzima-anticuerpo (2a) de concentración conocida, mezclado con la muestra problema. Utilizando como control otro pocillo carente de muestra (2b), y después de adicionado el sustrato (3a y 3b), se observa la diferencia de color entre ambos pocillos, que es indicativa de la concentración de antígeno de la muestra problema.

En la técnica del ELISA sandwich (Fig. II.3), el anticuerpo específico (anticuerpo de captura) se fija a una fase sólida (1) y a continuación se añade el antígeno problema, el cual es capturado por el anticuerpo fijado (2). El complejo anticuerpo-antígeno se detecta generalmente con el mismo anticuerpo marcado con un enzima (3) (anticuerpo de detección). Finalmente se añade el sustrato (4) y el compuesto coloreado, originado como consecuencia de la acción enzimática, permite visualizar la reacción.

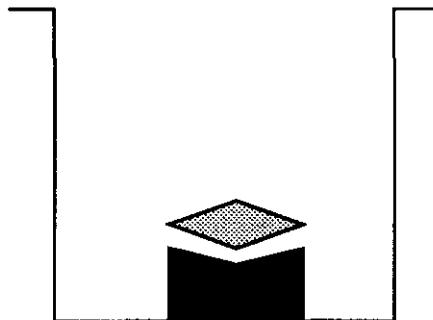
En los últimos años, se ha comprobado que el complejo avidina-biotina es un mediador muy útil y versátil en una gran variedad de aplicaciones analíticas, incluidas las técnicas inmunoenzimáticas (Wilchek y Bayer, 1988). El hecho de que en poco tiempo se haya generalizado su uso en campos muy

diversos se debe a la elevadísima afinidad ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) de la avidina por la biotina y a la gran estabilidad de esta interacción no covalente. Las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA) se pueden amplificar utilizando las propiedades del complejo avidina-biotina. En el caso del ELISA indirecto (Fig. II.4), después de fijar el antígeno a una superficie sólida (1), se añaden los anticuerpos específicos de la reacción conjugados con la biotina (2) y, a continuación, el complejo antígeno-anticuerpo se detecta adicionando un conjugado de avidina-enzima (3), en lugar de las anti-inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo unido al enzima. La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato (4), libera un compuesto coloreado.

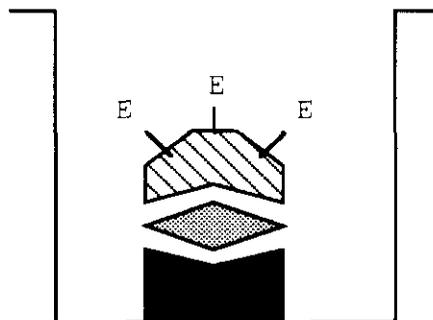
Las técnicas inmunoenzimáticas presentan múltiples ventajas en el análisis microbiológico de los alimentos debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez. Además son baratas y permiten analizar en poco tiempo un gran número de muestras, lo que las convierte en muy útiles para su utilización rutinaria en la industria alimentaria. Estas técnicas se han utilizado con éxito en la detección y cuantificación en diversos alimentos de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp. (D'Aoust y Sewell, 1988; Wyatt y col., 1990), *Shigella* sp. (Islam y Stimson, 1987), *Escherichia coli* enterotoxigénico (Shah y Rhea, 1986), *Campylobacter jejuni* (Annan-prah y Janc, 1988), *Staphylococcus aureus* (Peterkin y Sharpe, 1984; Mirhabibollahi y col., 1990), *Yersinia enterocolítica* (Slavchev y Zlatka, 1989), *Listeria monocytogenes* (Mattingly y col., 1988) y *Aeromonas hydrophila* (Merino y col., 1993), así como de diversos mohos y toxinas bacterianas, detectando niveles de microorganismos del orden de  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml o g (Candlish, 1991).



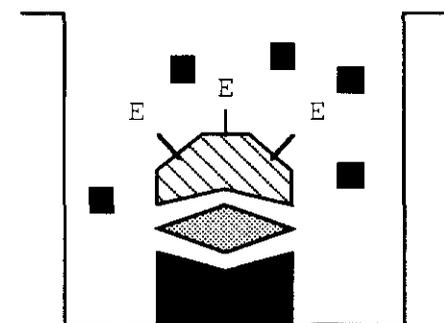
1.- Antígeno adsorbido al pocillo



2.- Anticuerpos específicos que reconocen al antígeno



3.- Antiinmunoglobulinas conjugadas a un enzima y que reconocen el complejo antígeno-anticuerpo



4.- Adición del sustrato enzimático

*Fig. II.1.* Esquema de la técnica del ELISA indirecto

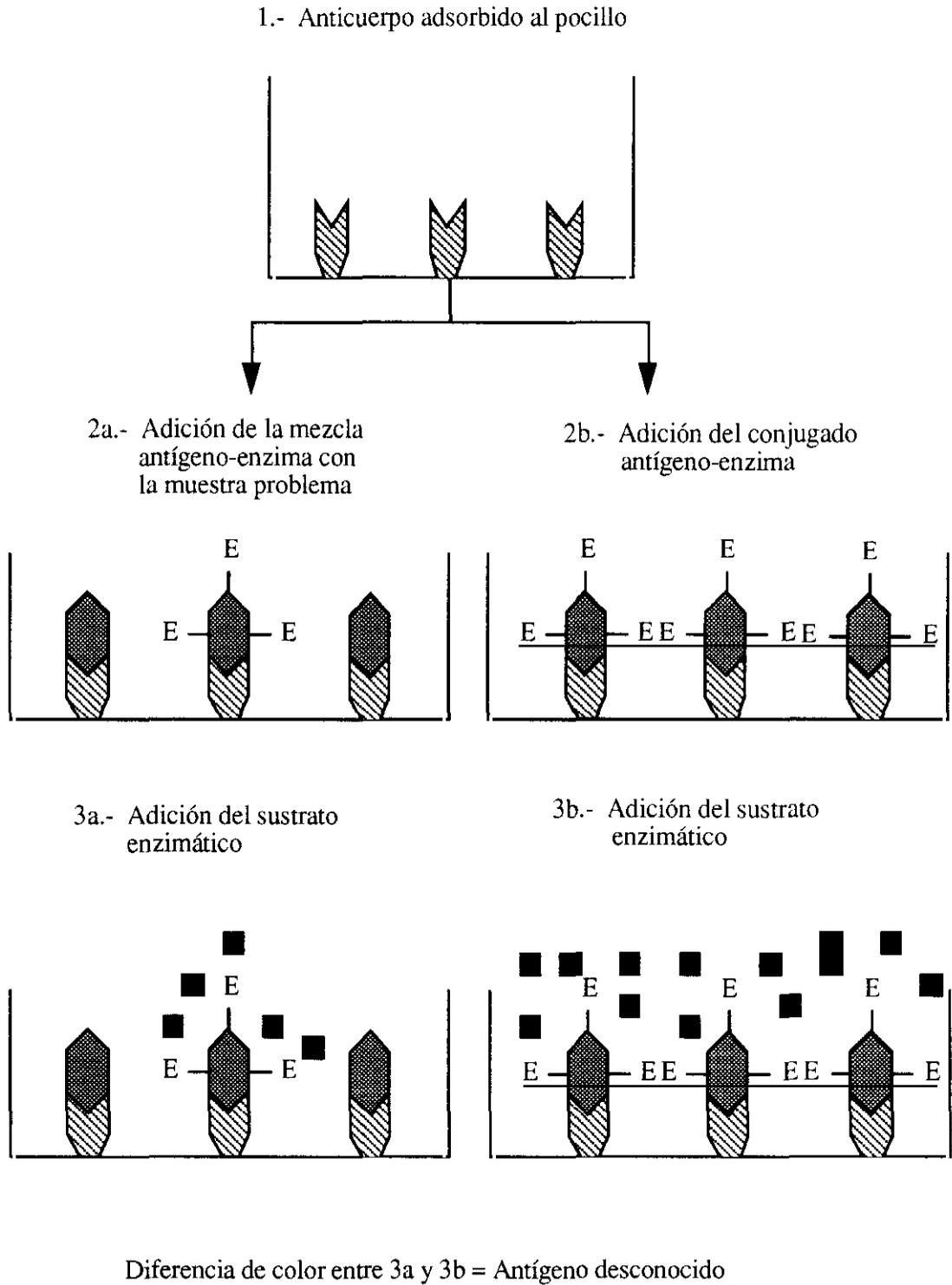


Fig II.2. Esquema de la técnica del ELISA competitivo

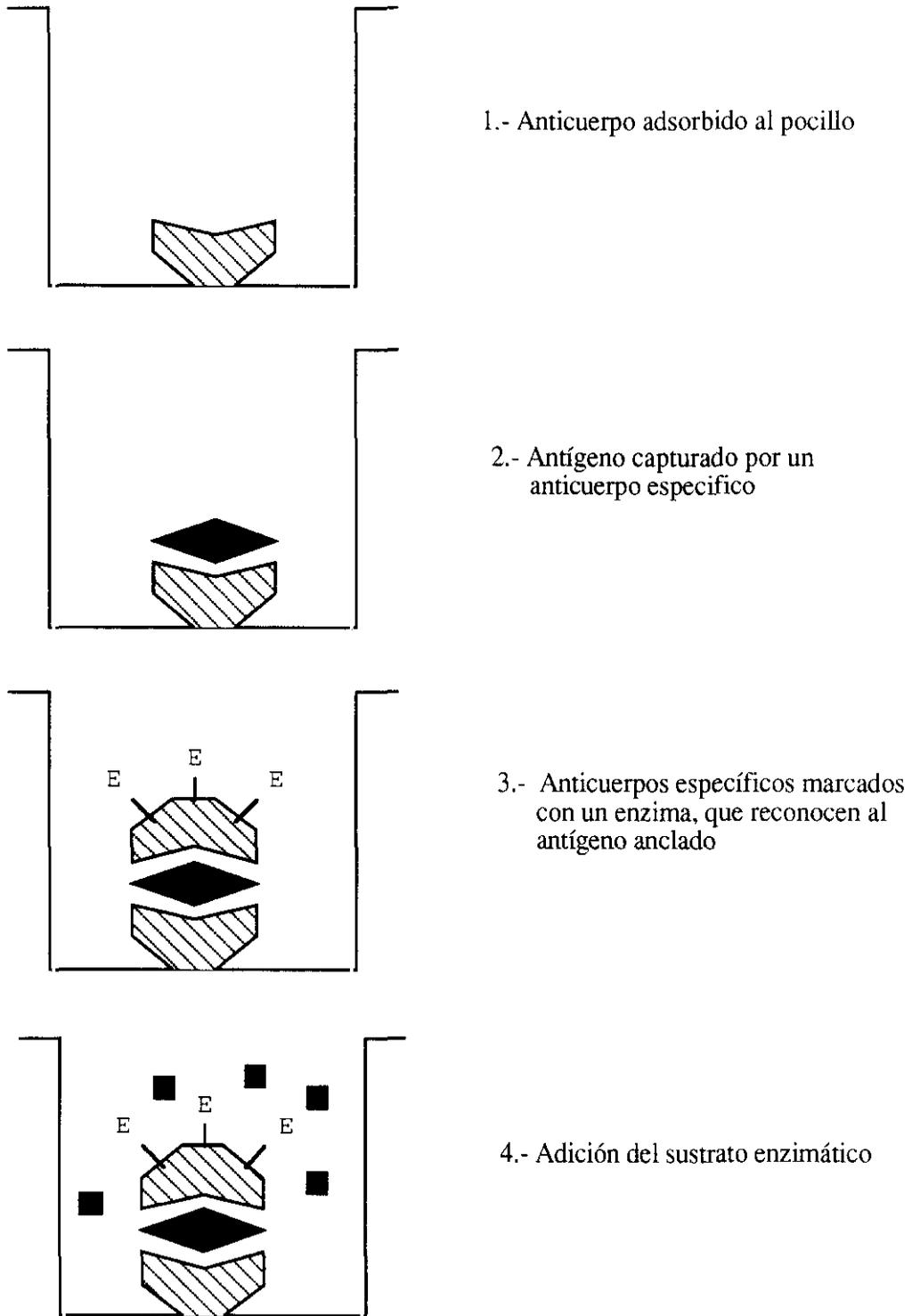


Fig. II.3. Esquema de la técnica del ELISA sandwich

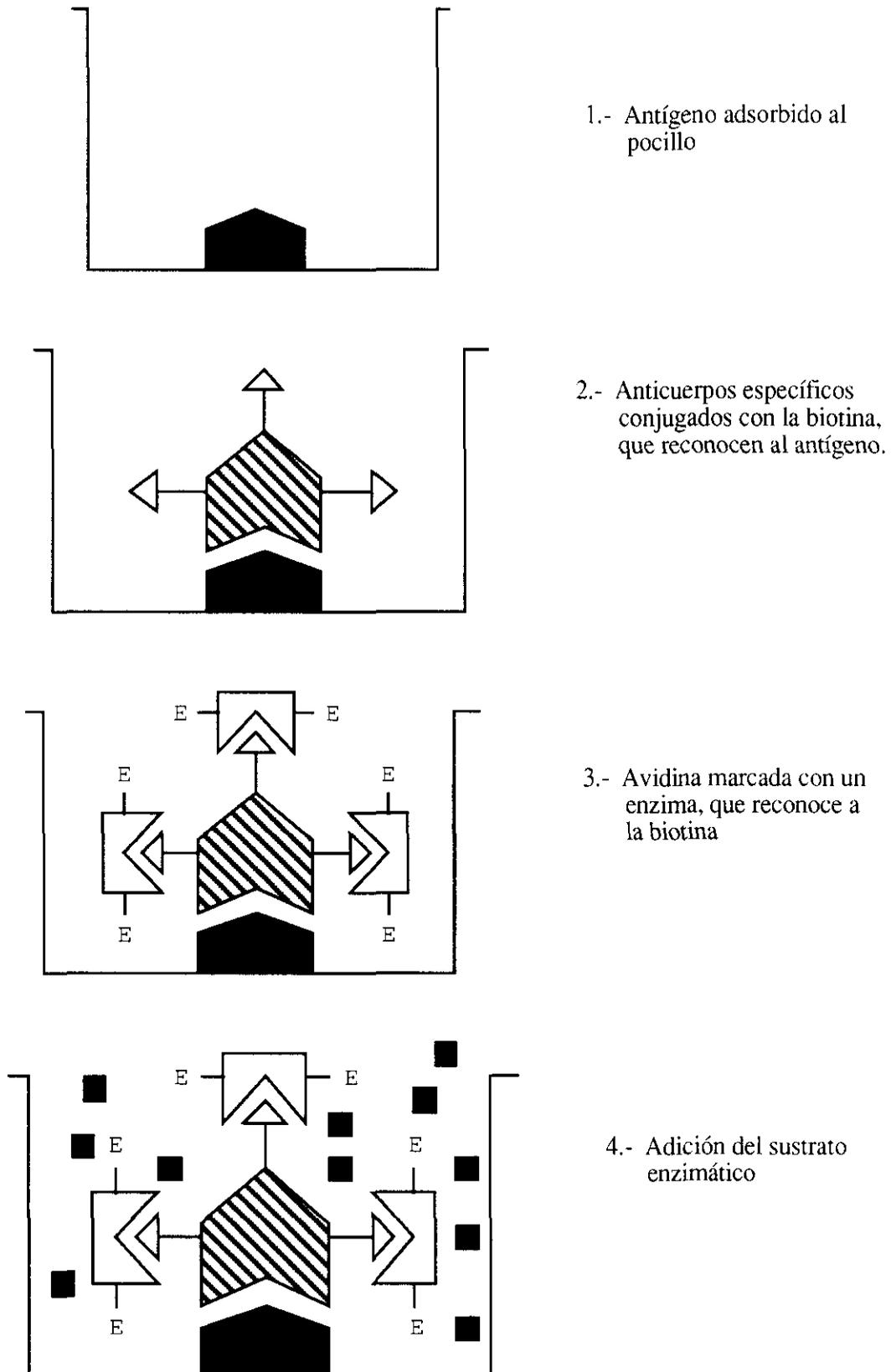


Fig. II.4. Esquema de la técnica del ELISA indirecto, utilizando anticuerpos

#### II.3.2.4. METODOS GENETICOS

Incluyen diversas técnicas basadas en la identificación de fragmentos de ADN cromosómico o plasmídico. Los métodos genéticos, aunque resultan caros para ser utilizados con fines analíticos rutinarios, proporcionan datos específicos y útiles para detectar en los alimentos la presencia de algunos microorganismos patógenos (Earnshaw y Gidley, 1992).

##### II.3.2.4.1. Perfil plasmídico

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN, distintas del ADN cromosómico, que se replican autónomamente. La tipificación e identificación de algunas bacterias atendiendo a su perfil plasmídico se realiza mediante la extracción de los plásmidos de las células y su caracterización posterior por electroforesis en geles de agarosa. En las bacterias Gram-positivas, el ADN plasmídico se extrae mediante un proceso de lisis con SDS (dodecil sulfato sódico) que sigue a un tratamiento con lisozima u otros enzimas que digieren la pared celular. Las bacterias Gram-negativas son más difíciles de lisar y, antes de la digestión de su pared con lisozima, necesitan un tratamiento con EDTA (ácido etilén-diamín-tetraacético) para romperla. No obstante, son muchos los métodos de extracción y aislamiento del ADN plasmídico (Birboim y Doly, 1979; Townsend y col., 1985).

El estudio del perfil plasmídico se utilizó inicialmente en epidemiología clínica para la tipificación de cepas de *Salmonella* sp. (Fantasia y col., 1990), pero también se ha aplicado a otros microorganismos patógenos. Actualmente, constituye un método muy utilizado para identificar las fuentes de contaminación durante el procesado de los alimentos. Ellison y col., (1989) han empleado esta técnica para diferenciar las cepas de *Bacillus cereus* de algunos ovoproductos. También se ha utilizado en la identificación y diferenciación de cepas de *Clostridium perfringens* (Phillips-Jones y col., 1989), *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* (Scheinbach y Hong, 1988), *Staphylococcus aureus* (Thompson y Holding, 1986) y *Pseudomonas syringae* (King, 1989).

Aunque la electroforesis de los ácidos nucleicos en geles de agarosa permite la caracterización de moléculas de tamaño pequeño (< 1 MDa), en

algunos casos los perfiles son complejos y difíciles de interpretar, sobre todo si hay varios plásmidos de tamaño parecido o si algunos plásmidos experimentan modificaciones que originan una migración no uniforme en el gel. No obstante, estos problemas pueden resolverse mediante el empleo de enzimas de restricción y técnicas de hibridación (Earnshaw y Gidley, 1992).

#### II.3.2.4.2. Perfil de restricción del ADN cromosómico

El ADN cromosómico está formado por una doble hélice de 4 nucleótidos que se repiten (adenina, guanina, citosina y timina). Los enzimas de restricción (endonucleasas) rompen la molécula de ADN en determinados lugares de secuencias específicas de nucleótidos, originando fragmentos de diversos tamaños. El número y posición de los lugares de fragmentación dependen de la secuencia de la molécula de ADN de cada microorganismo. Por tanto, el número y tamaño de los fragmentos cromosómicos generados reflejan la mayor o menor actividad de las endonucleasas del genoma bacteriano, así como los cambios de la secuencia de nucleótidos del cromosoma bacteriano.

La electroforesis en geles de agarosa (Schaberg y col., 1981) permite separar los fragmentos de restricción del ADN microbiano según su tamaño, en el intervalo comprendido entre 0,1 y 100 MDa. No obstante, la técnica presenta limitaciones cuando son muchos los fragmentos (más de 50) o son demasiado grandes (>100 MDa). El protocolo de extracción del ADN cromosómico debe realizarse con sumo cuidado para preservar la integridad de las moléculas de ADN de posibles daños físicos. Aunque existen múltiples procedimientos para extraer y purificar el ADN, generalmente se utilizan tratamientos cíclicos con RNasas y proteasas, seguidos de una extracción con cloroformo y precipitación del ADN en alcohol (Earnshaw y Gidley, 1992).

El perfil de restricción del ADN cromosómico se ha aplicado con éxito en la identificación de muchos microorganismos patógenos de los alimentos, como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* sp., *Campylobacter* sp. y *Aeromonas* sp. (Bialkowska-Hobrzanska y col., 1990; Kapperud y col., 1990; Simor y col., 1990).

### II.3.2.4.3. Sondas de ADN

Una sonda de ADN es un fragmento pequeño de nucleótidos que se unen a regiones complementarias de un blanco o diana, permitiendo la detección de una secuencia homóloga de ADN y, por tanto, de microorganismos con esa secuencia. La complementariedad entre los nucleótidos determina la hibridación de una sonda con su ADN específico. Para desarrollar una sonda de ADN es necesario identificar una secuencia de nucleótidos, aislarla, reproducirla y marcarla con un compuesto para determinar si ha tenido lugar la hibridación con el ADN diana (Tenover, 1988). Los marcadores más utilizados son los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{14}\text{C}$ , aunque también pueden emplearse enzimas como la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, el complejo avidina-biotina o el hapteno digoxigenina (Dovey y Towner, 1989).

No obstante, las sondas pueden obtenerse de varias formas: a) mediante síntesis química de los oligonucleótidos, para lo cual es necesario conocer la secuencia de nucleótidos del ADN plasmídico o cromosómico del microorganismo a investigar o la secuencia aminoacídica del componente estructural o toxina del microorganismo de interés y b) extrayendo el ADN de las células y rompiéndolo en fragmentos con enzimas de restricción, con el fin de que, al menos uno de ellos, contenga la secuencia de bases que le confiera especificidad. A continuación, y con el fin de reproducir esa secuencia, se insertan los fragmentos en un vector plasmídico que favorezca su clonación y después de otro tratamiento con endonucleasas y de la separación de los fragmentos por electroforesis, éstos se transfieren a filtros de nitrocelulosa y se marcan con el radioisótopo. Así, al depositar en los filtros la sonda que contiene el ADN diana, los lugares de hibridación de la sonda con el ADN adquieren radiactividad que se mide por autorradiografía (Leighton-Jones, 1991; Wolcott, 1991).

La especificidad de las sondas depende de su unión al ácido nucléico diana y no a otros procedentes de otros microorganismos o del alimento y pueden ser específicas de familia, género y especie. Las sondas de ADN se han desarrollado para la detección y/o enumeración de microorganismos patógenos presentes en los alimentos y en el agua. Actualmente se dispone de sondas génicas específicas para *Salmonella* sp. (Fitts y col., 1983; Fitts, 1985), *Listeria* sp. (Klinger y Johnson, 1988), enterotoxinas estafilocócicas

(Notermans y col., 1988), enterotoxinas de *Clostridium perfringens* (Van Damme-Jongsten, 1990) y *E. coli* enterotoxigénico (Samadpour y col., 1990), *Campylobacter* sp. (Olive y col., 1990), *Shigella* sp. (Small y Falkow, 1986) y *Pseudomonas* sp. (Ursing, 1986). También se han utilizado las sondas para detectar microorganismos de interés industrial, como *Lactobacillus curvatus*, utilizado en la fabricación de productos cárnicos fermentados (Petrick y col., 1988).

Otra de las ventajas de las sondas es su sensibilidad, ya que pueden detectar la presencia de un pequeño número de microorganismos. Mientras algunos autores señalan que la concentración mínima detectable con una sonda estándar es de  $10^6$ - $10^7$  células, otros indican un límite de detección de  $10^4$  células. No obstante, la sensibilidad de las sondas génicas puede mejorarse notablemente mediante una amplificación previa del ADN, lo que se consigue utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991).

#### II.3.2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, descrita por primera vez por Kepple y col., (1971) y modificada posteriormente por Saiki y col., (1985), también se utiliza en la detección de microorganismos patógenos. La reacción consta de tres pasos fundamentales: 1) la desnaturalización del ADN en dos cadenas; 2) la utilización de oligonucleótidos sintéticos específicos "*primers*" o cebadores que sirven de punto de partida para la incorporación de nuevos nucleótidos y 3) una reacción enzimática que permite, a partir de los cebos utilizados, completar la cadena complementaria del ADN utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Durante el segundo ciclo y siguientes, el fragmento inicial del ADN y el resultante de la hibridación se utilizan como molde. La reacción en cadena de la polimerasa dobla la cantidad de ADN específico en cada ciclo de desnaturalización. Una amplificación de 20-40 ciclos origina una amplificación de 1 millón de veces el ADN original. La reacción se ha simplificado con la utilización de una ADN-polimerasa termoestable. El ADN amplificado resultante se pone fácilmente de manifiesto mediante electroforesis de las muestras en geles de agarosa. Este método se ha utilizado para detectar, entre otras, cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (Olive, 1989), *L. monocytogenes* (Fitter y col., 1992), *Vibrio vulnificus* (Hill y col.,

1991), *Toxoplasma gondii* y *Shigella* sp., mejorando considerablemente el tiempo y límite de su detección (Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991).

#### II.3.2.4.5. Aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la bioluminiscencia bacteriana

Algunos microorganismos marinos de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas* y *Xenorhabdus* (Meigen, 1991) emiten luz. La energía necesaria para la bioluminiscencia proviene, no del ATP bacteriano, sino del flavín-mononucleótido reducido (FMNH<sub>2</sub>) y de un aldehído alifático de cadena larga (dodecanal o tetradecanal), que se oxidan en una reacción intracelular catalizada por el enzima luciferasa, provocando la emisión de una luz verdosa medible en un luminómetro. Los microorganismos terrestres carecen de los genes que codifican el enzima luciferasa. Actualmente, la aplicación de técnicas genéticas ha permitido incorporar los genes responsables de la luminiscencia (genes "lux") a microorganismos que no emiten luz, posibilitando así la detección e identificación de determinadas bacterias de los alimentos (Ulitzur y Kuhn, 1987; Baker y col., 1992; Griffiths, 1993).

La inserción de los genes "lux" en el ADN de bacteriófagos específicos permite su expresión en la bacteria hospedadora, que adquiere un fenotipo bioluminiscente. Esto ha posibilitado la detección de microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter* sp. y *Listeria monocytogenes*, así como la de bacterias entéricas indicadoras de la calidad higiénica de los alimentos (Stewart y col., 1991).

Por otra parte, los genes "lux" aislados de *Vibrio fischeri* permiten construir fenotipos bioluminiscentes de microorganismos de importancia industrial, como *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*. Dado que la emisión de luz está ligada a una reacción metabólica, la pérdida de luminiscencia de estas bacterias se considera indicativa de actividades antimicrobianas (antibióticos, biocidas, bacteriófagos, etc.) que en caso de encontrarse en la leche originarían la inactivación de los cultivos iniciadores utilizados en la fabricación de productos lácteos como yogur o queso (Stewart y col., 1989). La utilización de microorganismos con fenotipos luminiscentes constituye una alternativa metodológica eficaz para evaluar las

actividades antimicrobianas de la leche cruda.

Las bacterias luminiscentes proporcionan además una herramienta muy útil para observar o seguir la recuperación de los microorganismos con lesiones subletales originadas por la aplicación de tratamientos (esterilización, congelación, irradiación, etc.) destinados a prolongar la vida útil de los alimentos. La determinación de la recuperación de las células bacterianas lesionadas es importante en la enumeración de los microorganismos de los alimentos (Stewart, 1990).

Las bacterias luminiscentes también se emplean para controlar la eficacia de los tratamientos de pasteurización y esterilización de diversos alimentos. Los esporos de las células vegetativas bioluminiscentes, al ser metabólicamente inactivos, no emiten luz, pero durante su germinación se activan las reacciones enzimáticas que cursan con bioluminiscencia. Por este motivo, la introducción de los genes "*lux*" en determinadas especies de *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. megaterium*) ha permitido la detección en los alimentos de aquellos esporos que, al no haber sido convenientemente destruidos por el tratamiento térmico, constituyen un peligro para el consumidor (Stewart y col., 1989).

Aunque están todavía en fase de desarrollo, las pruebas que utilizan genes productores de enzimas luminiscentes para la detección e identificación microbiana se consideran rápidas, sencillas, específicas y sensibles (los luminómetros detectan recuentos de 500 bacterias/ml o más). Además, su correlación con los recuentos bacterianos en placa es alta (Baker y col., 1992; Griffiths, 1993).

**CAPITULO III**

***MATERIALES Y METODOS***

### III.1. MATERIALES

#### III.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

En la preparación de los medios de cultivo y soluciones acuosas se empleó agua destilada obtenida en un destilador Afora (1) y desmineralizada en un intercambiador iónico "Seta" mod. R-600.

Las pesadas ordinarias se efectuaron en balanzas monoplato "Sauter" mod. S-1000. Para las pesadas de precisión se utilizaron balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "A&D" mod. ER-120A. Para equilibrar las muestras a centrifugar se utilizó una balanza biplato "Cobos" mod. 28.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada "Sorvall" RG-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Las ultracentrifugaciones se efectuaron en una ultracentrífuga "Sorvall" mod. OTD-Combi, equipada con rotores T-875 y T-647.5.

Los pHmetros utilizados fueron "Crison" mod. Digit 501, "Radiometer" mod. 28 y "Metrohm" mod. 654.

Las siembras microbianas se realizaron en una campana de flujo laminar "Telstar" mod. CE-A, equipada con una lámpara ultravioleta.

En las incubaciones se utilizaron estufas "Heraeus" mod. KB-500 y "Selecta" mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada. Las incubaciones en agitación se realizaron en un incubador-agitador orbital "Lab-line" mod. 35271.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820 (e "Hitachi" mod. 2000), registrándose los resultados en una impresora térmica Uvikon LS-4B y en un registrador Uvikon 21.

*(1) La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc, no significa que la autora las recomiende con preferencia a otras marcas del mercado.*

Los recuentos microbianos se llevaron a cabo con un contador de colonias "WTW" mod. BZG-24.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo y soluciones se realizaron en un autoclave "Autotester" 437-G y "Autotester" G Selecta. La esterilización del material de vidrio se efectuó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K.

En el proceso de ruptura de las células microbianas por ultrasonidos se empleó un sonicador de "Heat Systems Ultrasonic Inc., Plainview, NY" mod. W-220F.

Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador "Terruzzi-Melvisa" mod. TP-3 con una superficie útil de carga de 0,3 m<sup>2</sup>, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovació y programador.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator" mod. ACK-55, así como en frigoríficos "Aspes" y "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator" termostatado a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  construido por una firma local.

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico se utilizó un aparato de electroforesis "Bio-Rad" mod. Protean II, empleando como fuente de alimentación un aparato "Shandon" mod. SAE 2761.

Las cromatografías de filtración en geles se realizaron en columnas de "Pharmacia" mod. 4,5 x 91 cm. Las fracciones cromatográficas se recogieron en un colector de fracciones "LKB Bromma" mod. 2212 Helirac.

Las muestras se dializaron en membranas de diálisis "Serva" mod. "Visking dialysis tubing, type 27/32".

La recogida de los microorganismos de la superficie de la carne se realizó mediante lavados sucesivos de la superficie delimitada por un cilindro metálico hueco de 3,5 cm de diámetro.

Las muestras de carne refrigeradas se mantuvieron en una cubeta de metacrilato dividida en dos compartimentos por una placa del mismo material perforada con numerosos orificios. En el compartimento superior (más amplio que el inferior) se colocaron las muestras y en el inferior, una disolución de cloruro sódico mantuvo la humedad relativa en el interior de la cubeta al 99%. Las muestras se dispusieron en posición vertical, suspendidas de ganchos de acero inoxidable pendientes de varillas de vidrio paralelas y horizontales. Los soportes de metacrilato de las varillas disponían de hilos de nylon que mantuvieron separados los filetes a una distancia suficiente.

Las placas de ELISA utilizadas en los ensayos inmunoenzimáticos fueron de la marca "Costar" mod. 3590 de 96 pocillos. Su agitación se llevó a cabo en un agitador de placas de ELISA marca "Wallac", mod. 1296.001 Plateshake, y para su lectura se utilizó un lector espectrofotométrico "Titertek Multiskan Plus, versión 1.4".

Como material general de laboratorio se utilizaron pipetas y micropipetas automáticas de la marca "Gilson" modelos p-5000, p-1000, p-200 y p-20, agitadores, mecheros de gas, termómetros, etc. El material de vidrio empleado en las experiencias fue siempre de la marca "Pyrex".

### III.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

#### III.1.2.1. MICROORGANISMOS

Se han utilizado seis cepas diferentes de *Ps. fluorescens*: tres de origen lácteo (AH-70, AR-11 y B-52) y tres de origen cárnico (DC-5, DC-7 y NT-19). Las cepas DC-5, DC-7 y NT-19 nos las proporcionó el Dr. B.G. Shaw, del *Food Research Institute*, Bristol, UK; las cepas B-52 y AR-11 el Dr. R.C. McKellar, del *Food Research Center*, Ottawa, Canadá y el Dr. B.A. Law, del *National Institute for Research in Dairying*, Slanfield, Reading, UK. Por último, la cepa de *Ps. fluorescens* AH-70, aislada de leche española refrigerada, fue identificada en nuestro laboratorio por Azcona y col., (1988).

Las bacterias psicrotrofas *Flavobacterium odoratum*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes denitrificans*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Ps. fragi*

procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo, ubicada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

### III.1.2.2. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS

En la obtención de los inmunosueros se emplearon conejos machos blancos de raza Nueva Zelanda, de 3-3,5 Kg de peso, criados y mantenidos en el animalario del Departamento de Cirujía Experimental del Hospital Militar Central "Gómez Ulla" de Madrid.

### III.1.2.3. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

En este trabajo se han utilizado dos tipos de muestras distintas:

#### a) **Muestras de leche**

Leche esterilizada: procedía de centros comerciales de venta al detalle; estaba envasada en tetrabrick y esterilizada por el procedimiento UHT.

Leche cruda refrigerada: se adquirió de una Granja Diplomada ("Priégola") ubicada en la Comunidad Autónoma de Madrid. La leche se recogió directamente del tanque de refrigeración y se transportó al laboratorio en botellas de vidrio estériles, que se introdujeron en un recipiente hermético isoterma que contenía hielo en bolsas impermeables.

#### b) **Muestras de carne**

Carne estéril: todas las muestras procedían del músculo *longissimus dorsi* de cerdo y se adquirieron en un matadero industrial frigorífico localizado en la provincia de Madrid.

Carne cruda refrigerada: las muestras procedían de diversos centros comerciales y pertenecían a la especie porcina. Se adquirieron fileteadas y envasadas en bandejas de poliestireno recubiertas con una película plástica de polietileno.

### III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo fueron suministrados por alguna de las siguientes firmas: "Merck", "Sigma", "Bio-Rad", "Oxoid", "Pharmacia", "Difco", "Panreac", "Dako" y "Fluka".

## III.2. METODOS

### III.2.1. METODOS MICROBIOLÓGICOS

#### III.2.1.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PSICROTROFAS

a) Medio líquido semidefinido: Se preparó a base de un 1% de triptona (Oxoid), 1% de extracto de levadura (Oxoid) y 0,5% de ClNa (Panreac) en agua destilada. Se utilizó para cultivar las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y las demás bacterias psicrotrofas utilizadas.

b) Agar para recuento en placa (PCA, Oxoid): Se empleó en el recuento de bacterias psicrotrofas viables.

c) Agar nutritivo (Difco): Se empleó para el mantenimiento de las cepas de *Pseudomonas*.

Los medios se prepararon de acuerdo con las instrucciones de las casas suministradoras y se esterilizaron durante 15 min a 121°C.

#### III.2.1.2. RECuento DE MICROORGANISMOS PSICROTROFOS VIABLES

Los recuentos se realizaron por el método de dilución en placa, efectuando las siembras por duplicado. Las placas se incubaron a una temperatura y tiempo variable dependiendo del origen de las muestras.

1) Muestras de leche UHT y de carne estéril: las muestras inoculadas con cepas de *Pseudomonas* sp. (véase apartados III.2.6.2.1.1 y III.2.6.2.1.2) se

incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de estas bacterias: 24°C durante 48 horas.

2) Muestras de leche cruda y de carne no estéril: la incubación se realizó primero a 17°C durante 17 horas y luego a 7°C durante 72 horas (Sogaard y Lund, 1981).

El recuento de las colonias se llevó a cabo con un contador de colonias provisto de registrador. Solo se consideraron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

### III.2.2. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Pseudomonas fluorescens*

El aislamiento de las proteínas de la membrana externa de *P.s. fluorescens* se realizó esencialmente de acuerdo al protocolo descrito por Yoshimura y col., (1983) en el aislamiento de una porina de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### III.2.2.1. SOLUCIONES EMPLEADAS

##### - Solución A

Es una solución de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1mM en tampón Tris-HCl 15mM, pH 8,0 a la que se le incorpora, en el momento de su utilización, 1 mg de ribonucleasa y 1 mg de deoxirribonucleasa.

##### - Solución B

Contiene un 2% de dodecilsulfato de litio (LDS) en tampón Tris-HCl 15mM, pH 8,0. Esta solución se mantiene en un baño de hielo picado hasta su utilización.

##### - Solución C

Contiene un 2% de LDS, LiCl 1M y Tris-HCl 15mM, pH 8,0 en agua destilada.

### III.2.2.2. METODOLOGIA

La cepa AH-70 de *Ps. fluorescens*, previamente revitalizada, se sembró al 2% en 4 litros de medio de cultivo líquido semidefinido y se incubó a 24°C durante 48 h. A continuación, la suspensión celular se centrifugó durante 10 min a 9000 x g y a una temperatura de 4°C. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100 ml de tampón Tris-HCl 15mM de pH 8,0.

Esta suspensión se centrifugó como queda dicho y el sedimento se resuspendió en 40 ml de solución A (ver sección III.2.2.1), procediéndose a continuación al lisado de las células con ultrasonidos (30 pulsos de una intensidad de 50 KHz y 20 seg de duración). La sonicación tuvo lugar manteniendo la muestra en un baño de hielo picado y realizando pausas de 15 segundos entre cada pulso, para mantener las condiciones de refrigeración. La sonicación se dió por finalizada cuando la absorbancia de la suspensión celular a 600 nm disminuyó a un 10% de su valor original.

La suspensión sonicada se centrifugó durante 10 min a 9000 x g a una temperatura de 4°C y, tras desechar el sedimento, el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 45 min para recuperar las proteínas de la membrana externa. El sedimento obtenido se resuspendió tres veces en 45 ml de solución B (ver sección III.2.2.1), ultracentrifugándose cada vez a 100.000 x g durante 45 min.

Por último, el sedimento resultante se resuspendió en 3 ml de solución C (ver sección III.2.2.1), incubándose a continuación a 37°C durante 90 min. Transcurrido este tiempo, la solución se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 45 min y el sobrenadante obtenido, que contenía las proteínas mayoritarias de la membrana externa, se liofilizó y se mantuvo en viales herméticamente cerrados en refrigeración hasta su utilización.

Los sobrenadantes de las otras ultracentrifugaciones (sobrenadantes 1, 2, 3, y 4) también se liofilizaron y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su empleo (Fig. III.1).

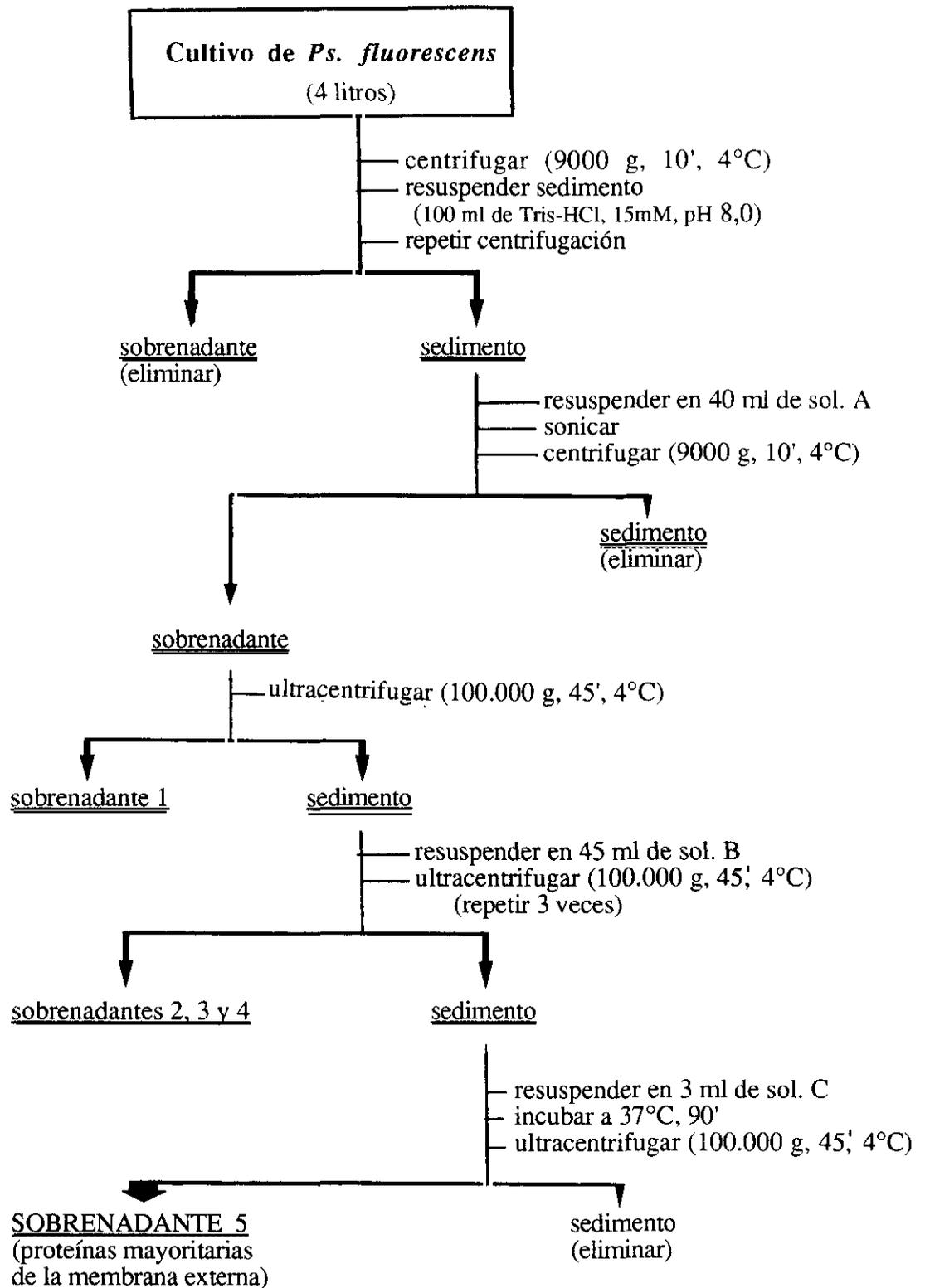


Figura III.1. Metodología empleada en el aislamiento de las proteínas de la membrana externa de *Ps. fluorescens*

El proceso de extracción de las proteínas de la membrana externa de la cepa AH-70 de *Ps. fluorescens* se repitió con el resto de las cepas seleccionadas de *Ps. fluorescens* AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19. La extracción de las proteínas de la membrana externa de cada cepa tuvo que repetirse varias veces para obtener una concentración de proteína suficiente para los ensayos posteriores.

### III.2.3. DETERMINACION DE LA PROTEINA

La determinación de la proteína de los sobrenadantes liofilizados se realizó con la técnica de Lowry modificada por Markwell y col., (1978) para muestras que contienen lipoproteínas y otros componentes de la membrana externa.

La técnica se basa en el desarrollo del color al poner en contacto las proteínas con los reactivos que posteriormente se detallan. El desarrollo del color se debe a una combinación de reacciones:

- a) En condiciones alcalinas, el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de tipo Biuret), reduciéndose a  $\text{Cu}^+$ .
- b) El  $\text{Cu}^+$ , junto con la tirosina y el triptófano, reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu originando un compuesto inestable que lentamente se reduce para dar lugar al reactivo molibdeno-túngstico de color azul. Dependiendo fundamentalmente de su contenido de tirosina y de triptófano, las proteínas producen color de diferente intensidad.

Esta técnica pone de manifiesto los grupos fenoles de las proteínas y por ello, es necesario extrapolar los resultados a una curva patrón construida con anterioridad. Como proteína estándar para construir la curva patrón se empleó la fracción V de la seroalbúmina bovina.

Reactivos:

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, NaOH al 0,4%, dodecil sulfato sódico

(SDS) al 1% y tartrato sódico potásico ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) ( $4\text{H}_2\text{O}$ ) al 0,16% en agua destilada.

- Solución B:  $\text{CuSO}_4$  ( $5\text{H}_2\text{O}$ ) al 4% en agua destilada.
- Solución C: Se obtiene mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.
- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada en la proporción 1:1 (v/v)

#### Procedimiento:

A 1 ml de una muestra que contenga entre 10 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína se le añaden 3 ml de la solución C y la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se adicionan 0,3 ml de la solución D y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 45 minutos. Finalmente, se mide el aumento de la absorbancia a 660 nm con referencia a un blanco preparado de la misma manera pero con agua destilada.

### III.2.4. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Ps. fluorescens*

Los sobrenadantes liofilizados procedentes de la extracción de las proteínas de la membrana externa de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 (apartado III.2.2.2) se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

#### III.2.4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SODICO

Esta técnica permite separar mezclas complejas de polipéptidos en función de su tamaño molecular. La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó según la técnica de Laemmli (1970). El dodecil sulfato sódico es un detergente que, con otros agentes como el mercaptoetanol y el calor, interviene en la desnaturalización

de las proteínas a subunidades y, además, proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma, cuando el complejo SDS-proteína se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico, en este caso, solo suministra la fuerza impulsora.

### III.2.4.1.1. Tampones, geles y soluciones empleadas

#### 1.- Tampón para solubilizar las muestras

Se compone de:

Tris HCl 0.5 M, pH 6,8	1,0 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS (10%)	1,6 ml
β-mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de bromofenol (0.05%)	0,2 ml
Agua destilada	4,0 ml

#### 2.- Solución de acrilamida- bisacrilamida

Contiene:

Acrilamida	14,6 g
N,N'- metilén- bisacrilamida	0,4 g
Agua destilada	hasta 50 ml

#### 3.- Gel de separación

Consta de:

Solución de acrilamida- bisacrilamida	20 ml
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	7,5 ml
Agua destilada	1,9 ml
SDS (10%)	0,3 ml
Persulfato amónico (10%)	0,15 ml

TEMED	15	μl
-------	----	----

#### 4.- Gel de concentración

Está formado por:

Solución acrilamida- bisacrilamida	1,3	ml
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5	ml
Agua destilada	6,1	ml
SDS (10%)	0,1	ml
Persulfato amónico	50	μl
TEMED	10	μl

#### 5.- Tampón de electroforesis

Contiene:

Tris base	6,6	g
Glicina	28,8	g
SDS	2	g
Agua destilada	2,2	l

#### 6.- Solución de tinción

Consta de:

Acido acético	10,0	ml
Alcohol metílico	40,0	ml
Agua destilada	50,0	ml
Azul brillante de Coomassie	0,25	g

Esta solución debe filtrarse por papel (Whatman nº 1) antes de su uso

## 7.- Solución de lavado

Se compone de:

Acido acético	10,0 ml
Alcohol metílico	40,0 ml
Agua destilada	50,0 ml

### III.2.4.1.2. Preparación de las muestras

Las muestras liofilizadas se disolvieron en el tampón de solubilización a una concentración de 0,4 mg/ml y se mantuvieron 5 minutos en un baño de agua hirviendo antes de depositar 25  $\mu$ l (correspondientes a 10  $\mu$ g de proteína) de cada solución en el gel de concentración.

### III.2.4.1.3. Preparación de los geles

El gel consta de dos porciones: fase inferior (gel de separación) y fase superior (gel de concentración). Para evitar la presencia de burbujas de aire en los geles, éstos se desgasificaron por sonicación en un baño durante 5 minutos, antes de añadir el TEMED y el persulfato amónico.

Los recipientes de formación de geles se llenaron primero con la solución del gel de separación hasta unos 3 cm de su extremo superior. Para evitar la formación de meniscos, se depositó en la superficie de la mezcla un pequeño volumen de una solución saturada de butanol. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 37°C y una vez polimerizada se retiró el butanol y se lavó su superficie con agua destilada. A continuación, se depositó la solución del gel de concentración y se introdujo el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Finalmente, la mezcla se polimerizó durante 30 min a 37°C, quedando el gel listo para realizar la electroforesis.

### III.2.4.1.4. Electroforesis

Una vez colocadas las muestras, la electroforesis se realizó pasando por el gel una corriente de 18-20 mA. Finalizada ésta, el gel se extrajo de los

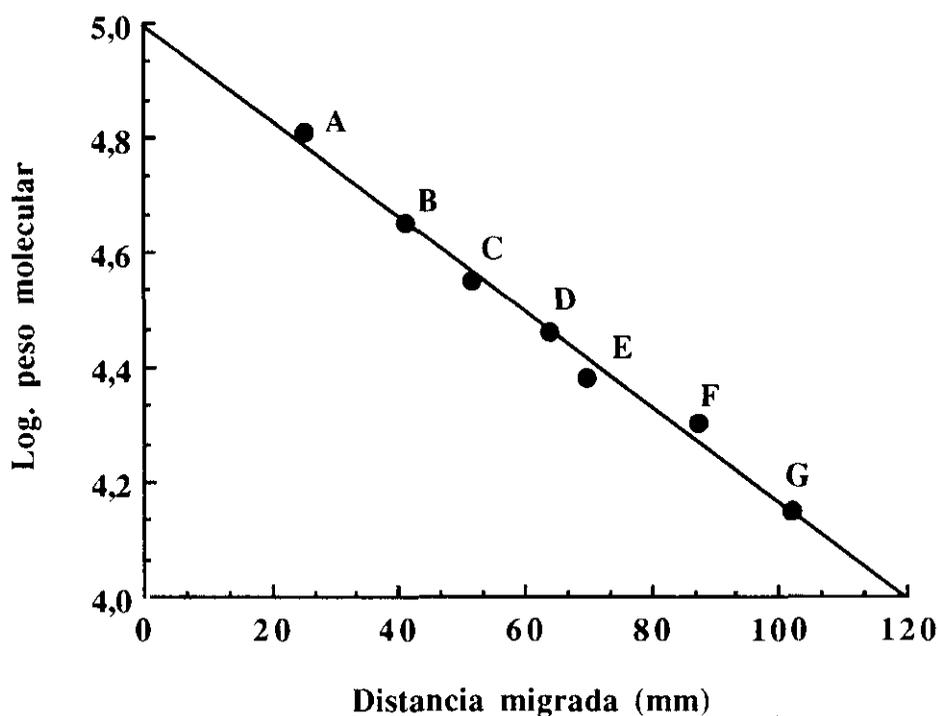
recipientes de soporte.

#### **III.2.4.1.5. Tinción del gel**

Terminada la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de tñido, donde se mantuvo durante 1 h a 37°C. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

#### **III.2.4.1.6. Determinación del peso molecular**

El peso molecular de las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens* se determinó por interpolación en una gráfica en la que se representa el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente a su distancia de migración en el gel (Fig. III.2). Las proteínas utilizadas en la confección de la recta patrón procedían de un "kit" comercial (Sigma) que contenía:  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,2 KDa), proteína inhibidora de la tripsina (20,1 KDa), tripsinógeno (24 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) y seroalbúmina bovina (66 KDa).



*Figura III.2.* Recta patrón para la determinación del peso molecular por la técnica de Laemmli. Proteínas estándar: (A)  $\alpha$ -lactoalbúmina; (B) Proteína inhibidora de la tripsina; (C) Tripsinógeno; (D) Anhidrasa carbónica; (E) Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa; (F) Ovoalbúmina; (G) Seroalbúmina bovina.

### **III.2.5. PURIFICACION DE LA PROTEINA F DE *Ps. fluorescens* AH-70**

El sobrenadante liofilizado que contenía las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 (sobrenadante 5), se purificó por cromatografía de filtración en geles.

#### **III.2.5.1. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GELES**

Esta técnica cromatográfica se basa en la separación de las moléculas en función de su tamaño molecular.

##### **III.2.5.1.1. Gel y tampón de elución empleados**

El gel utilizado fue el Sephacryl HR S-200, que es un polímero resultante de la formación de enlaces covalentes cruzados entre las moléculas de alil-dextrano y N-N-metilén bisacrilamida. Este gel permite el fraccionamiento de moléculas entre 5.000 y 250.000 daltones. La preparación y activación del gel se realizó siguiendo las normas de la casa suministradora (Pharmacia). El gel hidratado se conservó en refrigeración hasta su utilización.

La muestra se eluyó con un tampón que contenía un 1% SDS, NaCl 0,4M, Tris-HCl 10mM, pH 8,0 y un 0,01% de azida de sodio.

##### **III.2.5.1.2. Condiciones de trabajo**

La cromatografía se realizó en una cámara termostataada a 37°C para evitar la precipitación del tampón de elución y el eluato se recogió en un colector de fracciones.

El sobrenadante liofilizado de la última ultracentrifugación realizada durante el aislamiento de las proteínas de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 se purificó por cromatografía de filtración en un gel de Sephacryl S-200. Para ello, 5 mg de proteína del extracto liofilizado se disolvieron en 3 ml del tampón de elución y se depositaron en una columna (1,5 x 91 cm, Pharmacia) previamente equilibrada con el mismo tampón. El

eluato, en fracciones de 1 ml, se sometió a una lectura espectrofotométrica a 280 nm para determinar su contenido protéico. Las fracciones cromatográficas correspondientes al primer y segundo pico de absorción máxima a 280 nm, se recogieron separadamente y se dializaron frente a agua destilada durante 24 h. Finalmente, se liofilizaron ambos y se mantuvieron en un desecador a 4°C hasta su utilización posterior.

### **III.2.5.1.3. Determinación y caracterización de la proteína F purificada**

La determinación de la proteína de los extractos liofilizados correspondientes a cada pico cromatográfico se realizó mediante la técnica de Lowry modificada por Markwell y col., (1978), previamente descrita en el apartado III.2.3.

Los extractos liofilizados, correspondientes al primer y segundo pico de absorción máxima a 280 nm, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS, según la técnica descrita en el apartado III.2.4.1.

## **III.2.6. TECNICAS INMUNOLOGICAS**

### **III.2.6.1. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS**

#### **III.2.6.1.1. Extractos antigénicos utilizados**

Se emplearon dos extractos antigénicos distintos para la inmunización de dos lotes de conejos:

- 1) Proteína F purificada de *Ps. fluorescens* AH-70, obtenida como se describe en la sección III.2.5.1.
- 2) Células vivas de *Ps. fluorescens* AH-70 ( $10^9$  ufc/ml).

### III.2.6.1.2. Pauta de inmunización

Para la producción de inmunosueros se emplearon dos lotes de 2 conejos machos de raza Nueva Zelanda, de 3-3,5 Kg de peso. Al primer lote se le inoculó la proteína F purificada y al segundo las células vivas de *Ps. fluorescens* AH-70.

La inmunización de cada lote comenzó con la inyección subcutánea, en varios lugares de la espalda, de los correspondientes extractos antigénicos (0,5 mg de proteína F y  $10^9$  ufc de *Ps. fluorescens* AH-70) emulsionados en una mezcla a partes iguales (0,5 ml) de Adyuvante Completo de Freund y de PBS (tampón fosfato salino de pH 7,2). Las inoculaciones se realizaron durante 4 meses a intervalos de 7 días (Tabla III.1), sustituyendo, a partir de la segunda inyección, el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto.

Antes de la primera inoculación de los extractos antigénicos y para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a los antígenos utilizados, se realizó una sangría inicial ( $S_0$ ). Asimismo, a los 21, 42, 63, 84 y a los 105 días del proceso de inmunización, se realizaron sucesivas sangrías parciales con el fin de verificar la eficacia del mismo.

### III.2.6.1.3. Sangría final

A los 112 días del comienzo del proceso de inmunización y una vez comprobado que el título de los inmunosueros era el adecuado, se efectuó la sangría final de los animales. Se procedió como sigue: después de anestesiarse al animal por vía intramuscular con Kelotar (clorhidrato de ketamina) a una dosis de 10 mg/Kg de peso, se coloca en una mesa de sujeción en posición de decúbito supino y se inmoviliza por las cuatro extremidades. Una vez depilada y desinfectada la zona cervical inferior se practican las tres incisiones cutáneas siguientes:

- a) Longitudinal a lo largo de la línea media ventral
- b) Transversal a nivel de la segunda vértebra cervical
- c) Transversal a nivel de la sexta vértebra cervical

**Tabla III.1. Pauta de inmunización de los conejos por inoculación subcutánea de los extractos antigénicos de *Ps. fluorescens* AH-70**

Días	Extractos antigénicos		PBS (ml)	A C F (ml)	A I F (ml)	Sangría
	<u>LOTE I</u> Proteína F (mg)	<u>LOTE II</u> Células vivas (ufc)				
0	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	0,5	—	S <sub>0</sub>
7	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
14	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
21	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	S <sub>1</sub>
28	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
35	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
42	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	S <sub>2</sub>
49	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
56	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
63	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	S <sub>3</sub>
70	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
77	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
84	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	S <sub>4</sub>
91	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
98	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	
105	0,5	10 <sup>9</sup>	0,5	—	0,5	S <sub>5</sub>
112	—	—	—	—	0,5	S <sub>F</sub>

P B S: Buffer fosfato salino, pH 7,2  
 A C F: Adyuvante Completo de Freund  
 A I F: Adyuvante Incompleto de Freund

S<sub>0</sub>: Sangría inicial  
 S<sub>1</sub>: Sangría día 21  
 S<sub>2</sub>: Sangría día 42  
 S<sub>3</sub>: Sangría día 63  
 S<sub>4</sub>: Sangría día 84  
 S<sub>5</sub>: Sangría día 105  
 S<sub>F</sub>: Sangría final

A continuación, se diseccionan los músculos ventrales del cuello visibles en este área: *Ms. cleidomastoideus* (parte del *Ms. cleidocephalicus* y éste a su vez del *Ms. brachiocephalicus*), *Ms. sternomastoideus* (parte del *Ms. sternocephalicus*), *Ms. sternohyoideus* y *Ms. sternothyroideus*. Por el borde lateral del *Ms. sternothyroideus* se disecciona en profundidad hasta llegar al paquete vásculo-nervioso situado a uno y otro lado de la tráquea (*A. carotis comunis*, *V. jugularis* y *Truncus vagosympathicus*). Se disecciona la *A. carotis comunis* y con una pinza de tipo "mosquito" se fija el *N. vagus*, que continúa unido al tronco vascular. De este modo, al efectuar la sección de la arteria se puede dirigir el flujo sanguíneo a un tubo o recipiente donde se recoge la sangre. Cuando disminuye el flujo se recomienda aplicar un masaje cardiaco con el fin de conseguir el mayor volumen de sangre posible.

Una vez realizada la sangría final de acuerdo a las normas señaladas, se recogieron de 120 a 150 ml de sangre de cada animal.

#### **III.2.6.1.4. Obtención y conservación del suero**

La sangre obtenida se trasvasó lentamente a tubos de ensayo limpios y se mantuvo 1 h a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se mantuvo a 4°C para favorecer su retracción. El suero se trasvasó a tubos de centrifuga limpios y se centrifugó durante 10 min a 2000 x g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido se distribuyó en fracciones de 2 ml a las que se añadió una o dos gotas de una solución de azida de sodio al 0,01% que actuaba como agente conservador. Los viales se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### **III.2.6.1.5. Purificación parcial de los inmunosueros**

Los inmunosueros obtenidos frente a la proteína F (anti-PF) y frente a la pared celular (anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70 se purificaron parcialmente mediante una precipitación selectiva con sulfato amónico al 50%.

### III.2.6.1.5.1. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico

La precipitación con sulfato amónico es uno de los métodos más utilizados para la separación de los anticuerpos del inmunosuero. El método se basa en que las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares. Cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el amonio y el sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas por el agua. De esta forma, las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad, lo que origina su precipitación. La concentración de sulfato amónico necesaria para precipitar las inmunoglobulinas varía con la especie animal de la que proceden, aunque la más conveniente en la mayoría de los casos es una solución al 50% (Harlow y Lane, 1988).

En la precipitación de las inmunoglobulinas de los inmunoseros obtenidos frente a la proteína F (anti-PF) y frente a la pared celular (anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70 se procedió como sigue (Harlow y Lane, 1988):

- Se centrifugaron 10 ml de suero a 3000 x g durante 30 min y el sobrenadante se trasvasó a un vaso de precipitados.

- Se añadieron (gota a gota y agitando al mismo tiempo) 10 ml de sulfato amónico saturado (76,1 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  en 100 ml de agua destilada) cuyo pH se había ajustado a 7,4 con NaOH 1N inmediatamente antes de su empleo.

- La mezcla se mantuvo en reposo una noche a 4°C y se volvió a centrifugar a 3000 x g durante 30 min para recuperar las inmunoglobulinas precipitadas.

- Eliminado el sobrenadante, las inmunoglobulinas presentes en el sedimento se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato salino (PBS, de pH 7,2) y, a continuación, se dializaron durante 16 h a 4°C. Finalizada la diálisis, las inmunoglobulinas se distribuyeron en alícuotas de 5 ml, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

### III.2.6.1.6. Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina

La biotina es uno de los 12 factores hidrosolubles que forman el complejo vitamínico B. Debido a su pequeño tamaño molecular, su unión con el anticuerpo es más estable que cuando éste se conjuga directamente con un enzima (Yolken y col., 1983). La unión de la biotina con el anticuerpo (biotinización), además de ser fácil de realizar presenta la ventaja de que el anticuerpo sigue manteniendo la especificidad por el antígeno. Se ha comprobado que la avidina, proteína antibacteriana de la clara de huevo, posee una gran afinidad por la biotina ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). Por ello, utilizando las propiedades del complejo avidina-biotina se pueden amplificar las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). Los anticuerpos biotinizados se detectan por un conjugado comercial de avidina o estreptavidina conjugada a un enzima.

Los anticuerpos parcialmente purificados anti-PF y anti PC de *Ps. fluorescens* AH-70 se conjugaron con un éster de la biotina utilizando el compuesto denominado N-hidroxi-succinimida biotinamidocaproato, siguiendo la técnica de Bonnard y col., (1984). Para su realización se procedió de la siguiente manera:

- Se preparó una solución del éster de la biotina en dimetilsulfóxido a una concentración de 1 mg/ml.
- Los anticuerpos purificados se disolvieron en tampón PBS de pH 7,2, a una concentración de 1 mg/ml.
- Se añadió la solución de biotina a la del anticuerpo, en una relación molar biotina/anticuerpo de 50:1.
- La mezcla se incubó durante 2 h a temperatura ambiente.
- La biotina libre se eliminó mediante diálisis de la mezcla durante 16 h a 4°C frente a tampón PBS.
- Los anticuerpos conjugados, fraccionados en alícuotas de 0,1 ml, se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### III.2.6.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

#### III.2.6.2.1. **Muestras de referencia**

Se emplearon leche UHT y carne cruda estéril inoculadas con diversas cepas de *Ps. fluorescens*.

##### III.2.6.2.1.1. Leche UHT

La leche UHT se inoculó con cultivos puros de las cepas AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml. Como control se utilizó leche UHT no inoculada.

##### III.2.6.2.1.2. Carne cruda estéril

La carne procedía de un matadero industrial frigorífico y pertenecía a la especie porcina. La esterilización del músculo *longissimus dorsi* se realizó según la técnica descrita por Dainty y Hibbard (1980). Para ello, la superficie de la carne se roció con alcohol y se quemó con la llama de un mechero Bunsen. Posteriormente, se retiró la escara superficial con un bisturí estéril hasta una profundidad de aproximadamente 1 cm. Esta operación se repitió 2 ó 3 veces más con el fin de retirar la máxima cantidad posible de tejido muscular superficial. A continuación, el trozo obtenido se cortó con la ayuda de un cuchillo previamente flameado, en filetes de 1 cm de espesor que posteriormente se cortaron en porciones de 2 cm de lado.

Las porciones de carne así obtenidas se introdujeron en matraces Erlenmeyer estériles y su superficie ( $4 \text{ cm}^2$ ) se inoculó con cultivos puros de las cepas AH-70, DC-5, DC-7 y NT-19 de *Ps. fluorescens*, a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup>. Todas las operaciones se efectuaron en una campana de flujo laminar, empleando como control porciones de carne estéril no inoculada.

Después de incubar las muestras y los controles a 20°C durante 30 minutos, las bacterias adheridas a la superficie de la carne se recogieron mediante dos lavados sucesivos de las muestras con 30 ml de KCl 0,1M (Appl

y Marshall, 1984), seguidos de una centrifugación de la suspensión a 10.000 x g durante 15 min a 4°C. A continuación, el sedimento obtenido se resuspendió en 15 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2).

Para el recuento de los microorganismos de las muestras de leche UHT y de carne estéril inoculadas con las distintas cepas de *Ps. fluorescens*, así como de los respectivos controles no inoculados, se utilizaron los medios de cultivo y metodologías descritas en el apartado III.2.1.2.1 de esta memoria

### **III.2.6.2.2. Muestras problema**

#### **III.2.6.2.2.1. Leche cruda refrigerada**

La leche cruda refrigerada (aproximadamente 500 ml) procedente de una granja diplomada se transfirió, a su llegada al laboratorio, a un matraz Erlenmeyer estéril de 1 litro de capacidad. El matraz se mantuvo varios días en una cámara frigorífica termostataada a 4°C, retirándose las muestras de leche cada 24 horas.

#### **III.2.6.2.2.2. Carne cruda refrigerada**

Los filetes de carne de cerdo no estériles adquiridos en el mercado, se mantuvieron varios días a 4°C suspendidos de unos ganchos distribuidos a lo largo de unas varillas de vidrio situadas en el interior de una cubeta de metacrilato (según se describe en el apartado III.1.1). La toma de muestras se efectuó cada 24 horas, de la manera siguiente:

Los filetes se trasladaron de la cubeta de metacrilato a la cabina de flujo laminar, suspendidos de unas pinzas estériles y evitando que sus superficies contactasen con material contaminante. A continuación, se apoyó un cilindro de metal hueco y estéril sobre la superficie de los filetes y se recortó la circunferencia delimitada por el cilindro con un bisturí de corte estéril, siendo la superficie resultante de 30,2 cm<sup>2</sup>. Inmediatamente, estas porciones de carne se introdujeron en matraces Erlenmeyer estériles y se procedió a la recogida de los microorganismos de la superficie de la carne siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.6.2.1.2.

En la determinación de la tasa de microorganismos psicrotrofos de la leche cruda refrigerada y de la carne no estéril, se tomaron 1 ml de las muestras, obtenidas como se indica más atrás, para efectuar el recuento microbiano en placas (apartado III.2.1.2.2).

#### III.2.6.2.3. Condiciones de utilización de las muestras

Tanto las muestras de leche UHT y de carne estéril inoculadas con las pseudomonas de interés, como las muestras problema de leche y de carne cruda refrigeradas se sometieron a los siguientes tratamientos:

a) Muestras "enteras" o sin tratar:

De cada muestra se tomó una alícuota de 1 ml, que no se sometió a ningún tratamiento.

b) Muestras sonicadas:

De cada muestra se tomaron alícuotas de 10 ml, que se sometieron a un tratamiento con ultrasonidos consistente en la aplicación de 15 pulsos de una intensidad de 50 KHz y de 10 seg de duración. La sonicación se efectuó manteniendo las muestras en un baño de hielo picado, con pausas de 15 seg entre los pulsos.

c) Muestras tratadas enzimáticamente:

1 ml de cada muestra se sometió a lisis enzimática, realizada según el método de Cull y McHenry (1990). Para ello, a cada ml de muestra se le añadieron 100  $\mu$ l de una solución de EDTA (ácido etilén-diamintetraacético) 5mM en tampón Tris 0,1M pH, 7,2, incubando la mezcla a 37°C durante 15 min. A continuación, se adicionó a la mezcla una solución de lisozima (0,3 mg/ml) en el mismo tampón, incubándose la solución durante 15 min a 37°C.

Todas las muestras se distribuyeron en alícuotas de 200  $\mu$ l y se conservaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos inmunoenzimáticos.

### III.2.6.3. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

#### III.2.6.3.1. **Técnica del ELISA indirecto**

En este trabajo se han utilizado dos variantes de la técnica del ELISA indirecto. La primera es un ELISA indirecto clásico que emplea un conjugado comercial de anticuerpos anti-especie unidos al enzima peroxidasa de rábano, mientras en la segunda se utilizó el sistema de amplificación biotina-avidina, que precisa de la conjugación de los anticuerpos anti-PF y anti-PC con la biotina.

##### III.2.6.3.1.1. ELISA indirecto clásico

En esta técnica, los antígenos fijados a una superficie inerte son reconocidos por los correspondientes anticuerpos específicos y el complejo formado se detecta por un segundo anticuerpo marcado con un enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. La reacción es visible porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

##### a) Antígenos

Se emplearon muestras de tampón PBS estéril de pH 7,2 inoculadas con cepas de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  ufc/ml. Asimismo, se utilizaron muestras de leche UHT inoculadas con cepas de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml.

Las muestras de tampón PBS y de leche UHT, inoculadas con las distintas cepas de *Ps. fluorescens*, también se analizaron tras su sonicación en las condiciones descritas en el apartado III.2.6.2.3.b.

##### b) Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70 obtenidos por la inmunización de los conejos con los extractos antigénicos correspondientes y purificados parcialmente mediante precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico (sección III.2.6.1.5.1).

c) Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cerdo y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano (Dako).

d) Tampones y reactivos

## 1.- Tampón PBS de pH 7,2.

Se compone de: NaCl	8,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2,9	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	g
KCl	0,2	g
Agua destilada	1	l

## 2.- Tampón PBST.

Se prepara como el tampón PBS y se le añade un 5% de Tween 20.

## 3.- Tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 3,9.

- Preparar una solución de ácido cítrico monohidratado 0,1 M (21,01 g/l).
- Preparar una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M (28,4 g/l).
- Mezclar las dos soluciones hasta obtener el pH deseado.

## 4.- Sustrato.

El sustrato empleado fue el ácido 2-2'-azino-bis-3-etilenbenzotiazolina sulfónico (ABTS) (Sigma). Se prepararon dos soluciones: una de ABTS en agua destilada (15 mg/ml) y otra de ácido ascórbico (10 mg/ml), también en agua destilada. Después se preparó la siguiente mezcla:

- Tampón cítrico-fosfato de pH 3,9	10	ml
- Solución de ABTS (15 mg/ml)	0,4	ml

- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% p/v)	4	μl
- Solución de ácido ascórbico (10 mg/ml)	2	μl

5.- Solución de tapizado.

Gelatina al 1% en tampón PBS.

e) Metodología del ELISA indirecto

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 μl de la muestra antigénica correspondiente y la placa se incubó durante una hora a 37°C, tras lo cual se lavó 5 veces con tampón PBST. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 μl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37°C y los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μl del anticuerpo correspondiente (anti-PF o anti-PC), diluido en tampón PBST y la placa se incubó en un agitador de placas de ELISA durante una hora a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron de nuevo 5 veces con tampón PBST para eliminar los restos de anticuerpo que no hubiesen reaccionado. Seguidamente, se depositaron en cada pocillo 100 μl del conjugado diluido en tampón PBST y, de nuevo, la placa se mantuvo en el agitador durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 5 veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 150 μl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. El color verde, resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control del antígeno: gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato
- Control del anticuerpo: antígeno + gelatina + conjugado + sustrato
- Control del conjugado: conjugado + sustrato

Si la absorbancia a 405 nm de alguno de los controles era mayor de 0,150, el experimento se consideraba nulo.

#### III.2.6.3.1.2. ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina

Como se ha señalado en la sección III.2.6.1.6, la avidina tiene una gran afinidad ( $10^{-15} \text{ M}^{-1}$ ) por la biotina, por lo que el complejo avidina-biotina se utiliza para amplificar las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). Esta amplificación se debe a que la avidina contiene en su molécula cuatro lugares de unión con la biotina.

La diferencia entre esta técnica y la del ELISA indirecto clásico estriba en que los anticuerpos específicos se conjugan con la biotina (biotinización) y la detección de este complejo se realiza con un conjugado comercial de avidina o estreptavidina marcada con un enzima.

En esta técnica se han empleado como antígenos las muestras de carne estéril inoculadas con diversas cepas de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, utilizándose como control carne estéril sin inocular (III.2.6.2.1.2). Las muestras citadas, así como las de carne cruda refrigerada (III.2.6.2.2.2), también se analizaron por la técnica del ELISA indirecto, después de su sonicación (III.2.6.2.3.b).

La técnica sigue los mismos pasos y tiempos de incubación que los descritos en el ELISA indirecto clásico (III.2.6.3.1.1), excepto que como conjugado se utiliza uno comercial de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano.

#### III.2.6.3.2. **Técnica del ELISA sandwich**

En esta técnica, los anticuerpos específicos se fijan a una fase sólida y actúan como anticuerpos de captura de los antígenos problema. Los antígenos anclados son reconocidos por los mismos anticuerpos conjugados con la biotina y el complejo formado se detecta con un conjugado comercial de estreptavidina/peroxidasa. La reacción se pone de manifiesto porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

a) Antígenos

Como antígenos se emplearon las muestras de leche UHT y de carne cruda estéril, inoculadas con diversas cepas de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml o  $\text{cm}^2$  (III.2.6.2.1.1 y III.2.6.2.1.2).

Las muestras citadas, así como las muestras crudas de leche y de carne refrigeradas (III.2.6.2.2.1 y III.2.6.2.2.2), también se analizaron tras su sonicación, incluyendo asimismo las muestras de leche UHT tratadas enzimáticamente de la forma descrita en el apartado III.2.6.2.3.c.

b) Anticuerpos de captura

Como anticuerpos de captura se han empleado los inmunosueros anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70 obtenidos de conejos y parcialmente purificados por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

c) Anticuerpos de detección

Los anticuerpos de detección fueron los mismos que los de captura, pero conjugados con la biotina de la manera descrita en la sección III.2.6.1.6.

d) Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de estreptavidina/peroxidasa (Dako).

e) Tampones y reactivos

Además de los descritos en la sección III.2.6.3.1.1.d, se utilizó el tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6, cuya composición es la siguiente:

- Tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2,93 g
$\text{NaHCO}_3$	2,93 g
agua destilada	1 l

f) Metodología del ELISA sandwich

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 µl de los anticuerpos de captura correspondientes (anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70) diluïdos en tampón de carbonato-bicarbonato de pH 9,6, durante una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con tampón PBST para eliminar los anticuerpos no adsorbidos a la placa.

A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubieran adsorbido los anticuerpos, se añadieron a cada uno de ellos 200 µl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37°C y los pocillos se lavaron de nuevo con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl del antígeno correspondiente y la placa se mantuvo en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado con PBST, se depositaron en cada pocillo 100 µl del anticuerpo correspondiente conjugado con la biotina y la placa se mantuvo en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado con PBST, se añadieron a cada pocillo 100 µl del conjugado de estreptavidina/peroxidasa disuelto en PBST y la placa se incubó 1 una hora en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar los pocillos cinco veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 150 µl de la solución del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. El color verde, resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de los pocillos a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

Los controles realizados en cada ensayo de ELISA sandwich fueron los siguientes:

- Control del antígeno: anticuerpo de captura + gelatina + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.

- Control del anticuerpo de captura: gelatina + antígeno + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.

- Control del anticuerpo de detección: anticuerpo de captura + gelatina + antígeno + conjugado + sustrato.
- Control del conjugado: gelatina + conjugado + sustrato.

**CAPITULO IV**  
***RESULTADOS***

#### IV.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS PROTEINAS MAYORITARIAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Ps. fluorescens*.

El aislamiento de las proteínas de la membrana externa de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 se realizó de la manera descrita en el apartado III.2.2.2 de esta memoria. Con el fin de caracterizar dichas proteínas, los cinco sobrenadantes liofilizados resultantes de las sucesivas ultracentrifugaciones de las proteínas de la membrana externa de la cepa de *Ps. fluorescens* AH-70 se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Los resultados de la electroforesis se muestran en la figura IV.1. La línea B muestra las bandas electroforéticas correspondientes a las proteínas de la pared celular de *Ps. fluorescens* AH-70 presentes en el sobrenadante de la primera ultracentrifugación (sobrenadante 1) y cuyos pesos moleculares aparentes están comprendidos entre 7.500 y 74.000 daltones. Las líneas C, D y E (correspondientes a los sobrenadantes 2, 3 y 4), indican que las ultracentrifugaciones sucesivas eliminan las proteínas de la membrana citoplásmica y la mayor parte de las proteínas de la membrana externa. Finalmente, la última ultracentrifugación proporcionó un sobrenadante (sobrenadante 5) que sólo contenía dos proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 (líneas F y H). Estas dos proteínas se identificaron como F y H, al comparar sus pesos moleculares con los descritos por Yoshimura y col., (1983) para las mismas proteínas de *Ps. aeruginosa*. La línea A corresponde al electroferograma de proteínas estándar de pesos moleculares conocidos.

El protocolo descrito para la extracción de las proteínas F y H de *Ps. fluorescens* AH-70 se repitió con el resto de las cepas seleccionadas de *Ps. fluorescens* AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19. Conviene señalar que el rendimiento de cada extracción era muy pequeño, ya que de cada 4 litros de medio de cultivo inoculado con la correspondiente cepa de *Pseudomonas* se obtenían aproximadamente 10 mg de proteína. Por ello, la extracción tuvo que repetirse varias veces con cada cepa para obtener una concentración de proteína suficiente para los ensayos posteriores.

La figura IV.2 muestra la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de los sobrenadantes liofilizados de la última ultracentrifugación de las

proteínas de la membrana externa de las 6 cepas de *Ps. fluorescens* seleccionadas. En dicha figura se observa que las proteínas F y H se detectan en las seis cepas de *Ps. fluorescens* analizadas, lo que significa que pueden ser comunes a todas las cepas de *Ps. fluorescens*. Los pesos moleculares aparentes de las proteínas purificadas fueron de 17.532 daltones para la proteína H y de 33.052 daltones para la F.

#### **IV.2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA F DE *Ps. fluorescens* AH-70.**

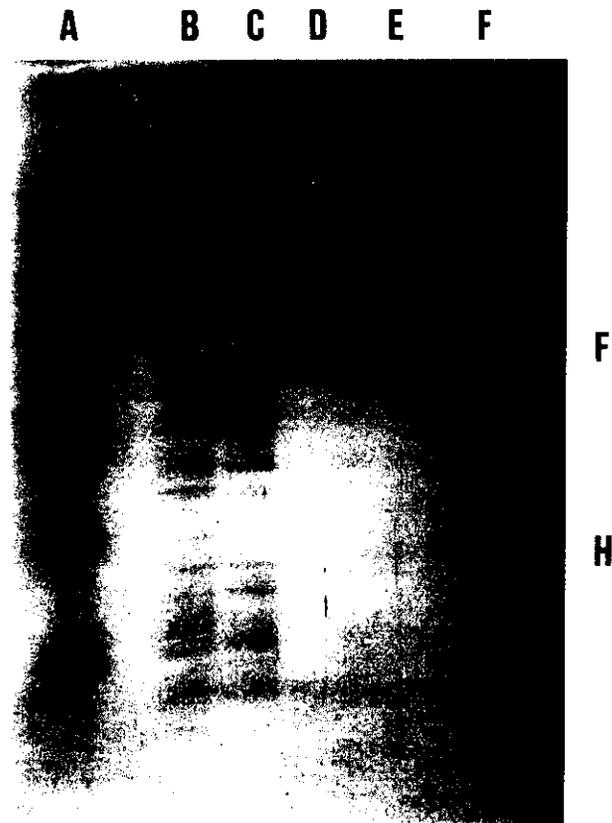
Una vez aisladas y caracterizadas las dos proteínas mayoritarias (proteínas F y H) de la membrana externa de varias cepas de *Ps. fluorescens*, se procedió a la purificación de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 por cromatografía de filtración en geles y a su caracterización por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

##### **IV.2.1. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GELES**

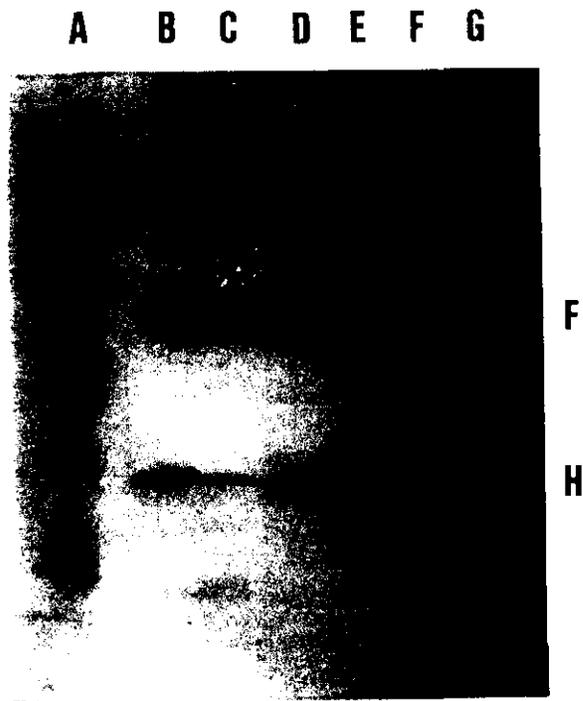
El sobrenadante que contenía las proteínas F y H de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 (sobrenadante 5) se purificó en una columna que contenía el gel de Sephacryl S-200. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.3, en la que se observa un pico de absorción máxima a 280 nm (A) seguido de otro de menor tamaño (B). Las fracciones correspondientes a cada pico, después de dializarse, se liofilizaron y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, con el fin de comprobar su grado de purificación.

##### **IV.2.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS**

Como se observa en la figura IV.4, los resultados obtenidos mostraron que la fracción cromatográfica del primer pico eluído contenía una proteína monomérica de un peso molecular aparente de 33.052 daltones, correspondiendo al de la proteína F de todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas.



*Figura IV.1.* Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas de membrana de *Ps. fluorescens* AH-70 (B). Las sucesivas fases de extracción eliminan las proteínas de la membrana citoplásmica y casi todas las de la membrana externa (C, D, E) permaneciendo el peptidoglicano asociado a las proteínas F y H, las cuales se solubilizaron con LDS que contenía LiCl 1M (F). Las proteínas estándar (A) fueron: seroalbúmina bovina (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (36 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), tripsinógeno (24 KDa), inhibidor de la tripsina de soja (20,1 KDa) y alfa-lactoalbúmina (14,2 KDa).



*Figura IV.2.* Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas F y H de la membrana externa de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (B), AR-11 (C), B-52 (D), DC-5 (E), DC-7 (F) y NT-19 (G). Proteínas estándar (A) como en la figura IV.1.

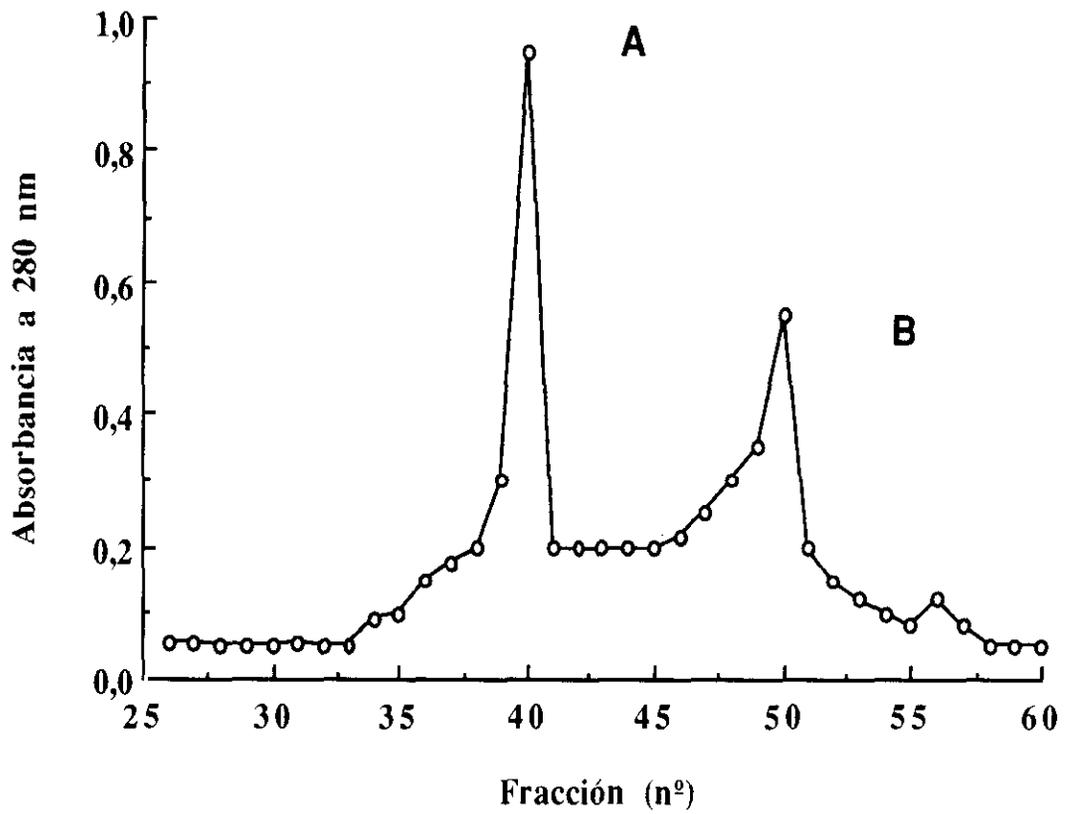


Figura IV.3. Purificación de las proteínas F y H de *Ps. fluorescens* AH-70 en un gel de Sephacryl S-200.



*Figura IV.4.* Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 (B), purificada y separada de la proteína H por cromatografía de filtración en gel. Las proteínas estándar (A) fueron como en la figura IV.1.

#### IV.3. ESTIMACION POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO DE LA CAPACIDAD DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-PROTEINA F (ANTI-PF) Y ANTI-PARED CELULAR (ANTI-PC) DE RECONOCER DIVERSAS CEPAS DE *Ps. fluorescens*

Para la obtención de los inmunosueros se emplearon dos lotes de 2 conejos cada uno. El primer lote se inmunizó con la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 y el segundo con células vivas de la misma cepa. No obstante, antes de comenzar el protocolo de inmunización, a los conejos se les extrajo una muestra de sangre y el suero obtenido se analizó por la técnica del ELISA indirecto frente a los extractos antigénicos de interés. Después de comprobar que ninguno de los conejos presentaba reactividad inmunológica frente a dichos extractos antigénicos, todos los animales se consideraron aptos para la inmunización.

Durante el proceso de inmunización de los conejos se realizaron 5 sangrías parciales y una final, para comprobar si los animales producían anticuerpos frente a la proteína F (anti-PF) y frente a las células vivas (anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70. De los resultados obtenidos (no mostrados) por la técnica de ELISA indirecto utilizada se dedujo que:

1) En las sangrías parciales efectuadas a los 21, 42 y 63 días de la primera inoculación, no se detectaba una reacción inmunológica significativa de los inmunosueros anti-PF y anti-PC con sus respectivos extractos antigénicos.

2) En las sangrías realizadas a los 84 y 105 días de la primera inoculación, se apreció un incremento significativo de la respuesta inmunológica de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés y por ello, a los 112 días se efectuó la sangría final.

Los inmunosueros anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70, procedentes de la sangría final, se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico y con una técnica de ELISA indirecto se estudió su potencial para reconocer diversas cepas de *Ps. fluorescens*. Después de varios ensayos preliminares, se establecieron las condiciones óptimas de trabajo;

fueron las siguientes:

- Antígenos: cultivos puros de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 en un tampón PBS estéril a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  ufc/ml, así como las mismas muestras sonicadas.

- Anticuerpos: los anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70 parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico y diluidos 1/2000 (v/v) en tampón PBST.

- Conjugado: uno comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas del cerdo y conjugadas al enzima peroxidasa de rábano (Dako), diluido 1/1500 (v/v) en tampón PBST.

#### IV.3.1. CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE CEPAS DE *Ps. fluorescens* POR EL INMUNOSUERO ANTI-PROTEINA F (ANTI-PF)

En las figuras IV.5 y IV.6 se reflejan los resultados obtenidos al estimar el potencial del inmunosuero anti-PF en el reconocimiento de diversas cepas de *Ps. fluorescens* mediante la técnica del ELISA indirecto. La figura IV.5 muestra los valores de absorbancia a 405 nm de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 en tampón PBS a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  ufc/ml; como puede apreciarse, los anticuerpos anti-PF no reconocen prácticamente a ninguna de las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas.

Para aumentar la sensibilidad del ensayo, las cepas de *Ps. fluorescens* inoculadas en tampón PBS se lisaron por sonicación. La figura IV.6 muestra que cuando los anticuerpos anti-PF se enfrentan a las cepas sonicadas de *Ps. fluorescens*, los valores de absorbancia a 405 nm son mayores que los correspondientes a las células intactas. Estos resultados indican que el tratamiento de las células con ultrasonidos determina que sea mayor el número de epítomos específicos expuestos a los anticuerpos anti-PF.

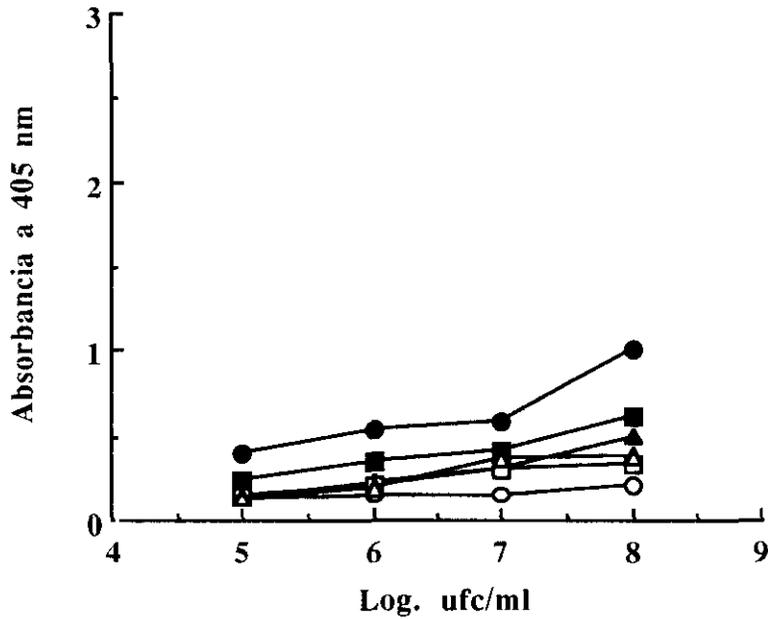


Figura IV.5. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en tampón PBS. Dilución del inmunosuero 1/2000. Dilución del conjugado 1/1500.

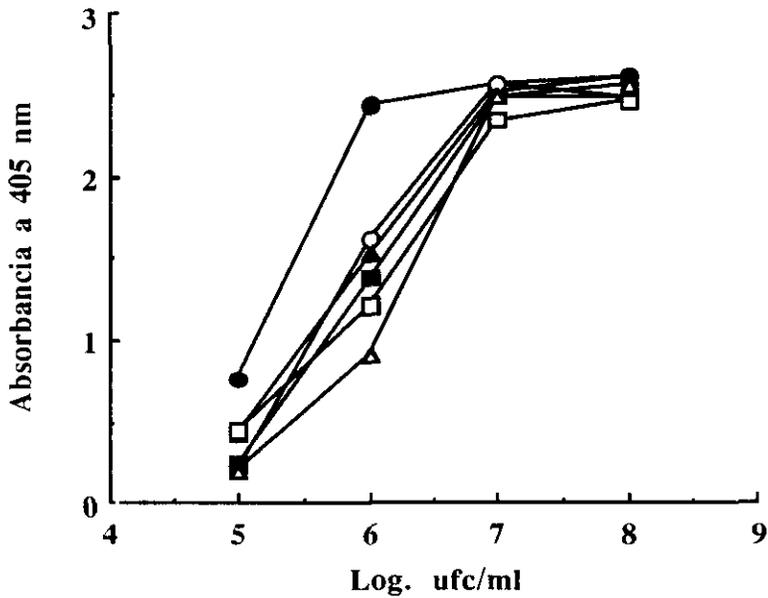


Figura IV.6. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en tampón PBS y sonicadas. El resto de los parámetros como en la figura IV.5.

#### IV.3.2. CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE CEPAS DE *Ps. fluorescens* POR EL INMUNOSUERO ANTI-PARED CELULAR (ANTI-PC)

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito para el inmunosuero anti-PF, se estudió la capacidad del inmunosuero anti-PC de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 en tampón PBS a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  ufc/ml; también se analizó su capacidad frente a las mismas cepas sometidas a un tratamiento de sonicación.

En la figura IV.7 se observa que los anticuerpos anti-PC reconocen todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas. Además, los resultados de la figura IV.8 indican que las células sonicadas de *Ps. fluorescens* son más fácilmente reconocidas por los anticuerpos anti-PC que las que no se someten a este tratamiento.

Del estudio de la capacidad de los inmunosueros anti-PF y anti-PC de reconocer diversas cepas de *Ps. fluorescens* mediante un ELISA indirecto, se deduce que:

1) Los anticuerpos anti-PF no reconocen prácticamente a ninguna de las cepas de *Ps. fluorescens* cuando se inoculan a distintas concentraciones en tampón PBS. Sin embargo, cuando las muestras se someten a sonicación sí las reconocen.

2) Los anticuerpos anti-PC reconocen la presencia de todas las cepas de *Ps. fluorescens* inoculadas en las muestras de tampón PBS; la sensibilidad del ensayo aumenta si las muestras se someten a sonicación.

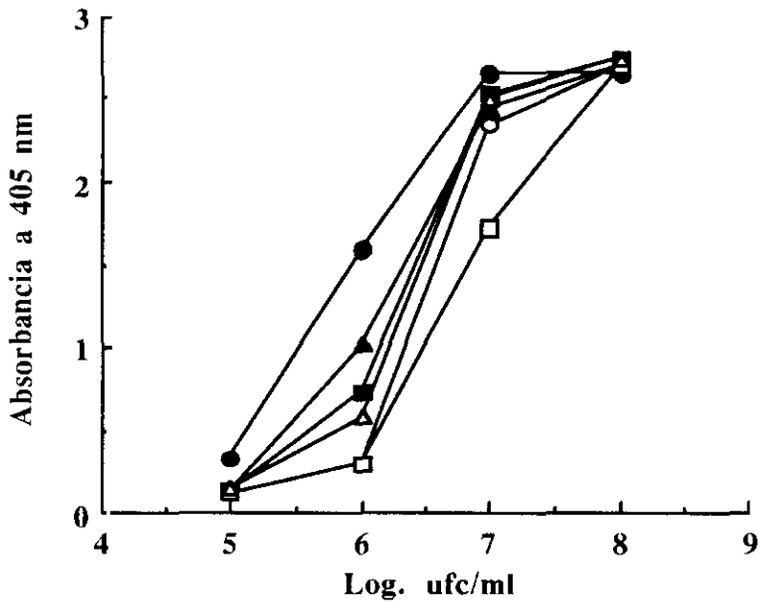


Figura IV.7. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en tampón PBS. Dilución del inmunosuero 1/2000. Dilución del conjugado 1/1500.

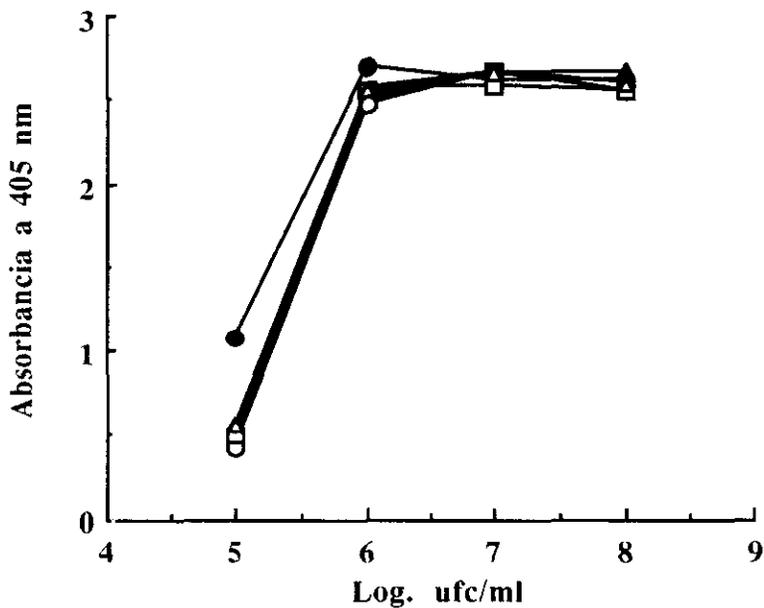


Figura IV.8. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en tampón PBS y sonicadas. El resto de los parámetros como en la figura IV.7.

#### IV.4. DETECCIÓN POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA

Los anticuerpos anti-PF y anti-PC se utilizaron en las técnicas del ELISA indirecto y del ELISA sandwich para estudiar su capacidad de reconocimiento de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas de la leche cruda refrigerada.

##### IV.4.1. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

Antes de desarrollar un ELISA indirecto para la detección y cuantificación de *Ps. fluorescens* y otras bacterias psicotrofas de la leche cruda refrigerada, se procedió a comprobar si mediante esta técnica, los anticuerpos anti-PF y anti-PC detectaban la presencia de *Ps. fluorescens* en muestras de leche UHT inoculadas experimentalmente con este microorganismo.

Para ello se realizó un ELISA indirecto en el que como antígenos se emplearon muestras de leche UHT inoculadas con un cultivo puro de la cepa de *Ps. fluorescens* AH-70 a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml. Como control se utilizaron muestras del mismo microorganismo inoculado en tampón PBS estéril.

En la figura IV.9 se observa que los anticuerpos anti-PF no reconocen la presencia de *Ps. fluorescens* AH-70 ni en las muestras de leche, ni en las de PBS analizadas. En cambio, los resultados de la figura IV.10 indican que los anticuerpos anti-PC reconocen la presencia de la cepa AH-70 de *Ps. fluorescens* a distintas concentraciones en el tampón PBS, pero no en la leche UHT.

Para aumentar la capacidad de reconocimiento de *Ps. fluorescens* AH-70 de la leche por los anticuerpos anti-PF y anti-PC, muestras de leche UHT inoculadas como queda dicho se sometieron a un tratamiento de sonicación. Los resultados obtenidos (que no hemos considerado necesario incluir), demostraron que los anticuerpos anti-PF y anti-PC no reconocían la cepa sonicada de *Ps. fluorescens* AH-70 en las muestras de leche analizadas.

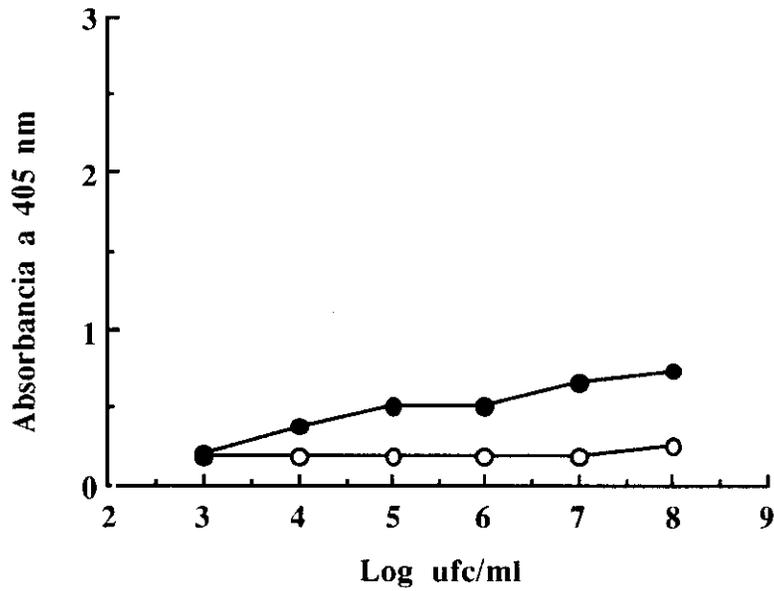


Figura IV.9. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer *Ps. fluorescens* AH-70 en tampón PBS (●) y en leche UHT (○). Dilución del anticuerpo 1/2000. Dilución del conjugado 1/1500.

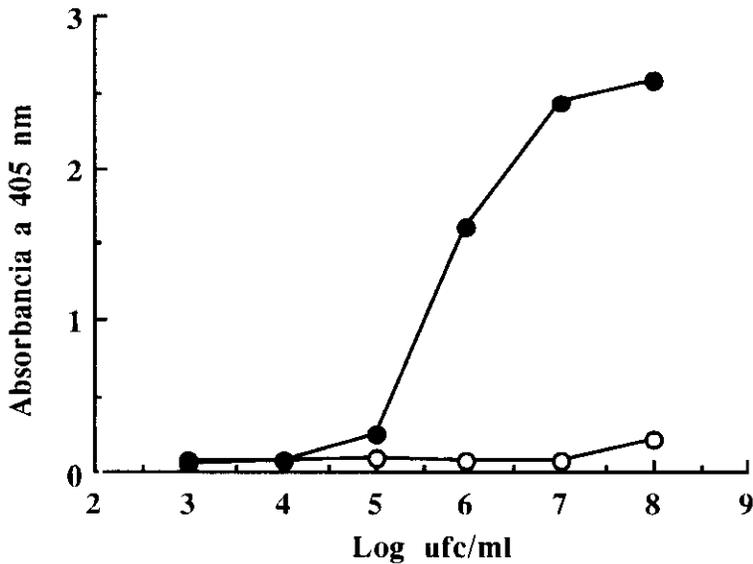


Figura IV.10. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer *Ps. fluorescens* AH-70 en tampón PBS (●) y en leche UHT (○). Dilución del anticuerpo 1/2000. Dilución del conjugado 1/1500.

Con el fin de comprobar si esta falta de capacidad de reconocimiento de *Ps. fluorescens* AH-70 en las muestras de leche por parte de los anticuerpos anti-PF y anti-PC se debía a la presencia de caseínas, proteínas del suero u otros componentes de la leche que, de algún modo, interferían en la reacción antígeno-anticuerpo, se realizaron nuevos ensayos utilizando como antígenos muestras de suero de leche y caseínas inoculadas con distintas concentraciones de *Ps. fluorescens* AH-70. Los resultados obtenidos (no mostrados) indicaron que los anticuerpos anti-PF y anti-PC tampoco detectaban la presencia de *Ps. fluorescens* en las muestras descritas.

Se pensó que quizá concentrando previamente los microorganismos de la leche mediante su centrifugación a 13.000 x g durante 10 min y a 4°C, se podría favorecer la detección de *Ps. fluorescens* por los anticuerpos anti-PF y anti-PC. Sin embargo, se comprobó que los anticuerpos anti-PF y anti-PC tampoco reconocían la cepa de *Ps. fluorescens* AH-70 de los sedimentos analizados.

Los resultados de las experiencias descritas en este apartado, permiten concluir que la técnica de ELISA indirecto no es útil en la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas de la leche, debido probablemente a que los distintos componentes lácteos interfieren en la fijación de los microorganismos a los pocillos de las placas de poliestireno.

#### IV.4.2. TECNICA DEL ELISA SANDWICH

Dada la ineficacia del ELISA indirecto en la detección de *Ps. fluorescens* en la leche cruda refrigerada, se procedió al desarrollo y puesta a punto de una técnica de ELISA sandwich.

En esta técnica se utilizaron como anticuerpos de captura los anticuerpos anti-PF y anti-PC purificados por precipitación con sulfato amónico y como anticuerpos de detección los mismos anticuerpos conjugados con la biotina. La detección del complejo antígeno-anticuerpo/biotina se efectuó con un conjugado comercial de estreptavidina marcado con el enzima peroxidasa de rábano.

#### **IV.4.2.1. Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo**

En primer lugar, se determinaron las concentraciones idóneas de los reactivos utilizados en los ensayos. Experiencias preliminares indicaron que la dilución idónea de los anticuerpos de captura (1 mg de proteína/ml) y de detección (1,15 mg de proteína/ml) era la de 1/1000. Asimismo se comprobó que la dilución óptima del conjugado de estreptavidina-peroxidasa era la de 1/3000.

Como antígenos, se emplearon muestras de leche UHT inoculadas con cultivos puros de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml y como control, se utilizó una muestra de leche UHT sin inocular. También se emplearon estas mismas muestras después de un tratamiento de sonicación y de lisis enzimática, así como muestras de leche cruda refrigerada sometidas a sonicación.

#### **IV.4.2.2. Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF)**

En este apartado se recogen los resultados obtenidos cuando se utilizan los anticuerpos anti-PF y la técnica del ELISA sandwich en la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas en la leche cruda refrigerada.

En primer lugar, se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti-PF en el reconocimiento de varias cepas de *Ps. fluorescens* en leche UHT. La figura IV.11 muestra los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA sandwich, al analizar muestras de leche UHT inoculadas con cultivos puros de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml. Como se observa, los anticuerpos anti-PF reconocen muy bien la presencia de la cepa AH-70 en las muestras de leche analizadas; los valores de absorbancia aumentan proporcionalmente con la concentración celular en el intervalo comprendido entre  $10^3$  y  $10^8$  ufc/ml, con un límite de detección aproximado para esta cepa de  $10^4$  ufc/ml. Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos anti-PF para reconocer la presencia del resto de las cepas inoculadas se reduce significativamente a niveles de  $10^6$  ufc/ml.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo, se realizó otra experiencia en la que la respuesta de los anticuerpos anti-PF frente a las muestras de leche UHT inoculadas con las cepas de *Ps. fluorescens*, se cuantificó tras una sonicación de las muestras de leche. En la figura IV.12 se aprecia que los valores de absorbancia frente a las muestras sonicadas eran mayores que los que se obtenían frente a las células intactas. No obstante, la especificidad de los anticuerpos anti-PF para reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras de leche sonicadas no mejoró sensiblemente, ya que el límite de detección de la cepa AH-70, así como del resto de las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas se mantuvo en  $10^4$  y  $10^6$  ufc/ml, respectivamente. Asimismo, las muestras de leche UHT inoculadas con las distintas cepas de *Ps. fluorescens* se analizaron por la técnica de ELISA sandwich, después de someterlas a un tratamiento enzimático con lisozima. Los resultados obtenidos (no mostrados) indicaron que la lisis enzimática fue menos eficaz que la sonicación para incrementar la sensibilidad de los anticuerpos anti-PF en la detección de las cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras de leche analizadas.

Una vez comprobada la especificidad de los anticuerpos anti-PF para detectar la presencia de diversas cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras de leche UHT, se procedió a su utilización en la detección y cuantificación de la flora psicrotrofa de la leche cruda refrigerada.

La figura IV.13 representa la evolución de los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y de los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica de ELISA sandwich en una muestra de leche cruda durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C. Como se observa, la absorbancia aumenta con los días de almacenamiento de la leche en refrigeración y muestra una evolución paralela al aumento de la carga bacteriana. A partir de los 3 días de almacenamiento a 4°C ya se detectan en la leche niveles de bacterias psicrotrofas próximos a  $10^6$  ufc/ml. Como se mencionaba en la introducción, esta concentración bacteriana en la leche cruda es suficiente para que la flora psicrotrofa comience a producir enzimas exocelulares, que originan posteriormente cambios organolépticos en las leches conservadas y en otros productos lácteos. Cuando la tasa de bacterias se situó por encima de las  $10^8$  ufc/ml, se dió por finalizado el recuento debido a que la leche cruda manifestaba signos objetivos de alteración. Por otra parte, la tasa inicial de bacterias psicrotrofas de la leche cruda no superó las  $10^3$  ufc/ml.

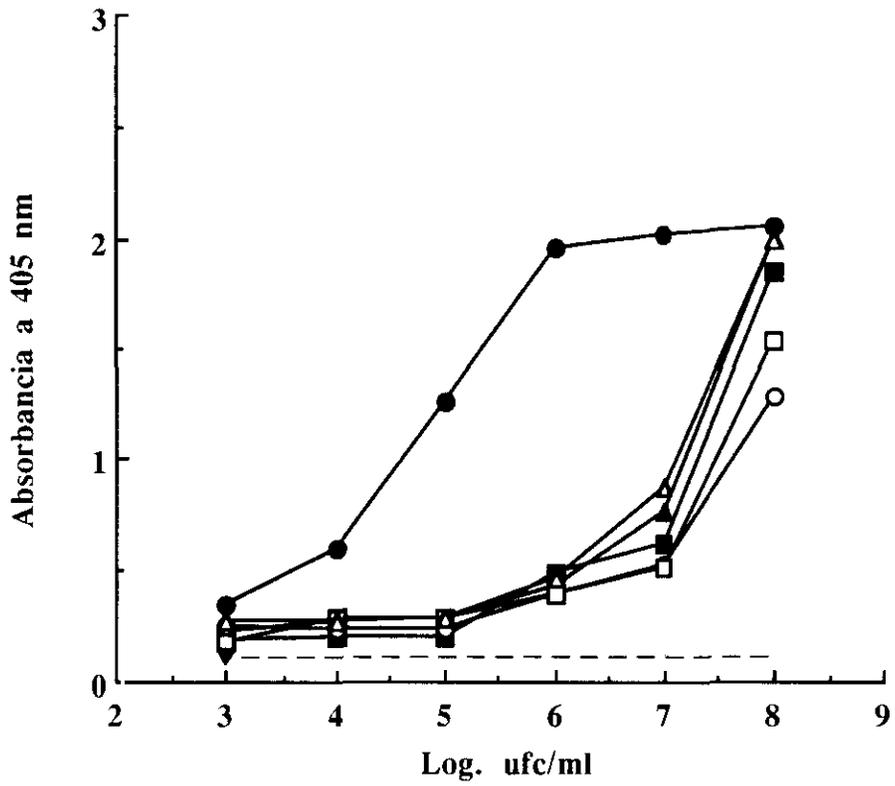


Figura IV.11. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en leche UHT. Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

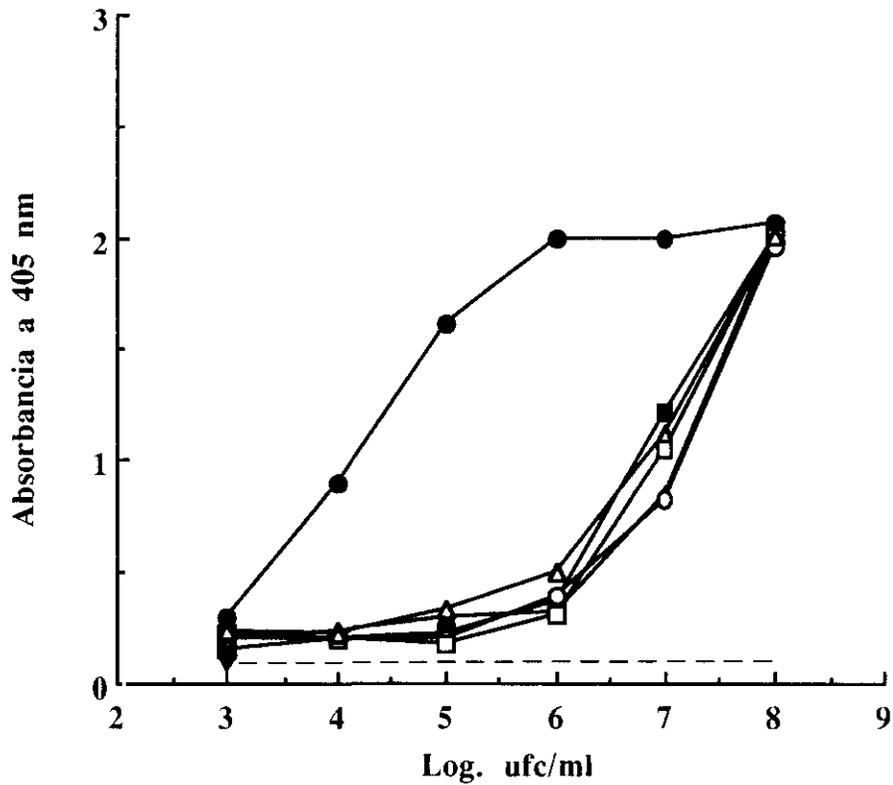
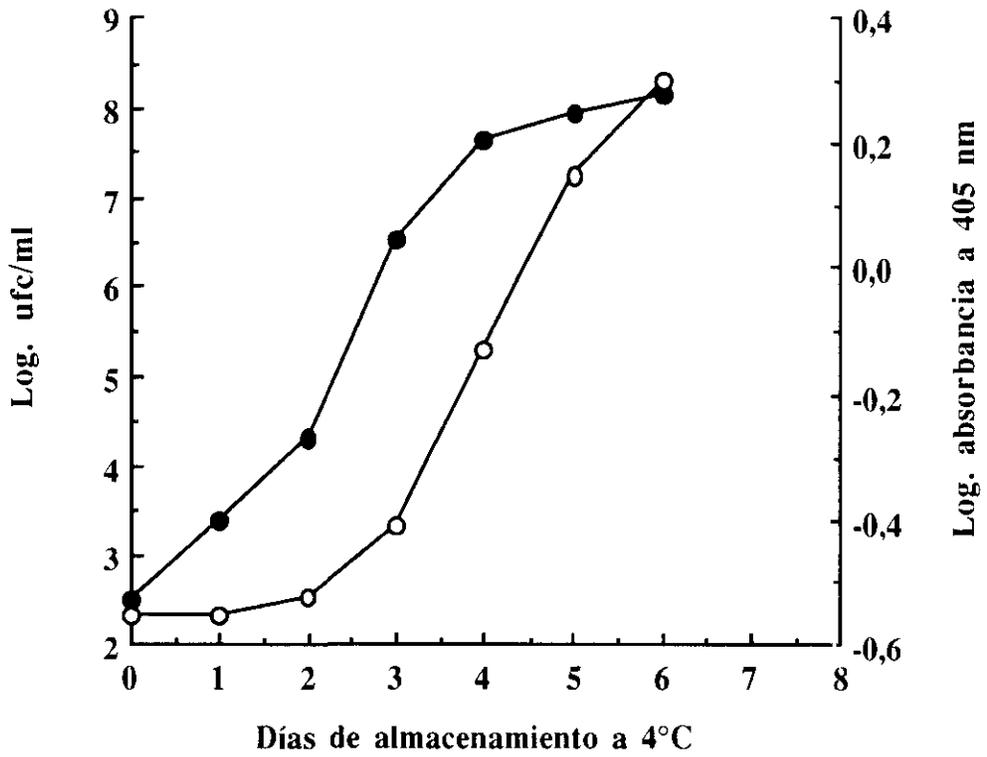


Figura IV.12. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en leche UHT y sonicadas. Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.



*Figura IV.13.* Evolución de los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas (●) y de los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica de ELISA sandwich (○) en una muestra de leche cruda durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C. Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección (anti-PF). Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos anti-PF en la detección y cuantificación de los microorganismos psicotrofos que proliferan en la leche durante su almacenamiento en refrigeración, se desarrolló un ELISA sandwich que permitiese establecer la relación entre los recuentos bacterianos de las muestras de leche cruda y la absorbancia a 405 nm de dichas muestras sonicadas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.14. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia a 405 nm de seis experiencias distintas realizadas con dos muestras diferentes de leche cruda. De estos resultados se deduce que con los reactivos utilizados y la técnica de ELISA sandwich descrita, es posible cuantificar el contenido de bacterias psicotrofas de la leche cruda, en el intervalo de  $10^5$ - $10^9$  ufc/ml, mediante la ecuación:

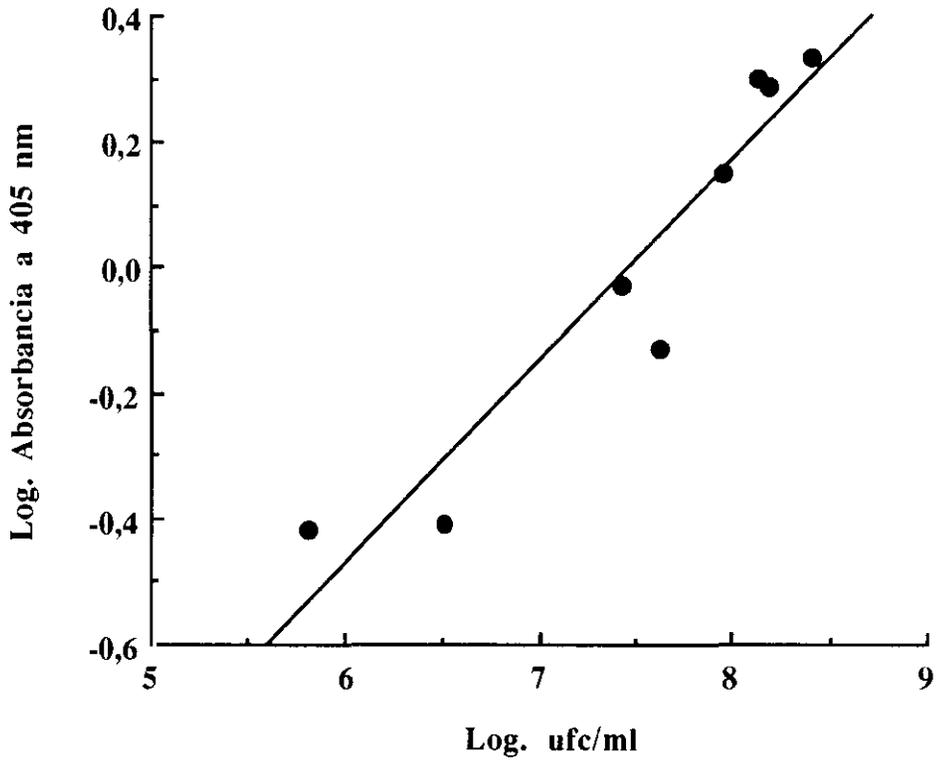
$$\text{Log. absorbancia } 405 \text{ nm} = -2,3908 + 0,3197 \log (B),$$

cuyo coeficiente de regresión fue de  $r^2 = 0,90$  y el coeficiente de regresión ajustado de  $\text{Adj.}r^2 = 0,88$  ( $p = 0,0003$ ), siendo B el contenido de bacterias psicotrofas por ml de leche.

También se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti-PF para reconocer la presencia de diversas bacterias psicotrofas en leche UHT. Los microorganismos analizados fueron *Ps. fluorescens* AH-70, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fragi*, *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp, *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Klebsiella* sp., y *Enterobacter* sp. Los resultados de la figura IV.15 indican que los anticuerpos anti-PF reconocen únicamente las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, *Ps. aeruginosa* y *Ps. fragi*. La incapacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer al resto de las bacterias psicotrofas utilizadas sugiere que la proteína F, aislada de *Ps. fluorescens* AH-70, es específica del género *Pseudomonas*. No obstante, los anticuerpos anti-PF permiten cuantificar la flora psicotrofa de la leche cruda ya que, como se indicaba en la introducción de esta memoria, la mayoría son bacterias Gram-negativas, de las que alrededor del 90% pertenecen al género *Pseudomonas*.

$$y = -2,3908 + 0,3197 x; \quad r^2 = 0,90; \text{Adj.}r^2 = 0,88$$

$$(p = 0,0003)$$



*Figura IV.14.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA sandwich en muestras de leche cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección (anti-PF). Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con dos muestras diferentes de leche cruda.

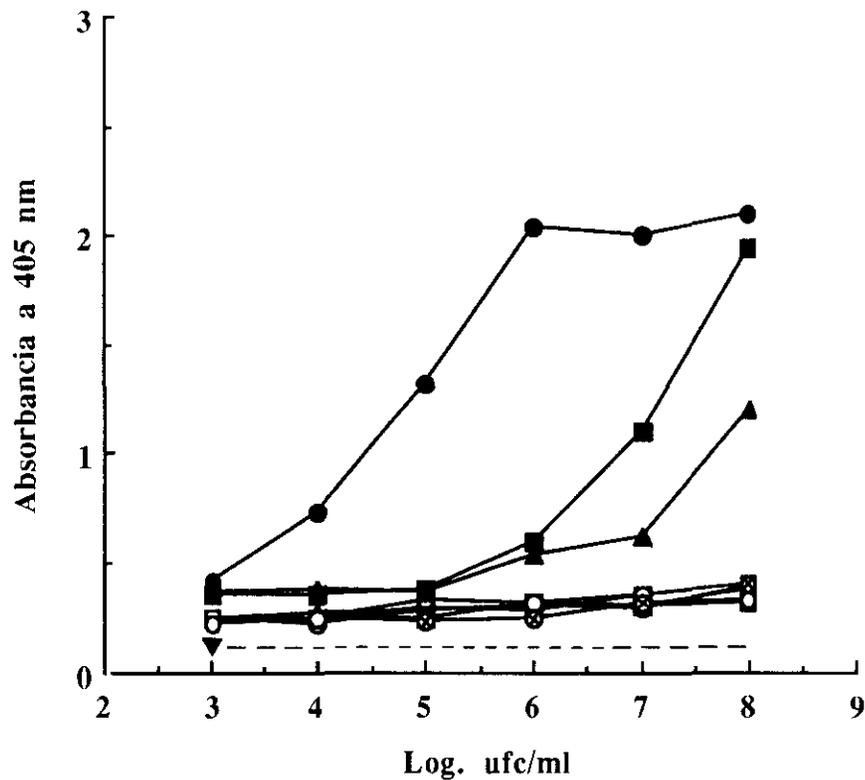


Figura IV.15. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer muestras de leche UHT inoculadas con cultivos puros de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), *Ps. aeruginosa* (■), *Ps. fragi* (▲), *Flavobacterium* sp. (○), *Achromobacter* sp. (□), *Acinetobacter* sp. (Δ), *Alcaligenes* sp. (⊞), *Klebsiella* sp. (⊙) y *Enterobacter* sp. (⊗). Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Nota: Los datos referentes a *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp. y *Klebsiella* sp. se ocultan tras los de *Flavobacterium* sp. y *Enterobacter* sp., por lo que no se pueden diferenciar en la figura

#### IV.4.2.2. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC)

Para establecer la especificidad de los anticuerpos anti-PC en la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la leche cruda refrigerada, se desarrolló un ELISA sandwich, siguiendo un protocolo experimental similar al descrito en el apartado anterior.

En la figura IV.16 se muestran los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de leche UHT inoculadas con seis cepas de *Ps. fluorescens* a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/ml. Los anticuerpos anti-PC reconocen la presencia de la cepa AH-70 en las muestras de leche analizadas desde niveles de  $10^4$  ufc/ml, mientras que su capacidad de reconocer al resto de las cepas solo acaece a partir de las  $10^5$  ufc/ml. La sonicación de las muestras de leche inoculadas con las cepas de *Ps. fluorescens* (Fig. IV.17) mejoró notablemente la sensibilidad del ensayo, ya que el límite de detección conseguido fue de  $10^4$  ufc/ml para todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas. Los valores de absorbancia a 405 nm de las células bacterianas lisadas enzimáticamente (resultados no mostrados) fueron inferiores a los obtenidos cuando se rompieron por sonicación. En consecuencia, dado que la sonicación proporcionaba una ruptura celular más eficaz que la lisis enzimática, el último tratamiento se excluyó en la preparación de las muestras de experiencias posteriores.

Para la detección y cuantificación de la flora psicrotrofa de la leche cruda refrigerada también se emplearon los anticuerpos anti-PC en la técnica del ELISA sandwich. La figura IV.18 muestra la relación lineal obtenida al representar los valores de los recuentos en placa de las bacterias psicrotrofas de la leche cruda, en función de los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de leche sonicadas. De los resultados obtenidos se deduce que la utilización de los anticuerpos anti-PC en la técnica del ELISA sandwich permite cuantificar la flora psicrotrofa de la leche cruda, en el intervalo de  $10^5$ - $10^9$  ufc/ml, mediante la ecuación:

$$\text{Log. absorbancia}_{405 \text{ nm}} = -2,4105 + 0,3519 \log (B),$$

que presenta un coeficiente de regresión de  $r^2 = 0,97$  y un coeficiente de regresión ajustado de  $\text{Adj.}r^2 = 0,96$  ( $p = 0,0001$ ), siendo (B) el contenido de

bacterias psicrotrofas por ml de leche.

También se determinó la especificidad de los anticuerpos anti-PC para reconocer otras bacterias psicrotrofas. Los resultados obtenidos (Fig. IV.19) indicaron que los anticuerpos anti-PC reconocen, además de las cepas del género *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens* AH-70, *Ps. aeruginosa* y *Ps. fragi*), otras bacterias psicrotrofas; sin embargo, la especificidad de los anticuerpos anti-PC no es homogénea en todos los casos.

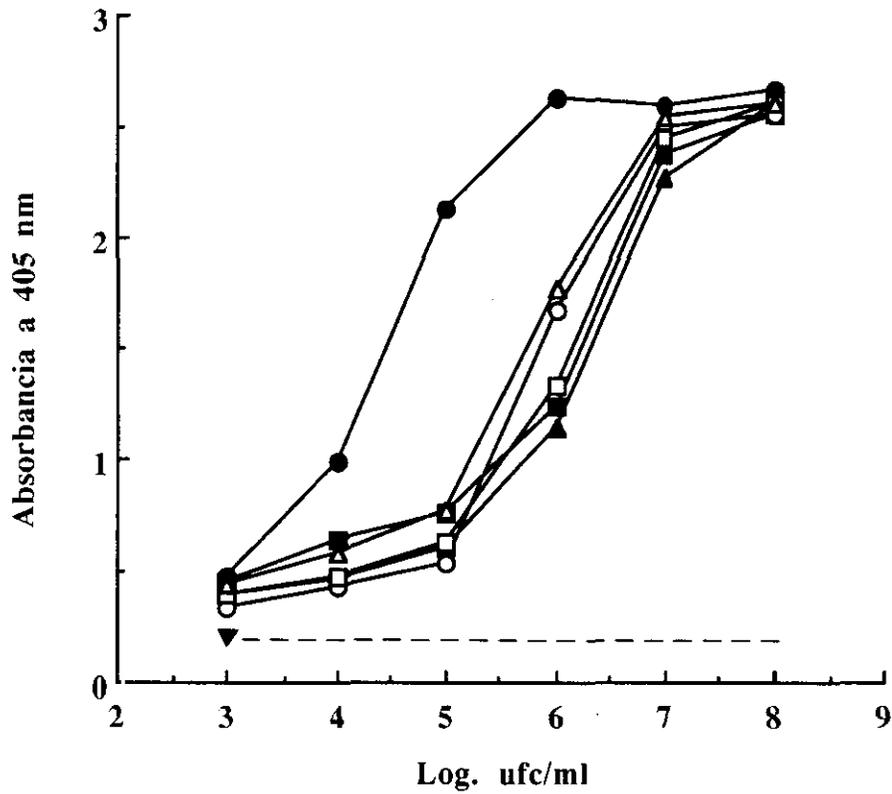


Figura IV.16. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en leche UHT. Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

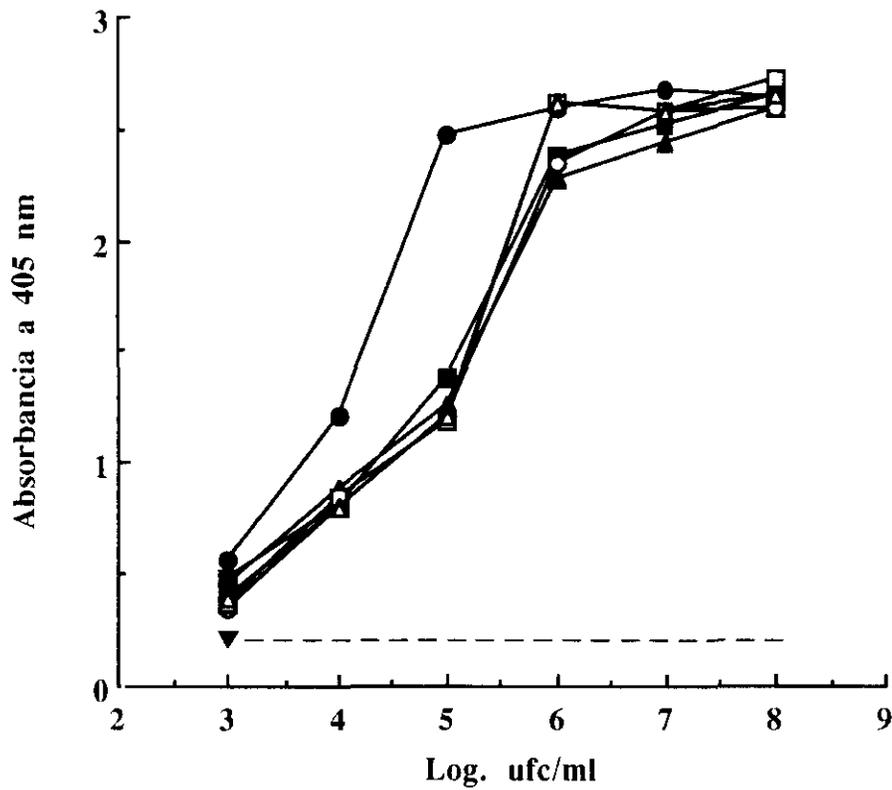
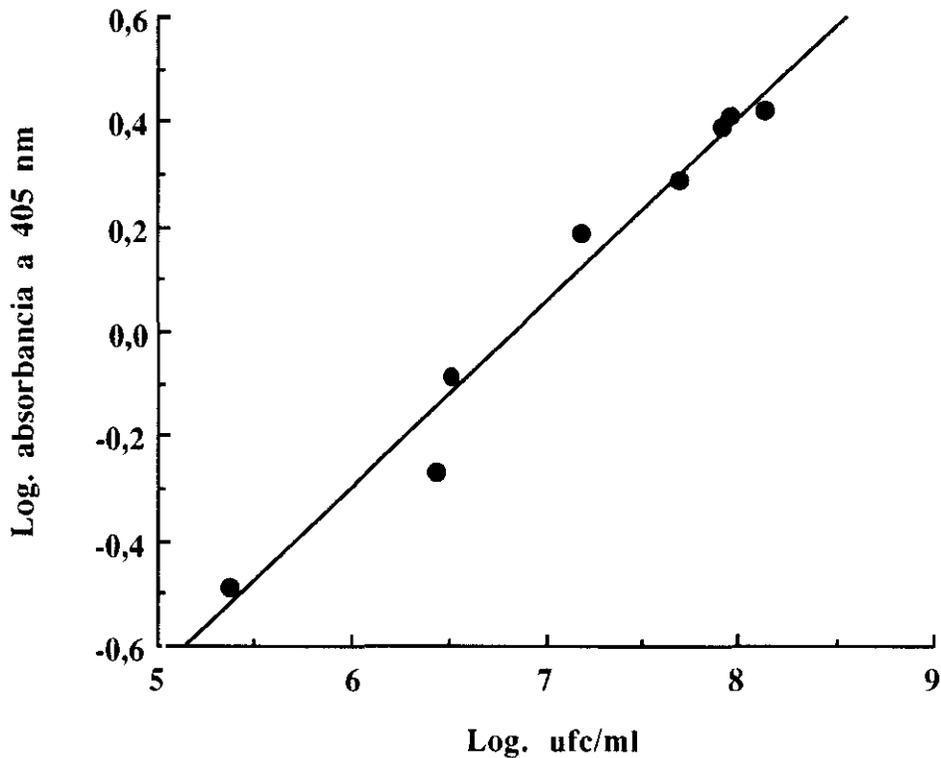


Figura IV.17. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), AR-11 (■), B-52 (▲), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (△) en leche UHT y sonicadas. Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa

$$y = -2,4105 + 0,3519 x; \quad r^2 = 0,97; \text{Adj.}r^2 = 0,96 \\ (p = 0,0001)$$



*Figura IV.18.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA sandwich en muestras de leche cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección (anti-PC). Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con dos muestras diferentes de leche cruda.

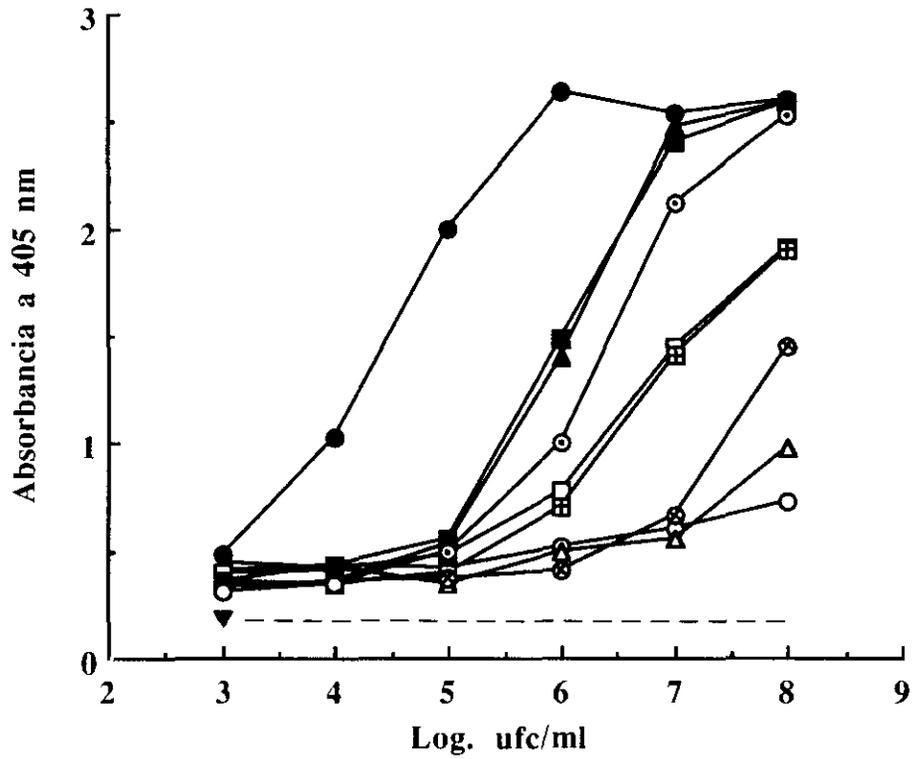


Figura IV.19. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer muestras de leche UHT inoculadas con cultivos puros de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), *Ps. aeruginosa* (■), *Ps. fragi* (▲), *Flavobacterium* sp. (○), *Achromobacter* sp. (□), *Acinetobacter* sp. (Δ), *Alcaligenes* sp. (⊞), *Klebsiella* sp. (⊙) y *Enterobacter* sp. (⊗). Control de leche UHT sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

#### **IV.5. DETECCIÓN POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA CARNE CRUDA REFRIGERADA**

En las experiencias con el ELISA indirecto y con el sandwich, seguidas para la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas de la carne cruda refrigerada, se emplearon los anticuerpos anti-PF y anti-PC; se siguió un procedimiento similar al descrito para las muestras de leche. Brevemente, los objetivos a desarrollar son los siguientes:

(A) Determinar la especificidad de los inmunosueros anti-PF y anti-PC para reconocer la presencia de diversas cepas de *Ps. fluorescens* en muestras de carne estéril inoculadas experimentalmente.

(B) Comprobar si la sonicación de las muestras aumenta la capacidad de los anticuerpos anti-PF y anti-PC de reconocer las distintas cepas de *Ps. fluorescens*.

(C) Estudiar si los anticuerpos anti-PF y anti-PC pueden emplearse para cuantificar la presencia de bacterias psicotrofas en muestras de carne cruda mantenidas en refrigeración.

##### **IV.5.1. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO UTILIZANDO EL SISTEMA DE AMPLIFICACION BIOTINA-AVIDINA**

En esta técnica, los anticuerpos anti-PF y anti-PC se conjugaron con la biotina y la detección de los anticuerpos biotinizados unidos a sus antígenos específicos se realizó empleando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

##### **IV.5.1.1. Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo**

Las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en los ensayos se determinaron tras varias experiencias preliminares, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.6.3.1.2. Los resultados obtenidos indicaron que la dilución más apropiada de los anticuerpos anti-PF y anti-PC biotinizados era la de 1/500, mientras que la del conjugado de estreptavidina-peroxidasa fue la

de 1/1500.

Como antígenos, se utilizaron muestras de carne cruda estéril que se inocularon con cultivos puros de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, DC-5, DC-7 y NT-19 a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, y como control se utilizó carne cruda estéril sin inocular. También se utilizaron estas muestras, así como las de carne cruda refrigerada, después de sometidas a un tratamiento de sonicación .

#### IV.5.1.2. Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF)

La figura IV.20 muestra los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de carne cruda estéril inoculadas con las cepas de *Ps. fluorescens* citadas. Utilizando los reactivos descritos y la técnica del ELISA indirecto, los anticuerpos anti-PF reconocen la presencia de las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* analizadas con una especificidad parecida. También se observa un aumento de la absorbancia proporcional a la concentración de bacterias, en el intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup>, con un límite de detección aproximado de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo, las muestras de carne estéril inoculadas con las cepas de *Ps. fluorescens* se analizaron después de su sonicación (Fig. IV.21). De los resultados obtenidos se desprende que los anticuerpos anti-PF reconocen mejor las cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras sonicadas, que en las que no lo fueron. No obstante, la sonicación no logró mejorar el límite de detección conseguido con las muestras no sonicadas.

Posteriormente se estudió la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos anti-PF en la detección y cuantificación de las bacterias psicrotrofas de la carne cruda refrigerada. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.22, donde se observa la relación existente entre los recuentos de bacterias psicrotrofas por cm<sup>2</sup> de carne cruda (B) y la absorbancia a 405 nm de las muestras de carne sonicadas. Cada punto de la gráfica representa la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con cuatro muestras diferentes de carne cruda. De estos resultados se deduce que con los reactivos descritos y la técnica del ELISA indirecto

desarrollada, es posible cuantificar la tasa de bacterias psicrotrofas de la carne cruda refrigerada, en el intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup>, mediante la ecuación:

$$\text{Log. absorbancia} = -1,4073 + 0,1955 \log (B),$$

que presentó un coeficiente de regresión de  $r^2 = 0,89$  y un coeficiente de regresión ajustado de  $\text{Adj.}r^2 = 0,88$  ( $p = 0,0001$ ), siendo (B) el contenido de bacterias psicrotrofas por cm<sup>2</sup> de carne.

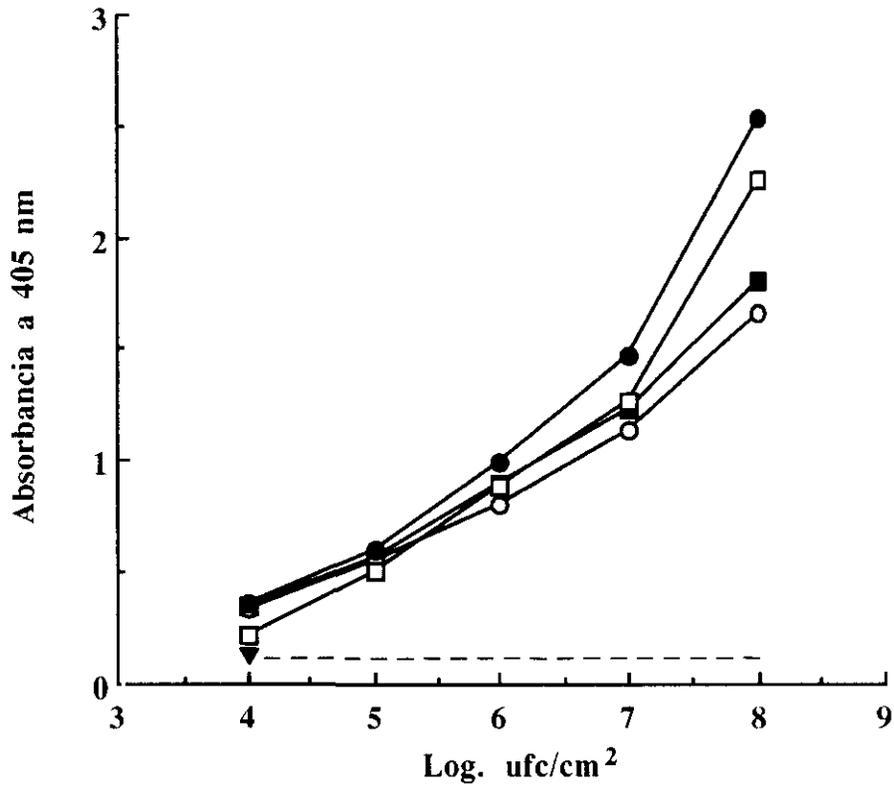


Figura IV.20. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PF biotinizados de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/500 del inmunosuero. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

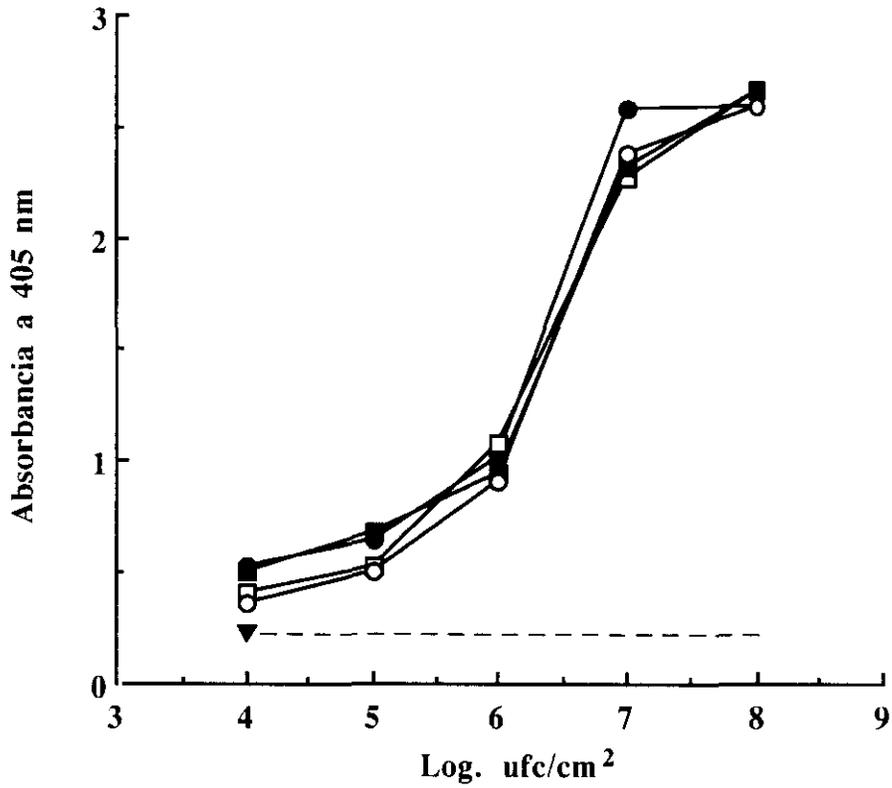
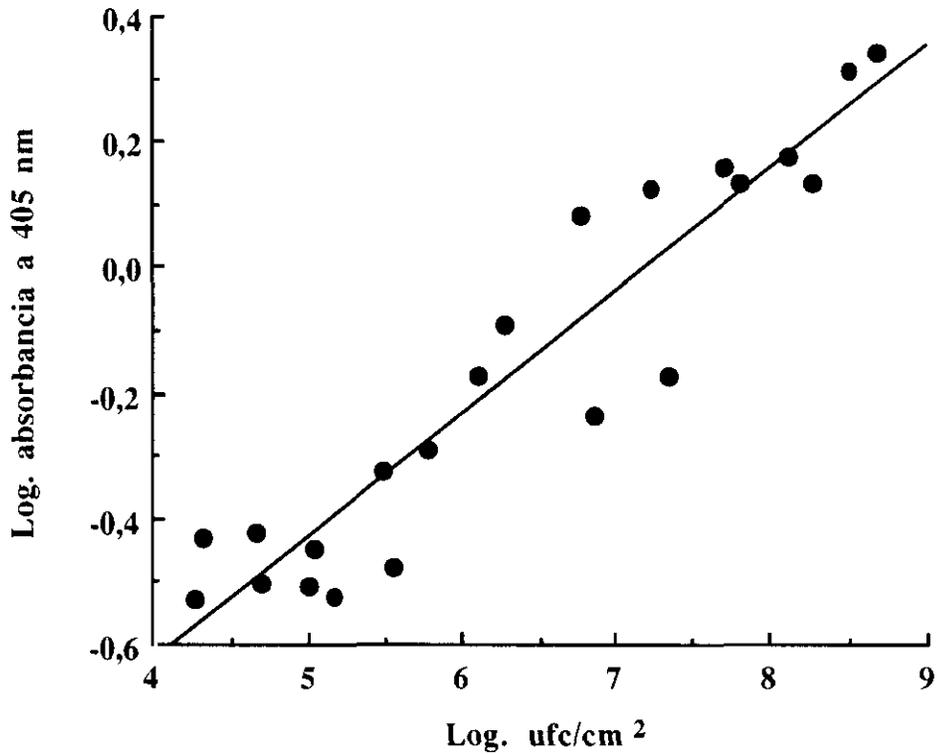


Figura IV.21. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PF biotinizados de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril y sonicadas. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/500 del inmunosuero. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

$$y = -1,4073 + 0,1955 x; \quad r^2 = 0,89; \text{Adj.}r^2 = 0,88 \\ (p = 0,0001)$$



*Figura IV.22.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA indirecto en muestras de carne cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/500 de los anticuerpos biotinizados anti-PF. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con cuatro muestras diferentes de carne refrigerada.

#### IV.5.1.2. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC)

Los resultados del ELISA indirecto de la figura IV.23 indican que los anticuerpos anti-PC también reconocen, prácticamente con la misma especificidad, las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* analizadas. El límite de detección de todas ellas fue de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>. Asimismo, la figura IV.24 muestra los valores de absorbancia obtenidos a 405 nm con las muestras de carne cruda estéril inoculadas con las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* y sometidas a sonicación. De los resultados obtenidos se deduce que la sonicación mejora la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer la presencia de dichas cepas en las muestras de carne analizadas.

La técnica del ELISA indirecto también se utilizó para determinar la utilidad de los anticuerpos anti-PC en la detección y cuantificación de la tasa de bacterias psicrotrofas de los filetes de carne cruda refrigerados a 4°C (Fig. IV.25). La ecuación que relaciona los recuentos de bacterias psicrotrofas por cm<sup>2</sup> de carne cruda (B) y la absorbancia a 405 nm de las muestras sonicadas, en el intervalo de  $10^4$ - $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup>, es la siguiente:

$$\text{Log. absorbancia} = -1,3782 + 0,1974 \log (B),$$

con un coeficiente de regresión de  $r^2 = 0,93$  y un coeficiente de regresión ajustado (Adj. $r^2$ ) de 0,93 ( $p = 0,0001$ ).

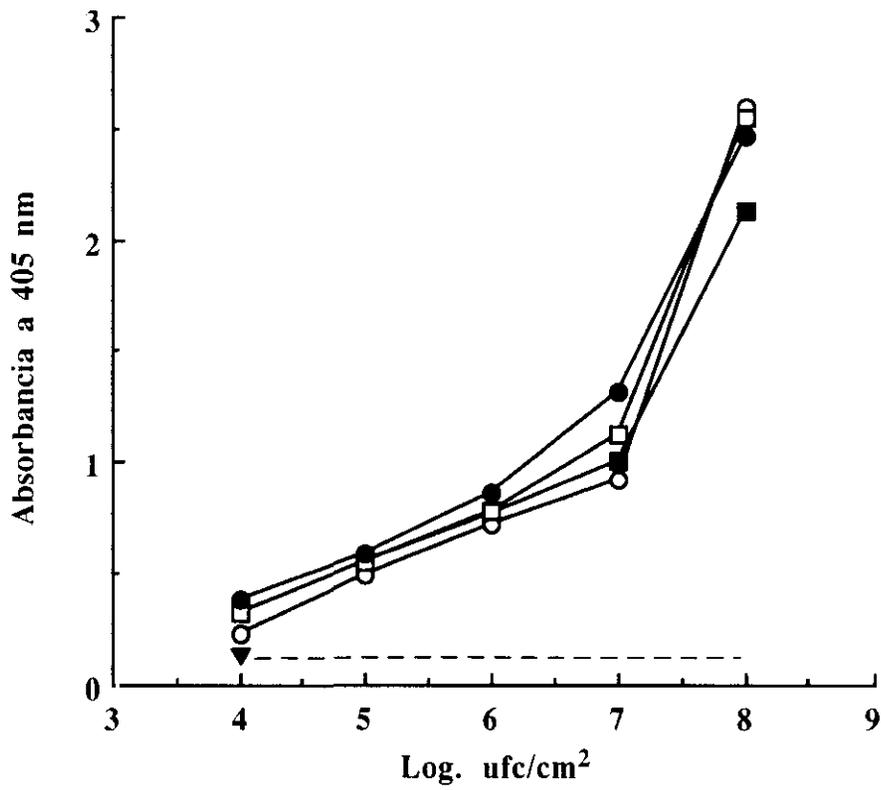


Figura IV.23. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PC biotinizados de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/500 del inmunosuero. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

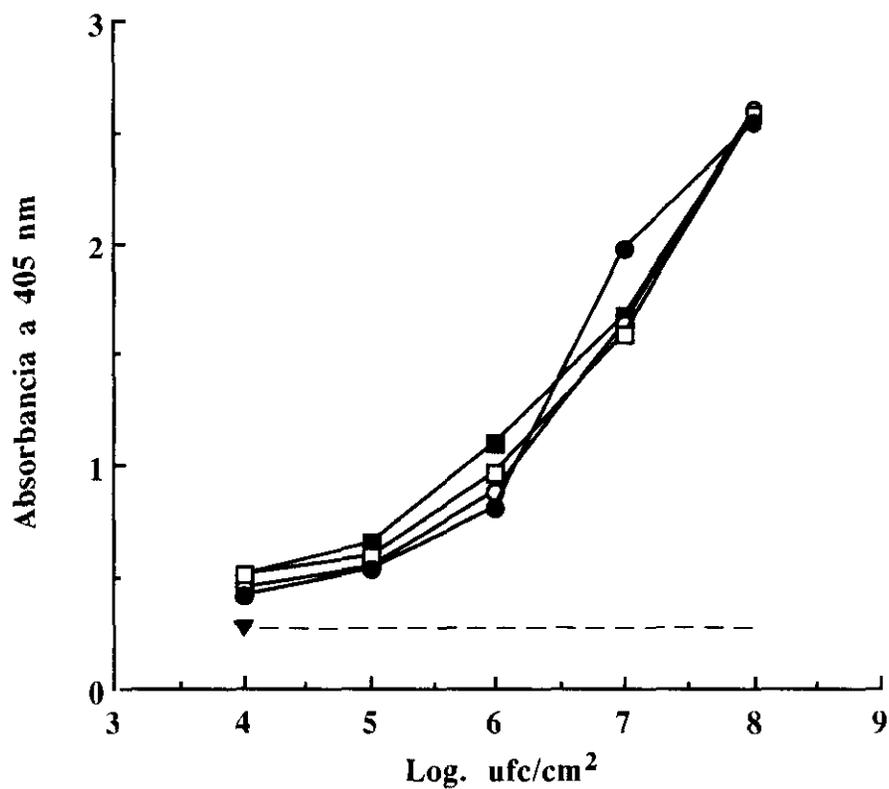
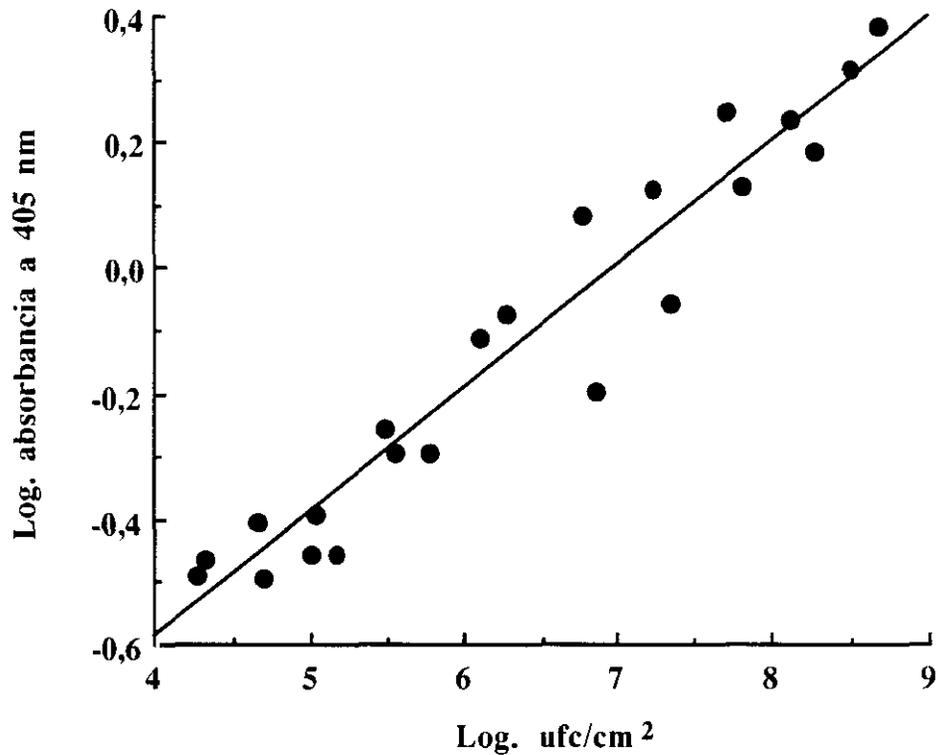


Figura IV.24. Estimación por un ELISA indirecto de la capacidad de los anticuerpos anti-PC biotinizados de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril y sonicadas. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/500 del inmunosuero. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

$$y = -1,3782 + 0,1974 x; \quad r^2 = 0,93; \text{Adj.}r^2 = 0,93 \\ (p = 0,0001)$$



*Figura IV.25.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA indirecto en muestras de carne cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/500 de los anticuerpos biotinizados anti-PC. Dilución 1/1500 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con cuatro muestras diferentes de carne refrigerada.

#### IV.5.2. TECNICA DEL ELISA SANDWICH

Para la detección y cuantificación de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la carne cruda refrigerada, también se desarrolló un ELISA sandwich.

##### IV.5.2.1. **Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo**

Tras realizar algunas experiencias previas, se comprobó que la dilución óptima de los anticuerpos de captura y de detección era la de 1/1000 y la de 1/250, respectivamente. Asimismo, la dilución óptima del conjugado se estableció en 1/3000.

Los antígenos empleados en el ensayo fueron 1) las muestras de carne cruda estéril inoculadas con distintas concentraciones de varias cepas de *Ps. fluorescens*; 2) las mismas muestras sonicadas y 3) las muestras sonicadas de carne comercial refrigerada.

##### IV.5.2.2. **Anticuerpos anti-proteína F (anti-PF)**

En la figura IV.26 se muestran los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica de ELISA sandwich al analizar las muestras de carne estéril inoculadas con cultivos puros de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, DC-5, DC-7 y NT-19 a las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>. Como puede apreciarse, los anticuerpos anti-PF detectan la presencia de las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* estudiadas con una sensibilidad similar, siendo su límite de detección de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

En la figura IV.27 se observa que cuando se enfrentan los anticuerpos anti-PF a las distintas cepas sonicadas de *Ps. fluorescens*, los valores de absorbancia a 405 nm son mayores que los que se obtienen frente a las células intactas. No obstante, el límite de detección para todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas se mantiene en  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Finalmente, la figura IV.28 muestra la relación existente entre los recuentos en placa de las bacterias psicrotrofas de las muestras de carne cruda

refrigeradas a 4°C y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos con el ensayo del ELISA sandwich en las muestras sonicadas. Estos dos parámetros se relacionan en el intervalo de  $10^5$ - $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup> mediante la ecuación:

$$\text{Log. absorbancia} = -1,6992 + 0,2508 \log (B),$$

que presentó un coeficiente de regresión de  $r^2 = 0,91$  y un coeficiente de regresión ajustado de  $\text{Adj.}r^2 = 0,90$  ( $p = 0,0001$ ), siendo (B) el contenido de bacterias psicrotrofas por cm<sup>2</sup> de carne. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con cuatro muestras diferentes de carne cruda refrigerada.

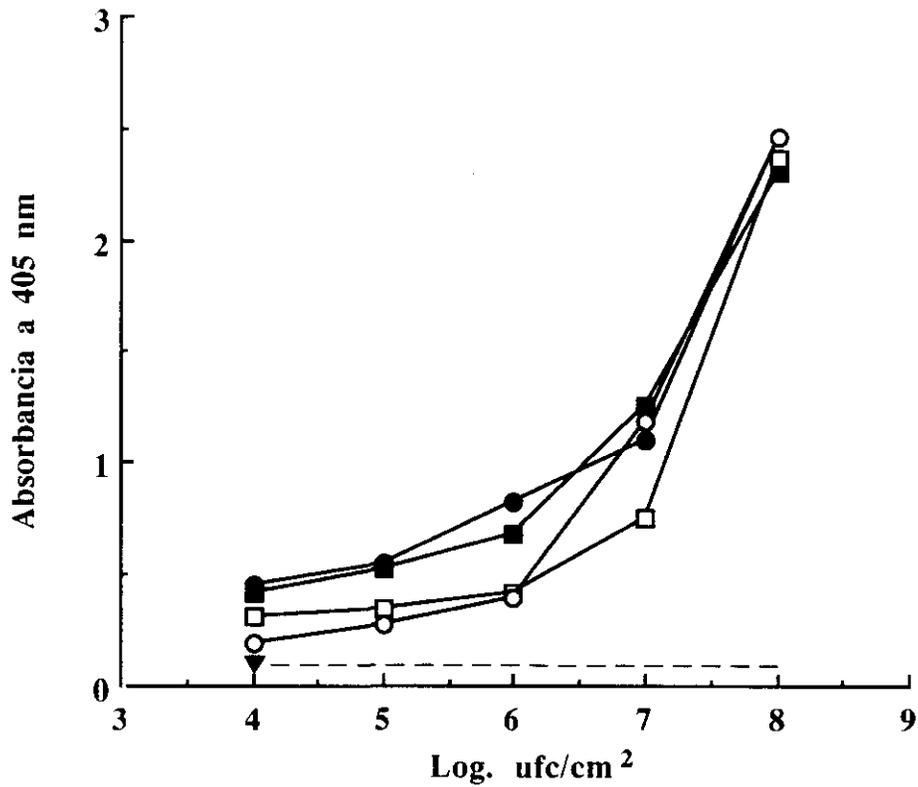


Figura IV.26. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

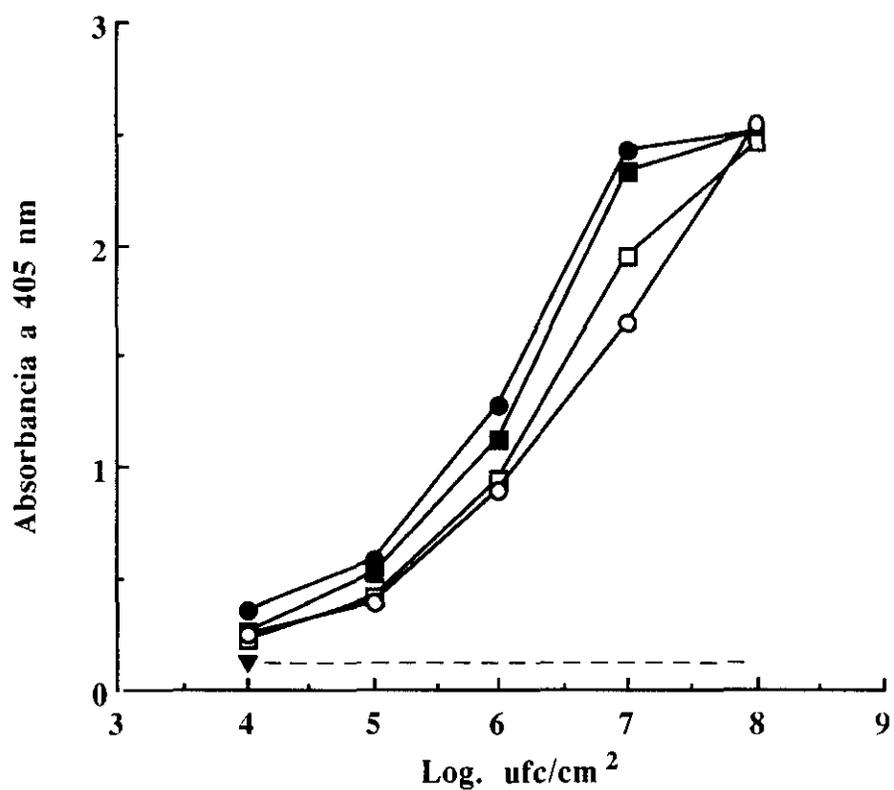
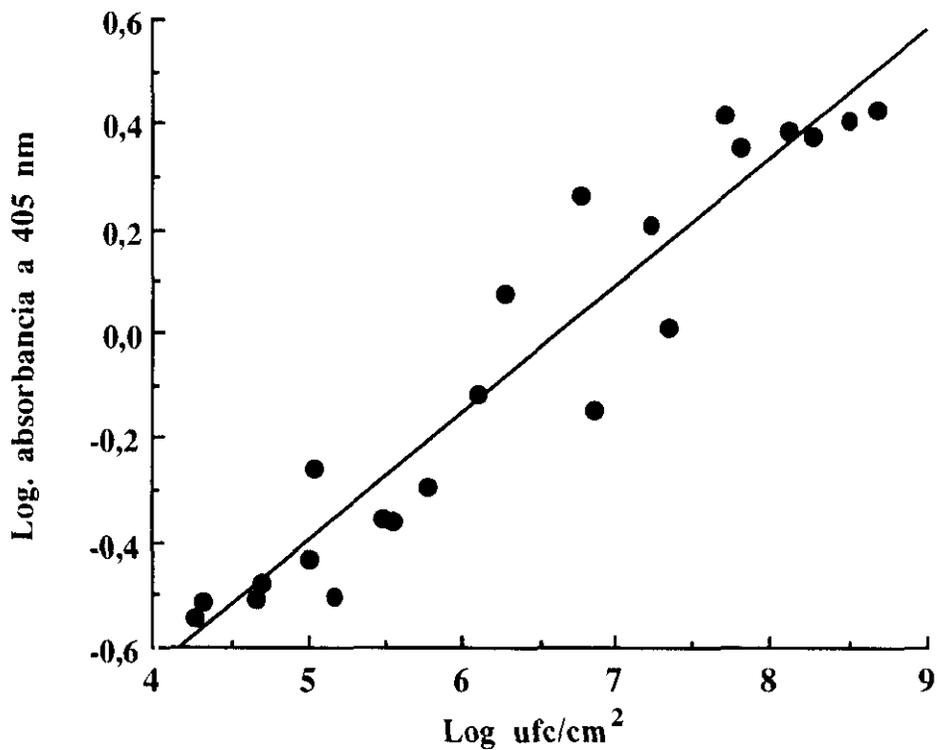


Figura IV.27. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 ( ● ), DC-5 ( ○ ), DC-7 ( □ ) y NT-19 ( ■ ) en carne cruda estéril y sonicadas. Control de carne estéril sin inóculo ( ▼ ). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

$$y = -1,6992 + 0,2508 x; \quad r^2 = 0,91; \text{Adj.}r^2 = 0,90 \\ (p = 0,0001)$$



*Figura IV.28.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA sandwich en las muestras de carne cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección anti-PF. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias distintas realizadas con cuatro muestras diferentes de carne refrigerada.

#### IV.5.2.3. Anticuerpos anti-pared celular (anti-PC)

Los resultados del ELISA sandwich de la figura IV.29 indican que los anticuerpos anti-PC también reconocen con la misma especificidad la presencia de las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* analizadas, con un límite de detección de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>. La figura IV.30 muestra los valores de la absorbancia a 405 nm de las muestras de carne cruda estéril inoculadas con las cuatro cepas de *Ps. fluorescens* y sometidas a sonicación. Se observa que la sonicación mejora la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer la presencia de dichas cepas en las muestras de carne analizadas.

Por último, la figura IV.31 refleja la relación existente entre los recuentos en placa de las bacterias psicrotrofas de las muestras de carne cruda refrigerada y los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras sonicadas cuando se emplean los anticuerpos anti-PC y la técnica del ELISA sandwich. A partir de los resultados obtenidos se ha establecido la siguiente ecuación que permite cuantificar la tasa de bacterias psicrotrofas de la carne cruda refrigerada, en el intervalo de  $10^4$ - $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup>:

$$\text{Log. absorbancia} = -1,5066 + 0,2297 \log (B),$$

cuyos coeficientes de regresión ( $r^2$ ) y de regresión ajustado (Adj. $r^2$ ) son de 0,92 ( $p = 0,0001$ ), donde (B) es el contenido de bacterias psicrotrofas por cm<sup>2</sup> de carne cruda.

Como se hizo con la leche, la especificidad de los anticuerpos anti-PF y anti-PC para reconocer la presencia de diversas bacterias psicrotrofas de la carne se determinó también por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). Los resultados de las experiencias realizadas (no mostrados), tanto del ELISA indirecto como del ELISA sandwich, fueron básicamente similares a los obtenidos en la leche, permitiendo deducir que: 1) Los anticuerpos anti-PF reconocen únicamente las cepas de *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa* y *Ps. fragi*); 2) Los anticuerpos anti-PC reconocen, además de las cepas del género *Pseudomonas*, otras bacterias psicrotrofas, aunque su especificidad no es homogénea en todos los casos.

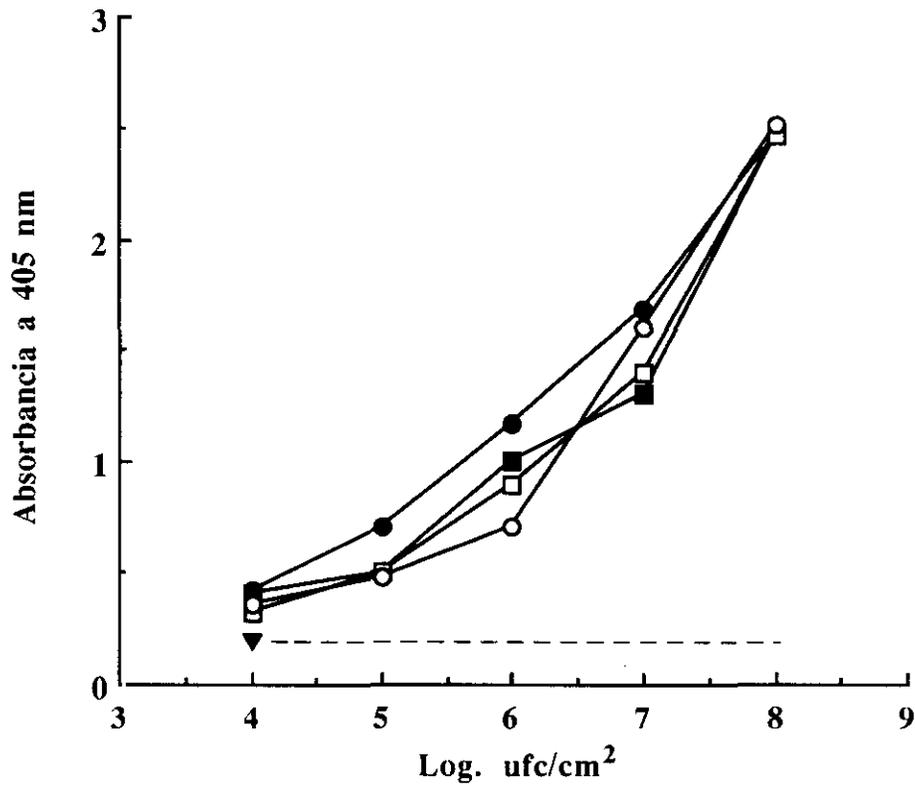


Figura IV.29. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer para detectar las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

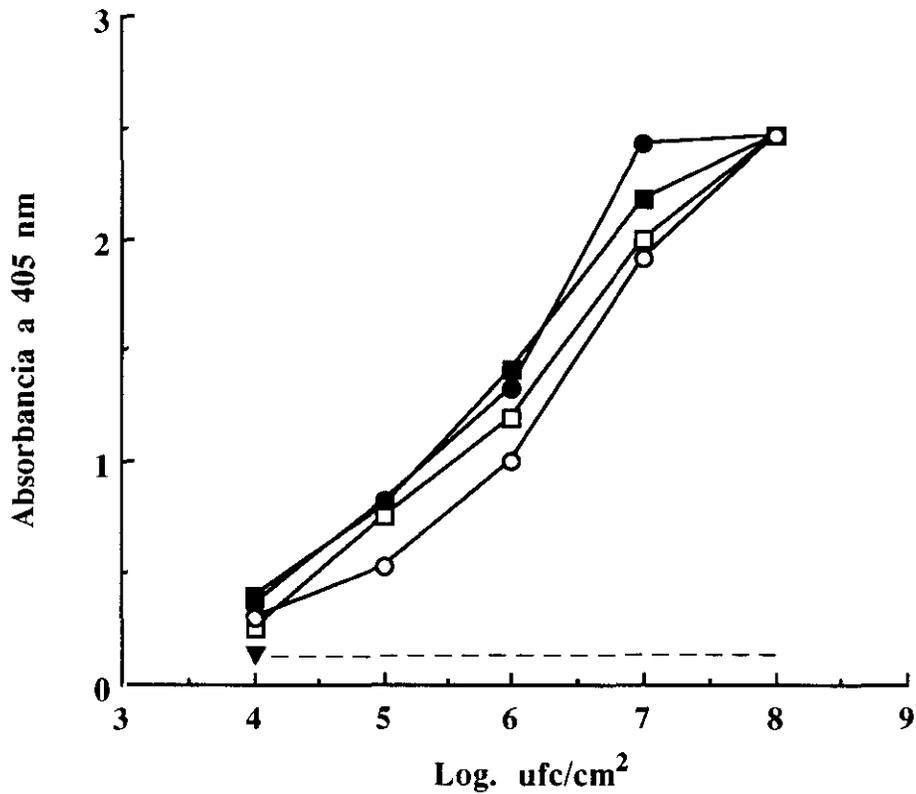
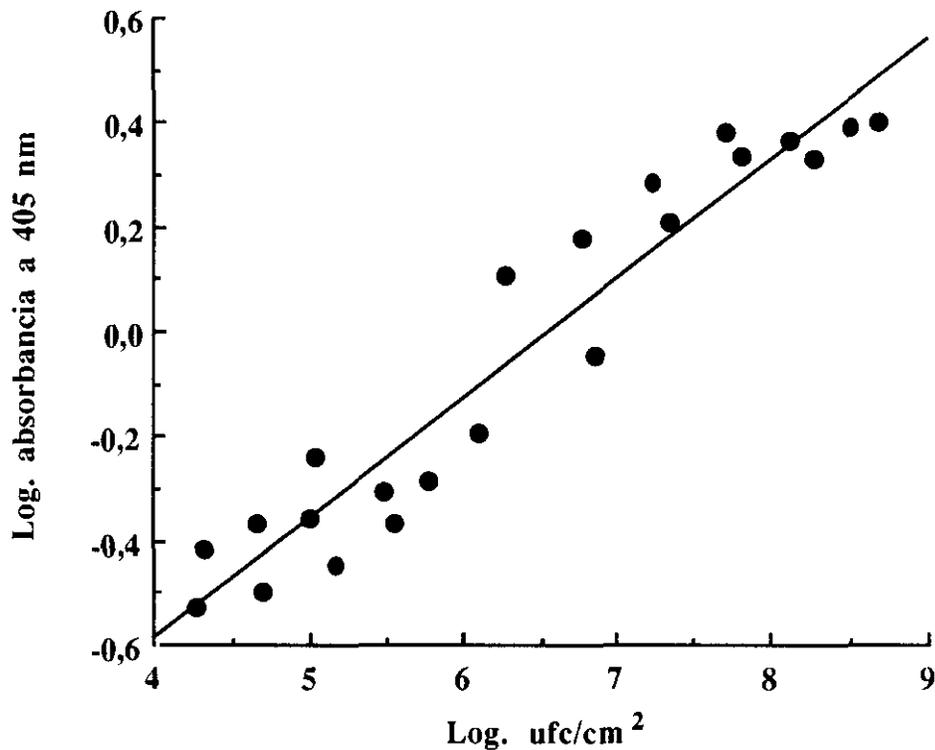


Figura IV.30. Estimación por un ELISA sandwich de la capacidad de los anticuerpos anti-PC de reconocer las cepas de *P. fluorescens* AH-70 (●), DC-5 (○), DC-7 (□) y NT-19 (■) en carne cruda estéril y sonicadas. Control de carne estéril sin inóculo (▼). Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

$$y = -1,5066 + 0,2297x; \quad r^2 = 0,92; \text{Adj.}r^2 = 0,92 \\ (p = 0,0001)$$



*Figura IV.31.* Relación entre los recuentos en placa de bacterias psicrotrofas y los valores de absorbancia a 405 nm obtenidos por la técnica del ELISA sandwich en muestras de carne cruda mantenidas a 4°C. Dilución 1/1000 de los anticuerpos de captura y 1/250 de los anticuerpos de detección anti-PC. Dilución 1/3000 del conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de seis experiencias diferentes realizadas para cuatro muestras de carne independientes.

**CAPITULO V**

***DISCUSION***

### V.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA PROTEINA F DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Ps. fluorescens*

Como se ha señalado en la exposición del problema a investigar, el objetivo de este trabajo consistía en la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas en la leche cruda y en la carne fresca refrigeradas, utilizando métodos inmunoenzimáticos (ELISA). Para ello, se obtuvieron en conejos inmunosueros frente a la proteína F de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 y frente a células vivas de la misma cepa.

La mayoría de los trabajos publicados sobre la identificación y caracterización de las proteínas de la membrana externa de las bacterias se han realizado con microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, siendo más escasas las referencias bibliográficas acerca de la caracterización de las proteínas de la membrana externa de las pseudomonas. Miura y Mizushima (1968) fueron los primeros investigadores que estudiaron la posibilidad de separar las proteínas de la membrana externa de *E. coli* utilizando las técnicas de centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa. Más tarde, Osborn y col., (1973), modificaron la técnica para separar las proteínas de la membrana externa de *S. typhimurium*. Estas técnicas se basan en la diferente solubilidad de las proteínas de la membrana en detergentes, como el tritón X-100, el dodecil-sulfato, etc, y sirven para determinar las características y comportamiento antigénico de las proteínas de la membrana externa de muchos microorganismos.

Mizuno y Kageyama (1978) sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico las preparaciones de la membrana externa de varias cepas de *Ps. aeruginosa* y observaron cinco bandas polipeptídicas mayoritarias y similares en todas las cepas analizadas, con unos pesos moleculares aparentes de 50.000, 45.000, 33.000, 21.000 y 8.000 daltones. Estos resultados han sido confirmados por otros investigadores. Una de estas proteínas de membrana, la proteína F, se encuentra en la superficie celular y muestra receptores antigénicos específicos que son comunes a las diferentes cepas de *Ps. aeruginosa* analizadas, lo cual facilita su accesibilidad y reactividad antigénica.

La proteína F es una porina que posee la propiedad de formar poros que atraviesan la región hidrofóbica de la membrana externa bacteriana (Nakae, 1976; Hancock y col., 1979; Benz y Hancock, 1981). Debido a esta característica, la proteína F desempeña un papel fundamental en la permeabilidad de la membrana externa, facilitando el paso al interior de la célula de sustancias hidrofílicas en función de su tamaño molecular. Estudios realizados a partir de liposomas reconstituidos con porinas purificadas de *Ps. aeruginosa* han sugerido que, si bien la proteína F de esta bacteria es capaz de formar canales de difusión mucho más amplios que las porinas de las enterobacterias (Hancock y Nikaido, 1978; Hancock y col., 1979), únicamente el 1% de las moléculas de proteína F son funcionalmente activas en la formación de poros, lo cual explicaría la resistencia intrínseca de *Ps. aeruginosa* a los antibióticos (Angus y col., 1982). Esto, unido a la comprobación de que la proteína F está antigénicamente relacionada en todas las cepas de *Ps. aeruginosa* estudiadas (Mutharia y Hancock, 1983; 1985), ha potenciado la utilización de la proteína F en forma de vacunas, al ser un agente inmunoterapéutico eficaz e inócuo frente a diversas infecciones causadas por esta bacteria (Gilleland y col., 1984; 1988).

Como sabemos, la mayor parte de los microorganismos que constituyen la flora psicrotrofa de los alimentos pertenecen al género *Pseudomonas*, siendo *Ps. fluorescens* su especie más frecuente. Teniendo esto en cuenta, se ha procedido al aislamiento, purificación y caracterización parcial de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70.

Son numerosas las técnicas descritas para la extracción e identificación de las proteínas de membrana de las bacterias Gram-negativas (Hancock y Nikaido, 1978; Mizuno y Kageyama, 1978, 1979; Hancock y Carey, 1979). En este trabajo se ha utilizado la metodología empleada por Yoshimura y col., (1983) en el aislamiento y purificación de la porina F de *Ps. aeruginosa*. La técnica se basa, esencialmente, en romper las células por sonicación y recuperar las proteínas de la membrana externa mediante sucesivas ultracentrifugaciones, utilizando dodecil-sulfato de litio (LDS) como detergente base para la solubilización de las proteínas durante su extracción. Teniendo en cuenta que las intensas interacciones hidrofóbicas que se producen entre los componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de su

integridad estructural, el empleo de detergentes iónicos a base de dodecil-sulfato es muy útil para solubilizar las proteínas y prevenir la reagregación de los componentes disociados (Seikizara y Fukui, 1973; Thomas y McNamee, 1990).

Siguiendo pues el protocolo de extracción de Yoshimura y col., (1983), hemos obtenido cinco sobrenadantes que se han sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Los resultados de la electroforesis (Fig. IV.1) reflejan que las sucesivas ultracentrifugaciones efectuadas eliminan las proteínas de la membrana citoplásmica y la mayor parte de las proteínas de la membrana externa (líneas B, C, D y E). La última ultracentrifugación proporcionó un sobrenadante que contenía, esencialmente, dos proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 (líneas F y H). Estas dos proteínas se identificaron como F y H al comparar sus pesos moleculares con los descritos por otros investigadores para las mismas proteínas de *Ps. aeruginosa* (Mizuno y Kageyama, 1978; Yoshimura y col, 1983).

Conviene recordar que, debido a las fuertes interacciones no covalentes de las proteínas F y H con el peptidoglicano de la pared celular, ambas proteínas permanecen asociadas a este componente de la región periplásmica durante su extracción (Mizuno y Kageyama, 1979; Yoshimura y col, 1983). Por ello, las dos proteínas se recuperaron después de solubilizar la membrana externa en LDS con cloruro de litio, compuesto que reduce la intensidad de los enlaces hidrofóbicos aumentando la solubilidad de las proteínas en la fase acuosa.

El protocolo utilizado para el aislamiento de las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens* AH-70 se repitió con otras cepas seleccionadas (*Ps. fluorescens* AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19), comprobándose (Fig. IV.2) que las proteínas F y H eran comunes en las seis cepas de *Ps. fluorescens* estudiadas. De acuerdo con estos resultados, las proteínas F y H podrían ser comunes a todas las cepas de *Ps. fluorescens* conocidas. Además, los pesos moleculares de las proteínas F y H fueron respectivamente de 33.052 y 17.532 daltones, encontrándose, por lo tanto, dentro del rango de pesos moleculares descritos por diversos investigadores para estas proteínas de *Ps. aeruginosa* (Mizuno y Kageyama, 1978;

Yoshimura y col., 1983; Gilleland y col, 1984; 1988).

Algunos investigadores han señalado cierta similitud estructural y funcional entre las proteínas F y H de la membrana externa de *Ps. aeruginosa* y algunas proteínas de la membrana externa de otras bacterias Gram-negativas, como *E. coli*. (Mizuno y Kageyama, 1979). No obstante, Labadie y Desnier (1992), utilizando anticuerpos policlonales frente a la proteína F de *Ps. fragi* y técnicas de "immunoblotting", comprobaron la falta de reactividad de dichos anticuerpos frente a bacterias Gram-negativas como *E. coli* y otros microorganismos Gram-positivos. Esta observación les llevó a sugerir que la proteína F era específica del género *Pseudomonas*. Los resultados de este trabajo han demostrado que la proteína F está antigénicamente relacionada en todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas.

Una vez aisladas e identificadas las proteínas F y H de la membrana externa, comunes a todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas, se procedió a la purificación de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 por cromatografía de filtración en gel de Sephacryl S-200 en presencia de SDS. La metodología empleada fue semejante a la descrita por Yoshimura y col., (1983) en la purificación de la proteína F de *Ps. aeruginosa*. Los resultados de la cromatografía proporcionaron un pico de absorción máxima a 280 nm, seguido de otro de menor tamaño (Fig. IV.3). Por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se determinó que la fracción cromatográfica del primer pico eluido contenía una proteína monomérica correspondiente a la proteína F, común a todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas (figura IV.4). Como ya se ha señalado, el peso molecular aparente de la proteína F de *Ps. fluorescens* fue de 33.052 daltones, similar al obtenido por diversos investigadores para la proteína F de *Ps. aeruginosa* (Hancock y Nikaido, 1978; Hancock y Carey, 1979; Mizuno y Kageyama, 1979; Yoshimura y col, 1983; Gilleland y col, 1984; 1988)

Los resultados, tanto de la elución cromatográfica (figura IV.3) como de la migración electroforética de la proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 (figura IV.4), coinciden con los obtenidos en el aislamiento de la proteína F de *Ps. aeruginosa* por Yoshimura y col., (1983).

## V.2. OBTENCION DE INMUNOSUEROS

Como ya se ha señalado en la Introducción de esta memoria, de todos los métodos disponibles para detectar y cuantificar rápidamente los microorganismos de los alimentos, los inmunológicos presentan múltiples ventajas debido a su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste.

Puesto que la mayor parte de los microorganismos que constituyen la flora psicrotrofa de los alimentos pertenecen al género *Pseudomonas* y dado que *Ps. fluorescens* es su especie más frecuente, se pensó que quizá los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la proteína F (anti-proteína F o anti-PF) y frente a las células vivas (anti-pared celular o anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70 fueran útiles para evaluar la calidad microbiológica de la leche y de la carne cruda refrigeradas.

Son numerosos los trabajos publicados en los que se han utilizado como antígenos células bacterianas enteras; ello ha permitido obtener anticuerpos de óptima calidad para la detección inmunológica de diversos microorganismos. Islam y Stimson (1987), utilizando como inmunógenos células bacterianas de *Shigella flexneri*, tanto vivas como inactivadas, obtuvieron anticuerpos monoclonales altamente específicos frente a este microorganismo. También se han utilizado como inmunógenos células vivas o inactivadas de *Salmonella* sp. (Paterson y Tiffin, 1988; Torensma y col., 1992) y de *Listeria monocytogenes* (Torensma y col., 1993). Diversos investigadores han sugerido que los tratamientos de inactivación (calor, agentes químicos, etc.) a los que se someten las células bacterianas pueden dar lugar a la exposición de determinados antígenos intracelulares o bien a alteraciones en la configuración estructural de los antígenos de la membrana externa. De aquí que el empleo de células inactivadas pueda generar inmunosueros portadores de anticuerpos que no reconocen la estructura celular de las bacterias vivas (Stya y col., 1984; Islam y Stimson, 1987). De acuerdo con estas observaciones, en este trabajo se han utilizado células vivas de *Ps. fluorescens* AH-70 en la inmunización de los conejos.

Los conejos son los animales más empleados en la obtención de anticuerpos policlonales, debido a que son de fácil manejo y mantenimiento, generan un buen volumen de suero y responden bien a una gran variedad de

antígenos (Dunbar y Schwoebel, 1990). Además, conviene señalar que la inmunogenicidad de un antígeno generalmente aumenta al hacerlo la distancia filogenética entre la especie que lo posee y la receptora.

La inmunización de los conejos con la proteína F purificada y con las células vivas de *Ps. fluorescens* AH-70 proporcionó un volumen suficiente de los correspondientes inmunosueros anti-PF y anti-PC.

Obtenidos los inmunosueros, se purificaron por precipitación selectiva con sulfato amónico. La precipitación selectiva de las inmunoglobulinas con sulfato amónico es el método más utilizado en la separación de las proteínas de sus soluciones y, en particular, en la separación de los anticuerpos o inmunoglobulinas del inmunosero total. La técnica se basa en añadir un tampón que contiene concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados, como amonio o sulfato, a una solución en la que las proteínas se encuentran unidas a las moléculas de agua formando puentes de hidrógeno. Los iones de amonio y de sulfato compiten con las moléculas proteicas por el agua y las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad y precipitan.

La purificación parcial de los inmunosueros por precipitación con sulfato amónico presenta las siguientes ventajas:

- a) la solución de sulfato amónico, a valores de saturación, presenta una molaridad suficientemente elevada como para producir la precipitación de casi todas las proteínas, a las que protege frente a la desnaturalización previniendo además el crecimiento microbiano.
- b) es un método económico, sencillo y aplicable a volúmenes grandes de suero.
- c) es útil para la concentración y purificación de anticuerpos de cualquier especie.
- d) minimiza las interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y determinados metabolitos o sustancias cuya superficie posee una configuración molecular similar a la de los epítomos del

antígeno a analizar.

La utilización de los anticuerpos precipitados con sulfato amónico en las técnicas del ELISA indirecto y del ELISA sandwich desarrolladas en este trabajo requiere, a veces, su conjugación previa con la biotina.

#### V.2.1. CONJUGACION DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS CON LA BIOTINA

La detección y cuantificación de un antígeno o anticuerpo por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) requiere la utilización de conjugados de enzima-proteína. Aunque la preparación de estos conjugados generalmente se basa en la interacción covalente entre el enzima y el anticuerpo (Nakane y Kawaoi, 1974), en los últimos años se ha generalizado la utilización del complejo biotina-avidina. En este trabajo la biotina se conjugó con los anticuerpos anti-PF y anti-PC de la manera descrita por Bonnard y col., (1984). Los anticuerpos biotinizados se detectaron con un conjugado comercial de estreptavidina unida a un enzima.

Las ventajas del sistema de amplificación biotina-avidina se deben a la afinidad excepcionalmente elevada de la avidina por la biotina ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) y a la gran estabilidad de esta interacción no covalente. La biotina, conjugada tanto con moléculas de alto como de bajo peso molecular, es fácilmente reconocida por la avidina, proteína antibacteriana presente en la clara de huevo (Green, 1975). En el caso de las reacciones inmunoenzimáticas, cada inmunoglobulina se une a varias moléculas de biotina (al menos 4), facilitando el anclaje de las moléculas de avidina a los anticuerpos conjugados. La conjugación anticuerpo-biotina está basada en la reacción del grupo carboxílico de la biotina con los grupos amino libres de las proteínas. En este trabajo, para facilitar la unión de la biotina a las inmunoglobulinas de interés, se ha utilizado un éster de la biotina denominado biotinil-N-hidroxisuccinimida (BNHS). Este reactivo es hidrosoluble y fácil de manejar, reaccionando con los anticuerpos a través de los grupos amino libres de las proteínas, normalmente los del aminoácido lisina.

Debido al bajo peso molecular de la biotina y a las condiciones de la conjugación, su unión con el anticuerpo evita los efectos perjudiciales que

tienen lugar cuando los anticuerpos se conjugan con un enzima; además no afecta a la afinidad del anticuerpo por el antígeno (Wilchek y Bayer, 1988). De otra parte, y en las mismas condiciones, los anticuerpos conjugados con la biotina son más estables que los conjugados de anticuerpo-enzima. No obstante, la avidina presenta uniones no específicas atribuidas a la basicidad de su molécula y a su contenido de cadenas hidrocarbonadas (hexosas y aminoazúcares). Para eliminar esta limitación, la avidina de la clara de huevo se sustituye por la estreptavidina bacteriana (Nerurkar y col., 1984), que es una proteína neutra no glucosilada producida por *Streptomyces avidinii*.

Aunque los inmunoseros totales pueden conjugarse directamente con la biotina (Bayer y col., 1976), en este trabajo se han empleado los anticuerpos parcialmente purificados con el fin de evitar en las técnicas de ELISA las reacciones inespecíficas debidas a la unión de la biotina con otras proteínas del inmunosero.

Los anticuerpos anti-PF y anti-PC de interés se emplearon en el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA indirecto y del ELISA sandwich con el fin de determinar su utilidad en la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la carne y de la leche cruda refrigeradas.

### **V.3. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA**

En primer lugar, se desarrolló un ELISA indirecto como método de aproximación rápido para la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la leche cruda refrigerada; después se puso a punto otra variante más sensible, el ELISA sandwich.

En la realización de la técnica del ELISA indirecto se utilizaron los anticuerpos anti-proteína F (anti-PF) y anti-pared celular (anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70 parcialmente purificados con sulfato amónico y un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con el enzima peroxidasa de rábano.

Antes de comprobar la capacidad de detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas de la leche cruda refrigerada por parte de los anticuerpos anti-PF y anti-PC, se determinó si su empleo en la técnica del ELISA indirecto permitía reconocer la presencia de *Ps. fluorescens* en muestras de leche UHT inoculadas experimentalmente con este microorganismo.

Los resultados obtenidos indicaron que, si bien los anticuerpos anti-PF y anti-PC reconocían la presencia de la cepa de *Ps. fluorescens* AH-70 en tampón PBS, no lo hacían en las muestras de leche analizadas. La incapacidad del ELISA indirecto de reconocer a *Ps. fluorescens* AH-70 en la leche se debe probablemente a que algunos de sus componentes (caseínas, proteínas del suero, etc.) interfieren en la adsorción de los microorganismos a los pocillos de las placas de ELISA. Para mejorar la sensibilidad del ensayo se desarrolló un ELISA sandwich en el que como anticuerpos de captura se utilizaron los anti-PF y anti-PC y como anticuerpos de detección estos mismos conjugados a la biotina. La detección del complejo antígeno-anticuerpo/biotina se efectuó con un conjugado comercial de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano.

El ELISA sandwich es una de las técnicas con mayor aplicación en el análisis de los alimentos debido a su gran especificidad y sensibilidad, en comparación con otras variantes de ELISA. La especificidad de esta técnica se atribuye a la utilización de anticuerpos específicos (anticuerpos de captura), que se adsorben a los pocillos de las placas capturando los antígenos de la muestra frente a los que se obtuvieron. Por ello, y a diferencia de lo que sucede con el ELISA indirecto, los anticuerpos de detección no se encuentran en los pocillos con una mezcla de antígenos heterogénea, sino sólo con los anclados por los anticuerpos de captura. Por otro lado, y como ya se ha descrito en la sección V.2 de este trabajo, la conjugación con la biotina de los anticuerpos de detección y su "revelado" con avidina o estreptavidina amplifica la respuesta inmunológica, aumentando la sensibilidad. Esto se debe a que al encontrarse las inmunoglobulinas unidas a muchas moléculas de biotina, el conjugado de estreptavidina-peroxidasa encuentra más lugares de anclaje a los anticuerpos que cuando se utilizan como conjugado los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de especie marcadas con el mismo enzima. Además, debido a que la afinidad de la avidina por la biotina es mayor que la

del anticuerpo por su antígeno ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$  frente a  $10^4$ - $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) su unión es más eficaz, más rápida y más estable, lo que disminuye la variabilidad interna de los ensayos.

Los resultados obtenidos al utilizar anticuerpos anti-PF y anti-PC y la técnica del ELISA sandwich, se han descrito en la sección IV.4.2 de este trabajo. Determinadas las concentraciones óptimas de los reactivos que intervienen en el ensayo, se comprobó la especificidad de los inmunosueros anti-PF y anti-PC para reconocer la presencia de las cepas de *Ps. fluorescens* AH-70, AR-11, B-52, DC-5, DC-7 y NT-19 inoculadas a distintas concentraciones en leche UHT. Como se observa en la figura IV.11, los anticuerpos anti-PF reconocen fácilmente la presencia de *Ps. fluorescens* AH-70 en la leche analizada a partir de las  $10^4$  ufc/ml, con un aumento de la absorbancia, en el intervalo comprendido entre  $10^3$  y  $10^8$  ufc/ml, que es proporcional a la concentración de bacterias.

Cuando se emplean anticuerpos anti-PC, los valores de la absorbancia son mayores. Estos anticuerpos también detectan a *Ps. fluorescens* AH-70 a partir de los mismos niveles que los anticuerpos anti-PF. En ambos casos, la especificidad de los anticuerpos para reconocer al resto de las cepas de *Ps. fluorescens* en muestras de leche disminuye significativamente entre niveles de  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml. Esto podría atribuirse a que la proteína F y otros componentes antigénicos de la pared celular de *Ps. fluorescens* AH-70 contienen determinados epítomos específicos que no se encuentran en las otras cepas de *Pseudomonas* analizadas.

En el caso concreto de los anticuerpos anti-PF, la diferencia de especificidad observada también podría deberse a una degradación parcial de la proteína F, dependiendo de la actividad proteásica de cada bacteria; ello podría variar el número de epítomos de dicha proteína de unas cepas a otras (Labadie y Desnier, 1992).

Cuando se sonicaron las muestras de leche inoculadas con *Ps. fluorescens*, aumentó la capacidad de los anticuerpos anti-PF (Fig. IV.12) y anti-PC (Fig. IV.17) de reconocer las cepas inoculadas. Al analizar las muestras sonicadas frente a los anticuerpos anti-PC, los valores de absorbancia fueron mayores que los obtenidos frente a los anticuerpos anti-PF. El aumento

de la absorbancia de las muestras sonicadas frente a las que contienen células intactas, indica que el tratamiento de las células con ultrasonidos contribuye a la liberación de proteína F y de otros componentes antigénicos de su pared celular, favoreciendo con ello la exposición de un mayor número de epítomos a los anticuerpos anti-PF y anti-PC.

Comprobada la capacidad de detección de *Ps. fluorescens* por los anticuerpos anti-PF y anti-PC, se trató de establecer si su utilización en la técnica del ELISA sandwich permitía la detección y cuantificación de los microorganismos psicrotrofos de la leche cruda. En el caso de los anticuerpos anti-PF, la representación gráfica de la relación entre los recuentos bacterianos de las muestras de leche cruda y la absorbancia de las muestras sonicadas, dió como resultado una recta (Fig. IV.14) cuya ecuación fue la siguiente:  $\text{Log. absorbancia}_{405 \text{ nm}} = -2,3908 + 0,3197 (B)$ , con un coeficiente de regresión ( $r^2$ ) de 0,90 y un coeficiente de regresión ajustado ( $\text{Adj.}r^2$ ) de 0,88 y con un valor de  $p = 0,0003$ . El coeficiente de regresión ajustado es el parámetro estadístico más adecuado cuando el número de muestras de que se parte no es grande. De la expresión  $\text{Adj. } r^2 = 0,88$  ( $p = 0,0003$ ) se deduce que hay una relación estrecha entre el número de microorganismos psicrotrofos de las muestras de leche y la absorbancia de dichas muestras.

Cuando se emplearon anticuerpos anti-PC, el coeficiente de regresión ajustado de la ecuación que relaciona los recuentos bacterianos de la leche cruda con la absorbancia de la sonicada, fue alto ( $\text{Adj. } r^2 = 0,96$ ) y significativo ( $p = 0,0001$ ). Por lo tanto, también es grande la correlación entre el aumento de los valores de la absorbancia y el de la tasa de bacterias psicrotrofas de la leche cruda refrigerada (Fig. IV.18).

De los resultados obtenidos se deduce que con los anticuerpos anti-PF y anti-PC y la técnica del ELISA sandwich descrita en este trabajo, se detecta y cuantifica la tasa de microorganismos psicrotrofos de la leche cruda refrigerada, en el intervalo comprendido entre  $10^5$  y  $10^9$  ufc/ml. No obstante, debido a las variaciones que pueden producirse en los ensayos realizados entre distintos laboratorios e incluso entre diferentes operarios de un mismo laboratorio, es necesario introducir muestras de referencia para la estimación de la calidad microbiológica de la leche cruda refrigerada.

Si se comparan globalmente los resultados obtenidos en los ensayos del ELISA sandwich con anticuerpos anti-PF (Figs. IV.11, IV.12 y IV.14) y anti-PC (Figs. IV.16, IV.17 y IV.18), se aprecia que, con los últimos, los valores de absorbancia son generalmente mayores que con los anticuerpos anti-PF. Una de las razones que podrían explicar este resultado es que la proteína F está fuertemente ligada al peptidoglicano y forma poros que atraviesan la región hidrofóbica de la membrana externa bacteriana. Es posible que en determinados momentos del metabolismo celular, esta proteína oculte los epítomos que normalmente expone en la superficie bacteriana, con lo que sería menor su accesibilidad a los anticuerpos anti-PF. Por otra parte, la menor sensibilidad de los anticuerpos anti-PF para reconocer distintas cepas de *Ps. fluorescens* se debería a que al haberse producido frente a una sola proteína (proteína F), reconocen a un menor número de epítomos que los anti-PC, que se originan frente al conjunto de los antígenos de la pared celular bacteriana.

También se ha determinado la especificidad de los anticuerpos anti-PF y anti-PC en el reconocimiento de la presencia de diferentes bacterias psicrotrofas en leche UHT. Mientras los anticuerpos anti-PF sólo reconocen las especies de *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa* y *Ps. fragi*) (Fig. IV.15), los anti-PC reconocen también otras bacterias psicrotrofas (Fig. IV.19). La incapacidad de los anticuerpos anti-PF de reconocer géneros bacterianos distintos de *Pseudomonas* sugiere, coincidiendo con los resultados de Labadie y Desnier (1992), que el poder antigénico de la proteína F se mantiene en las distintas especies del género *Pseudomonas*.

El principal inconveniente de la técnica descrita del ELISA sandwich es la poca sensibilidad de los anticuerpos anti-PF, comparados con los anti-PC, para reconocer otras cepas de *Ps. fluorescens* distintas de la cepa AH-70, así como otras bacterias psicrotrofas de la leche cruda refrigerada. No obstante, los resultados obtenidos permiten concluir que ambos inmunosueros detectan y cuantifican la flora psicrotrofa de la leche cruda refrigerada desde niveles de  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml. Una de las principales ventajas de la técnica del ELISA sandwich es que no requiere el aislamiento ni la concentración previa de los microorganismos de la leche. Debido al límite de detección conseguido y a su simplicidad, rapidez y bajo coste, la técnica del ELISA sandwich podría utilizarse para detectar leches cuyos niveles de bacterias psicrotrofas sean lo

suficientemente elevados como para limitar su vida útil y la de otros productos lácteos.

#### V.4. DETECCION POR METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA), DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS DE LA CARNE CRUDA REFRIGERADA

La detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas de la carne cruda refrigerada se realizó con ayuda de los anticuerpos anti-PF y anti-PC y las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA indirecto y ELISA sandwich.

Como se describe en la sección IV.5, los ensayos inmunoenzimáticos con carne se desarrollaron empleando un procedimiento similar al descrito para la leche. No obstante, mientras en las experiencias realizadas con la leche no fue preciso el aislamiento inicial de los microorganismos de las muestras a analizar, en el caso de la carne primero hubo que aislar las bacterias presentes en las muestras.

Dado que la alteración de la carne refrigerada es un fenómeno fundamentalmente superficial (McMeekin, 1982; Gill, 1983; Notermans y Kampelmacher, 1983), conviene prestar atención a los aspectos implicados en la adhesión de los microorganismos a la superficie de la carne. El mecanismo de adhesión de las bacterias a la superficie de la carne no se conoce con exactitud, puesto que tanto la célula bacteriana como la superficie muscular presentan estructuras muy complejas (Notermans y Kampelmacher, 1983). El grado de adhesión de las bacterias a la superficie de la carne depende de numerosos factores como el tipo de microorganismos, la naturaleza de la superficie de la carne, la movilidad bacteriana, el pH, la temperatura, etc. (Firstenberg-Eden y col., 1978; Piette e Idziac, 1992; Selgas y col., 1993). Asimismo, exámenes microscópicos de carne alterada han confirmado la presencia de microorganismos atrapados en estructuras como células musculares (Benedict y col., 1990), células adiposas o fibras tendinosas (Piette e Idziac, 1991). Para detectar y cuantificar los microorganismos psicotrofos que se desarrollan en la carne refrigerada es fundamental utilizar soluciones de lavado que permitan recoger la mayor cantidad de bacterias adheridas a su superficie. Se ha demostrado que, en general, las bacterias móviles

Gram-negativas proliferan más fácilmente en la superficie de la carne que las bacterias inmóviles Gram-positivas. Por otra parte, Appl y Marshall (1984) han sugerido que las modificaciones de la concentración iónica de las soluciones de lavado pueden aumentar la tasa de microorganismos recogida de la superficie de la carne. Basándose en diversas experiencias efectuadas con *Pseudomonas*, los autores citados concluyeron que de los derivados clorados, el KCl es el que permite recoger una mayor concentración de microorganismos de la superficie de la carne. Por todo ello, para recoger las células de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la superficie de la carne elegimos una solución 0,1M de KCl.

Debe advertirse que si bien las experiencias descritas en este trabajo se han realizado con carne porcina, los resultados que a continuación se discuten podrían aplicarse a la carne de vacuno, ovino y aves, ya que no hay evidencias que indiquen que la carne de especies animales diferentes posea una flora distinta responsable de su alteración (Gill y Newton, 1982).

#### V.4.1. DETECCION DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO, UTILIZANDO EL SISTEMA DE AMPLIFICACION BIOTINA-AVIDINA

Para el desarrollo de esta técnica se conjugaron con la biotina los anticuerpos anti-PF y anti-PC parcialmente purificados y su detección, después de biotinizados y unidos a sus antígenos específicos, se realizó mediante un conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Los resultados obtenidos utilizando como antígenos muestras de carne estéril inoculadas con cepas de *Ps. fluorescens* (AH-70, DC-5, DC-7 y NT-19), indican que los anticuerpos anti-PF (Fig. IV.20) y los anti-PC (IV.23) reconocen la presencia de todas las cepas de *Ps. fluorescens* analizadas, a partir de niveles de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>. En el intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup>, la absorbancia aumenta proporcionalmente a la concentración bacteriana de las muestras. A diferencia de lo que sucede con la leche, en las muestras de carne estéril los anticuerpos anti-PF (Fig. IV.20) y anti-PC (Fig. IV.23) detectan todas las cepas de *Ps. fluorescens* con una especificidad parecida. Posiblemente ello se debe a que, para la detección inmunológica de *Ps. fluorescens* de la carne, los microorganismos se recogen

de la superficie de las muestras con una solución salina, mientras los análisis inmunoenzimáticos de la leche se realizan sin una extracción previa de los microorganismos de las muestras.

Al extraer y someter a sonicación las muestras de carne estéril inoculadas con las cepas de *Pseudomonas*, se observa que aunque el límite de detección se mantiene en  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>, tanto los anticuerpos anti-PF (Fig. IV.21) como los anti-PC (Fig. IV.24), reconocen mejor las cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras sonicadas. El aumento en de la absorbancia de las muestras sonicadas respecto de las que contienen células intactas nos hace pensar, al igual que en la leche, que el tratamiento con ultrasonidos de las células podría contribuir a la liberación de proteína F y de otras proteínas de la membrana externa, favoreciéndose así la exposición a los anticuerpos de un mayor número de determinantes antigénicos.

Las figuras IV.22 y IV.25 muestran la eficacia de los anticuerpos anti-PF y anti-PC y de la técnica del ELISA indirecto en la detección y cuantificación de las bacterias psicrotrofas de muestras comerciales de carne mantenidas en refrigeración. En el caso de los anticuerpos anti-PF, la representación gráfica de la relación existente entre los recuentos bacterianos de las muestras de carne cruda y la absorbancia de las muestras sonicadas, fue una recta (Fig. IV.22) cuya ecuación:  $\text{Log. absorbancia}_{405 \text{ nm}} = -1,4073 + 0,1955 (B)$ , presentó un coeficiente de regresión ( $r^2$ ) de 0,89 y un coeficiente de regresión ajustado ( $\text{Adj.}r^2$ ) de 0,88, con un valor de  $p = 0,0001$ . Por tanto, la expresión  $\text{Adj. } r^2 = 0,88$  ( $p = 0,0001$ ) indica que hay una relación estrecha entre el número de microorganismos psicrotrofos y la absorbancia de las muestras de carne. El coeficiente de regresión ajustado de la ecuación que relaciona los recuentos bacterianos de la carne cruda y la absorbancia de las muestras sonicadas, al emplear en el ensayo los anticuerpos anti-PC, fue lo suficientemente elevado ( $\text{Adj. } r^2 = 0,93$ ) y significativo ( $p = 0,0001$ ) como para afirmar que también en este caso hay una gran correlación entre el aumento de la absorbancia y el de la tasa de bacterias psicrotrofas de la carne refrigerada (Fig. IV.25).

De los resultados obtenidos se deduce que, utilizando los anticuerpos anti-PF y anti-PC y la técnica del ELISA indirecto, se detectan y cuantifican los microorganismos psicrotrofos de la carne cruda refrigerada en el

intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^9$  ufc/ml. No obstante y como ya se ha señalado, debido a las variaciones que pueden producirse en los ensayos realizados entre distintos laboratorios e incluso entre diferentes operarios de un mismo laboratorio, deben introducirse muestras de referencia para estimar la calidad microbiológica de la carne cruda refrigerada.

La técnica del ELISA indirecto desarrollada es sencilla y rápida, ya que para completarla se necesitan menos de 4 horas. Además, dentro del intervalo de detección de los inmunosueros, la técnica puede aplicarse para determinar los recuentos de microorganismos psicrotrofos de la carne antes de que manifieste signos de alteración.

#### V.4.2. DETECCION DE *Ps. fluorescens* Y DE OTRAS BACTERIAS PSICROTROFAS UTILIZANDO LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH

En el ELISA sandwich desarrollado en este trabajo, como anticuerpos de captura se utilizaron los anti-PF y anti-PC y como anticuerpos de detección los mismos, pero conjugados a la biotina.

En las condiciones citadas, los anticuerpos anti-PF (Fig. IV.26) y anti-PC (Fig. IV.29) detectan la presencia de *Ps. fluorescens* en las muestras de carne estéril a partir de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>, siendo su especificidad parecida en todas las cepas analizadas. En las mismas muestras sonicadas (Figs. IV.27 y IV.30), la especificidad de los inmunosueros para reconocer las cepas de *Pseudomonas* es mayor.

Las figuras IV.28 y IV.31 indican que tanto los anticuerpos anti-PF como los anti-PC pueden emplearse en la técnica del ELISA sandwich para cuantificar la tasa de bacterias psicrotrofas que se desarrollan en la carne refrigerada. Para ello se utiliza la ecuación de la recta que correlaciona los recuentos bacterianos por cm<sup>2</sup> de carne cruda y la absorbancia de las muestras sonicadas, en el intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^9$  ufc/cm<sup>2</sup>. En este caso los coeficientes de regresión ajustados fueron también altos (Adj.  $r^2 = 0,90$  y  $0,92$  al emplear los anticuerpos anti-PF y anti-PC, respectivamente) y muy significativos ( $p = 0,0001$  en ambos casos). Consecuentemente, se puede afirmar que el aumento de la población de bacterias psicrotrofas y el de la absorbancia están estrechamente relacionados.

Los resultados de la detección de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicrotrofas de la carne refrigerada mediante el ELISA indirecto y el ELISA sandwich fueron similares. En consecuencia, ambas técnicas pueden ser útiles en el análisis microbiológico de la carne cruda.

#### **V.5. COMPARACION DE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA) DESARROLLADAS CON OTROS METODOS RAPIDOS DE ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LOS ALIMENTOS**

Como ya se ha señalado en la Introducción de esta memoria (II.3), las técnicas de detección e identificación de microorganismos han evolucionado notablemente en los últimos años, debido a la necesidad de disponer de métodos más rápidos y fiables aplicables al análisis microbiológico rutinario de los alimentos (Firstenberg-Eden y Sharpe, 1991). A continuación se resumen las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) desarrolladas en este trabajo y se compara su utilidad con la de otros métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos.

En este trabajo se ha comprobado que con los anticuerpos anti-PF y anti-PC de *Ps. fluorescens* AH-70 y con las técnicas del ELISA sandwich y del ELISA indirecto, se puede estimar la calidad microbiológica de la leche cruda y de la carne fresca refrigeradas, antes de que los recuentos de bacterias psicrotrofas alcancen valores que modifiquen la calidad organoléptica de ambos alimentos.

Los límites de detección de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) desarrolladas en este trabajo, son iguales a los descritos por otros investigadores que las han utilizado para detectar en los alimentos la presencia de una gran variedad de microorganismos patógenos y de sus toxinas (Peterkin y Sharpe, 1984; Shah y Rhea, 1986; Annan-Prah y Janc, 1988; Mattingly y col., 1988; Mirhabibollahi y col., 1990; Merino y col., 1993). Por ello se proponen como pruebas rápidas para determinar la calidad microbiológica de la leche y de la carne refrigeradas. Conviene señalar que estas técnicas permiten analizar un gran número de muestras, son sencillas de realizar y su coste no es elevado.

Al revisar los distintos métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos, se ve que existen otras técnicas para estimar la calidad microbiológica de la carne y la leche, que superan en sensibilidad y en rapidez a las del ELISA. Entre ellas, la prueba del *Limulus* detecta niveles muy bajos de bacterias Gram-negativas ( $10^2$ - $10^4$  ufc/ml o  $\text{cm}^2$ ) en 1 hora aproximadamente. No obstante, a pesar de su sensibilidad y rapidez, el principal inconveniente de la prueba del *Limulus* radica en que su utilización para fines rutinarios se encuentra limitada en gran medida por el elevado coste del lisado de amebocitos (Jarvis y Easter, 1987; Svensson y Hahn-Hägerdal, 1987).

Otra de las técnicas rápidas utilizadas en el análisis microbiológico de los alimentos es la epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT). Su límite de detección es del orden de  $10^3$  ufc/ml o  $\text{cm}^2$ , su correlación con el método de recuento en placa es grande y los resultados se obtienen en menos de 1 hora (Pettipher y Rodriguez, 1982; Shaw y col., 1987). Estas ventajas han impulsado su desarrollo como prueba rápida de control rutinario de la calidad microbiológica de los alimentos. Sin embargo, la compleja preparación de las muestras que requieren un tratamiento previo con tripsina y Tritón X-100 y la fatiga de los operarios al realizar los recuentos bacterianos al microscopio, han llevado a su automatización con analizadores computerizados de imágenes que, aunque facilitan el trabajo, elevan considerablemente el coste del método (Pettipher, 1986; Pettipher y col., 1992).

La impedimetría se considera actualmente como una de las técnicas instrumentales más prometedoras y con mayor potencial de aplicación en la detección de microorganismos en alimentos (Firstenberg-Eden y Zindulis, 1984; Bishop y White, 1986). Posee las ventajas de ser sencilla e informatizable, pero presenta el inconveniente de su baja relación sensibilidad/rapidez, ya que cuanto menores son los recuentos mayor es el tiempo necesario para la obtención de resultados. Así, para límites de detección que se aproximan a los alcanzados con las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) ( $10^4$ - $10^5$  ufc/ml o  $\text{cm}^2$ ), el tiempo necesario para la obtención de resultados es mayor, alrededor de 7 horas. Además, es elevado el coste del instrumental necesario para medir la impedancia de las muestras e informatizar los resultados obtenidos.

La bioluminiscencia es otro de los métodos más rápidos y eficaces de establecer el contenido total de microorganismos de los alimentos, ya que en sólo 10-20 minutos detecta poblaciones bacterianas de alrededor de  $10^5$  ufc/ml o g (Wood y Gibbs, 1982). No obstante, a pesar de su simplicidad y rapidez, presenta algunos inconvenientes como la necesidad de eliminar el ATP no microbiano del alimento, lo que dificulta la preparación de las muestras a analizar. El elevado coste del luminómetro y la limitada estabilidad del reactivo (luciferín-luciferasa), impide su aplicación en el análisis microbiológico rutinario de los alimentos (Martínez y Rodrigo, 1987).

Por último, una prueba rápida, sencilla y barata, desarrollada para estimar la calidad microbiológica de la carne y la leche refrigeradas es la basada en la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Pérez de Castro y col., 1988, 1989; Alvarado y col., 1992). Con ella se detectan tasas de bacterias psicrotrofas a partir de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup> ó ml en, aproximadamente, 2,5 horas. Si bien este método parece aceptable para el control rutinario de la calidad de la carne, su principal inconveniente en la estimación de la calidad microbiológica de la leche es su pérdida de sensibilidad debido a la dificultad en la recogida de los microorganismos de las muestras de leche. A este respecto, es importante recordar que una de las ventajas de la técnica del ELISA sandwich desarrollada en este trabajo, es que no requiere el aislamiento o concentración previa de los microorganismos de las muestras de leche, lo cual facilita enormemente su manejo.

**CAPITULO VI**

***CONCLUSIONES***

1.- El aislamiento y caracterización de las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *Ps. fluorescens*, puso de manifiesto la existencia de dos proteínas comunes a todas las cepas analizadas y que se identificaron como F y H al comparar sus pesos moleculares con los descritos por otros investigadores para estas proteínas de *Ps. aeruginosa*. La separación de las proteínas F y H por cromatografía de filtración en geles de Sephacryl S-200 permitió la purificación a homogeneidad de la proteína F, cuyo peso molecular aparente fue de 33.052 daltones.

2.- La inmunización de dos lotes de conejos, uno con proteína F de *Ps. fluorescens* AH-70 y otro con células vivas de la misma cepa, permitió disponer de inmunosueros anti-proteína F (anti-PF) y anti-pared celular (anti-PC), que se utilizaron en el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA indirecto y del sandwich para detectar y cuantificar *Ps. fluorescens* y otras bacterias psicotrofas de la leche y carne.

3.- La utilización de los anticuerpos anti-PF y anti-PC en las técnicas inmunoenzimáticas permite concluir que, si bien los anticuerpos policlonales anti-PF son específicos del género *Pseudomonas*, los anticuerpos anti-PC, además de reconocer distintas especies del género *Pseudomonas*, reconocen también otras bacterias psicotrofas. El tratamiento previo de las muestras de leche y carne con ultrasonidos mejora sensiblemente la especificidad de los anticuerpos.

4.- Con los anticuerpos anti-PF y anti-PC y la técnica del ELISA indirecto desarrollada, no se detectó la presencia de *Ps. fluorescens* en la leche. Sin embargo, los mismos anticuerpos con la técnica del ELISA sandwich, detectaron diversas cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras de referencia. También se pudo detectar y cuantificar esta especie y otras bacterias psicotrofas en la leche cruda refrigerada, en el intervalo comprendido entre  $10^5$  y  $10^9$  ufc por ml.

5.- En el caso de la carne, tanto con la técnica del ELISA indirecto como con la del ELISA sandwich, los anticuerpos anti-PF y anti-PC detectaron distintas cepas de *Ps. fluorescens* en las muestras de referencia. En la carne cruda refrigerada y en el intervalo comprendido entre  $10^4$  y  $10^9$  ufc por  $cm^2$ , permitieron detectar y cuantificar *Ps. fluorescens* y otras bacterias psicotrofas.

**CAPITULO VII**

***TRABAJO FUTURO***

De los resultados descritos en este trabajo, puede concluirse que el empleo de los anticuerpos policlonales anti-proteína F (anti-PF) y anti-pared celular (anti-PC) de *Ps. fluorescens* AH-70 permiten la detección y cuantificación de *Ps. fluorescens* y de otras bacterias psicotrofas en la leche cruda y en la carne fresca refrigeradas mediante el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) apropiadas. Sin embargo, uno de los factores limitantes para llevar a cabo esta detección son los anticuerpos policlonales.

La obtención de anticuerpos policlonales está condicionada a su obtención *in vivo* a partir de animales de experimentación, por lo que su disponibilidad se encuentra limitada por la necesidad de inmunizar nuevos lotes de conejos. Esta limitación obliga a pensar en el empleo, con el mismo fin, de los anticuerpos monoclonales. El desarrollo de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) ha supuesto un gran avance en el campo de la inmunología aplicada, ya que permite la obtención de clones de células híbridas o hibridomas que producen, de forma continua e ilimitada, anticuerpos monoespecíficos de actividad biológica conocida y especificidad constante.

En los últimos años han sido numerosos los trabajos de investigación que utilizan anticuerpos monoclonales en la detección inmunológica de microorganismos y toxinas microbianas en los alimentos (Thompson y col., 1986; Notermans y col., 1987; Mattingly y col., 1988; Lee y col., 1990). Por ello, es lógico proponer como trabajo futuro la obtención de anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína F y las células enteras de *Ps. fluorescens* AH-70, con el objeto de evaluar la calidad microbiológica de la leche y la carne cruda refrigeradas. No obstante, para ello será necesario desarrollar los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Inmunización *in vivo* de ratones Balb/c con la proteína F y las células enteras de *Ps. fluorescens* AH-70.

- 2.- Fusión de los linfocitos extraídos del bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma de ratón (P3X63-Ag. 8-653).

- 3.- Identificación de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales, lo que se realizará mediante el desarrollo de un ELISA

indirecto apropiado para tal fin.

4.- Selección de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales de interés.

5.- Clonación, expansión y congelación de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína F y las células enteras de *Ps. fluorescens* AH-70.

6.- Producción a gran escala de los anticuerpos monoclonales de interés, mediante la inoculación de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c.

7.- Purificación de los anticuerpos monoclonales del líquido ascítico de los ratones sensibilizados, por precipitación selectiva con sulfato amónico.

8.- Evaluación de los anticuerpos monoclonales obtenidos en la detección e identificación de *Ps. fluorescens* y otras bacterias psicotrofas, utilizando diversas variantes de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

9.- Utilización de los anticuerpos monoclonales anti-PF y anti-PC para evaluar la calidad microbiológica de la leche y la carne cruda refrigeradas.

Finalmente, es interesante señalar que los avances realizados en los últimos años en las técnicas de ingeniería genética aplicadas a la obtención de fragmentos activos de anticuerpos, están teniendo importantes repercusiones en el análisis de alimentos. Estos avances combinan la capacidad de expresar proteínas eucariontes en bacterias con el aislamiento y amplificación de los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con los sistemas de selección que permiten el aislamiento de los anticuerpos de una forma mucho más sencilla y rápida que la seguida en la selección de los anticuerpos monoclonales (Chiswell y McCafferty, 1992).

Los anticuerpos recombinantes obtenidos por manipulación genética, presentan las siguientes ventajas sobre los anticuerpos policlonales y monoclonales: 1) se obtienen en menos tiempo; 2) ofrecen la posibilidad de

prescindir de la inmunización de animales de experimentación y 3) permiten la obtención de reactivos de afinidad y especificidad precisas, mediante la utilización de técnicas que modifican la estructura y características del lugar de unión del anticuerpo con el antígeno. Estas ventajas hacen pensar en la posibilidad de obtener también anticuerpos recombinantes para estimar la calidad microbiológica de la leche y de la carne refrigeradas.

**CAPITULO VIII**

***BIBLIOGRAFIA***

- ADAMS, D. M., BARACH, J. T. y SPECK, M. L. (1975) Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.* **58**, 828-834.
- ADAMS, D. M., BARACH, J. T. y SPECK, M. L. (1976) Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk in milk proteins and stability of milk proteins to ultra-high-temperature treatment. *J. Dairy Sci.* **59**, 823-827.
- ADAMS, D. M. y BRAWLEY, T. G. (1981) Factors influencing the heat resistance of a heat-resistant lipase of *Pseudomonas*. *J. Food Sci.* **46**, 673-676.
- ALLEN, J. C. (1990) The value of immunoassays to food analysis. En *Developments and Application of Immunoassay for Food Analysis*. J. M. Rittenburg (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 59-80.
- ALVARADO, R., RODRIGUEZ YUNTA, M. A., HOZ, L., GARCIA DE FERNANDO, G. D. y ORDOÑEZ, J. A. (1992) Rapid p-nitroaniline test for assessing microbial quality of refrigerated meat. *J. Food Sci.* **57**, 1330-1331.
- ANGUS, B. L., CAREY, A. M., CARON, D. A., KROPINSKI, A. M. B. y HANCOCK, R. E. W. (1982) Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 299-309.
- ANNAN-PRAH, A. y JANC, M. (1988) Chicken to human infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: biotype and serotype correlation. *J. Food Prot.* **51**, 562-564.
- ANON (1985) Listeriosis outbreak associated with mexican-style cheese. California. *Morb. Mort. Weekly Rept.* **34**, 357-359.
- APPL, C. P. y MARSHALL, R. T. (1984) Detachment of *Pseudomonas fluorescens* P26 from beef rinsed in salt and acid solutions. *J. Food Prot.*

47, 537-541.

ASENSIO, M. A., ORDOÑEZ, J. A. y SANZ, B. (1988) Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Prot.* **51**, 356-360.

AUSTIN, B. L. y THOMAS, B. (1972) Dye reduction tests on meat products. *J. Sci. Food Agric.* **23**, 542.

AYRES, J. C. (1960) Temperature relationship and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. *Food Res.* **25**, 1-18.

AZCONA, J. I., MARTIN, R., ASENSIO, M. A., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1988) Heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AH-70: purification by affinity chromatography on cyclopeptide antibiotics. *J. Dairy Res.* **55**, 217-226.

BAKER, S. K. (1983) The keeping quality of refrigerated pasteurized milk. *Aust. J. Dairy Technol.* **38**, 124-127.

BAKER, J. M., GRIFFITHS, M. W. y COLLINS-THOMPSON, D. L. (1992) Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. *J. Food Prot.* **55**, 62-70.

BALA, K., MARSHALL, R. T., STRINGER, W. C. y NAUMANN, H. D. (1977) Effect of *Pseudomonas fragi* on the color of beef. *J. Food Sci.* **42**, 1176-1179.

BANDLER, D. K., GRAVANI, R. B., KINSELLA, J. K., LEDFORD, R. A., SENYK, G. F., SHIPE, W. F., WOLFF, E. T. y ZALL, R. R. (1981) The milk quality situation in New York state. *J. Dairy Sci.* **64**, 56-60.

BARACH, J. T., ADAMS, D. M. y SPECK, M. L. (1976) Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.* **59**, 391-395.

- BARCINA, Y., MORA, M. T. y HERRERA, A. (1989) Métodos de detección rápida en microbiología de los alimentos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* **29**, 149-161.
- BARNES, E. M. e IMPEY, C. S. (1968) Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 97-107.
- BAYER, E. A., SKUTELSKY, E., WYNNE, D. y WILCHEK, M. (1976) Preparation of ferritin-avidin conjugates by reductive alkylation for use in electron microscopic cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 933-939.
- BENEDICT, R. C., SCHULTZ, F. J. y JONES, S. B. (1990) Attachment and removal of *Salmonella* spp. on meat and poultry tissues. *J. Food Safety* **11**, 135-148.
- BENGSSTON, K., GARDHAGE, L. e ISAKSSON, B. (1973) Gelation in UHT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistant proteases. *Milchwissenschaft* **28**, 495-499.
- BENZ, R. y HANCOCK, R. E. W. (1981) Properties of the large iron permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **646**, 298-308.
- BETTS, R. P., FARR, L., BAUKES, P. y STRINGER, M. F. (1988) The detection of irradiated foods using the direct epifluorescent filter technique (DEFT). *J. Appl. Bacteriol.* **64**, 329-335.
- BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., JASKOT, D. y HAMMEMBERG, O. (1990) A method for DNA restriction endonuclease fingerprinting of coagulase-negative staphylococci. *J. Microbiol. Methods* **12**, 41-49.
- BIRNBOIM, H. C. y DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- BISHOP, J. R. y WHITE, C. H. (1985) Estimation of potential shelf-life of cottage cheese utilizing bacterial numbers and metabolites. *J. Food Sci.*

48, 663-667.

- BISHOP, J. R. y WHITE, C. H. (1986) Assessment of dairy product quality and potential shelf-life: a review. *J. Food Prot.* **49**, 739-753.
- BISHOP, J. R., WHITE, C. H. y FIRSTENBERG-EDEN, R. (1984) A rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. *J. Food Sci.* **47**, 471-475.
- BLACKBURN, C. D. (1993) Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in foods: a review. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 199-214.
- BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S. y KRACHENBUHL, J. P. (1984) The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron-microscope immunocytochemistry. En *Immunolabelling for Electron Microscopy*. J. M. Polak e I. M. Varndell (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 95-111.
- BOTHE, W. C., LÜCK, J. y JOOSTE, P. J. (1986) Determination of bacterial ATP in milk. The influence of adenosine triphosphate-hydrolyzing enzymes from somatic cells and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Prot.* **49**, 822-825.
- BRAMLEY, A. J. y MCKINNON, C. H. (1990) The microbiology of raw milk. En *Dairy Microbiology*. 2nd Ed. Vol. 1. R. K. Robinson (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 163-208
- BREED, R. S. (1916) The determination of bacteria in milk by direct microscopy examination. *Zentralbl. Bakteriol. II. Abt.* **30**, 337.
- BROOKS, F. T. y HANSFORD, C. G. (1923) Mould growths upon cold-store meat. *Transactions of the British Mycological Society.* **8**, 113-142.
- BUCHANAN, R. L. y PALUMBO, S. A. (1985) *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J. Food Safety* **7**, 15-29.

- BULTE, M. y REUTER, G. (1984) Impedance measurement as a rapid method for the determination of the microbial contamination of meat surfaces, testing two different instruments. *Int. J. Food Microbiol.* **1**, 113-125.
- CANDLISH, A. A. G. (1991) Immunological methods in food microbiology. *Food Microbiol.* **8**, 1-14.
- CERNY, G. (1976) Method for a distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**, 223-225.
- CHAMPAGNE, C. P., GARDNER, N y DOLLAN, G. (1989) Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2488-2492.
- CHESBRO, W., EVANS, T. y EIFERT, R. (1979) Very slow growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **139**, 625-638.
- CHISWELL, D. J. y McCAFFERTY, J. (1992) Phage antibodies: will new "coliclonal" antibodies replace monoclonal antibodies?. *Trends in Biotechnol.* **10**, 80-84.
- CHRISTOPHER, F. M., SIEDEMAN, S. C., CARPENTER, Z. L., SMITH, G. C. y VANDERZANT, C. (1979a) Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. *J. Food Prot.* **42**, 240-244.
- CHRISTOPHER, F. M., SIEDEMAN, S. C., CARPENTER, Z. L. y SMITH, G. C. (1979b) Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. *J. Food Prot.* **42**, 323-327.
- CLARK, R. B. y ENGVALL, E. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. En *Enzyme Immunoassays*. E. T. Maggio (ed.), Cleveland, CRC Press. pp: 167-179.
- COGAN, T. M. (1977) A review of heat-resistant lipases and proteinases and the quality of dairy products. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **1**, 95-105.

- COLLINS, E. B. (1981) Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* **64**, 157-160.
- COLLINS, S. J., BESTER, B. H. y MCGILL, A. E. J. (1993) Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. *J. Food Prot.* **56**, 418-425.
- COLLINS, W. S., METZGER, J. F. y JOHNSON, A. D. (1972) A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. *J. Immunol.* **108**, 852-856.
- COUSIN, M. A. (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot.* **45**, 172-207.
- COUSIN, M. A. y MARTH, E. H. (1977) Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft* **32**, 337-341.
- COX, W. A., FUNG, D. Y. C., BAILEY, J. S., HARTMAN, P. A. y VASAVEDA, P. C. (1987) Miniaturized kits, immunoassays and DNA hybridation assay for recognition and identification of foodborne bacteria. *Dairy Food Sanit.* **7**, 628-631.
- CREDIT, C., HEDERMAN, R., HEYWOOD, P. y WESTHOFF, D. (1972) Identification of bacteria isolated from pasteurized milk following refrigerated storage. *J. Milk Food Technol.* **35**, 708-709.
- CULL, M. y MCHENRY, C. S. (1990) Preparation of extracts from prokaryotes. *Meth. Enzymol.* **182**, 147-153.
- DAINTY, R. H. (1986) Chemical changes associated with microbial growth on meat stored at chill temperatures. *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work.* Ghent, Bélgica. pp: 171-186.
- DAINTY, R. H. (1989) Spoilage microbes on meat and poultry. *Food Sci. Technol. Today* **3**, 250-251.

- DAINTY, R. H., EDWARDS, R. A. y HIBBARD, C. M. (1984) Volatile compounds associated with the aerobic growth of some *Pseudomonas* species on beef. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 75-81.
- DAINTY, R. H. y HIBBARD, C. M. (1980) Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.* **48**, 387-396.
- DAINTY, R. H. y HIBBARD, C. M. (1983) Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 127-133.
- DAINTY, R. H., SHAW, B. G. y ROBERTS, T. A. (1983) Microbial and chemical changes in chill stored red meats. En *Food Microbiology: Advances and Prospects*. T. A. Roberts y F. A. Skinner (eds.), Academic Press Inc., Londres. pp: 151-178.
- D'AOUST, J. Y. y SEWELL, A. M. (1988) Reliability of the immunodiffusion 1-2 test system for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* **51**, 853-856.
- DAVIDSON, C. M., MABBS, P. y STUBBS, J. M. (1968) Some morphological and physiological properties of *Microbacterium thermosphactum*. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 551-559.
- DAVIS, J. G. (1981) The microbiology of milk products. En *Dairy Microbiology*. R. K. Robinson (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 31-89.
- DEETH, H. C., FITZ-GERALD, C. H. y WOOD, A. F. (1979) Lipolysis and butter quality. *Aust. J. Dairy Technol.* **34**, 146-149.
- DEETH, H. C., FITZ-GERALD, C. H. y WOOD, A. F. (1983) Lipolytic enzymes and hydrolytic enzymes in milk and milk products. En *Developments in Dairy Chemistry*. Vol 2: Lipids. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 195-239.

- DODSWORTH, P. J. y KEMPTON, A. G. (1977) Rapid measurement of meat quality by resarzurin reduction. II. Industrial application. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **10**, 158-160.
- DONNELLI, C. W. (1990) Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat. En *Foodborne Listeriosis*. A. J. Miller y J. L. Smith (eds.), Society for Industrial Microbiology. Elsevier Science Publishing. Inc., Nueva York. pp: 189-193.
- DOVEY, S. y TOWNER, K. J. (1989) A biotinylated DNA probe to detect bacterial cells in artificially contaminated foodstuffs. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 43-47.
- DOWNEY, W. K. (1980) Review of the progress of dairy science: flavour impairment from the pre and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *J. Dairy Res.* **47**, 237-252.
- DRIESSEN, F. M. (1983) Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. *Neth. Milk Dairy J.* **37**, 193-196.
- DUMONT, J. P., DELESPAUL, G., MIGNOT, B. y ADDA, J. (1977) Influence des bacteries psychrotrophes sur la qualité organoleptique des fromages a partie molle. *Le Lait* **57**, 619-630.
- DUNBAR, B. S. y SCHWOEBEL, E. D. (1990) Preparation of polyclonal antibodies. En *Methods in Enzymology*. Vol 182 (49). M. P. Deustcher (ed.), Academic Press Inc., Londres. pp: 663-670.
- DZIEZAK, J. D. (1987) Rapid methods for microbiological analysis of foods. *Food Technol.* **41**, 56-73.
- EARNSHAW, R. y GIDLEY, J. (1992) Molecular methods for typing bacterial food pathogens. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 39-43.
- EASTER, M. C. (1985) Uses of rapid microbiology in bakery quality control. *Baking Today* **5**, 17-36.

- EASTER, M. C., KROLL, R. G., FARR, L. y HUNTER, A. C. (1987) Observations on the introduction of the DEFT for the routine assessment of bacteriological quality. *J. Soc. Dairy Technol.* **40**, 100-103.
- EDDY, B. P. (1960) The use and meaning of the term "psychrophilic". *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 189-190.
- EDWARDS, R. A., DAINTY, R. H. y HIBBARD, C. M. (1983) The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration and aerobically stored beef, pork and lamb. *J. Food Technol.* **18**, 777-778.
- ELLISON, A., DOOD, C. E. R. y WAITES, W. M. (1989) Use of plasmid profiles to differentiate between strains of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* **6**, 93-98.
- ERIBO, B. E. y JAY, J. M. (1985) Incidence of *Acinetobacter* spp. and other Gram-negative oxidase-negative species (genus *Acinetobacter*). *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 256, 257.
- FAIRBAIRN, D. J. y LAW, B. A. (1986) Proteinases of psychrophilic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* **53**, 139-177.
- FANTASIA, M., RICCI, N., MANUPPELLA, A., MARTIN, A., FILETICI, E. y LAURELLI, T. (1990) Phage type and DNA plasmid profile of *Salmonella typhimurium* isolates in the area of Isernia, Italy. *Epidemiol. Infect.* **105**, 317-323.
- FARBER, J. M., DALEY, E., COATES, F., EMONS, D. B. y McKELLAR, R. (1992) Factors influencing the survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a High-Temperature Short-Time pasteurizer. *J. Food Prot.* **55**, 946-951.
- FARBER, J. M. (1989) Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 285-291.
- FARBER, J. M. e IDZIAK, E. S. (1982) Detection of glucose oxidation

products in chilled fresh beef undergoing spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 521-524.

FIRSTENBERG-EDEN, R. (1986) Electrical impedance for determining microbial quality of foods. En *Foodborne Microorganisms and their Toxins: Developing Methodology*. M. D. Pierson y N. J. Stern (eds.), Marcel Dekker Inc., Nueva York. pp: 129-144.

FIRSTENBERG-EDEN, R., NOTERMANS, S. y VAN SCHOTHORST, M. (1978) Attachment of certain bacterial strains to chicken and beef meat. *J. Food Safety* **1**, 217-228.

FIRSTENBERG-EDEN, R. y SHARPE, A. N. (1991) Impact of biotechnology and new methodology on microbial testing of foods. En *Biotechnology and Food Ingredients*. I. Golberg y R. Williams (eds.), Van Nostrand Reinhold, Nueva York. pp: 507-535.

FIRSTENBERG-EDEN, R. y ZINDULIS, J. (1984) Electrochemical changes in media due to microbial growth. *J. Microbiol. Methods* **2**, 103-105.

FITTER, S., HEUZENROEDER, M. y THOMAS, C. J. (1992) A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 53-59.

FITTS, R. (1985) Development of a DNA-DNA hybridation test for the presence of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* **39**, 95-102.

FITTS, R., DIAMOND, M. L., HAMILTON, C. y NORI, M. (1983) DNA-DNA hybridation assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1146-1151.

FLEMING, D. W., COCHI, S. L., MacDONALD, K. L., BRONDUM, J., HAYES, P. S., PLIKAYTIS, B. D., HOLMES, M. B., AUDIRIER, A., BROOME, C. U. y REINGOLD, A. L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 404-408.

- FORREST, W. W. (1972) Microcalorimetry. *Meth. Microbiol.* **6**, 285-318.
- FORSTER, J. (1887) Ueber einige eigenchaften leuchtender bakterien. *Centr. Bakteriolog. Parasitenk* **2**, 337-340.
- FRANK, J. F., HANKEN, L., KOBRUGER, J. A. y MARTH, E. H. (1985) Tests for groups of microorganisms. En *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 15th ed. G. H. Richardson (ed.), American Public Health Association, Washington D. C. pp: 194-197.
- FUNG, D. Y. C. (1975) Evaluation of an automatic Gram-staining machine. *J. Milk Food Technol.* **38**, 262-265.
- FUNG, D. Y. C. (1984) Rapid and automatic methods of microbiological analysis. *Proc. Inds. Meat Res. Conf.* pp: 1-5.
- FUNG, D. Y. C., LEE, C. y KASTNER, C. L. (1980) Adhesive tape method for estimating microbial load on meat surfaces. *J. Food Prot.* **43**, 295-297.
- GARCIA, M. L., SANZ, B., GARCIA-COLLIA, P y ORDOÑEZ, J. A. (1989) Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteinases from *Pseudomonas* isolated from raw milk. *Milchwissenschaft* **44**, 457-550.
- GARCIA, M. J., ZUÑIGA, M. y URRUBURU, F. (1991) Métodos directos de medida de crecimiento bacteriano. *Alimentaria* **9**, 31-34.
- GARCIA-COLLIA, P., MAS, B., ORDOÑEZ, J. A. y SANZ, B. (1981). Incidencia de *Pseudomonas* en la leche cruda refrigerada. *VIII Congreso Nacional de Microbiología*. Madrid. p: 314.
- GARCIA-COLLIA, P., SANZ, B., GARCIA, M. L. y ORDOÑEZ, J. A. (1988) Heat stability of the extracellular lipase from a *Pseudomonas* strain isolated from refrigerated raw milk. *Microbiol. SEM.* **4**, 125-128.
- GARDNER, G. A., CARSON, A. W. y PATTON, J. (1967) Bacteriology of

- pre-packed pork with reference to gas composition within the pork. *J. Appl. Bacteriol.* **30**, 321-333.
- GARVIE, E. I. y ROWLANDS, A. (1952) The role of microorganisms in dye-reduction and keeping quality tests. II. The effect of microorganisms when added to milk in pure and mixed culture. *J. Dairy Res.* **19**, 263-274.
- GAZZAR, S. S., RASCO, B. A. y DONG, F. M. (1992) Application of immunochemical assays to food analysis. *Cr. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**, 197-229.
- GENNARI, M. y DRAGOTTO, F. (1992) A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 281-282.
- GEYER, R., GALANOS, C., WESTPHAL, O. y GOLECKI, J. R. (1979) A lipopolysaccharide-binding cell surface protein from *Salmonella minnesota*. *Eur. J. Biochem.* **98**, 27-38.
- GILL, C. O. (1976) Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 401-410.
- GILL, C. O. (1979) Intrinsic bacteria in meat. *J. Appl. Bacteriol.* **47**, 367-378.
- GILL, C. O. (1982) Microbial interactions with meats. En *Meat Microbiology*. M. D. Brown (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 225-264.
- GILL, C. O. (1983) Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J. Food Prot.* **46**, 442-452.
- GILL, C. O. y NEWTON, K. G. (1977) The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 189-195.

- GILL, C. O. y NEWTON, K. G. (1978) The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Sci.* **2**, 207-217.
- GILL, C. O. y NEWTON, K. G. (1979) Spoilage of vacuum-packaged dark, firm dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 362-364.
- GILL, C. O. y NEWTON, K. G. (1980) Development of bacterial spoilage at adipose tissue surfaces of fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1076-1077.
- GILL, C. O. y NEWTON, K. G. (1982) The effect of lactic acid concentration on the growth of meat Gram-negative psychrotrophs from a meat works. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 284-288.
- GILLELAND, H. E., GILLELAND, L. B. y MATTHEWS-GREER, J. M. (1988) Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* **56**, 1017-1022.
- GILLELAND, H. E., PARKER, M., MATTHEWS-GREER, J. M. y BERG, R. D. (1984) Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* **44**, 49-54.
- GONZALEZ DE CANALES, F. (1990) La problemática creada por el tratado de adhesión al sector lácteo español. En *Economía, Calidad y Nutrición en el Sector Lácteo Español*. Seminario Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander. Septiembre.
- GORDI, A. y ASPARGAUS, G. R. (1980) Improved microtechnique for endotoxin assay by the *Limulus* amoebocyte lysate test. *Anal. Biochem.* **109**, 382-385.
- GOUNOT, A. M. (1991) Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications: a review. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 386-397.

- GRAM, L. y SOGAARD, H. (1985) Microcalorimetry as a rapid method for estimation of bacterial levels in ground meat. *J. Food Prot.* **48**, 341-345.
- GREEN, N. M. (1975) Avidin. En *Advances in Protein Chemistry*. Vol. 29. M. L. Anson y J. T. Edsell (eds.), Academic Press, Nueva York. pp: 85-113.
- GREER, G. (1981) Rapid detection of psychrotrophic bacteria in relation to retail beef quality. *J. Food Sci.* **46**, 1669.
- GRIFFITHS, M. W. (1993) Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J. Dairy Sci.* **76**, 3118-3125.
- GRIFFITHS, M. W. y PHILLIPS, D. J. (1990) Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *Dairy Technol.* **43**, 62-66.
- GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, D. J. y MUIR, D. D. (1987) Effect of low temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. *Food Microbiol.* **4**, 285-291.
- GUAMIS, B., HUERTA, T. y GARAY, E. (1987) Heat inactivation of bacterial proteases in milk before UHT treatment. *Milchwissenschaft* **42**, 651-653.
- HANCOCK, R. E. W. y CAREY, A. M. (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140**, 902-910.
- HANCOCK, R. E. W., DECAD, G. M. y NIKAIDO, H. (1979) Identification of the proteins producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Ps. aeruginosa* PA01. *Biochim. Biophys. Acta* **554**, 323-333.
- HANCOCK, R. E. W. y NIKAIDO, H. (1978) Outer membrane of Gram-negative bacteria. Isolation from *Ps. aeruginosa* PA01 and use in

- reconstitution and definition of permeability barrier. *J. Bacteriol.* **136**, 381-390.
- HANSEN, K., MIKKELSEN, T. y MOLLER-MADSEN, A. (1982) Use of the *Limulus* test to determine the hygienic status of milk products as characterized by levels of Gram-negative bacterial polysaccharide present. *J. Dairy Res.* **49**, 322-328.
- HARDY, D., KRAEGER, S. J., DUFOUR, S. W. y CADY, P. (1977) Determination of microbial contamination in frozen vegetables using automatic impedance measurements. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 14-17.
- HARLOW, E. y LANE, D. (1988) En *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York Cold Spring Harbor Laboratory. pp: 298-299
- HATCHER, W. S., DIBENEDETTO, S., TAYLOR, L. E. y MURDOCK, D. I. (1977) Radiometric analysis of frozen concentrate orange juice for total viable microorganisms. *J. Food Sci.* **42**, 636-639.
- HEDGES, A. J., SHANNON, R. y HOBBS, R. P. (1978) Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the spiral plate maker, the droplette and the Miles and Misra methods. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 57-65.
- HECHELMANN, H. y KASPROWIAK, R. (1991) Microbiological criteria for stable products. *Fleischwirtsch.* **71**, 1303-1308.
- HILL, W. S., KEARLER, P., TRUCKESS, M. W., FENG, P., KAYSNER, A. y LAMPEL, K. A. (1991) Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 707-711.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. y JASPER, S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225-1228.

- HOLLEY, R. A., SMITH, S. M. y KEMPTON, A. G. (1977) Rapid measurement of meat quality by resazurin reduction. I. Factors affecting test validity. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **10**, 153-157.
- INGRAHAM, J. L. y STOKES, J. L. (1959) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **23**, 97-108.
- INGRAM, M. y DAINITY, R. H. (1971) Changes caused by microbes in spoilage of meats. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 21-39.
- ISLAM, M. S. y STIMSON, W. H. (1987) Production of monoclonal antibodies to *Shigella*. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies with intact bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 85-89.
- IWANAGA, S., MORITA, T., HARADA, T., NAKAMURA, S. (1978) Chromogenic substrate assay method for bacterial endotoxins using horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocyte lysate. *J. Biochem.* **92**, 793-800.
- JARVIS, B. (1982) Rapid methods in food microbiology: a practical approach. *Food Technol. Aust.* **34**, 518-525.
- JARVIS, B. y EASTER, M. C. (1987) Rapid methods in the assessment of microbial quality: experiences and needs. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* pp: 115-126.
- JAY, J. M. (1972) Mechanism and detection of microbial spoilage in meats at low temperatures: a status report. *J. Milk Food Technol.* **35**, 467-471.
- JAY, J. M. (1977) The *Limulus* lysate endotoxin assay as a test of microbial quality of ground beef. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 99-109.
- JAY, J. M. (1981) Rapid estimation of microbial numbers in fresh ground beef by use of the *Limulus* test. *J. Food Prot.* **44**, 275-278.
- JAY, J. M. (1986) Microbial spoilage: indicators and metabolites. En

- Foodborne Microorganisms and their Toxins: Developing Methodology*. M. L. Pierson y N. J. Stern (eds.), Marcel Dekker Inc., Nueva York. pp: 219-240.
- JAY, J. M. (1992a) Low temperature food preservation and characteristics of psychrotrophic microorganisms. En *Modern Food Microbiology*. 4th edition. Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York. pp: 314-335.
- JAY, J. M. (1992b) Culture, microscopic and sampling methods. En *Modern Food Microbiology* 4th edition. Van Nostrand Reinhold Company, New York. pp: 97-119.
- JAY, J. M. (1992c) Physical, chemical and immunologic methods. En *Modern Food Microbiology* 4th edition. Van Nostrand Reinhold Company, New York. pp: 122-165.
- JAY, J. M., MARGITIC, S., SHEREDA, A. L. y COVINGTON, H. V. (1979) Determining endotoxin content of ground beef by the *Limulus* amoebocyte lysate test as a rapid indicator of microbial quality. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 885-890.
- JOHNSON, H. M., BUKOVIC, J. A., KAUFFMAN, P. E. y PEELER, J. T. (1972) Staphylococcal enterotoxin B: solid phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.* **22**, 837-841.
- JORGENSEN, H. L. y SCHULZ, E. (1985) Turbidimetric measurement as a rapid method for the determination of the bacteriological quality of minced beef. *Int. J. Food Microbiol.* **2**, 177-183.
- JUFFS, B. H. S. (1970) A four-day count for psychrotrophs. *Aust. J. Dairy Technol.* **25**, 30-32.
- JUFFS, B. H. S. (1973) Identification of *Pseudomonas* spp. isolated from milk produced in South Eastern Queensland. *J. Appl. Bacteriol.* **36**, 585-598.
- JUFFS, B. H. S. (1974) Influence of proteinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on manufacture and quality of

- Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* **29**, 74-78.
- KAPPERUD, G., NESBAKKEN, T., ALEKSIS, S. y MOLLARET, H. H. (1990) Comparison of restriction endonuclease analysis and fenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1125-1131.
- KEPPLE, K., OHTSUKA, R., KEPPLE, R., MOLINEUX, I. y KRORANA, H. G. (1971) Studies of polynucleotides. Rapid replication of short synthetic DNA's as a catalyzer by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **56**, 341-361.
- KING, G. J. (1989) Plasmid analysis and variation in *Pseudomonas syringae*. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 489-496.
- KLINGER, J. D. y JOHNSON, A. R. (1988) A rapid nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. *Food Technol.* **42**, 66-70.
- KNABEL, S. J., WALKER, H. W., HARTMAN, P. A. y MENDONCA, A. (1990) Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 370-376.
- KOHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **266**, 495-497.
- KOTULA, A. W., BERRY, B. W. y EMSWILER-ROSE, B. S. (1987) Microbiology of restructured meat and poultry products. En *Advances in Meat Research*. Vol. 3: restructured meat and poultry products. A. M. Pearson y J. R. Dutson (eds.), AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. pp: 161-220.
- KRAMER, J. M., KENDAL, M. y GILBERT, R. J. (1979) Evaluation of the spiral plate and laser colony counting techniques for the enumeration of bacteria in foods. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 289.
- KRAFT, A. A. y REY, C. R. (1979) Psychrotrophic bacteria in foods: an

- update. *Food Technol.* **33**, 66-71.
- KRICKA, L. J. (1988) Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins. *Anal. Biochem.* **175**, 14-21.
- KROLL, R. G. (1985) A cytochrome oxidase test for the rapid detection of psychrotrophic bacteria in milk. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 484-489.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LABADIE, J. y DESNIER, I. (1992) Selection of cell wall antigens for the rapid detection of bacteria by immunological methods. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 220-226.
- LAMBERT, A. D., SMITH, J. P. y DODDS, K. L. (1991) Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. *Food Microbiol.* **8**, 267-297.
- LAMBRECHT, R. S., CANIERE, J. F. y COLLINS, M. T. (1988) A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 910-916.
- LAMMERDING, A. M., GARCIA, M. M., MANN, E. D., ROBINSON, Y., DORWARD, W. J., TRUSCOTT, R. B. y TITTIGER, I. (1988) Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef and poultry in Canada. *J. Food Prot.* **51**, 47-52.
- LAMPI, R. A., MIKALSON, D. A., ROWLEY, D. B., PREVITE, J. J. y WELLS, R. E. (1974) Radiometry and microcalorimetry techniques for the rapid detection of food-borne microorganisms. *Food Technol.* **28**, 52-55.
- LAW, B. A. (1979) Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects in milk and milk products. *J. Dairy Res.* **46**, 573-588.
- LAW, B. A., ANDREWS, A. T. y SHARPE, M. E. (1977) Gelation of

- ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *J. Dairy Res.* **44**, 145-148.
- LAW, B. A., COUSINS, M. E., SHARPE, A. N. y DAVIES, F. L. (1979) Psychrotrophs and their effects on milk and dairy products. En *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Enviroment*. A. D. Russell y R. Fuller (eds.), Society for Applied Bacteriology. Technical series n° 13. Academic Press, Londres. pp: 137-152.
- LAW, B. A. y MABBIT, L. A. (1983) New methods for controlling the spoilage of milk and milk products. En *Food Microbiology: Advances and Prospects*. T. A. Roberts and F. A. Skinner (eds.), Society for Applied Bacteriology. Symposium Series n° 11. Academic Press, Londres. pp: 131-150.
- LAW, B. A., SHARPE, M. E. y CHAPMAN, H. R. (1976) The effect of lipolytic Gram-negative pscrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **43**, 459-468.
- LAZDUNSKI, A., MURGIER, M. y LAZDUNSKI, C. (1975) Evidence of an aminopeptidase localized near the cell surface of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **60**, 349-355.
- LEE, W. H. (1977) An assessment of *Yersinia enterocolitica* and its presence in foods. *J. Food Prot.* **40**, 486-489.
- LEE, H. A., WYATT, G. M., BRAMHAM, S. y MORGAN, M. R. A. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1541-1546.
- LEIGHTON JONES, J. (1991) DNA probes: applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 28-32.
- LEVIN, G. V., HARRISON, V. R. y HESS, W. C. (1956) Preliminary report on a one-hour presumptive test for coliform organisms. *J. Amer. Water*

- Works Assoc.* **48**, 75-80.
- LESSIE, T. G. y PHIBBS, P. V. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, 359-387.
- MABBIT, L. A. (1981) The significant metabolic activity of bacteria in raw milk. *Kiel. Milchwirts. Forschung.* **33**, 273-280.
- MACKEY, B. M. y BRATCHELL, N. (1989) The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 89-94.
- MARKWELL, M. A. K., HASS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **81**, 206-210.
- MARTINEZ, A. y RODRIGO, M. (1987) Métodos rápidos en el análisis microbiológico de los alimentos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* **27**, 15-23.
- MATTILA, T. (1987) Automated turbidometry. A method for enumeration of bacteria in food samples. *J. Food Prot.* **50**, 640-642.
- MATTILA, T. y ALIVEHMAS, J. (1987) Automatic turbidometry for predicting colony forming units in raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **4**, 157-160.
- MATTINGLY, J. A., BUTMAN, B. T., PLANK, M. C., DURHAM, R. J. y ROBINSON, B. J. (1988) Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 679-681.
- MAY, S. A., MIKOLAJCIK, E. M. y RITCHER, E. R. (1989) Conventional tube and microplate *Limulus* amoebocyte lysate procedures for determination of Gram-negative bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* **72**, 1137-1141.
- McCRADY, M. H. (1915) The numerical interpretation of fermentation tube

- results. *J. Infect. Dis.* **17**, 183-212.
- McKELLAR, R. C., FROEHLICH, D. A., BUTLER, G., CHOLETTE, H. y CAMPBELL, C. (1984) The effect of uncooled storage on proteolysis, bitterness and apparent viscosity in UHT milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **17**, 14-17.
- McMEEKIN, T. A. (1975) Spoilage association of chicken breast muscle. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**, 44-47.
- McMEEKIN, T. A. (1982) Microbial spoilage of meats. En *Developments in Food Microbiology*. Vol. 1. R. Davies (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 1-40.
- MEIGHEN, E. A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* **55**, 123-142.
- MELVAAR, K. L. y FYSTRO, D. (1982) Modified micromethod of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for endotoxin. *Appl Environ. Microbiol.* **43**, 493-494.
- MERINO, S., CAMPRUBI, S. y TOMAS, J. M. (1993) Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 149-154.
- MIKOLAJCIK, E. M. (1979) Psychrotrophic bacteria and dairy products quality. Major organisms involved and defects produced. *Cultured Dairy Prod. J.* **14**, 6-10.
- MIKOLAJCIK, E. M. (1983) GNB organisms tests yields reliable results. *Dairy Field* **166**, 38-44.
- MIKOLAJCIK, E. M. y BRUCKER, R. B. (1983) *Limulus* amoebocyte lysate assay. A rapid test for the assessment of raw and pasteurized milk quality. *Dairy Food Sanit.* **3**, 129-131.
- MILLIERE, J. B. y VEILLET-PONCET, L. (1985) *Flavobacterium*, bacterie

- psychrotrophe caséolytique du lait cru. *Sci. Aliment.* **5**, 17-20.
- MIRHABIBOLLAHI, B., BROOKS, J. L. y KROLL, R. G. (1990) Development and performance of an enzyme-linked amperometric immunosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 577-585.
- MIURA, T. y MIZUSHIMA, S. (1968) Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 159-161.
- MIZUNO, T. y KAGEYAMA, M. (1978) Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* **84**, 179-191.
- MIZUNO, T. y KAGEYAMA, M. (1979) Isolation and characterization of major outer membrane proteins from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO with special reference to peptidoglycan-associated proteins. *J. Biochem.* **86**, 979-989.
- MOLIN, G. y TERNSTRÖM, A. (1982) Numerical taxonomy of psychrophilic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1249-1264.
- MORITA, R. Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **39**, 144-167.
- MOTTAR, J. F. (1984) Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UHT. *Le Lait* **64**, 29-45.
- MOTTAR, J. F. (1988) The determination of endotoxins as a measure for the bacteriological quality of foodstuffs. *Belgian J. Food Chem. Biotechnol.* **43**, 69-74.
- MOTTAR, J. F. (1989) Effect on the quality of dairy products. En *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. R. C. McKellar, (ed.), Ed CRC Press Inc., Boca Raton y Florida. pp: 227-243.

- MOTTAR, J. F., DE BLOCK, J., MERCHERS, M., VANTOMME, K. and MOERMANS, R. (1993) Routine *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test for endotoxin determination in milk using a Toxinometer ET-201. *J. Dairy Res.* **60**, 223-228.
- MUIR, D. D., PHILLIPS, J. D. y DALGLEISH, D. G. (1979) The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *J. Soc. Dairy Technol.* **32**, 19-23.
- MUTHARIA, L. M. y HANCOCK, R. E. W. (1983) Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **42**, 1027-1033.
- MUTHARIA, L. M. y HANCOCK, R. E. W. (1985) Characterization of two surface-localized antigenic sites on porin protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 381-386.
- NAKAE, T. (1976) Identification of the outer membrane protein of *Escherichia coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71**, 877-884.
- NAKAE, T. y ELLIOTT, J. A. (1965) Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of aminoacids. *J. Dairy Sci.* **48**, 293-299.
- NAKANE, P. K. y KAWAOI, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1084.
- NERURKAR, L. S., NAMBA, M., BRASHEARS, G., JACOB, A. J., LEE, Y. J. y SEVER, J. L. (1984) Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens by use of a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 109-114.
- NEWBY, P. J. (1991) Analysis of high-quality pharmaceutical grade water by a direct epifluorescent filter technique microcolony method. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 291-293.

- NEWTON, K. G. y GILL, C. O. (1978) The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **44**, 91-95.
- NOTERMANS, S., BOOT, R. y TATINI, S. R. (1987) Selection of monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins in heat processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* **5**, 49-51.
- NOTERMANS, S., HEUVELMAN, K. J., y WERNARS, K. (1988) Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 531-533.
- NOTERMANS, S. y KAMPELMACHER, E. H. (1974) Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. *Br. Poultr. Sci.* **15**, 573-585.
- NOTERMANS, S. y KAMPELMACHER, E. H. (1983) Attachment of bacteria in meat processing. *Fleischwirtsch.* **63**, 72-78.
- NOTTINGHAM, P. M. (1982) Microbiology of carcass meats. En *Meat Microbiology*. M. D. Brown (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 13-65.
- OEHLRICH, H. K. y McKELLAR, R. C. (1983) Evaluation of an 18°C/45 hour plate count technique for the enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* **46**, 528-529.
- OLIVE, D. M. (1989) Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after Polymerase Chain Reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 261-265.
- OLIVE, D. M., JOHNY, M. y SETHI, S. K. (1990) Use of an alkaline phosphatase-labeled synthetic oligonucleotide probe for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin Microbiol.* **28**, 1565-1569.
- OLIVEIRA, J. S. y PARMELEE, C. E. (1976) Rapid enumeration of

- psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.* **39**, 269-272.
- OSBORN, M. J., GANDER, J. E., PARISI, E. y CARSON, J. (1973) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* **247**, 3962-3972.
- PATEL, T. R., BARTLETT, F. M. y HAMID, J. (1983) Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. *J. Food Prot.* **46**, 90-94.
- PATERSON, G. E. y TIFFIN, A. I. (1988) Production of a monoclonal antibody specific for *Salmonella* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 41-43.
- PAYNE, M. J. y KROLL, R. G. (1991). Methods for the separation and concentration of bacteria from foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 315-319.
- PEREZ DE CASTRO, B. (1989) Desarrollo de una prueba rápida y sencilla para determinar el grado de frescura de la carne y leche. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- PEREZ DE CASTRO, B., ASENSIO, M. A., SANZ, B. y ORDOÑEZ, J. A. (1988) A method to assess the bacterial content of refrigerated meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1462- 1465.
- PESTKA, J. J., LI, V., HARDER, W. O. y CHU, F. S. (1981) Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 294-301.
- PETERKIN, P. I. y SHARPE, A. N. (1984) Rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods by direct demonstration of enterotoxigenic colonies on membrane filters by enzyme immunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1047-1053.

- PETRICK, H. A. P., AMBROSIO, R. E. y HOLZAPFEL, W. H. (1988) Isolation of a DNA probe for *Lactobacillus curvatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 405-408.
- PETTIPHER, G. L. (1986) Review: the direct epifluorescent filter technique. *J. Food Technol.* **21**, 535-546.
- PETTIPHER, G. L., MANSELL, R., MCKINNON, C. H. y COUSINS, M. C. (1980) Rapid membrane filtration epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 423-429.
- PETTIPHER, G. L. y RODRIGUEZ, U. M. (1982) Rapid enumeration of microorganisms on food by the direct epifluorescent filter. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 809-813.
- PETTIPHER, G. L., WATTS, Y. B., LANGFORD, S. A. y KROLL, R. G. (1992) Preliminary evaluation of COBRA, an automated DEFT instrument for the rapid enumeration of microorganisms in cultures, raw milk, meat and fish. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 206-209.
- PHILLIPS-JONES, M. K., IWANEJKO, L. A. y LONGDEN, M. S. (1989) Analysis of plasmid profiling as a method for rapid differentiation of food-associated *Clostridium perfringens* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 243-254.
- PIERSON, M. D., COLLINS-THOMPSON, D. L. y ORDAL, Z. J. (1970) Microbiological sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. *Food Technol.* **24**, 1171-1175.
- PIETTE, J. P. G. e IDZIAK, E. S. (1991) Role of flagella in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to tendon slices. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1635-1639.
- PIETTE, J. P. G. e IDZIAK, E. S. (1992) A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2783-2791.

- PISHAWIKAR, M. S., SINGHAL, R. S. y KULKARNI, P. R. (1992) Rapid non-microbiological methods for detecting microorganisms in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 165-169.
- PONCE DE LEON, J. L. (1993) La máquina de ordeño y el tanque refrigerante, factores fundamentales para obtener leche de calidad para la industria. *ILE. Marzo*, 33-42.
- PREVITE, J. J. (1972) Radiometric detection of some food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.* **24**, 535-539.
- PRIOR, R. B. y SPAGNA, V. A. (1979) Adaptation of a microdilution procedure to the *Limulus* lysate assay for endotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 394-395.
- PUNCH, J. D. y OLSON, J. C. (1964) Comparison between standard methods procedure and a surface plate method for estimating psychrophilic bacteria in milk. *J. Milk Food Technol.* **27**, 43-47.
- QUESNEAU, R. (1983) La luminiscence. *Tech. Lait.* **974**, 49-59.
- REINHEIMER, J. A., BARGAGNA, M. L. y RAMANZIN, M. G. (1985) Psychrotrophic microflora of raw milk in the Santa Fe region and its seasonal variation. *Rev. Fac. Ing. Quím.* **47**, 29-33.
- RICO MANSILLA, A (1990) La problemática higiosanitaria de la cabaña bovina de leche española. En *Economía, Calidad y Nutrición en el Sector Lácteo Español*. Seminario Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander. Septiembre.
- RITCHER, R. (1979) Psychrotrophic bacteria and shelf-life. *Am. Dairy Res.* **41**, 48-50.
- RODRIGUEZ, U. M. y KROLL, R. G. (1988) A rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.* **64**, 65-78.

- ROHM, H., ELISKASES-LECHNER, F. y BRAÜER, M. (1992) Diversity of yeasts in selected dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 370-376.
- ROSE, S. A. y STRINGER, M. F. (1989) Immunological methods. En *Rapid Methods in Food Microbiology*. Vol. 26. M. R. Adams y C. F. A. Hope (eds.), Surrey, Reino Unido. pp: 121-167.
- ROTH, L. A. y CLARK, D. S. (1972) Studies on the bacterial flora of vacuum-packaged fresh beef. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1761-1766.
- ROWLEY, D. B., SRIMIVASA, H. P. y PREVITE, J. J. (1977) Use of a sodium formate in radiometric determination of microbial acceptability of cooked vegetables. *Abst. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* pp: 259.
- RUSSELL, N. J. y FUKUNAGA, N. (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 171-182.
- SACKS, L. E. y MANEFEE, E. (1972) Thermal detection of spoilage in canned foods. *J. Food Sci.* **37**, 928-931.
- SAFFLE, R. L., MAY, K. N., HAMID, H. A. e IRBY, J. D. (1961) Comparing three rapid methods of detecting spoilage in meat. *Food Technol.* **15**, 465-467.
- SAIKI, R. K., SCARF, S. y FALOONE, F. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* **230**, 1350-1353.
- SAMADPOUR, M., LISTON, J., ONGERTH, J. E. y TARR, P. I. (1990) Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1212-1215.
- SAMARAJEEWA, U., WEI, C. I., HUANG, T. S. y MARSHALL, M. R. (1991) Application of immunoassay in the food industry. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 403-434.

- SCHABERG, D. R., TOMPKINS, L. S. y FALKOW, S. (1981) Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 1105-1108.
- SCHEINBACH, S. y HONG, S. I. (1988) Detection of resident populations of *Salmonella* and *Escherichia coli* in food ingredients by plasmid analysis. *Food Microbiol.* **5**, 235-241.
- SCHIEMANN, D. A. (1978) Association of *Yersinia enterocolitica* with the manufacture of cheese and occurrence in pasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 274-277.
- SCHMIDT-NIELSEN, S. (1902) Über einige psychrophile mikroorganismen und ihr vorkommen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abstr.* **2,9**, 145.
- SCHRÖDER, M. J. A., COUSINS, C. M. y McKINNON, C. H. (1982) Effect of psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keeping quality at 11 and 50°C of HTST-pasteurized milk in the UK. *J. Dairy Res.* **49**, 619-630.
- SEIKIZARA, J. y FUKUI, S. (1973) Isolation, solubilization and reaggregation of outer membrane of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **307**, 104-117.
- SELGAS, D., MARIN, M. L., PIN, C. y CASAS, C. (1993) Attachment of bacteria to meat surfaces: a review. *Meat Sci.* **34**, 265-273.
- SHAH, D. B. y RHEA, U. S. (1986) Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli* identification and enumeration in nitrocellulose membrane by enzyme immunoassay. *Int. J. Food Microbiol.* **3**, 79-82.
- SHARPE, A. N., WOODROW, M. N. y JACKSON, A. K. (1970) Adenosinetriphosphate (ATP) levels in food contaminated by bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 758-767.
- SHAW, B. G., HARDING, C. D., HUDSON, W. H. y FARR, L. (1987) Rapid estimation of microbial numbers on meat and poultry by the direct

- epifluorescent technique. *J. Food Prot.* **50**, 652-657.
- SHAW, B. G. y LATTY, J. B. (1984) A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source tests. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 59-67.
- SHAW, B. G. y LATTY, J. B. (1988) A numerical taxonomic study of non-motile non-fermentative Gram-negative bacteria from foods. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 7-21.
- SHELLEY, A. W., DEETH, H. C. y MACRAE, I. C. (1986) Growth of lipolytic psychrotrophic pseudomonads in raw and ultra-heated treated milk. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 395-400.
- SIMOR, A. E., SHAMES, B., DRUMM, B., SHERMAN, P., LOW, D. E. y PENNER, J. L. (1990) Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 83-86.
- SLAVCHEV, G. y ZLATKA, D. (1989) Detection of *Yersinia enterocolitica* in milk and milk products by ELISA. *Food Sci. Technol. Abstr.* **21** (Abstr. 2, p:11).
- SMALL, P. C. L. y FALKOW, S. (1986) Development of a DNA probe for the virulence plasmid of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. En *Microbiology*. L. Leive (ed.), American Society for Microbiology. Washington D. C. pp: 121-124.
- SNEATH, P. H. A. y JONES, D. (1976) *Brochothrix*: a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*. *Int. Syst. Bacteriol.* **26**, 102-104.
- SOGAARD, H. y LUND, R. (1981) A comparison of three methods for enumeration of psychrotrophic bacteria in raw milk. En *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian y N. Skovgaard (eds.), Academic Press Inc., Londres. pp: 109-116.

- SPURGASH, A., LITTEL, K. J., GALLIGAN, P., PIKELIS, S. y LAROCCO, K. (1985) Rapid bioluminiscent methods for the detection of microbiological contamination in food products. *Third Eur. Conf. Food. Chem. Bélgica*. pp: 12.
- STADHOUDERS, J. (1975) Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy J.* **29**, 104-126.
- STANLEY, G., SHAW, K. J. y EGAN, A. F. (1981) Volatile compounds associated with spoilage of vacuum-packaged sliced luncheon meat by *Brochothrix thermosphacta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 816-818.
- STANNARD, C. J. (1989) ATP estimation. En *Rapid Methods in Food Microbiology*. Vol 26. M. R. Adams y C. F. A. Hope (eds.), Leatherhead, Reino Unido. pp: 1-18.
- STANNARD, J. C. y GIBBS, P. A. (1986) Rapid microbiology applications of bioluminescence in the food industry: a review. *J. Biolum. Chemilum.* **1**, 3-10.
- STARKER, R. M. (1984) Bioluminiscent ATP analysis for the rapid enumeration of bacteria: principles, practice, potential areas of inaccuracy and prospects for the food industry. *Res. Assoc. Tech. Bull.* **57**, 1-6.
- STEAD, D. (1986) Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.* **53**, 481-505.
- STEAD, D. (1987) Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrophilic bacteria in whole milk. *J. Dairy Res.* **54**, 535-543.
- STEWART, B. J., EYLES, M. J. y MURREL, W. G. (1980) Rapid radiometric method for detection of *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 223-230.
- STEWART, G. S. A. B. (1990) *In vivo* bioluminescence: new potentials for

- microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**, 1-8.
- STEWART, G. S. A. B., SMITH, T. y DINGER, S. (1989) Genetic engineering for bioluminescent bacteria. *Food Sci. Technol. Today* **3**, 19-22.
- STEWART, G. S. A. B., DENYER, S. P. y LEWINGTON, J. (1991) Microbiology illuminated: gene engineering and bioluminescence. *Trends Food Sci. Technol.* **1**, 7-11.
- STOKES, J. L. (1963) General biology and nomenclature of psychrophilic microorganisms. En *Recent Progress in Microbiology*. Vol 8. Toronto: University of Toronto Press. pp: 187-192.
- STOKES, J. L. y REDMOND, M. L. (1966) Quantitative ecology of psychrophilic microorganisms. *Appl. Microbiol.* **14**, 74-78.
- STYA, M., WAHL, R. y BEIERWALTES, W. H. (1984) Dot-based ELISA and RIA: two rapid assays that screen hybridoma supernatant against whole live cells. *J. Immun. Methods* **15**, 75-81.
- SUAREZ, B. y FERREIROS, C. M. (1991) Psychrotrophic flora of raw milk. Resistance to several common disinfectants. *J. Dairy Res.* **58**, 127-136.
- SÜDI, J. (1982) *Limulus* assay of bacterial lipopolysaccharides in UHT milk. *Kiel. Milchwirts. Forschung.* **34**, 141-146.
- SÜDI, J., SUHREN, G., HEESCHEN, W. y TOLLE, A. (1981) Development of a miniaturized *Limulus* assay in a microtitre system for the quantitative detection of Gram-negative bacteria in milk and milk products. *Milchwissenschaft* **36**, 193-198.
- SUHREN, G. (1989) Producer microorganisms. En *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. R. C. McKellar (ed.), Ed CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. pp: 4-11.
- SVENSSON, A. y HAHN-HÄGERDAL, B. (1987) Comparison of a gelation

- and a chromogenic *Limulus* (LAL) assay for the detection of Gram-negative bacteria and the application of the latter assay to milk. *J. Dairy Res.* **54**, 267-273.
- TENOVER, F. C. (1988) Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 82-101.
- TERNSTRÖM, A., LINDBERG, A. M. y MOLIN, G. (1993) Clasification of the spoilage flora of raw and pasteurized milk with reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 25-34.
- THOMAS, S. B. (1958) Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part I. *Dairy Sci. Abst.* **20**, 355-370.
- THOMAS, S. B. (1970) Psychrotrophic microorganisms in market cream: a review. Part I. *Dairy Ind.* **35**, 79-84.
- THOMAS, S. B. y BLODWEN, F. T. (1973) Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk collected raw milk. *Dairy Ind. Int.* **38**, 11-15.
- THOMAS, S. B. y DRUCE, R. G. (1971) Psychrotrophic microorganisms in butter: a review. Part II. *Dairy Ind.* **36**, 145-150.
- THOMAS, T. C. y McNAMEE, M. G. (1990) Purification of membrane proteins. En *Methods in Enzymology*. Vol 182 (38). M. P. Deutscher (ed.), Academic Press Inc., Londres. pp: 499-520.
- THOMAS, S. B. y THOMAS, B. F. (1973) Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part I. *Dairy Ind.* **38**, 11-15.
- THOMPSON, J. K. y HOLDING, A. J. (1986) Plasmids of *S. aureus* associated with live and processed poultry. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 277-287.
- THOMPSON, N. E., RAZDAN, M., KUNTSMANN, G., ASCHENBACH, J. M., EVENSON, M. L. y BERGDOLL, M. S. (1986) Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and

- radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 885-889.
- TIJSSEN, P. (1985) Enzymes used in activity amplification assays. En *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. R. H. Burdon y P. H. Van Knippenberg (eds.), Elsevier. Londres. pp: 174-204.
- TORENSMA, R., VISSER, M. J. C., AARSMAN, C. J. M., POPPELIER, M. J. J., FLUIT, A. C. y VERHOEF, J. (1993). Monoclonal antibodies that react with live *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2713-2716.
- TORENSMA, R., VISSER, M. J. C., AARSMAN, C. J. M., POPPELIER, M. J. J., VAN BEURDEN, R., FLUIT, A. C. y VERHOEF, J. (1992) Monoclonal antibodies that detect live *Salmonellae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3868-3872.
- TOWNSEND, D. E., ASHDOWN, N., BOLTON, S. y GRUBB, W. B. (1985) The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid isolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable and non relaxable plasmid DNA suitable for *in vitro* manipulation. *Lett. Appl. Microbiol.* **1**, 87-94.
- ULITZER, S. y KUHN, J. (1987) Introduction of "lux" genes into bacteria, a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility. En *Bioluminescence and Chemiluminescence New Perspectives*. J. Scholmerich, R. Andersen, A. Kapp, M. Ernst y W. G. Wood (eds.), John Wiley and sons, Toronto. pp: 463-472.
- URSING, J. (1986). Similarities of genome deoxyribonucleic acids of *Pseudomonas* strains isolated from meat. *Curr. Microbiol.* **13**, 7-10.
- VAN DAMME-JONGSTEN, M., RODHOUSE, J., GILBERT, R. J. y NOTERMANS, S. (1990) Synthetic DNA-probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from outbreaks of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 131-133.
- VAN VUNAKIS, H. (1980) Radioimmunoassays: an overview. *Meth. Enzymol.* **70**, 201-210.

- VASAVADA, P. C. (1993) Rapid methods and automation in dairy microbiology. *J. Dairy Sci.* **76**, 3101-3133.
- VISSER, S. (1981) Proteolytic enzymes and their action on milk proteins: a review. *Neth. Milk Dairy. J.* **35**, 65-88.
- VOLLER, A., BIDWEL, D. y BARTLETT, A. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay. En *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. N. R. Rose, H. Friedman y J. L. Fahey (eds.), American Society for Microbiology, Washington D. C. pp: 99-109.
- WASHAM, C. J., OLSON, H. C. y VEDAMUTHU, E. R. (1977) Heat resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. *J. Food Prot.* **40**, 101-108.
- WECKBACH, L. S. y LANGLOIS, B. E. (1977) Effects of heat treatments on survival and growth of a psychrotroph and on nitrogen fractions in milk. *J. Food Prot.* **40**, 857-862.
- WESTPHAL, O. (1975) Bacterial endotoxins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunology* **49**, 1-43.
- WILCHEK, H. y BAYER, E. A. (1988) The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **171**, 1-32.
- WITTER, L. D. (1961) Psychrophilic bacteria: a review. *J. Dairy Sci.* **44**, 983-988.
- WOLCOTT, M. J. (1991) DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *J. Food Prot.* **54**, 387-401.
- WONG, W. C. (1990) Production of monoclonal antibodies to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolitica* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**, 241-244.
- WOO, A. H. y LINDSAY, R. C. (1983) Statistical correlation of quantitative flavor intensity assessments and individual free fatty acid measurements

- for routine detection and prediction of hydrolytic rancidity off-flavors in butter. *J. Food Sci.* **48**, 1766-1771.
- WOOD, J. M. y GIBBS, P. A. (1982) New developments in the rapid estimation of microbial populations in foods. En *Developments in Food Microbiology*. R. Davis (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 183-214.
- WOOD, J. M., LACH, V. y JARVIS, B. (1977) Detection of food-associated microbes using electrical impedance measurements. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 14-15.
- WOODRUFF, W. A., PARR, T. R., HANCOCK, R. W., HANNE, L. F., NICAS, T. I. e IGLEWSKY, B. H. (1986) Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* **167**, 473-479.
- WOODWARD, R. L. (1957) How probable is the most probable number?. *J. Amer. Water Works Assoc.* **49**, 1060-1068.
- WYATT, G., LEE, H. y MORGAN, M. (1990) Immunoassays in the food industry. Development of a rapid *Salmonella* assay. *Proc. Food. Sci. Technol. Today* **4**, 178-180.
- YOLKEN, R. H., LEISTER, F. J., WHITCOMB, L. S. y SANTOSHAM, M. (1983) Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex. *J. Immun. Meth.* **56**, 319-327.
- YOSHIMURA, F., ZALMAN, L. S. y NIKAIDO, H. (1983) Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J. Biol. Chem.* **258**, 2308-2314.
- YOUNG, N. S., LEVIN, J. y PREUDERGAST, R. A. (1972) An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J. Clin. Invest.* **51**, 1790-1797.

- ZIMMERMANN, R., ITURRIAGA, R. y BECKER-BICK, J. (1978) Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 926-935.
- ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M. y VAN'T RIET, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875-1882.