



Universitat de Girona

Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica

Belén MARTÍN JUÁREZ

ISBN: 84-689-3758-4

Dipòsit legal: GI-952-2005



Universitat de Girona

Departament d' Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària

**ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE
EMBUTIDOS FERMENTADOS LIGERAMENTE ACIDIFICADOS
MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES. ESTANDARIZACIÓN,
SEGURIDAD Y MEJORA TECNOLÓGICA**

Memoria presentada por Belén Martín Juárez, inscrito en el programa de doctorado de Ciencias, itinerario de Biotecnología del departamento de *Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària* (EQATA) para optar al grado de Doctor por la Universitat de Girona. El presente trabajo se ha realizado en el *Centre de Tecnologia de la Carn* (IRTA), bajo la dirección de la Dra. Marta Hugas y la Dra. Teresa Aymerich.

Belén Martín Juárez

Girona, enero 2005

Centre de Tecnologia de la Carn

Departament de Microbiologia i Biotecnologia Alimentàries

**ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE
EMBUTIDOS FERMENTADOS LIGERAMENTE ACIDIFICADOS
MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES. ESTANDARIZACIÓN,
SEGURIDAD Y MEJORA TECNOLÓGICA**

Dra. Marta Hugas
Co-Directora de la tesis

Dra. Teresa Aymerich
Co-Directora de la tesis

Dr. Josep M^a Monfort
Tutor de la tesis

El trabajo expuesto en esta memoria ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de la concesión de una beca de investigación de Formación de Personal Investigador (F.P.I.), por el proyecto ALI-99-0308 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y por los proyectos europeos FOOD-PCR (QLK-CT-1999-00226) y TRADISAUSAGES (QLRT 2002-02240) financiados por la Comisión Europea.

Lo más bello que podemos experimentar es el lado misterioso de la vida. Es el sentimiento profundo que se encuentra en la cuna del arte y de la ciencia verdadera.

Albert Einstein.

Amb aquestes paraules vull expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que, d'una manera o d'altra, m'han recolzat durant aquests quatre anys de treball.

Un primer agraïment per les Dres. Marta Hugas i Teresa Aymerich directores d'aquesta tesi. Sense la seva direcció i recolzament, aquest treball no hauria estat possible.

Al Dr. Josep M^a Monfort, director del Centre de Tecnologia de la Carn i tutor d'aquesta tesi.

A la Dra. Margarita Garriga, cap de la Unitat de Microbiologia i Biotecnologia Alimentàries del Centre de Tecnologia de la Carn, per l'ajuda i bons consells que m'ha proporcionat.

A tots els membres del laboratori de "micro": en David, l'Anna Claret, la Bego i especialment a la Yolanda Beltran, la que més temps m'ha "aguantat". Tots vosaltres heu contribuït en aquest treball, a tots els nivells.

A l'Anna Jofré, companya de despatx i laboratori, per ajudar-me sempre que ho necessito.

A la Carmen Sárraga, en Narcís Sais, en Pedro i a tots amb els que comparteixo l'hora de l'esmorzar i del dinar; que fariem sense aquests petits moments!

A tot el personal del Centre de Tecnologia de la Carn: becaris, secretaries, investigadors, "matxaques"... , sense oblidar-me de ningú, per totes les bones estones, i les no tan bones, que hem passat

A la Conxi i en Xevi, pel seu carinyo i tots els bons dinars i sopars que hem compartit.

A en Sergi Arbonès, pel suport informàtic i l'ajuda desinteressada.

A la meva família, que encara que estan lluny, m'ajuden en tot el que poden.

I molt especialment, a en Quim, per tot.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Embutidos fermentados	3
1.1. El sector cárnico	4
1.1.1. Producción de elaborados cárnicos	4
1.2. Clasificación de los embutidos	6
1.2.1. Clasificación española de embutidos	8
1.2.2. Embutidos fermentados ligeramente acidificados	10
1.2.2.1. Principales EFLA	10
1.2.2.1.1. Chorizo	10
1.2.2.1.2. Salchichón de Vic	10
1.2.2.1.3. Fuet	11
1.2.2.1.4. Sobrasada	11
1.3. Elaboración de embutidos fermentados	11
1.3.1. Picado de la carne y la grasa	12
1.3.2. Mezclado con el resto de ingredientes y aditivos	12
1.3.2.1. Sal común	12
1.3.2.2. Nitratos y nitritos	12
1.3.2.3. Glúcidos	13
1.3.2.4. Ascorbato	13
1.3.2.5. Especies	13
1.3.2.6. Cultivos iniciadores	13
1.3.3. Embutido	15
1.3.4. Fermentación	15
1.3.5. Curado	15
1.3.6. Envasado	16

1.4. Microbiología de la carne	16
1.5. Ecología bacteriana de los embutidos fermentados	18
1.5.1. Las bacterias del ácido láctico	20
1.5.1.1. Taxonomía	21
1.5.1.2. Importancia de las BAL en la elaboración de embutidos	21
1.5.1.2.1. Productos primarios de la fermentación de las BAL	22
1.5.1.3. Impacto de las BAL en la salud humana. Enterococos	24
1.5.2. Cocos gram-positivos catalasa-positivos	26
1.5.2.1. Taxonomía	26
1.5.2.2. Importancia de los CGC+ en la elaboración de embutidos	29
1.5.2.3. Impacto de los CGC+ en la salud humana: ECN	30
1.6. Seguridad biológica de los embutidos fermentados	32
1.6.1. Enterobacterias: <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i>	32
1.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	33
1.6.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	34
1.6.4. Bacterias formadoras de esporas	34
1.6.5. Mohos y micotoxinas	35
1.6.6. Virus y parásitos	35
1.6.7. Aminas biógenas y nitrosaminas	36
1.7. Nuevas técnicas de conservación de productos cárnicos	38
1.7.1. HHP como método de higienización de embutidos fermentados	38
2. Identificación y tipificación de microorganismos mediante técnicas moleculares	41
2.1. Técnicas de ácidos nucleicos para la detección de microorganismos	42
2.1.1. Hibridación de ácidos nucleicos	43
2.1.2. Métodos de amplificación: PCR	43
2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	44
2.1.2.1.1. Concepto y etapas	44
2.1.2.1.2. Diseño de cebadores	47
2.1.2.2. Límites de la PCR	48
2.1.2.2.1. Diferenciación entre microorganismos viables y no viables	48

2.1.2.2.2. Inhibición de la PCR	48
2.1.2.2.3. Contaminación de la PCR. Precauciones para evitarla	50
2.1.2.3. PCR cuantitativa: PCR a tiempo real	51
2.1.2.4. Implementación de la PCR	53
2.2. Tipificación molecular de microorganismos	55
2.2.1. Análisis del perfil plasmídico	57
2.2.2. Análisis de la restricción del ADN cromosómico	58
2.2.3. Ribotipado	58
2.2.4. Electroforesis de campo pulsante	60
2.2.5. Técnicas de tipificación basadas en la PCR	61
2.2.5.1. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)	61
2.2.5.2. PCR-ribotipia	63
2.2.5.3. PCR-RFLP	63
2.2.6.4. Rep-PCR	64
2.2.6.5. AFLP	64
2.2.6.7. Tipificación de secuencias multilocus	66
OBJETIVOS	69
3. OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS	73
4. MATERIALES	75
4.1. Muestras de embutidos fermentados ligeramente acidificados	75
4.2. Cepas bacterianas	75
4.2.1. Conservación de las cepas de colección	77
4.3. Medios de cultivo, soluciones y tampones	77
4.3.1. Medios de cultivo	77
4.3.2. Tampones y soluciones	83
4.3.4. Oligonucleótidos	86
5. MÉTODOS	89
5.1. Análisis microbiológico de las muestras	89

5.1.1. Preparación de la muestra	89
5.1.2. Recuento de bacterias del ácido láctico	90
5.1.3. Recuento de cocos gram-positivos catalasa-positivos	90
5.1.4. Recuento de enterococos	90
5.1.5. Recuento de <i>Enterobacteriaceae</i>	90
5.1.6. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
5.1.7. Investigación de <i>Salmonella</i> spp.	91
5.1.8. Identificación y recuento de <i>Listeria monocytogenes</i>	91
5.1.9. Recuento de clostridios sulfito-reductores	92
5.1.10. Aislamiento y conservación de las cepas	92
5.2. Análisis físico-químico de las muestras	93
5.3. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas	93
5.3.1. Determinación de la actividad antagonista contra <i>Listeria monocytogenes</i>	93
5.3.2. Determinación de la actividad proteolítica	93
5.3.3. Determinación de la actividad lipolítica	94
5.3.4. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos	94
5.3.5. Determinación de la actividad aminoácido-descarboxilasa	95
5.4. Identificación bioquímica de especies bacterianas	95
5.5. Caracterización molecular de las cepas aisladas	95
5.5.1. Tratamiento pre-PCR de las muestras de embutido	96
5.5.1.1. Extracción del ADN bacteriano de las muestras de embutido	96
5.5.1.2. Extracción del ADN con la resina Chelex [®] 100.	98
5.5.1.3. Método de filtración para la purificación del ADN	99
5.5.2. Identificación de microorganismos y genes bacterianos de interés mediante PCR	99
5.5.2.1. Selección y diseño de cebadores	100
5.5.2.2. Optimización de las condiciones de PCR	100
5.5.2.2.1. Detección de microorganismos de interés tecnológico mediante PCR	101
5.5.2.2.2. Detección de microorganismos patógenos en embutidos	102

5.5.2.2.3. PCR para la detección de genes relacionados con factores de virulencia y resistencia a vancomicina en enterococos	104
5.5.2.2.4. PCR para la detección de genes de enterotoxinas y resistencia a meticilina en CGC+	105
5.5.2.2.5. Detección del gen <i>tyrdc</i> en BAL	105
5.5.2.2.6. Detección del gen <i>tyrdc</i> en <i>L. curvatus</i>	106
5.5.2.2.7. Amplificación del gen ARNr 16S	106
5.5.2.2.8. Amplificación de la región espaciadora 16S-23S ARNr	106
5.5.2.2.9. Amplificación del gen <i>sodA</i>	107
5.5.2.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	107
5.5.2.4. Diseño de un control interno de amplificación (IAC)	108
5.5.3. Secuenciación de ADN	108
5.5.3.1. Amplificación del fragmento o gen a secuenciar	108
5.5.3.2. Extracción del ADN del gel de agarosa. GeneClean® II	108
5.5.3.3. Purificación del producto de PCR. QIAquick PCR purification kit	109
5.5.3.4. Reacción de secuenciación	110
5.5.4. Genotipado de las cepas aisladas de los embutidos fermentados	110
5.5.4.1. Determinación del perfil plasmídico	110
5.5.4.2. RAPD-PCR	111
5.5.4.3. Análisis informático de los patrones de bandas obtenidos	113
5.6. Elaboración de embutidos	113
5.7. Tratamiento de alta presión	114
5.8. Análisis estadístico	114
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
6.1. Identificación de las principales especies bacterianas de interés tecnológico y estudio de la calidad microbiológica e higiénico-sanitaria de los embutidos fermentados ligeramente ácidos	117
6.2. Desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de patógenos alimentarios en productos cárnicos	135

6.3. Estudio de la biodiversidad genética y caracterización tecnológica e higiénico-sanitaria de las principales comunidades microbianas de interés tecnológico en los embutidos fermentados	155
6.4. Estandarización y mejora higiénico-tecnológica de los embutidos poco ácidos	233
6.5. Discusión general y consideraciones finales	261
CONCLUSIONES	275
7. CONCLUSIONES	277
BIBLIOGRAFÍA	281
8. BIBLIOGRAFÍA	283
Índice de Tablas	317
Índice de Figuras	321
Índice de Publicaciones	325
Abreviaturas	327

INTRODUCCIÓN

1. EMBUTIDOS FERMENTADOS

La búsqueda de soluciones para la conservación de los alimentos ha estado ligada desde la prehistoria a la evolución humana, y aún hoy es un reto para la humanidad. Entre los métodos de conservación más utilizados desde la antigüedad destacan el secado y la fermentación.

La fermentación representa, probablemente, uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. Esta técnica, que se ha utilizado desde la Prehistoria para la conservación de alimentos durante periodos prolongados de tiempo, consume poca energía y da lugar a un producto de elevada calidad (Molly *et al.*, 1997).

La fermentación de alimentos se desarrolló de forma empírica durante muchos siglos, sin que se conocieran sus fundamentos científicos. Actualmente, sabemos que en los procesos fermentativos tiene una participación decisiva la microbiota presente en cada producto; los microorganismos fermentadores no sólo participan en la estabilidad microbiológica del alimento fermentado, sino que también contribuyen a sus propiedades organolépticas.

Los embutidos fermentados son productos tradicionales de la Europa central y meridional que se originaron probablemente en la cuenca mediterránea. La historia de la conservación de la carne a través de la fermentación ha sido estudiada en detalle por Leistner (1986) y Zeuthen (1995). Sabemos, por ellos, que en la Roma imperial era frecuente el consumo de embutidos y de jamones, algunos llegados de los valles pirenaicos y, en especial, de la Cerdaña. Los romanos ya conocían que la carne picada adicionada de sal, azúcar y especias se convertía en un producto sabroso y de larga vida si se preparaba y curaba de forma apropiada. No obstante, el consumo del cerdo bajo esta forma de conservación alcanzó mayor predicamento a partir del siglo IX. Es frecuente encontrar, datados en esas fechas, documentos que especifican las donaciones de embutidos, en forma de pagos o tributos, y las técnicas que deben emplearse para la conservación de las carnes del cerdo, ya sean curadas o cocidas.

Aparentemente, el clima templado con viento y lluvias moderadas de los países mediterráneos favorece la curación de los embutidos. En otros países europeos, sin embargo, la forma tradicional de preservación de la carne consistió en el salado y secado de la carne sin picar. En Alemania, la manufactura de embutidos fermentados comenzó hace sólo unos 160 años y

mayoritariamente se trata de embutidos fermentados ahumados; en Italia, Francia y España, en cambio, predominan los embutidos picantes y secados al aire.

El intercambio cultural y gastronómico entre todos los pueblos de Europa ha hecho que el repertorio de embutidos que se puede encontrar en el mercado sea muy amplio.

En España, los embutidos definidos por el pimentón (chistorra, chorizos, lomo adobado) son de consumo frecuente en zonas geográficas en las que estas técnicas de elaboración eran extrañas. Paralelamente, la sobrasada, característica de las Islas Baleares, se elabora y se consume en toda la península.

Algo semejante ha sucedido con los patés, pasteles de hígado de cerdo típicamente franceses y de escasa presencia en la historia de la gastronomía española, pero ahora de uso habitual. De Italia se ha incorporado el salami y la mortadela. Esta última se elabora en nuestro país, muchas veces con recetas propias. Como conserva ahumada los ingleses han aportado el *bacon*, mientras que de Alemania ha llegado una larga serie de embutidos que se han incorporado, de pleno derecho, al panorama culinario español. Frankfurts, bratwust, cervelas, son algunas de estas salchichas que se elaboran, siguiendo el modelo alemán, en todas partes del mundo.

1.1. EL SECTOR CÁRNICO

El sector cárnico constituye hoy día un sector de primer orden dentro del conjunto de la industria alimentaria, como demuestra el hecho que de los 66.242 millones de euros de gasto alimentario en España durante el año 2002, un 24,9% correspondieron a la carne y sus derivados, muy por encima de sectores como la pesca (13,9%) o el lácteo (12,1%) (AICE, 2004). Según los datos de la FIAB (Federación de Industrias de la Alimentación y Bebidas) el sector cárnico está compuesto por 4.568 empresas que representan el 13,5% del total de industrias elaboradoras de alimentos y bebidas (Cruz, 2004).

La producción total de carne en el 2002 fue de 5,53 millones de toneladas. El incremento registrado fue superior al de otros años y se situó en torno al 4% respecto a los niveles registrados en el 2001. De la producción total registrada en el 2002, el 58% correspondió a la carne de cerdo, con un total de 3,15 millones de toneladas. Estos niveles suponen el 58% del total de la producción cárnica nacional y el 16% de la producción final agraria (Cruz, 2004). A lo largo de los doce últimos años la producción se ha duplicado, convirtiendo a España en un fuerte productor mundial y en el segundo dentro de la UE, tras Alemania.

1.1.1. Producción de elaborados cárnicos

El sector de los elaborados cárnicos está compuesto por 4.568 empresas que generan en torno a 50.500 puestos de trabajo. El número de empresas está en continua evolución por la irrupción en este mercado de nuevos operadores. Los cinco primeros grupos productores acaparan el 22,5% del mercado, mientras que los diez más importantes presentan una cuota

conjunta del 28% (MERCASA, 2003) lo que indica el fuerte grado de atomización que aún existe en el sector. La mayoría de las empresas están apostando en estos momentos por la diversificación de las ofertas y por productos de mayor valor añadido (Cruz, 2004). La situación del sector no es la misma en todo el territorio español. La provincia de Barcelona agrupa la mayor concentración de industrias de elaborados cárnicos (11% del total), seguida por Salamanca, Girona, Valencia y Badajoz (Anónimo, 2001).

A lo largo del 2002, la producción de elaborados cárnicos en España fue de 1.141.438 TM (AICE, 2004). Como se aprecia en la Figura 1, la mayoría de los productos registran una tendencia al alza en la producción desde 1997, coincidiendo con la autorización para las exportaciones de este tipo de productos y también con la adecuación de la mayoría de empresas españolas a las exigencias de la Unión Europea.

La partida mayor de elaborados la compone la de "otros productos curados por el calor", con un volumen de 329.323 TM, el 28% del total, seguida por la de jamones y paletas curados, con 234.000 TM y la de embutidos curados, con 184.466 TM (Figura 1).

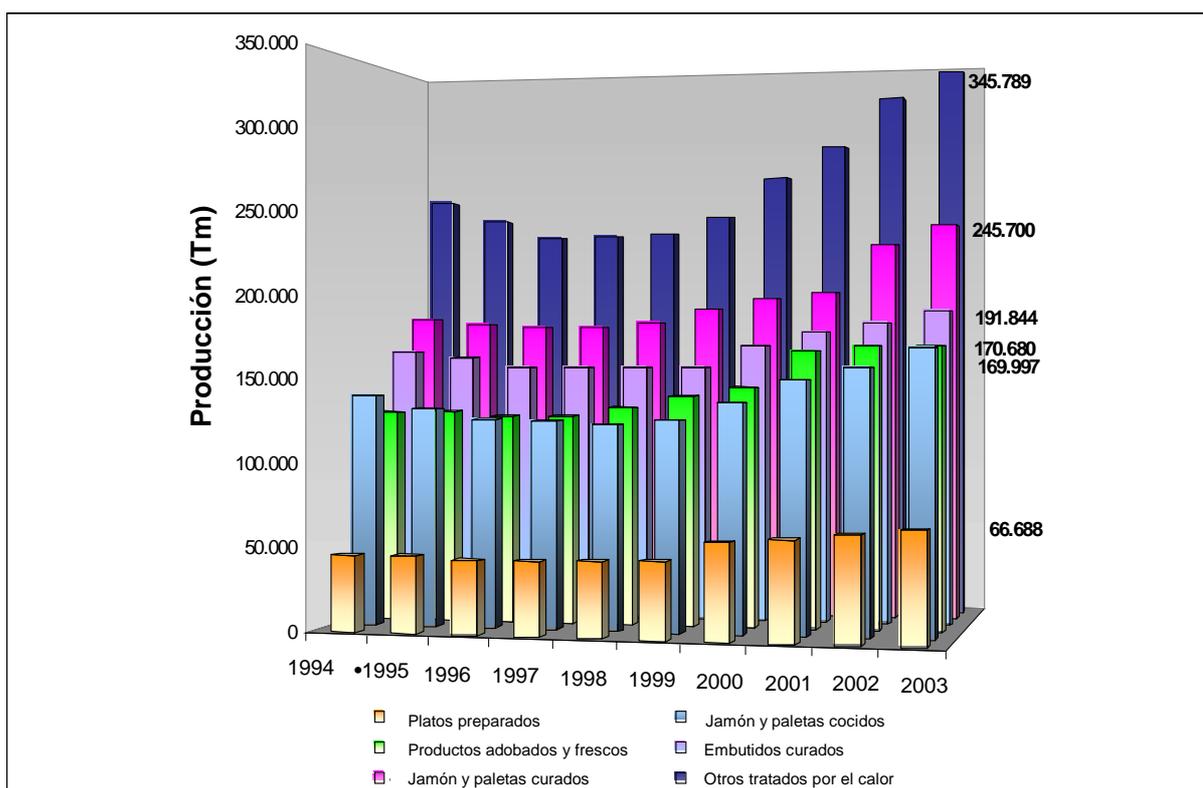


Figura 1. Producción de elaborados cárnicos en España (1994-2003).

Dentro de los embutidos curados, la producción de embutidos fermentados ligeramente acidificados (EFLA) en España se incrementa año tras año, debido a su facilidad de compra y a que el consumidor aprecia cada vez más los productos poco ácidos en su dieta. Es difícil encontrar datos sobre la producción de EFLA, debido a la gran variedad que presenta este tipo de productos, pero es el único grupo de productos cárnicos picados-curados que ha experimentado un incremento de consumo comparado con el resto de productos fermentados. Se conoce que la producción en España de chorizos madurados en frío es de unas 21.750 TM y la de fuet de unas 15.545 TM (ventas controladas según el índice A.C. Nielsen, período octubre 1997 - noviembre 1998) y que la producción de salchichón de Vic con denominación de Origen es de unas 5.000 TM/año aproximadamente. Aunque los datos son escasos, es evidente la importancia de estos embutidos poco ácidos, tanto por la superficie que ocupan en los supermercados como por su promoción comercial.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBUTIDOS

Desde un punto de vista tecnológico, la denominación de embutido seco o curado engloba un determinado grupo de embutidos conocidos desde mucho tiempo atrás. La gran variedad que presentan se debe a los diferentes procesos de elaboración, entre los que cabe destacar dos avances tecnológicos:

- El desarrollo de la técnica de climatización que posibilita un control de la temperatura, humedad relativa y velocidad del aire durante la elaboración del embutido en cualquier época del año.
- La utilización de diversas sustancias o aditivos químicos y microbianos para la elaboración de embutidos (colorantes, aromatizantes y saborizantes, reguladores del potencial redox, cultivos iniciadores, etc.) que favorecen la aplicación de técnicas rápidas de fabricación.

A lo largo de los años los embutidos se han clasificado de diferentes maneras y las clasificaciones oficiales varían de unos países a otros. Las clasificaciones pueden basarse en diferentes propiedades, como el contenido en humedad, contenido en proteína, cociente humedad/proteína, etc.

Kinsman (1980) clasifica los embutidos en seis categorías:

Embutidos frescos.- Elaborados a partir de carne picada condimentada y usualmente embutida en tripa natural. No están curados ni ahumados. Se deben someter a un tratamiento culinario antes de su consumo.

Embutidos cocidos.- Fabricados a partir de carne picada, condimentada, curada y embutida en tripa. Están cocidos pero no ahumados.

Embutidos cocidos y ahumados.- Obtenidos como los anteriores pero sometidos a un proceso de ahumado sin ningún tipo de tratamiento térmico.

Embutidos secos o semi-secos.- Están elaborados con carne picada, condimentada y embutida en tripa. Se someten a un proceso de secado al aire bajo condiciones controladas de tiempo-temperatura-humedad. Pueden estar ahumados.

Especialidades cárnicas.- Comprenden una gran variedad de productos que tiene en común el hecho de estar preparados a partir de carne curada o no, picada o triturada, condimentada y normalmente cocidos más que ahumados.

Roca e Incze (1990) basándose en el tiempo de fermentación y maduración del embutido, proponen otra clasificación para embutidos fermentados (Tabla 1).

Tipo de embutido	Tiempo de Producción	Contenido de agua (%)	Valor a_w final
Untable	3 - 5 días	34 - 42	0,95 - 0,96
Lonchable:			
maduración corta	1 - 4 semanas	30 - 40	0,92 - 0,94
maduración larga	12 - 14 semanas	20 - 30	0,85 - 0,86

Tabla 1. Clasificación de embutidos fermentados según Roca e Incze (1990).

Lücke (1998) propone una clasificación des de un punto de vista microbiológico que se basa en la actividad de agua (a_w) y en el tratamiento de superficie (Tabla 2).

Categoría	Tiempo de Curación	a_w final	Aplicación de Ahumado
Embutidos secos con mohos	> 4 semanas	<0,90	No
Embutidos secos con mohos	>4 semanas	<0,90	Sí (durante la fermentación)
Embutidos secos, sin crecimiento de mohos	>4 semanas	<0,90	Sí o No
Embutidos semi-secos con mohos	<4 semanas	0.90-0.95	No
Embutidos semi-secos sin crecimiento de mohos	<4 semanas (10-20 días)	0.90-0.95	Sí (con excepciones)
Embutidos fermentados frescos, para untar.	<2 semanas	0.94-0.96	Sí o No

Tabla 2. Clasificación de embutidos fermentados (Lücke, 1998).

1.2.1. Clasificación española de embutidos.

Como en otros países europeos, en España se elaboran y consumen una gran cantidad de productos cárnicos típicos originarios de cada una de las regiones. La importancia económica de los productos curados dentro del sector cárnico español y la incorporación de España a la U.E. en el 1986, hicieron necesario la elaboración de una clasificación y tipificación, fundamentalmente de los embutidos curados típicos españoles, con el objeto de clarificar el sector.

Los derivados cárnicos son productos alimentarios preparados total o parcialmente con carnes, despojos, grasas y subproductos comestibles, procedentes de animales de abasto u otras especies y, en su caso, de ingredientes de origen vegetal o animal, así como condimentos, especias y aditivos, siempre que estén autorizados, y se ajusten a las normas específicas de calidad (B.O.E., 1984). Los derivados cárnicos se clasifican en:

- Productos cárnicos crudos adobados
- **Embutidos crudos curados**
- Productos cárnicos tratados por calor
- Salazones cárnicas
- Platos preparados cárnicos
- Otros derivados cárnicos

En la categoría de embutidos crudos curados se incluyen productos cárnicos, troceados o no, adicionados de sal y otras sustancias, que se someten a un proceso de maduración-secado apropiado y, opcionalmente, ahumado.

Cuando su fabricación depende de la acción de microorganismos (adicionados en forma de cultivos iniciadores y/o presentes en las materias primas) estos productos se denominan también embutidos fermentados. Podemos diferenciar 5 tipos diferentes en función del origen de las carnes y del grado de maduración-secado.

Chorizo

Se denomina chorizo la mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo o cerdo y vacuno y tocino y/o grasa de cerdo, con adición de sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos autorizados, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, que ha sufrido un proceso de maduración-secado, con o sin ahumado, que se caracteriza por su coloración roja (con la excepción de los denominados chorizos blancos) y por su olor y gustos característicos (Orden de 27 de febrero de 1980; BOE 21/3/80). En el mercado existen numerosos productos que responden a la definición anterior. Flores (1999) los clasifica en función de:

- La forma: chorizo vela, rosario, herradura, etc.
- El calibre y tipo de tripa: chorizo, chistorra.
- Las características sensoriales: chorizo ahumado, blanco, casero o picante.
- El tamaño y tipo de materia prima: chorizo de lomo, chorizo de Pamplona o chorizo de Soria.

Salchichón

Se denomina salchichón a la mezcla de carnes picadas de cerdo, vacuno o cerdo y vacuno y aditivos, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, que ha sufrido un proceso de maduración-secado que le asegura una buena estabilidad, así como un aroma y un gusto característicos (Orden de 27 de febrero de 1980; BOE 21/3/80). En el mercado existe una gran variedad de salchichón que tienen diferentes denominaciones según la forma, tripa, calibre, origen geográfico, características geográficas, etc.: salchichón de Vic, salchichón imperial, salchichón de Aragón, fuet, "secallona" y "sumaia".

Sobrasada

Son embutidos elaborados con carne de cerdo constituidos por una pasta homogénea de carne y grasa con pequeños trozos de carne, fácilmente diferenciables. Están mezclados con condimentos y tienen el pimentón como ingrediente típico, especias, ingredientes y aditivos autorizados, embutidos en tripas naturales o sintéticas, que han experimentado un proceso de maduración-secado, sin ahumado, y que se caracterizan por su coloración roja y su aroma y gustos típicos (Orden de 27 de febrero de 1980; BOE 21/3/80).

Lomo embuchado

Es un producto elaborado a partir del músculo íleo-espinal del cerdo (prácticamente libre de grasa externa), aponeurosis y tendones, salado adobado y embutido en tripas naturales o artificiales permeables y que se ha sometido a un proceso de maduración apropiado (Orden de 27 de febrero de 1980; BOE 21/3/80).

Morcón

Son productos elaborados con recortes de cabeza de lomo y/o magro de cerdo, adobados con sal, pimentón (como elemento característico), especias e ingredientes y aditivos autorizados, y embutidos en vejigas o ciegos de cerdo. Estos embutidos se someten a un proceso de maduración-secado y dan lugar a un producto con características sensoriales típicas, que se comercializa completamente curado (Orden de 27 de febrero de 1980; BOE 21/3/80).

Todos estos embutidos se han elaborado durante muchos años de forma artesanal y por tanto, han estado sujetos a problemas de producción derivados de la falta de conocimiento científico. Durante los últimos años, la biotecnología de alimentos se ha especializado en la adaptación de los procesos tradicionales para la producción industrial a gran escala. Los microorganismos competitivos típicos de los procesos modernos han sido aislados y desarrollados como cultivos iniciadores, por su poder fermentador y acidificante; esto ha permitido a la industria satisfacer la creciente demanda de los consumidores de productos seguros con unos costes asequibles. Sin embargo, estas estrategias no son válidas para todos los tipos de productos. Los cultivos iniciadores que existen en el mercado no son lo más apropiados para la fabricación de EFLA, ya que en estos productos es necesario conservar las variedades regionales y las características organolépticas y sensoriales típicas.

1.2.2. Embutidos fermentados ligeramente acidificados

Los EFLA forman un grupo de productos tradicionales españoles con una gran diversidad entre las diferentes regiones de origen y caracterizados por presentar un pH final que oscila entre 5,3 y 6,2. En concreto se trata de chorizos de pequeño calibre y madurados en frío, fuets, sobrasadas, *xoliç* del Pallars (Ripoll, 1992), salchichones de tipo artesanal y en general embutidos crudos curados poco acidificados.

1.2.2.1. Principales EFLA

1.2.2.1.1. Chorizo

El chorizo es el producto cárnico fermentado más consumido en el estado español. Existen muchas variedades de chorizo, alrededor de 20, pero muchos de ellos son productos ácidos. Los chorizos de baja acidificación son aquellos elaborados artesanalmente con magro y grasa de cerdo, cloruro sódico, pimentón rojo, ajo y orégano. La mayoría de estos chorizos están madurados en frío y se caracterizan por no incorporar hidratos de carbono ni agentes curantes entre sus ingredientes, aunque las especias añadidas a la formulación aportan carbohidratos y agentes nitrificantes. El contenido en grasa de este producto oscila entre 30-50% (Lois *et al.*, 1987). El proceso de secado se prolonga durante 21 días a 10-15°C y un 80-95% de humedad relativa, posteriormente y hasta unos 42 días aproximadamente, se disminuye la temperatura (6-12°C) y la humedad (75-90%) y en muchos casos el producto es ahumado (quemando madera de roble dentro de la bodega o cámara de secado). Los estudios sobre la evolución y composición microbiana en estos productos artesanales son escasos. Domínguez-Fernández y Zumalacárregui-Rodríguez (1991) estudiaron los cambios oxidativos en chorizos madurados en frío, observando valores más elevados que los obtenidos en chorizos elaborados industrialmente. La evolución del pH se caracteriza por un descenso durante la primera semana del proceso hasta 5,4 y un posterior aumento hasta valores de 5,8-6,0.

1.2.2.1.2. Salchichón de Vic

El salchichón de Vic es un producto artesanal producido sin la adición de cultivos iniciadores. Al ser un producto fermentado poco acidificado, el pH no ayuda a prolongar la vida útil del producto. Esto se consigue mediante una larga maduración a baja temperatura.

Los aditivos utilizados en su fabricación, además del magro y la grasa de cerdo en proporción 85:15, son sal, pimienta negra (en grano y molida) y nitrato potásico. Al no añadirse carbohidratos se limita el descenso de pH por acción microbiana.

El salchichón de Vic tiene un proceso de maduración en frío que puede llegar a los 12 meses. Según un estudio realizado en este tipo de producto (Ferrer y Arboix, 1986) la microbiota predominante son las bacterias del ácido láctico, con valores que alcanzan las 10^8 – 10^9 ufc/g a los dos meses, para disminuir al final del proceso hasta 10^4 ufc/g. La población de enterobacterias disminuye progresivamente y los cocos gram-positivos catalasa positivos se mantienen alrededor de 10^3 ufc/g a lo largo del proceso disminuyendo al final a 10^2 ufc/g. El pH

del producto va aumentando progresivamente durante todo el proceso de fabricación con valores de 5,88 al inicio y superiores a 6 en el producto final.

1.2.2.1.3. Fuet

El fuet es un producto típico muy apreciado por sus peculiares características organolépticas. Como embutido es muy similar en su formulación al salchichón, pero a diferencia de éste, el fuet presenta un calibre inferior (30-40 mm) y una acidificación menor, con valores de pH de 5,4-5,6 al final del proceso.

1.2.2.1.4. Sobrasada

Otra especialidad regional que se enmarca dentro de los embutidos fermentados de baja acidez es la sobrasada típica de las Islas Baleares. Es uno de los productos que más se ha industrializado, alejándose así de la sobrasada artesanal original y popularizándose su consumo.

La sobrasada es un embutido con un elevado contenido en grasa (40%), con pimentón rojo y sal, madurada durante semanas en frío (8-15°C) y con valores de humedad entre el 60-85%. Dado su elevado contenido en grasa, los valores iniciales de a_w son bajos (0,93) y al final del proceso disminuyen hasta 0,88-0,83. Algunos autores (Rosselló *et al.*, 1995) describen un descenso acusado del pH en los primeros días del proceso de elaboración, hasta valores de 5,3 unidades; la mayor parte de las sobrasadas presentan pH finales más altos que oscilan entre 5,4 y 6,0.

La microbiota bacteriana tiene un papel importante en la maduración de este tipo de embutidos, aún así, existe poca información publicada sobre su composición y evolución. Rosselló *et al.* (1995) estudiaron las diferentes comunidades microbianas a lo largo del proceso de maduración de la sobrasada mallorquina constatando un predominio de las bacterias del ácido láctico, que presentaron valores de 10^9 ufc/g entre los 7 y 9 días de maduración, manteniendo estos niveles hasta los 30 días del proceso; a partir de aquí la población de BAL disminuía hasta 10^7 ufc/g. Los cocos gram-positivos catalasa-positivos presentaron valores de 10^6 ufc/g por lo que también parecen tener un papel importante en la maduración del producto.

1.3. ELABORACIÓN DE EMBUTIDOS FERMENTADOS

La base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar muchas modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w (Leistner, 1992).

La obtención de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que en combinación con la disminución del pH hace que el

embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada (Frey, 1983). En la Figura 2 se representan las etapas que constituyen el proceso de elaboración de los embutidos.

1.3.1. Picado de la carne y la grasa

Los embutidos crudos curados fermentados pueden tener un grado diverso de picado (fino, medio o grueso). Si el picado es grueso, la carne y la grasa se desmenuzan en una máquina picadora, mientras que para conseguir un picado medio o fino se recurre a la *cutter*, sobre todo si las materias primas están congeladas (Girard *et al.*, 1991).

La operación de picado influye decisivamente en el trabado de la masa y en la adecuada consistencia al corte del producto final. Si la pasta se calienta demasiado por refrigeración insuficiente o por congelación deficiente de la materia prima, las partículas de grasa se disponen alrededor de la carne magra y el embutido conserva una consistencia excesivamente blanda debido a que las partículas de carne no se han trabado convenientemente. Asimismo, resulta muy perjudicada la cesión de agua al exterior durante la fase de desecación, ya que la grasa se distribuye en forma de película alrededor de todo el embutido (Roca e Incze, 1990).

1.3.2. Mezclado con el resto de ingredientes y aditivos

Además de la carne y la grasa, los embutidos fermentados contienen o pueden contener una serie de aditivos que cumplen diversas funciones durante el proceso de elaboración y que participan de las características del producto final.

1.3.2.1. Sal común

La adición de sal es esencial para la elaboración de embutidos crudos curados (Leistner, 1992). Además de ser un ingrediente que mejora el sabor, su importancia tecnológica radica en su influencia sobre múltiples reacciones de los procesos de maduración y desecación. Además, adicionando sal se reduce el valor de la a_w , con lo que se restringen las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. La sal ejerce un papel primordial en la ligazón de la pasta, ya que interviene en la solubilización de las proteínas cárnicas, permitiendo que formen una película adhesiva que propicia que las partículas de carne se intercalen entre las partículas de grasa (Varnan y Sutherland, 1998). La cantidad de sal adicionada depende del tipo de embutido y suele variar entre un 2 y un 3% en el producto final.

1.3.2.2. Nitratos y nitritos

El principal objetivo de la adición de nitratos y nitritos a los embutidos crudos curados es la inhibición de microorganismos indeseables como *Clostridium botulinum*, pero también contribuyen en la formación del color típico de los productos curados (por formación del complejo nitrosomioglobina), en el desarrollo del aroma a curado (por reacción de varios componentes de la carne con el nitrito o el óxido nítrico) y ejerce un efecto antioxidante (actuando contra los productos generados en los procesos oxidativos de los componentes lipídicos). Las cantidades legalmente autorizadas en España son de 150 ppm para los nitritos y

300 ppm para los nitratos. Además, las cantidades residuales de nitritos y nitratos en el producto final no deben superar las 50 y 250 ppm, respectivamente (Real Decreto 142/2002, BOE 20/2/2002).

1.3.2.3. Glúcidos

El descenso de pH tiene lugar por acción de los microorganismos presentes en la masa del embutido crudo frente a los azúcares que metabolizan hasta ácidos (Roca e Incze, 1990). El descenso de pH puede ser más o menos pronunciado según el tipo y la cantidad de azúcar adicionado. La glucosa es asimilada rápidamente por casi todos los microorganismos, pero también se utilizan lactosa, sacarosa u otros azúcares menos asimilables como el almidón o dextrinas para regular la velocidad de la acidificación (Lücke, 1998).

1.3.2.4. Ascorbato

Sustancia antioxidante y coadyuvante del proceso de curado que ayuda a disminuir la cantidad de nitrito residual puesto que favorece su transformación a óxido nítrico con lo que, además, mejora la formación y estabilización del color. La legislación española (Real Decreto 142/2002, BOE 20/2/2002) permite la adición de ácido L-ascórbico o ascorbato sódico en dosis *quantum satis* (habitualmente 0,5 g/Kg).

1.3.2.5. Especies

Las especias son ingredientes vegetales con carácter aromático que se utilizan habitualmente en pequeñas cantidades para conferir determinados sabores, aromas y colores a los productos cárnicos. Además de sus propiedades aromáticas, debidas a los aceites esenciales y las oleorresinas que contienen, muchas especias son antioxidantes (como la pimienta negra y el jengibre) y antimicrobianas (por ejemplo el ajo). Las proporciones de utilización de especias en los embutidos fermentados son variables. Así, por ejemplo, el ajo y el pimentón se emplean a razón de 2-6 g/Kg y 0,5-25 g/Kg, respectivamente, en chorizos, sobrasada y lomo embuchado; La pimienta negra y blanca se adicionan en cantidades que oscilan entre 0,1 y 4 g/Kg en los salchichones (Rodríguez-Rebollo, 1998).

1.3.2.6. Cultivos iniciadores

Los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la fabricación de embutidos fermentados, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista, y algunos de ellos pueden derivarla hacia una dirección indeseable. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto en numerosas ocasiones se opta por utilizar cultivos de microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación del embutido además de inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación (Frey, 1983).

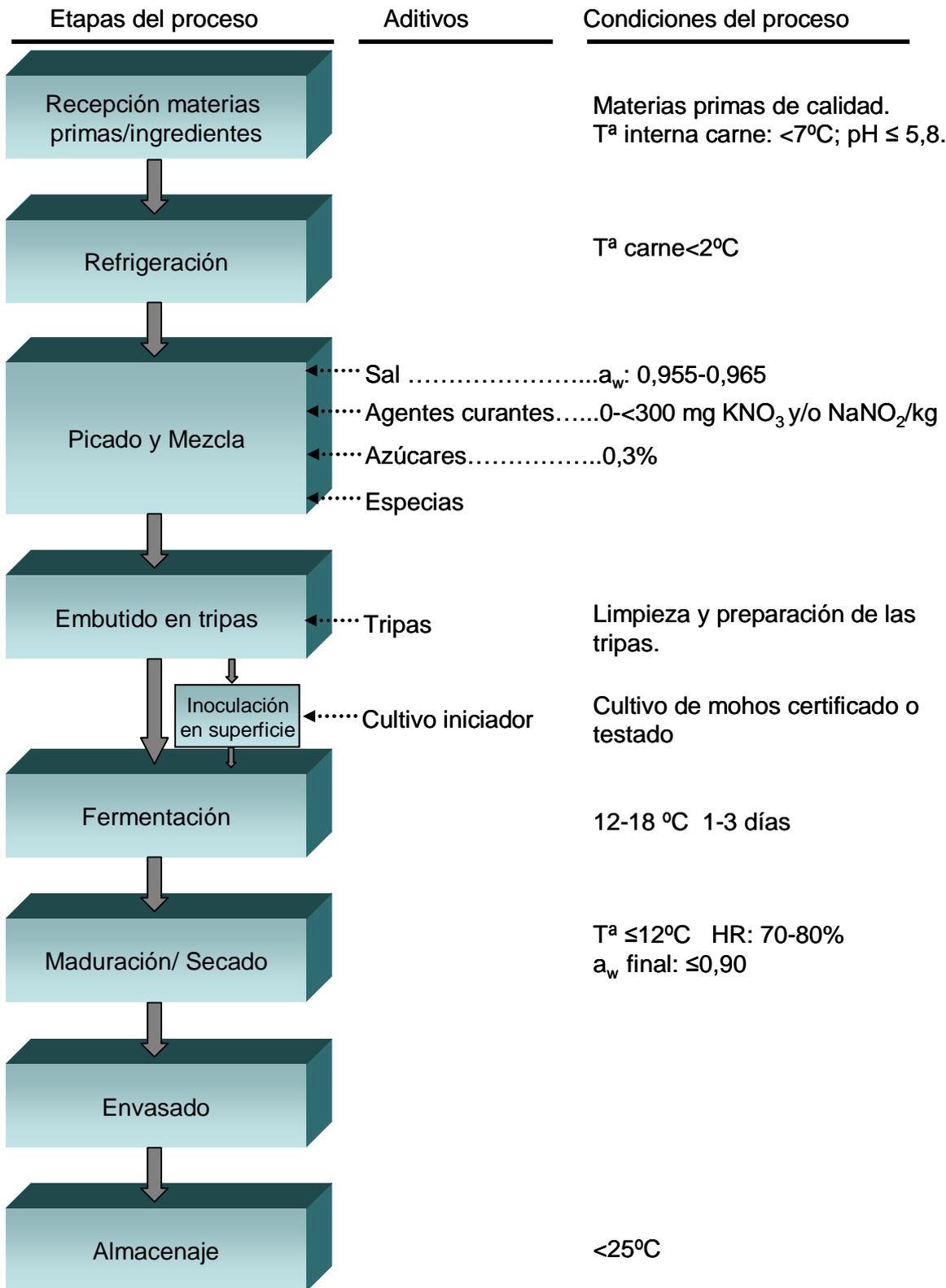


Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de un embutido. Adaptado de Lücke (1998).

Las especias, los aditivos, el azúcar y la sal suelen agregarse a la masa básica de carne y grasa picadas, la mezcla se homogeniza por acción de una máquina amasadora para obtener una distribución adecuada de todos los componentes. La a_w de la masa se ve reducida desde 0,99 hasta 0,96 por la presencia de la sal, los agentes de curado y los azúcares y el nitrato y/o nitrito ejercen su efecto inhibitor (Ordóñez *et al.*, 1999). En el caso que se añadan cultivos iniciadores, se hace al final del proceso, cuando el resto de ingredientes forman ya una masa uniforme. Tras su adición se continúa con el amasado para que la distribución de los microorganismos sea homogénea en toda la mezcla.

1.3.3. Embutido

Tras mezclar todos los ingredientes, la pasta debe introducirse en las tripas para constituir las piezas de embutido. En esta operación debe facilitarse la salida del aire del interior de la tripa y comprimir y conformar la pasta. Las tripas deben ser permeables al vapor de agua y pueden ser artificiales (fibrosas, de colágeno) o naturales.

1.3.4. Fermentación

Los embutidos se cuelgan a continuación en cámaras de aire acondicionado o natural, y se mantiene a una temperatura variable (entre 12-25°C) y 90-95% de humedad relativa durante un periodo de tiempo que puede variar entre 24 y 72 h. Durante esta etapa los microorganismos, presentes en la carne o bien adicionados como cultivos iniciadores, metabolizan los azúcares presentes y/o añadidos a la masa a ácido láctico principalmente y el pH disminuye hasta valores próximos a 5,0, es decir, alrededor del punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas (Demeyer, 1992). Esto reduce la capacidad de retención de agua de la masa, facilitando el secado posterior, además de promover la coagulación de las proteínas cárnicas, que aporta firmeza al producto final (Bacus, 1984).

Junto con la fermentación de azúcares, las proteínas musculares cárnicas (actina y miosina) empiezan a ser degradadas a péptidos, lo que se traduce en un aumento del nitrógeno no proteico. Las principales responsables de esta degradación son las proteasas musculares, fundamentalmente la catepsina D.

Al mismo tiempo, se inicia la hidrólisis lipídica o lipólisis, fenómeno que se debe tanto a la presencia de lipasas microbianas (Ordóñez *et al.*, 1999), como de lipasas endógenas de la carne, destacando la lipasa ácida liposomial (García *et al.*, 1992; Toldrá, 1992).

También durante esta fase los cocos gram-positivos catalasa-positivos realizan la reducción de los nitratos a nitritos dando lugar a la formación de la nitrosomioglobina.

1.3.5. Curado

Una vez finalizada la etapa de fermentación, los embutidos se sitúan en la cámara de curado, donde empieza el proceso de maduración y, simultáneamente, el secado del producto. Esta etapa implica el mantenimiento de los embutidos durante periodos variables de tiempo en condiciones de humedad y temperaturas controladas (Chang *et al.*, 1996). Los procedimientos más habituales suelen consistir en 5-10 días a 18-22°C y humedad relativa entre el 80 y el 90%

y, posteriormente, se mantienen a 12-15°C y una humedad relativa del 65-80% (Toldrà, 1992). La duración de este último periodo del curado es variable, en función de la clase de producto y su diámetro, pero suele oscilar entre unos 20 (curado rápido) y 90 (proceso tradicional) días (Flores, 1997). No obstante, todos estos parámetros pueden variar considerablemente de un embutido a otro, especialmente en los embutidos elaborados de forma artesanal.

La deshidratación es un requisito esencial para conseguir la firmeza final de la masa del embutido (Incze, 1992). Tras la fermentación, la masa coagulada es todavía inestable y está debilitada por una capa intermedia de moléculas de agua. Para lograr la firmeza final de la masa las moléculas de agua inmovilizadas que ocupan los espacios entre los agregados de proteínas deben liberarse (Chang *et al.*, 1996). Esto se consigue realizando una deshidratación continua mediante el ajuste y control de las condiciones de secado de la cámara de curado.

Paralelamente a la deshidratación se producen los fenómenos asociados a la maduración del producto. La proteólisis, iniciada durante la fermentación, continúa ahora con la actuación de las exopeptidasas, tanto endógenas como de origen microbiano, que liberan pequeños péptidos y aminoácidos libres (Verplaetse, 1994; Molly *et al.*, 1997). La fracción de nitrógeno no proteico se enriquece, además, con el amoníaco procedente del metabolismo microbiano de los aminoácidos (Demeyer, 1992), provocando un ligero aumento del pH (Verplaetse *et al.*, 1989). Este incremento en el nitrógeno no proteico y los aminoácidos libres contribuye, aparte de al sabor y aroma del producto final, a su desecación, pues acelera la pérdida de agua (DeMasi *et al.*, 1990).

La lipólisis, iniciada durante la fermentación, continúa en esta fase de maduración. Además, los ácidos grasos libres generados sufren diversas reacciones oxidativas que conducen a la aparición de sustancias volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor y aroma del embutido (Demeyer *et al.*, 1986).

Por último, durante esta fase tiene lugar la completa reducción del nitrito residual de la fermentación, con lo que los valores finales suelen estar por debajo de los 10 mg/Kg de producto (Incze, 1992).

1.3.6. Envasado

Una vez secados, los embutidos se envasan en cajas de cartón o en bolsas de plástico (en algunos casos al vacío). En ocasiones se venden ya loncheados y envasados al vacío.

1.4. MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE

La carne está constituida fundamentalmente por el tejido muscular de los mamíferos que en la práctica se limita a un pequeño número de especies de abasto. El músculo está formado por elementos miofibrilares contráctiles y proteínas sarcoplasmáticas solubles.

Las características microbiológicas y la composición química de la carne la convierten en un excelente sustrato para los microorganismos (Hirooka *et al.*, 1982). Desde un punto de vista microbiológico, la propiedad más importante que presenta la carne es un elevado contenido en

agua que se traduce en una actividad de agua (a_w) de aproximadamente 0,99, lo que permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos. El músculo contiene un 75% de agua con una gran variedad de importantes sustratos de crecimiento y otros micro-nutrientes; por tanto, el músculo es un medio apto para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, en especial aquéllos que se ven favorecidos por las condiciones de humedad.

El crecimiento de microorganismos de la carne tiene lugar a expensas de sus componentes solubles: carbohidratos, ácido láctico y aminoácidos.

Las propiedades redox de la carne ejercen una gran influencia en su microbiología; el factor central es la respiración tisular que continua consumiendo oxígeno y produciendo CO_2 . En los animales vivos la demanda de oxígeno está compensada por el transportado por la sangre por lo que la tensión de oxígeno y el potencial redox del músculo vivo son grandes. Con la muerte, finaliza el aporte sanguíneo, el contenido de oxígeno y el potencial redox del músculo disminuyen gradualmente, conduciendo a la producción y acumulación anaerobia de ácido láctico. La acidez generada puede ser suficiente para reducir el metabolismo tisular, aunque éste continúa durante unos días a una velocidad que supera a la que el oxígeno puede difundir en la carne. Por tanto, la masa cárnica se convierte en anaerobia en unas horas *post mortem*, cosa que se traduce en un color rojo más brillante y en que no se origina acidez. Cuando la carne se congela, se trata con calor o se sala, se inhibe la respiración tisular; sin embargo, persiste normalmente la suficiente actividad reductora como para mantener condiciones anaerobias en el interior de cualquier trozo de carne de más de 10 mm de grosor. Consecuentemente, aunque en la superficie se desarrolle una microbiota aerobia, en la carne sólo pueden crecer microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos.

En condiciones naturales, la carne presenta un pH *postmortem* cercano a la neutralidad (6-6,5), muy próximo al pH óptimo de muchos microorganismos patógenos y causantes de alteración. Un pH alrededor de 5,5 es muy desfavorable para el desarrollo de un gran número de bacterias, y combinado con otros factores perjudiciales, como temperaturas bajas, puede prevenir el crecimiento bacteriano casi en su totalidad. Sin embargo, algunas cepas de *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Micobacterium thermosphactum* crecen a su máxima velocidad en un rango de pH comprendido entre 5,5 y 7,0 (Gill y Newton, 1977). El pH bajo, combinado con las sales del curado es especialmente eficaz ante las bacterias que suelen desarrollarse en las carnes curadas.

Dentro del amplio grupo de microorganismos de la carne pueden diferenciarse tres categorías:

- Microorganismos alterantes de las propiedades organolépticas (microorganismos deteriorantes).
- Microorganismos que pueden causar infecciones y toxiinfecciones alimentarias (microorganismos patógenos).
- Microorganismos que conducen la fermentación e influyen en determinadas características finales del embutido como la textura, el color, el aroma y el gusto (microorganismos de interés tecnológico).

Con la excepción de la superficie externa y de los tractos digestivo y respiratorio, los tejidos animales sanos contienen pocos microorganismos; los mecanismos de defensa animal controlan con eficacia los agentes infecciosos en los animales vivos sanos. Después del sacrificio, y antes del eviscerado, las características de la carne son las mismas que en vida; la superficie del animal contiene un alto índice de contaminación microbiológica procedente del suelo, del aire y del agua, mientras que en el músculo esquelético la contaminación es prácticamente nula ya que sólo pueden existir pequeños focos de contaminación provenientes del intestino, de alguna posible fisura, de los riñones, de los nódulos linfáticos o del sistema circulatorio (Lechowich, 1971). Los microorganismos deteriorantes y patógenos adquieren importancia durante el eviscerado de la canal ya que es probable que muchos de estos microorganismos de la superficie y de las vísceras del animal, como *Salmonella* spp. u otras enterobacterias, lleguen a entrar en contacto con el músculo. El riesgo más elevado de contaminación se da en la manipulación de la canal y en la entrada de la carne en los canales de distribución. Aunque el transporte se realiza en condiciones de refrigeración, las superficies de corte van incrementando la carga microbiana.

La microbiota que va adquiriendo la carne es muy variada, pero la mayoría de los microorganismos que provocan alteraciones se pueden agrupar dentro de los psicrótrofos aerobios de los géneros *Pseudomonas* y *Moraxella*. También pueden encontrarse especies anaerobias facultativas como enterobacterias psicrótrofas, *Aeromonas* spp. y *Shewanella putrefaciens*, y microorganismos gram-positivos como *Bochothrix thermosphacta* (Danty *et al.*, 1983; Buchanan y Palumbo, 1985).

No es inusual encontrar en la carne microorganismos gram-positivos causantes de infecciones y toxiinfecciones alimentarias: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Listeria monocytogenes* (Lambert *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1993). También puede darse el crecimiento de una amplia variedad de mohos y levaduras, sobretodo en las etapas de almacenamiento de la carne y secado de embutidos. Este tipo de microorganismos pueden dar alteraciones de las características organolépticas. Destacan, por su predominio, géneros como *Penicillium* y *Mucor* (mohos) y *Candida* y *Debaryomyces* (levaduras).

1.5. ECOLOGÍA BACTERIANA DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

La microbiota de los productos cárnicos curados-fermentados ha sido caracterizada tanto en España (Hugas *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1998) como en Europa (Schillinger y Lücke, 1987; Montel *et al.*, 1989) y se ha comprobado que no existen grandes diferencias entre los diferentes productos de diversos países europeos a nivel de especies bacterianas. Así, dentro de las bacterias del ácido láctico (BAL), *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* son las especies bacterianas más descritas. En cuanto a los cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+), encontramos estafilococos coagulasa negativos (ECN) y algunas

especies del género *Kocuria*; *Staphylococcus xylosus* es la especie de mayor prevalencia en los embutidos fermentados (Pirone y Manganeli, 1990; Comi *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 2001).

Las referencias bibliográficas que existen sobre la ecología de los EFLA son escasas por tratarse de productos de fabricación local y con procedimientos, hasta hace relativamente poco, totalmente artesanales. Existen algunos datos y referencias de productos parecidos fabricados en Italia como el salame felino (Vicini y Raczynski, 1977; Papa *et al.*, 1990; Dellapina *et al.*, 1994) y embutidos fermentados secos italianos (Comi *et al.*, 1992), todos ellos productos de baja acidez. En productos españoles existen algunas referencias bibliográficas sobre el salchichón de Vic (Ferrer y Arboix, 1986), sobre sobrasada (Rosselló *et al.*, 1995) y sobre chorizos madurados en frío (Lois *et al.*, 1987). Dentro de las BAL, *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* y *L. plantarum* son las especies más descritas (Schillinger y Lücke, 1987; Hammes *et al.*, 1990, Montel *et al.*, 1991; Hugas *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1998). Dellapina *et al.* (1994) demostraron que mientras en embutidos fermentados ácidos los lactobacilos eran el género predominante, en el salame felino éstos y los enterococos están muy equilibrados. En cuanto a los CGC+, *S. xylosus* es la especie prevalente en la mayoría de embutidos fermentados tradicionales (Montel *et al.*, 1992; Coppola *et al.*, 1997; Rebecchi *et al.*, 1998; García-Varona *et al.*, 2000).

Para la obtención de embutidos madurados, la mezcla de carne especias y aditivos se somete a un proceso de curado/fermentación. La fermentación llevada a cabo por la microbiota de la carne o por los contaminantes del entorno fabril llega a alcanzar generalmente un pH de 4,8-5,0 una vez finalizada la fermentación, asegurando así una estabilidad microbiológica satisfactoria además de un rápido incremento de la firmeza (Klettner y Rödel, 1978). Para conseguir esto, se añade un 0,4-0,8% de carbohidratos de fermentación rápida, como por ejemplo glucosa o glucono- δ -lactona. El pH baja más rápidamente si la mezcla con el carbohidrato añadido se inocula con un cultivo iniciador de la fermentación.

Normalmente la formulación inicial de los embutidos contiene un 2,4-3% de cloruro sódico por lo que la a_w de la mezcla inicial del embutido crudo es de 0,965-0,955 dependiendo del contenido graso de la formulación. Esta actividad de agua inhibe o dificulta el crecimiento de muchos microorganismos indeseables y/o patógenos mientras que favorece el desarrollo de las BAL y los CGC+. A parte de su efecto sobre la microbiota, el cloruro sódico interactúa con la estructura miofibrilar y solubiliza proteínas formando así una película viscosa alrededor de las partículas de la carne, hecho que contribuye al gusto característico de los embutidos.

Los agentes curantes, nitritos y nitratos, se utilizan para conferir a los productos cárnicos su color, aroma y estabilidad microbiológica característicos. El nitrato actúa como reserva de nitrito (si existen microorganismos capaces de reducirlo) pero ejerce un escaso efecto bacteriostático o bactericida *per se*, por lo que puede ser sustituido por concentraciones inferiores de nitrito en la mayoría de productos cárnicos. El efecto bacteriostático del nitrito depende del pH de la carne. Cuando el pH baja una unidad, el efecto bacteriostático aumenta unas 10 veces, llegando a su máximo efecto alrededor de un pH de 5,0.

El proceso de elaboración del embutido es una etapa crítica, ya que el picado, amasado y embutido de la masa cárnica influirán de forma decisiva en la calidad microbiológica del producto final (Fraizer y Westhoff, 1993). Según la teoría de los obstáculos (Leistner y Hechelmann, 1993), la estabilidad y seguridad de la mayoría de alimentos se basa en una combinación de diferentes factores o barreras antimicrobianas. La calidad de un alimento se consigue manteniendo las barreras de seguridad y calidad en el rango óptimo. La combinación de diferentes barreras conduce a una alteración múltiple de la homeostasis de los microorganismos, de forma que se consigue una conservación más efectiva de los alimentos. Se han identificado más de 40 barreras potenciales útiles en la conservación de los alimentos. La más importantes que se usan, bien como proceso o como aditivos, son: la alta temperatura, la baja temperatura, la actividad de agua (a_w), la acidez (pH), el potencial redox, los conservantes (nitrito, ácidos orgánicos, etc.), los microorganismos competitivos (BAL, etc.). Otras barreras que se han identificado son la tensión de oxígeno, el envasado en atmósfera modificada, la alta presión, la irradiación, la ultrasonificación, etc.

El parámetro más importante en la elaboración de embutidos es el control de la temperatura en el secado, ya que es determinante para evitar que la contaminación microbiana aumente. La temperatura en las etapas iniciales de fabricación de estos productos no debería sobrepasar los $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dado que entre los $10\text{-}12^{\circ}\text{C}$ se puede dar el crecimiento de *Clostridium botulinum*.

La enterotoxina de *Staphylococcus aureus* constituye un peligro en los embutidos, especialmente en aquellos elaborados rápidamente por fermentación a temperaturas relativamente altas. Pero la toxina no se forma durante el almacenaje del producto acabado, ya que la actividad de agua es suficientemente baja como para prevenir el crecimiento microbiano y la formación de toxina. El peligro se da en el proceso de fermentación, cuando la a_w es aún elevada. La enterotoxina pre-formada llegará al producto acabado donde los estafilococos mueren progresivamente a medida que la fermentación se ralentiza y el secado disminuye la a_w .

Las enterobacterias constituyen una familia de notable importancia desde un punto de vista higiénico y sanitario. Se encuentran en la carne y los embutidos procedentes del intestino del animal y se consideran, con frecuencia, una contaminación de origen fecal. Dentro de esta familia destaca el género *Salmonella*, cuyas especies se hayan distribuidas por el agua, el suelo y los animales. Durante el proceso de fermentación, y debido a los obstáculos o barreras que suelen aplicarse, los recuentos de enterobacterias suelen disminuir gradualmente.

1.5.1. Las bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son el grupo bacteriano de mayor importancia en el proceso de elaboración de los embutidos fermentados. Estos microorganismos, especialmente el género *Lactobacillus*, son los responsables de la producción de ácido láctico durante la fermentación, provocando así una disminución del pH. Las BAL se desarrollan rápidamente durante el proceso fermentativo y evolucionan desde $10^3\text{-}10^4$ ufc/g hasta $10^8\text{-}10^9$ ufc/g al final

de la fermentación, manteniéndose en estos niveles al final de la maduración (Hugas *et al.*, 1993).

1.5.1.1. Taxonomía

Las BAL forman un grupo natural de bacterias gram-positivas, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas (algunas cepas presentan una pseudo-catalasa), con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo, que fermentan carbohidratos para formar principalmente ácido láctico, con un contenido en G+C inferior a 55 mol%, pertenecientes, por tanto, a la subdivisión *Clostridium* de las eubacterias gram-positivas.

Aunque taxonómicamente forman un grupo bastante heterogéneo, los géneros incluidos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Vandamme *et al.*, 1996).

1.5.1.2. Importancia de las BAL en la elaboración de embutidos

Las BAL se encuentran normalmente en alimentos fermentados (carne, vegetales, frutas, bebidas y productos lácticos) y también en los tractos respiratorio, intestinal y genital de humanos y animales, en aguas fecales y en materias vegetales. Las BAL tienen una gran importancia en alimentación y tecnología alimentaria, sobretodo por su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos. El efecto conservador de las BAL durante la fabricación y almacenaje de los alimentos fermentados se debe a la producción de altos niveles de ácido láctico y otras sustancias inhibitoras del crecimiento microbiano. La producción de altos niveles de ácido láctico también contribuye en el gusto del embutido crudo y además tiene un impacto positivo en la salud humana y animal.

Las BAL que más frecuentemente se encuentran en carne y productos cárnicos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*. Los lactobacilos son el género de las LAB que predomina en los embutidos fermentados. Los lactobacilos se utilizan en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios (Bottazi, 1988). *Lactobacillus plantarum* está asociado generalmente con fermentaciones cárnicas y de vegetales (Fernández-González, 1993; Hugas *et al.*, 1993). *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus curvatus* son esenciales para la fermentación de embutidos preparados con adición de sacarosa o leche en polvo (Krockel, 1995). Estas especies se utilizan frecuentemente como cultivos iniciadores para asegurar un flavor uniforme y una buena conservación (Liepe, 1983). En embutidos fermentados de forma natural, sin la adición de cultivos iniciadores, *Lactobacillus sakei* y *L. curvatus* predominan a temperaturas inferiores a 25°C, y por encima de los 25°C la especie predominante es *L. plantarum* (Krockel, 1995). Los lactobacillos heterofermentadores y *Leuconostoc* spp. suelen representar menos del 10% de las BAL en embutidos fermentados. Estos últimos son indeseables dado que pueden producir gas, peróxidos y limo (Lücke, 1985).

Además de los ácidos láctico y acético, las BAL también son capaces de producir y excretar otras sustancias, como ya se ha comentado, aunque en cantidades muy inferiores.

Entre estas destacan el ácido fórmico, ácidos grasos libres, amonio, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoina, 2,3-butanodiol, acetaldehído, benzoato, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y antibióticos, además de diversas sustancias inhibitoras que no están completamente identificadas (Gilliland, 1986; Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990; Schillinger, 1990; Piard y Desmazeud, 1991, 1992; Vanderbergh, 1993). Algunas de estas sustancias tienen actividad antagonista respecto a diversos microorganismos patógenos y deteriorantes de los alimentos, incluyendo lactobacilos psicrófilos y leuconostocs, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. La inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables se produce por eliminación competitiva de los substratos esenciales, acumulación de D-aminoácidos, disminución del potencial redox, congregación, etc. No obstante, en algunos casos, la antibiosis podría inhibir a otras cepas de BAL sí deseables. Houle *et al.* (1989) demostraron que la mezcla de cepas que crecen rápidamente (utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación de la carne) puede retardar el crecimiento de otras cepas por la antibiosis causada por la producción de bacteriocinas.

1.5.1.2.1. Productos primarios de la fermentación de las BAL

Los niveles y proporciones de los productos finales de la fermentación que se acumulan dependen de las especies de BAL involucradas, la composición química del ambiente de cultivo y las condiciones físicas que hay durante el proceso fermentativo (Kandler, 1983; Gilliland, 1986; Condon, 1987; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Los productos finales de la fermentación de las BAL de más interés en la industria cárnica son los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, el dióxido de carbono, las aminas biógenas y las bacteriocinas.

Ácidos Orgánicos

El ácido láctico es el principal producto final del catabolismo de los carbohidratos en las BAL. La producción de ácido láctico es la responsable de la típica disminución del pH de la masa cárnica después de unas horas de haber comenzado la fermentación. La disminución del pH tiene un efecto positivo para la conservación, textura y secado del embutido crudo.

En base al catabolismo de las hexosas, las BAL se clasifican en (Orla-Jensen, 1919):

Homofermentadoras (vía glicolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas): lactococos, pediococos, estreptococos, lactobacilos homofermentadores. Metabolizan las hexosas principalmente a ácido láctico, con un rendimiento neto de 2 moles de ATP por mol de hexosa fermentado (Kandler, 1983).

Heterofermentadoras (vía de las pentosas fosfato): leuconostocs, lactobacilos heterofermentadores. En la fermentación de hexosas y pentosas el ácido láctico comprende el 70% de los productos catabólicos finales, junto con cantidades equimolares de CO₂ y acetato o etanol. El rendimiento neto es de un mol de ATP por mol de hexosa.

Heterofermentadoras facultativas: lactobacilos heterofermentativos facultativos. Algunas BAL homofermentativas disponen de fofocetolasa, una enzima inducible de la vía de las pentosas

fosfato, que les permite tener un patrón de productos finales heterofermentativo que comprende ácido fórmico, ácido acético y etanol (Cogan *et al.*, 1989) estos productos se forman cuando existen niveles relativamente bajos de fructosa 1,6-difosfato, un activador esencial de la lactato-deshidrogenasa, particularmente cuando las bacterias crecen en concentraciones limitantes de glucosa o lactosa (Thomas *et al.*, 1979).

En los embutidos fermentados es importante evitar una fermentación heteroláctica, ya que puede provocar la aparición de agujeros en la masa del embutido, falta de cohesión y gustos ácidos y/o picantes. Las especies de BAL predominantes más competitivas en la fermentación son *L. sakei* y *L. plantarum*, heterofermentadoras facultativas (Reuter, 1971).

Las BAL pueden vivir y desarrollarse a un pH relativamente bajo porque disponen de un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y protones al exterior celular que, además de contribuir a la homeostasis del pH interno, proporciona energía (Michels *et al.*, 1979; Tseng y Montville, 1993).

Peróxido de hidrógeno

Las BAL producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección ante el oxígeno que se acumula en el medio de crecimiento. Su acción bactericida se debe a su efecto altamente oxidante, que provoca la peroxidación de los lípidos de la membrana (Haugaard, 1968; Morris, 1979), incrementando la permeabilidad (Kong y Davidson, 1980). También destruye las estructuras moleculares básicas de los ácidos nucleicos y las proteínas de la célula (Dahl *et al.*, 1989; Piard y Desmazeaud, 1991). Además, el peróxido de hidrógeno también puede reaccionar con otros componentes para formar otras sustancias inhibitoras adicionales. La acumulación de este compuesto en la masa cárnica no solamente puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, sino que también puede provocar reacciones de enranciamiento de las grasas del embutido provocando olores desagradables.

Dióxido de Carbono y Aminas Biógenas

El dióxido de carbono es un producto final de la fermentación de hexosas por las BAL heterofermentadoras. Diversas especies y cepas de BAL, incluyendo algunas cepas homofermentadoras, también son capaces de producir dióxido de carbono a partir de otros sustratos, como el malato y el citrato (Fleming *et al.*, 1986; London, 1990), gluconato (London, 1990), lactato (London, 1990), lactosa (Cogan, 1986) y aminoácidos como arginina (Poolman, 1993), histidina y tirosina.

Las reacciones de descarboxilación de aminoácidos no solo causan deterioro debido a la acumulación de dióxido de carbono, sino que también resultan en la formación de aminas biógenas (Fleming *et al.*, 1986; Poolman, 1993; Buckenhüskes, 1993). Estos compuestos se consideran indeseables debido a sus potenciales efectos tóxicos (Silla-Santos, 1996).

Algunas BAL tienen una reconocida actividad aminoácido descarboxilasa en determinadas condiciones, es decir, la capacidad para formar aminas biógenas a partir de sus aminoácidos precursores (tirosina, histidina, ornitina, lisina, fenilalanina y triptófano). Además de la disponibilidad de sustratos, durante la elaboración de productos cárnicos fermentados se dan las

condiciones físico-químicas adecuadas para la formación de aminas (presencia de cofactores como vitaminas del grupo B, pH, a_w y temperatura de maduración). La actividad descarboxilasa microbiana puede provenir de los propios microorganismos fermentadores, de la microbiota banal y/o de los microorganismos contaminantes de las materias primas. Se ha observado una gran variabilidad en la naturaleza y la cantidad de aminas biógenas formadas, tanto por parte de las diferentes especies bacterianas como para las cepas comprendidas en una misma especie (Hernández-Jover *et al.*, 1997a y b; Bover-Cid *et al.*, 1998). Actualmente, se considera que la correcta aplicación de medidas higiénicas y unas condiciones tecnológicas apropiadas (formulación, temperatura, humedad relativa, etc.) son el mejor método para el control de la actividad aminoácido descarboxilasa de los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación y para, en definitiva, reducir el riesgo de acumulación de niveles tóxicos e higiénicamente inaceptables de aminas biógenas.

Bacteriocinas

Algunas BAL (principalmente lactobacilos y enterococos) tienen la capacidad de sintetizar bacteriocinas, sustancias con actividad antibacteriana de naturaleza proteica y por tanto biodegradables, que pueden inhibir el crecimiento de algunos patógenos y otras bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente con las bacterias productoras. Así por ejemplo, se ha demostrado que la bacteriocina sakacina K producida por *Lactobacillus sakei* CTC494 es capaz de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salchichón (Hugas *et al.*, 1995).

1.5.1.3. Impacto de las BAL en la salud humana. Enterococos

Las BAL se consideran organismos GRAS ("*generally recognise as safe*") en la producción de alimentos. Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado el estatus GRAS de uno de los géneros de bacterias lácticas: los enterococos.

Los enterococos son microorganismos ubicuos que habitan el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Con frecuencia se encuentran en productos cárnicos fermentados, pudiendo alcanzar recuentos de hasta 10^5 ufc/g (Marchesino *et al.*, 1992; Dellapina *et al.*, 1994; Teuber *et al.*, 1999) debido a su tolerancia al cloruro sódico y al nitrito que le permite sobrevivir, e incluso multiplicarse, durante la fermentación (Giraffa, 2002). Los enterococos se han utilizado desde hace años en la producción de alimentos por su importante contribución al desarrollo del aroma en quesos, como probióticos en alimentación humana y animal y como cultivos bioprotectores, productores de bacteriocinas, en productos lácteos y cárnicos (Trovatelli *et al.*, 1987; Centeno *et al.*, 1996; Coppola *et al.*, 1998; Aymerich *et al.*, 2000). Sin embargo, su presencia en los alimentos es motivo de controversia, ya que algunos autores los consideran microorganismos indeseables, indicadores de contaminación fecal y responsables del deterioro de productos cárnicos (Bell *et al.*, 1984; Franz *et al.*, 1999). Esta controversia se ha visto además acentuada por la desafortunada relevancia clínica que en las últimas décadas han adquirido los enterococos. Éstos se han convertido en la tercera causa de enfermedades nosocomiales causando infecciones del tracto urinario, bacteremia y endocarditis (CDC NNIS System, 1998). La mayor parte de infecciones nosocomiales por enterococos están causadas

por *Enterococcus faecalis*, responsable del 80% de los casos, seguido por *Enterococcus faecium* que se asocia a un 15-20% de las infecciones restantes (Morrison *et al.*, 1997).

Los mecanismos de virulencia de los enterococos no se conocen con exactitud pero sí se han descrito una serie de factores de virulencia que incluyen la adherencia al tejido hospedador, invasión, formación de abscesos, resistencia y modulación de los mecanismos de defensa del hospedador, secreción de citolisinas y producción de feromonas codificadas en plásmidos (Wirth 1994; Jett *et al.*, 1994; Dunny *et al.*, 1990; Lowe *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1998a; Haas y Gilmore, 1999; Shankar *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 1999; Eaton y Gasson, 2001). La adherencia al tejido hospedador está mediado por adhesinas. Una de las adhesinas más conocidas es la sustancia agregante (AS), una proteína de superficie inducible por feromonas que media la unión de la célula donante a células receptoras libres de plásmidos y promueve la agregación celular (Waters y Dunny, 2001). Otras adhesinas identificadas en enterococos son el antígeno A de *E. faecalis* (EfaA) y la proteína de superficie Esp, que participan en la adhesión celular a superficies bióticas y abióticas y en la formación de biofilms (Lowe *et al.*, 1995; Shankar *et al.*, 2001). Otro factor de virulencia descrito es la gelatinasa gelE, una zinc-endopeptidasa que hidroliza la gelatina y otros péptidos bioactivos. Este factor de virulencia se ha encontrado mayoritariamente en enterococos aislados de pacientes con endocarditis, por lo que parece contribuir en la virulencia de estos microorganismos (Singh *et al.*, 1998b).

Otra característica que contribuye a la patogenicidad de los enterococos es su resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, que dificulta en gran medida el tratamiento médico de las infecciones por enterococos (Murray, 1990; Mundy *et al.*, 2000). El principal motivo de preocupación son los enterococos resistentes a vancomicina, ya que este antibiótico es una de las últimas opciones de terapia antimicrobiana en algunas infecciones por bacterias gram-positivas (Rubin *et al.*, 1992; Wegener *et al.*, 1999). El descubrimiento de genes de resistencia a vancomicina y otras resistencias a antibióticos en plásmidos y transposones (Leclercq, 1997; Morrison *et al.*, 1997) ha incrementado esta preocupación. El intercambio génico mediante conjugación (Clewell *et al.*, 1990; Franz *et al.*, 1999) puede propagar las resistencias a antibióticos, y también los genes que codifican factores de virulencia, entre la población de enterococos o a otras bacterias patógenas. La transferencia génica ha sido demostrada, al menos *in vitro*, entre cepas de la misma especie (Cocconcelli *et al.*, 2003), entre especies diferentes de enterococos (Nicas *et al.*, 1989; Boyle *et al.*, 1993) y entre enterococos y bacterias de otros géneros como *Listeria monocytogenes* (Leclercq *et al.*, 1989) y *Staphylococcus aureus* (Noble *et al.*, 1992, Tenover *et al.*, 2004).

Los enterococos de origen alimentario no se han relacionado, hasta ahora, como causa directa de infecciones clínicas (Adams, 1999) aunque sí es cierto que se han encontrado genes que codifican factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos (Eaton *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001; Semedo *et al.*, 2003) aunque en menor frecuencia que en las cepas de origen clínico.

Los enterococos resistentes a antibióticos están ampliamente distribuidos en alimentos crudos (Giraffa, 2002), así como también se han aislado de productos lácteos, alimentos preparados, productos cárnicos y entre cepas utilizadas como probióticos (Quednau *et al.*, 1998; Teuber *et al.*, 1999; Giraffa *et al.*, 2000; Baumgartner *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003;

Temmerman *et al.*, 2003). Este hecho podría contribuir a incrementar la prevalencia de patógenos en alimentos con múltiples resistencias a antibióticos con el consecuente impacto sobre la salud humana.

1.5.2. Cocos gram-positivos catalasa-positivos

Simultáneamente al crecimiento de las BAL, se produce el desarrollo de otro grupo microbiano de gran importancia en los embutidos: los cocos gram-positivos, catalasa-positivos (CGC+). Este grupo incluye micrococcos y estafilococos coagulasa negativos (ECN), siendo éstos últimos los más abundantes ya que crecen mejor en anaerobiosis. Los recuentos de este grupo de microorganismos en los embutidos fermentados parten de una situación inicial de $10^2 - 10^4$ ufc/g has alcanzar niveles que oscilan entre 10^5 y 10^8 al final del proceso de fermentación.

Es en este grupo microbiano donde reside la base de la peculiaridad que caracteriza a los EFLA. Según Montel *et al.* (1998), en los productos cárnicos fermentados de pH elevado especies de *Staphylococcus* de elevada capacidad lipolítica podrían incrementar el grado de lipólisis en este tipo de embutidos. La acidificación parece ser un factor limitante en el desarrollo del aroma dado que a valores de pH inferiores a 5,0 las reacciones metabólicas bacterianas se ven desfavorecidas.

1.5.2.1. Taxonomía

Los CGC+ pertenecían a la familia tradicionalmente conocida como *Micrococcaceae*. Esta familia se consideraba dividida en 4 géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*. Gracias al avance que han experimentado las técnicas taxonómicas moleculares en los últimos años, actualmente se considera que no existe tal familia, y las especies englobadas en el género *Micrococcus* se han reclasificado en 5 géneros (Stackebrandt *et al.*, 1995): *Kytococcus*, *Nesterenkonia*, *Dermacoccus*, *Kocuria* y *Micrococcus* (Tabla 3). Considerando estos antecedentes, parece más acertado denominar cocos gram-positivos catalasa-positivos al grupo que incluye bacterias gram-positivas, aerobias facultativas, catalasa-positivas y con actividad nitrato-reductasa; algunos de los CGC+, además, toleran concentraciones importantes de cloruro sódico. Del mismo modo que las BAL, aunque en menor proporción, pueden hidrolizar la glucosa produciendo gas y ácido.

Descripción del género *Kocuria* (Stackebrandt *et al.*, 1995)

El género *Kocuria* está formado por bacterias cocoides, gram-positivas, catalasa-positivas, no encapsuladas, que no forman endosporas.

Son microorganismos quimioorganotrofos, de metabolismo estrictamente respiratorio. Aunque son bacterias aerobias, las cepas de una especie, *K. kristinae*, pueden ser anaerobias facultativas. No son halófilas, normalmente crecen en medios con un 10% de NaCl, si bien *K. varians* crece mejor con un 7,5% de NaCl. Mesófilas. Su contenido en G+C del ADN varía entre 66-75 mol%. La especie tipo es *K. rosea*.

Las especies más descritas en embutidos fermentados son *K. varians* y *K. kristinae* (Fischer y Schleifer, 1980; Comi *et al.*, 1992).

Especie	Especie reclasificada	G+C (mol%)	Género
<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>	70-76	<i>Micrococcus</i>
<i>M. lylae</i>	<i>M. lylae</i>	69	
<i>M. varians</i>	<i>Kocuria varians</i>	66-72	<i>Kocuria</i>
<i>M. kristinae</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	67	
<i>M. roseus</i>	<i>Kocuria rosea</i>	66-75	
<i>M. halobius</i>	<i>Nesterenkonia halobia</i>	70-72	<i>Nesterenkonia</i>
<i>M. sedentarius</i>	<i>Kytococcus sedentarius</i>	68-69	<i>Kytococcus</i>
<i>M. nishinomiyaensis</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	66-71	<i>Dermacoccus</i>

Tabla 3. Reclasificación de las especies del género *Micrococcus* (Stackebrandt *et al.*, 1995).

Descripción del género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está compuesto por bacterias esféricas, de 0,5-1,5 μm de diámetro, gram-positivas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas. Son microorganismos quimioorganotrofos, presentan metabolismo respiratorio y fermentativo. Son catalasa-positivos y, normalmente, oxidasa negativos. Generalmente presentan actividad nitrato-reductasa. Son susceptibles a la lisis por lisostafina pero no por lisozima (Schleifer y Kloos, 1975). Normalmente crecen en medios con un 10% de NaCl (*S. carnosus* puede crecer con un 15% de NaCl). Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30-37°C. El contenido en G+C del ADN varía entre 30-38 mol% (Stackebrandt *et al.*, 1995).

Estudios taxonómicos recientes han demostrado que el género *Staphylococcus* puede ser dividido en, al menos, 38 especies y 21 subespecies, consistentes en 6 especies coagulasa positivas o coagulasa variables y 32 especies coagulasa negativas (Tabla 4).

Los estafilococos están ampliamente extendidos por la naturaleza y forman parte de la microbiota de la piel y de las membranas de las mucosas de mamíferos y aves. Frecuentemente también se aíslan de alimentos, agua y polvo. Algunas especies coagulasa positivas, como *S. aureus*, son patógenos oportunistas de humanos y animales (Holt *et al.*, 1994).

La especie de mayor prevalencia en embutidos fermentados es *S. xylosus* aunque también se han descrito otras especies como *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. equorum* (Fischer y Schleifer, 1980; Simonetti y Cantoni, 1983; Seager *et al.*, 1986; Coppola *et al.*, 1996; García-Varona *et al.*, 2000), todos ellos estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Especie	Subespecie	Coagulasa	Referencia
<i>S. arlettae</i>		-	Schleifer <i>et al.</i> , 1985
<i>S. aureus</i>	<i>anaerobius aureus</i>	+	De la fuente <i>et al.</i> , 1985
		+	Rosenbach, 1884
<i>S. auricularis</i>		-	Kloos y Schleifer, 1983
<i>S. capitis</i>	<i>capitis ureolyticus</i>	-	Kloos y Schleifer, 1975
		-	Bannerman y Kloos, 1991
<i>S. caprae</i>		-	Devriese <i>et al.</i> , 1983
<i>S. carnosus</i>	<i>carnosus utilis</i>	-	Schleifer y Fischer, 1982
		-	Probst <i>et al.</i> , 1998
<i>S. caseolyticus</i> ¹		-	Schleifer <i>et al.</i> , 1982
<i>S. chromogenes</i>		-	Hájek <i>et al.</i> , 1986
<i>S. cohnii</i>	<i>cohnii urealyticum</i>	-	Schleifer y Kloos, 1975
		-	Kloos and Wolfshohl, 1991
<i>S. condimenti</i>		-	Probst <i>et al.</i> , 1998
<i>S. delphini</i>		+	Varaldo <i>et al.</i> , 1988
<i>S. epidermidis</i>		-	Schleifer y Kloos, 1975
<i>S. equorum</i>	<i>equorum linens</i>	-	Schleifer <i>et al.</i> , 1985
		-	Place <i>et al.</i> 2003
<i>S. felis</i>		-	Igimi <i>et al.</i> , 1989
<i>S. fleurettii</i>		-	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2000
<i>S. gallinarum</i>		-	Devriese <i>et al.</i> , 1983
<i>S. haemolyticus</i>		-	Schleifer y Kloos, 1975
<i>S. hominis</i>	<i>hominis novobiosepticus</i>	-	Kloos y Schleifer, 1975
		-	Kloos <i>et al.</i> , 1998
<i>S. hyicus</i>		v	Devriese <i>et al.</i> , 1978
<i>S. intermedius</i>		+	Hájek, 1976
<i>S. kloosii</i>		-	Schleifer <i>et al.</i> , 1985
<i>S. lentus</i>		-	Schleifer <i>et al.</i> , 1983
<i>S. lugdunensis</i>		-	Freney <i>et al.</i> , 1988
<i>S. lutrae</i>		-	Foster <i>et al.</i> , 1997
<i>S. muscae</i>		-	Hájek <i>et al.</i> , 1992
<i>S. nepalensis</i>		-	Spergser <i>et al.</i> , 2003
<i>S. pasteurii</i>		-	Chesneau <i>et al.</i> , 1993
<i>S. piscifermentans</i>		-	Tanasupawat <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pulvereri</i>		-	Zakrzewska-Czerwinska <i>et al.</i> , 1995
<i>S. saccharolyticus</i>		-	Kilpper-Bälz y Schleifer, 1984
<i>S. saprophyticus</i>	<i>bovis saprophyticus</i>	-	Hájek <i>et al.</i> , 1996
		-	Shaw <i>et al.</i> , 1951
<i>S. schleiferi</i>	<i>coagulans schleiferi</i>	+	Igimi <i>et al.</i> , 1990
		-	Freney <i>et al.</i> , 1988
<i>S. sciuri</i>	<i>carnaticus rodentium sciuri</i>	-	Kloos <i>et al.</i> , 1997
		-	Kloos <i>et al.</i> , 1997
		-	Kloos <i>et al.</i> , 1997
<i>S. simulans</i>		-	Kloos y Schleifer, 1975
<i>S. succinus</i>	<i>casei succinus</i>	-	Place <i>et al.</i> , 2002
		-	Lambert <i>et al.</i> , 1998
<i>S. vitulinus</i>		-	Webster <i>et al.</i> , 1994
<i>S. warneri</i>		-	Kloos y Schleifer, 1975
<i>S. xylosum</i>		-	Schleifer y Kloos, 1975

Tabla 4. Especies y subespecies del género *Staphylococcus* y clasificación en función de la producción de coagulasa (en plasma de conejo); +: ≥90% de las cepas son positivas; -: ≥90% de las cepas son negativas; v: 11-89% de las cepas son positivas. Fuente: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* GMBH (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>) y Holt *et al.*, 1994) actualmente también denominado *Macrococcus caseolyticus*.

1.5.2.2. Importancia de los CGC+ en la elaboración de embutidos

El papel que desempeñan estos microorganismos en los procesos fermentativos cárnicos se centra principalmente en tres aspectos:

- La actividad catalasa, que degrada los peróxidos.
- La actividad nitrato y nitrito-reductasa, convirtiendo los nitratos a nitritos y éstos a óxido nítrico.
- La actividad proteolítica y lipolítica.

Actividad catalasa

La catalasa es una enzima que forma parte de la estructura biomolecular de los CGC+. Su importancia radica en que descompone los peróxidos que se forman durante la hidrólisis de los carbohidratos en presencia de oxígeno por acción de las flavinooxidasas o las NADH peroxidasas de las BAL y, en menor medida de los CGC+ (Kandler, 1983). Los peróxidos inhiben el crecimiento de patógenos en el embutido, pero también son responsables de alteraciones del color por oxidación del pigmento, así como de las reacciones de enranciamiento lipídico que ocasionan defectos en las características organolépticas del producto final.

Actividad nitrato y nitrito reductasa

El nitrato se adiciona a la masa cárnica por su capacidad para fijar y conseguir el color típico de los productos curados más que por sus características antioxidantes y antimicrobianas. Para ser efectivo, el nitrato añadido debe ser reducido a nitrito. Los CGC+ utilizan el nitrato como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Este hecho provoca la reducción de nitrato a nitrito, que conjuntamente con un medio ácido, favorece la transformación del nitrito a óxido nitroso por medio de microorganismos presentes en el embutido (incluyendo microbiota nitrato-reductora y algunas cepas de bacterias lácticas) y éste se descompone originando óxido nítrico. El óxido nítrico formado reacciona con la mioglobina (pigmento muscular) de la carne para producir el deseado pigmento rojo típico de los productos curados: el nitrosopigmento o nitrosomioglobina (Palumbo y Smith, 1977).

Actividad proteolítica y lipolítica

La presencia de numerosas lipasas y proteasas favorece la liberación de ácidos grasos volátiles, sustancias aromáticas, ruptura de triglicéridos, formación de péptidos, aminoácidos y otros compuestos, incidiendo de forma notable en el aroma del producto. Estos efectos son más remarcables en el género *Staphylococcus*, ya que sus especies disponen de un mayor número de proteasas y lipasas que las del género *Kocuria*, pueden crecer en medios con una elevada concentración de NaCl y, lo que es más importante, pueden seguir realizando funciones lipolíticas y proteolíticas aún en ausencia de oxígeno (Comi *et al.*, 1992).

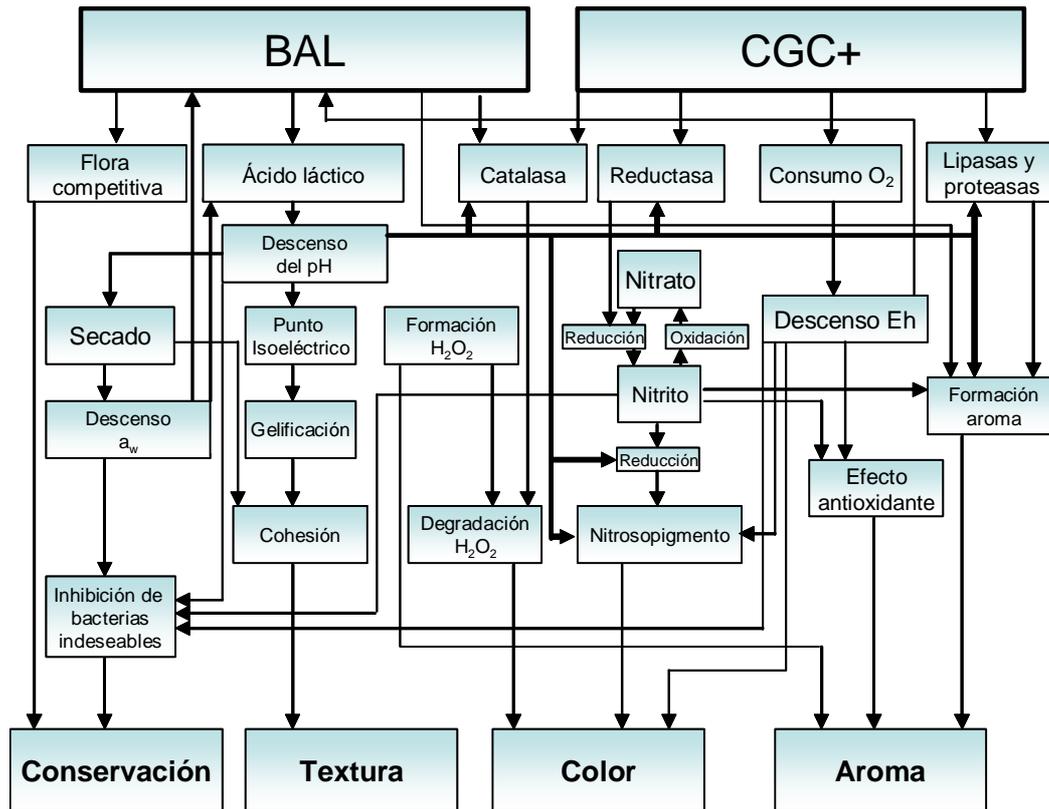


Figura 3. Interacciones entre BAL y CGC+ que se establecen durante la fermentación de los productos cárnicos (Buckenhüskes, 1993).

Además de las actividades descritas, los CGC+ también producen ácidos orgánicos dado que pueden metabolizar carbohidratos, provocando una disminución del pH, que contribuye a la fijación del nitrosopigmento y a la inhibición de microorganismos patógenos (Miralles *et al.*, 1996). La disminución del pH, sin embargo, no es tan acusada como en el caso de las BAL. Los dos grupos microbianos son importantes durante la fermentación de la carne y, de hecho, son las interacciones que se establecen entre las actividades metabólicas de las BAL y los CGC+ las que determinan el desarrollo de las características típicas de los embutidos fermentados, tanto desde el punto de vista de su calidad sensorial, como en referencia a la estabilidad y la seguridad microbiológica. De forma esquemática, la Figura 3 muestra la complejidad de estas interacciones.

1.5.2.3. Impacto de los CGC+ en la salud humana: ECN

La importancia tecnológica que los CGC+, tanto ECN como *Kocuria* spp., tienen en la elaboración de embutidos es indiscutible. No obstante y de forma similar al caso de los enterococos, los ECN, anteriormente considerados microorganismos comensales no patógenos, se han convertido en importantes patógenos causantes de infecciones nosocomiales, sobretodo

en pacientes inmunodeprimidos (Jarvis y Martone, 1992). Los ECN, especialmente *S. epidermidis*, se han identificado como la tercera causa más común de infecciones nosocomiales y la causa más frecuente de bacteremia nosocomial (Pittet *et al.*, 1994; Spencer, 1996; CDC NNIS System, 1998).

La terapia antimicrobiana de las infecciones por ECN puede ser complicada ya que estos microorganismos son frecuentemente resistentes a una gran variedad de antibióticos (Agvald-Öhman *et al.*, 2004). Los ECN presentan una elevada prevalencia de resistencia a meticilina (Sidebottom *et al.*, 1988; Hedin y Hambræus, 1991). La especie más problemática es *S. epidermidis* resistente a meticilina, que junto a *S. aureus* resistente a este antibiótico, se han convertido en importantes patógenos nosocomiales (Mulligan *et al.*, 1993). La mayoría de ECN resistentes a meticilina son resistentes también a otros antimicrobianos (Paulsen *et al.*, 1997) y además pueden ser reservorios de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos a otros estafilococos (Archer *et al.*, 1994; Wieders *et al.*, 2001). La transferencia de estos elementos a especies patógenas, como *S. aureus*, es motivo de preocupación ya que puede disminuir las opciones terapéuticas dificultando así el tratamiento de las infecciones causadas por estos patógenos

Los ECN de origen alimentario no se han establecido, en ningún caso, como origen de infecciones nosocomiales. En los alimentos, su problemática se centra en dos aspectos básicos: la transferencia de resistencias a antimicrobianos y su potencial enterotoxigénico.

La transferencia de cepas resistentes a antimicrobianos desde animales a humanos es un problema cada día más importante. Se considera que el uso intensivo de agentes antimicrobianos en la ganadería podría contribuir a crear un reservorio animal de microorganismos resistentes a antibióticos (Tenover y Hughes, 1996; Tenover y McGowan, 1996). Desde este reservorio, las cepas resistente o los genes de resistencia pueden diseminarse entre los humanos vía cadena alimentaria (Swartz, 2002; OMS, 2002).

Las enterotoxinas estafilocócicas son una familia de nueve tipos serológicos de enterotoxinas termoestables que causan gastroenteritis por consumo de alimentos contaminados (Balaban y Rasooly, 2000). Si bien los ECN no suponen el mismo riesgo que *S. aureus*, importante patógeno oportunista humano y principal responsable de intoxicaciones alimentarias (Le Loir *et al.*, 2003), a diferencia de éste los ECN suelen estar presentes en números elevados en los embutidos fermentados por lo que las cepas enterotoxigénicas si pueden ser un riesgo potencial para la salud humana. Se han descrito cepas de ECN productoras de enterotoxinas (Bautista *et al.*, 1988; Jay, 1992; Rodríguez *et al.*, 1996; Udo *et al.* 1999, Padmapriya *et al.*, 2003), pero hasta la fecha, *Staphylococcus intermedius* (coagulasa positivo) es la única especie, además de *Staphylococcus aureus*, que se ha relacionado claramente con brotes de toxiinfecciones estafilocócicas. Aún así, es imprescindible que las cepas de ECN seleccionadas para su uso como cultivos iniciadores no produzcan enterotoxinas (Rodríguez *et al.*, 1996).

1.6. SEGURIDAD BIOLÓGICA DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

La seguridad biológica, tanto biótica como abiótica, de los EFLA ha sido poco estudiada y se conoce poco sobre el efecto inhibitor del proceso tecnológico sobre el desarrollo de microorganismos patógenos contaminantes de la carne fresca y sobre la acumulación de aminas biógenas.

Los embutidos fermentados presentan una seguridad biológica igual o incluso superior a otros productos cárnicos que reciben un tratamiento térmico durante su manufactura o antes del consumo. Sin embargo, se han descrito brotes de salmonelosis, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos, y recientemente, infecciones por cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* por consumo de embutidos fermentados (Lücke *et al.*, 1998). En los EFLA (donde el pH es superior a 5,3) se pierde una de las barreras de seguridad, la acidez, facilitando así el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos. Según Leistner (1986), cuando un obstáculo se ve reducido, debe ser compensado aumentando otro de los obstáculos (por ejemplo, disminuyendo la temperatura de fermentación). Este punto debe ser tenido en cuenta cuando se diseña un sistema de Análisis de Puntos Críticos (APPCC) para la manufactura de este tipo de embutidos.

1.6.1. Enterobacterias: *Salmonella* y *Escherichia coli*

Durante el proceso de fermentación de los embutidos, el recuento de enterobacterias normalmente permanece constante o se incrementa como máximo un ciclo logarítmico. Los factores que favorecen el crecimiento de enterobacterias y por tanto, de *Salmonella* y *E. coli*, incluyen una elevada actividad de agua, un pH inicial alto, una baja concentración de carbohidratos fermentables, un bajo número de lactobacilos en la mezcla de carne inicial, el uso de nitratos o niveles muy bajos de nitritos como agentes curantes (Hechelmann *et al.*, 1974; Lücke *et al.*, 1998).

Salmonella es el principal agente etiológico de enfermedades de origen alimentario (Mead *et al.*, 1999, Haeghebaert *et al.*, 2002). La Legislación Española exige ausencia de *Salmonella* en 25 g de producto (Orden 21/6/77, B.O.E. 11 y 12/7/77), pero son raros los casos de salmonelosis por ingestión de embutidos fermentados.

Schillinger y Lücke (1988) afirman que la disminución rápida del pH a niveles inferiores a 5,3 durante la fermentación es suficiente para inhibir el crecimiento de *Salmonella*. Durante el secado, las enterobacterias, incluyendo *Salmonella*, se inactivan lentamente (Kleemann y Bergann, 1996). La inhibición de *Salmonella* durante la maduración de embutidos depende en gran medida del tipo de producto. En embutidos ahumados de tipo europeo se da una reducción de uno a dos ciclos logarítmicos (Holley *et al.*, 1988), pero la reducción puede oscilar desde menos de un ciclo logarítmico hasta aproximadamente 4 ciclos logarítmicos. *Salmonella* se da con mayor frecuencia en embutidos frescos o poco fermentados que en embutidos secos más ácidos (Lücke *et al.*, 1998).

El departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha descrito en dos ocasiones presencia de *Salmonella* en dos tipos de embutidos fermentados (lebanon bologna y cervelat, 1995 y 1997). La incidencia de *Salmonella* en 110 muestras procedentes de 40 fábricas de los

Estados Unidos se estimó en un 12 a 29% (Johnston *et al.*, 1982). En España no existen datos sobre la incidencia de *Salmonella* en la mezcla inicial de carne fresca preparada para embutir, pero en un estudio realizado en Inglaterra (Wall *et al.*, 1994) se identificaron de 2 -11% muestras con presencia de *Salmonella* en 25 g. Sin embargo, hasta el momento sólo se han descrito tres casos de salmonelosis debido a embutidos fermentados. El primero tubo lugar en Australia y el embutido implicado fue salami. Según Leistner *et al.* (1982) el productor había combinado una dosis de nitrito muy baja (común en los embutidos de tipo italiano) con una temperatura de fermentación superior a 25°C. El segundo caso, un pequeño brote que tubo lugar en Holanda, fue debido al consumo de lebanon bologna (van Netten, 1986). Recientemente se ha descrito un brote de salmonelosis en Alemania debido al consumo de embutidos fermentados. En la elaboración de estos embutidos se empleó un corto período de fermentación (tan sólo 4 días) que permitió el desarrollo de *Salmonella* (Bremer, 2004).

Además de *Salmonella*, otra enterobacteria que tiene gran importancia en embutidos debido a su elevada patogenicidad: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). A diferencia de *Salmonella*, la dosis infectiva de EHEC es generalmente baja y no es necesario que se multiplique en el embutido para causar una infección. Además, la inactivación durante la maduración del embutido es lenta (aproximadamente un ciclo logarítmico en los experimentos de Glass *et al.*, 1992). Afortunadamente la prevalencia de EHEC es baja y limitada a carne de cordero y vaca (Bülte *et al.*, 1996). La legislación española establece un máximo de 10² ufc de *E. coli* en los embutidos crudos curados (O. 21/6/77, B.O.E. 11 y 12/7/77).

1.6.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se encuentra frecuentemente en la carne fresca y en embutidos fermentados, pero generalmente en niveles bastante bajos (Lücke *et al.*, 1998). *S. aureus* es un importante patógeno ya que combina la producción de toxinas con una importante capacidad invasiva y la resistencia a antibióticos. No tan sólo está relacionado con intoxicaciones alimentarias sino que también es un patógeno nosocomial muy común y está relacionado con enfermedades de adquisición comunitaria. El dramático incremento de la prevalencia de *S. aureus* resistentes a antibióticos, sobretodo a meticilina, en todo el mundo (Jacoby, 1996; Witte, 1999) se ha convertido en un importante problema clínico, dado que las cepas multi-resistentes disminuyen la utilidad de los antibióticos en la medicina humana y limitan las opciones terapéuticas (Ehlert, 1999).

S. aureus presenta una gran variedad de enzimas y toxinas que contribuyen a su patogenicidad y un grupo de toxinas, las enterotoxinas, causan intoxicaciones alimentarias (Balaban y Rasooly, 2000). Aún cuando son necesarios recuentos superiores a 10⁷ ufc/g de *S. aureus* para generar niveles de enterotoxinas suficientes para causar una intoxicación, la legislación española exige recuentos de *S. aureus* inferiores a 100 ufc/g (Orden 21/6/77, B.O.E. 11 y 12/7/77).

El desarrollo de *S. aureus* ha sido estudiado durante la maduración de diversos tipos de embutidos. Este microorganismo se ve poco afectado por el contenido en sal y nitrito del embutido, pero en condiciones anaerobias y a temperatura y pH bajos se dificulta

considerablemente su crecimiento. Puede crecer a temperaturas de fermentación elevadas durante la fase estacionaria del desarrollo de las BAL pudiendo alcanzar niveles elevados en las capas externas de los embutidos. Metaxopoulos *et al.* (1981a y b) demostró que el pH inicial y la actividad de las BAL son parámetros críticos para el control de *S. aureus*. En los embutidos fermentados a no más de 25°C durante 2-3 días, con recuentos de *S. aureus* inferiores a 10^4 , el riesgo de producción de enterotoxinas es bajo (Holley *et al.*, 1988a), incluso en embutidos no ahumados (Metaxopoulos *et al.*, 1981a y b; Holley *et al.*, 1988b). Si la fermentación se realiza a 23°C, la reducción del pH a 5,3 en 2-3 días es un punto crítico para estos productos. Esto normalmente se consigue añadiendo lactobacilos o *Pediococcus pentosaceus* como cultivo iniciador junto a un 0,3% de carbohidratos de fermentación rápida. También es muy importante ajustar la a_w inicial por debajo de 0,955 y realizar la maduración a temperaturas inferiores a 15°C hasta que la a_w haya descendido a valores inferiores a 0,90. A temperaturas de fermentación de 15°C, no se ha observado crecimiento de *S. aureus*, independientemente de la formación de ácido (Lücke *et al.*, 1998).

1.6.3. *Listeria monocytogenes*

Durante los últimos años *Listeria monocytogenes* se ha establecido como un importante patógeno alimentario. Aunque existen otras vías de transmisión, los alimentos son la fuente más importante de listeriosis. La elevada prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos unido al elevado porcentaje de casos fatales de listeriosis sugiere que este microorganismo representa un importante peligro para la salud humana, especialmente para los grupos de alto riesgo como inmunodeprimidos, personas de la tercera edad y mujeres embarazadas (Anónimo, 1999a).

Una gran variedad de carnes y productos cárnicos, incluyendo embutidos fermentados, están contaminados con *Listeria* spp. Dado su amplia distribución en carne y su habilidad para crecer a baja temperatura y a relativamente baja a_w ($>0,93$), *L. monocytogenes* podría representar un peligro para los consumidores de embutidos fermentados. Sin embargo, no existe ninguna evidencia epidemiológica de brotes de listeriosis causados por el consumo de embutidos fermentados. Durante la fermentación y secado de los embutidos, *L. monocytogenes* que es ubicuota, psicrótrofa y relativamente resistente a los agentes curantes, puede sobrevivir (Johnson *et al.*, 1988; Junntila *et al.*, 1989) aunque los niveles en producto final suelen ser bajos (<10 a 100 cfu/g). La condiciones de control de *Salmonella* y *S. aureus* suelen ser efectivas también para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Lücke *et al.*, 1998). Durante la maduración, *Listeria* spp. muere, pero sólo lentamente. El uso de lactobacilos formadores de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* como cultivos iniciadores reduce los recuentos de *Listeria* aproximadamente un Log al inicio de la fermentación (Foegeding *et al.*, 1992; Hugas *et al.*, 1995).

1.6.4. Bacterias formadoras de esporas

Los embutidos fermentados pueden contener un elevado número de esporas de *Bacillus* spp. provenientes en su mayor parte de las especias adicionadas. Aunque muchas especies de *Bacillus* son responsables de síntomas de deterioro, como por ejemplo proteólisis, parece que

las condiciones de baja a_w , bajo pH y ausencia de oxígeno son suficientes para controlar sus efectos en los embutidos fermentados (Lücke *et al.*, 1998).

Los clostridios, entre ellos *Clostridium botulinum*, pueden controlarse manteniendo un pH y a_w bajos, independientemente de la adición de nitrito. No existe evidencia práctica ni epidemiológica del crecimiento y producción de toxinas de los clostridios durante la maduración y almacenamiento de embutidos fermentados. La toxina botulínica ha sido detectada sólo si el embutido se elaboraba sin glucosa adicionada y se mantenía a elevadas temperaturas (32.2°C) durante largo tiempo (Christiansen *et al.*, 1975).

La legislación española establece un máximo para clostridios sulfito-reductores de 10^2 ufc/g (O. 21/6/77, B.O.E. 11 y 12/7/77).

1.6.5. Mohos y micotoxinas

Los mohos colonizan la superficie de aquellos embutidos no ahumados y secados al aire. También pueden crecer en embutidos ahumados almacenados en condiciones de humedad y temperatura elevada. En los embutidos fermentados con mohos, *Penicillium* spp. predomina y las especies aisladas con mayor frecuencia son *P. verrucosum*, *P. chrysogenum*, *P. frequentans*, *P. nalgiovense* y *P. variable*. *Aspergillus* spp. puede competir con *Penicillium* spp. pero sólo en temperaturas de almacenamiento elevadas y baja a_w (Lücke, 1998).

Las aflatoxinas y otras toxinas de *Aspergillus* se han detectado sólo en embutidos madurados a elevadas temperaturas y humedades relativas altas, condiciones que no suelen prevalecer en la práctica comercial (Álvarez-Barrea *et al.*, 1982). Normalmente, la maduración y secado de los embutidos fermentados se realiza a temperaturas de 15°C o inferiores, de forma que *Aspergillus* spp. es desplazado por *Penicillium* spp. y *Scopulariopsis* spp. (Incze *et al.*, 1976). En cuanto a las toxinas de *Penicillium*, pequeñas cantidades de citreoviridina y rugulosina pueden formarse en la capa más externa del embutido (Scheuer, 1995). Aunque los niveles que se han detectado en embutidos inoculados experimentalmente han sido pequeños y limitados a no más de unos pocos milímetros bajo la superficie, el crecimiento de mohos no deseables en embutidos fermentados debe ser evitado, no sólo para evitar el riesgo de micotoxinas y formación de antibióticos, sino también para evitar defectos en la apariencia y las características organolépticas. En los embutidos madurados con mohos, el crecimiento de mohos no deseados puede ser inhibido inoculando la superficie con una cepa no tóxica apropiada. En otros embutidos fermentados, el crecimiento de mohos se inhibe por otros métodos, como por ejemplo, sumergiendo los embutidos en soluciones de sorbato potásico o primaricina al final del período de fermentación (Lücke *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso de primaricina para la preservación de los embutidos fermentados está prohibido en muchos países dado que este antimicrobiano se usa también en quimioterapia humana.

1.6.6. Virus y parásitos

Los virus presentes en el ganado en el momento del sacrificio normalmente no afectan a los humanos. La mayoría de estos virus (virus de la enfermedad de pies y boca, fiebre aftosa) son sensibles a los ácidos y normalmente se inactivan durante la fermentación de los embutidos

(McKercher *et al.*, 1982; Panina *et al.*, 1989). Los agentes causantes de la fiebre porcina africana, de la enfermedad vesicular porcina y cólera porcino se inactivan muy lentamente durante la maduración de los embutidos y pueden llegar a detectarse incluso transcurridos tres meses (McKercher *et al.*, 1982). Por lo tanto, la carne y los embutidos fermentados de zonas donde prevalecen dichas enfermedades no deben ser exportadas. No obstante, no hay evidencias epidemiológicas que demuestren que los embutidos fermentados sean un vector de transmisión de agentes virales.

Toxoplasma es uno de los parásitos que regularmente se encuentra en cerdo (Lücke, 1998). Afortunadamente, los cistos de Toxoplasma se inactivan rápidamente durante la manufactura de los embutidos.

El nematodo *Trichinella spiralis* es un parásito de humanos y cerdos, por lo que el consumo de productos crudos de carne de cerdo puede acarrear un serio riesgo si no se toman las medidas adecuadas. La inspección rutinaria del diafragma de las canales de cerdo parece ser bastante efectivo para la protección del consumidor. Además, las larvas de *Trichinella* se destruyen a baja a_w , que puede obtenerse mediante procesos de congelación, salazón o desecación. Un embutido fermentado con a_w inferiores a 0,90 muy difícilmente contendrá larvas de *Trichinella* (Lücke *et al.*, 1998).

1.6.7. Aminas biógenas y nitrosaminas

Los alimentos fermentados pueden contener cantidades considerables de aminas biógenas que, no sólo pueden ser precursoras de nitrosaminas, sino que también pueden causar trastornos como la intoxicación histamínica (intoxicación escombroida), crisis hipertensivas debido a la interacción entre alimentos y medicamentos IMAO y migrañas de origen alimentario en individuos sensibles (Brink *et al.*, 1990; Bardócz, 1995; Mariné-Font *et al.*, 1995).

En los embutidos fermentados, el pH ácido que se da durante la fermentación parece estimular la síntesis y actividad aminoácido descarboxilasa, tanto de la microbiota responsable de la fermentación, como de los microorganismos contaminantes presentes en las materias primas (Halász *et al.*, 1994; Majjala *et al.* 1995). Se han descrito valores medios de aproximadamente 100 mg de histamina/Kg de peso seco y valores máximos de 300 mg de histamina/Kg de peso seco en este tipo de embutidos (Vandekerkhove, 1977; Wortberg y Woller, 1982; Sheuer y Rödel, 1995; Eerola *et al.*, 1998). Los diferentes estudios sobre aminas biógenas en productos cárnicos crudos curados fermentados indican que, en general, la tiramina es la amina que primero alcanza mayores concentraciones (hasta un máximo de 1000 mg/Kg de peso seco) al finalizar la fermentación/maduración del producto. Le siguen, en tiempo y cantidad, las diaminas putrescina y/o cadaverina. Los contenidos de histamina y demás aminas aromáticas suelen ser bastante bajos, aunque determinados productos pueden presentar contenidos de estas aminas incluso superiores a los de tiramina. Los niveles descritos de aminas biógenas raramente provocan intoxicación escombroida o síntomas de migraña (Lüthy y Schlatter, 1983) pero dado que se han descrito embutidos fermentados de alta calidad con valores de aminas biógenas extremadamente bajos, parece plausible establecer medidas de control que permitan evitar la acumulación de aminas durante la elaboración de estos

productos. El uso de materias primas de alta calidad, cultivos iniciadores apropiados, formulaciones y condiciones de maduración apropiadas, la formación de aminas biógenas puede ser minimizada. Dado que algunas cepas de BAL y CGC+ son capaces de descarboxilar ciertos aminoácidos (Bover-Cid *et al.*, 2000) es necesario analizar la actividad aminoácido-decarboxilasa de las cepas seleccionadas como cultivos iniciadores previo a su utilización.

Las nitrosaminas son compuestos estables que se forman bajo ciertas condiciones por la interacción del nitrito con aminas secundarias (Scanlan, 1995). Las nitrosaminas volátiles han sido las más estudiadas, y entre éstas la N-nitrosodimetilamina, N-nitrosopirrolidina y N-nitrosopiperidina se encuentran con relativa frecuencia en distintos alimentos: productos cárnicos, conservados en salazón y nitritos o ahumados, pescado ahumado, algunos quesos, especias y bebidas alcohólicas (Tricker y Preussman, 1991; Scanlan, 1995). Aunque se ha demostrado que las nitrosaminas son cancerígenas en animales de laboratorio, en realidad no se conoce con exactitud la concentración de nitrosaminas que en humanos puede provocar efectos mutágenos (Scanlan, 1995).

Las aminas biógenas presentes en los alimentos se han descrito en numerosas ocasiones como potenciales precursores de nitrosaminas, especialmente las poliaminas y las diaminas (Warthesen *et al.*, 1975; Scanlan, 1995). Para la formación de nitrosaminas en alimentos a partir de aminas biógenas se requiere la coincidencia de ciertas condiciones especiales: la presencia de agentes nitrosantes (nitritos, nitratos y/o óxido de nitrógeno), valores de pH relativamente ácidos y, en algunos casos, también son necesarias temperaturas elevadas (Scanlan, 1995). Durante el procesado de los embutidos fermentados pueden darse las condiciones necesarias para la formación de nitrosaminas, puesto que para su elaboración se utilizan sales curantes (nitratos y nitritos) que pueden reaccionar con las aminas biógenas.

Las concentraciones de nitrosaminas en productos cárnicos suelen ser bajas (excepto en *bacon*) y en muchos casos incluso no detectables (Scanlan, 1995; Eerola *et al.*, 1997). Para prevenir la formación de nitrosaminas se ha planteado la posibilidad de reducir los niveles de nitritos adicionados y la exclusión de nitratos como agentes curantes, aunque cierta cantidad de estos compuestos es necesaria, no sólo por su efecto antimicrobiano, sino también para el desarrollo del color típico de los productos curados. Actualmente, el contenido en nitrato de los embutidos crudos-curados raramente supera los 100 mg KNO₃/Kg (Lücke *et al.*, 1998). Igualmente, la adición de ascorbato parece inhibir las reacciones de nitrosación, con lo que ayuda a prevenir la formación de nitrosaminas (Scanlan, 1995).

1.7. NUEVAS TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS

La seguridad alimentaria en carne y productos cárnicos está bajo escrutinio por la opinión pública debido, sobretodo, a las recientes crisis alimentarias (Encefalopatía espongiforme bovina, dioxinas, etc.). Los sistemas de aseguramiento de la calidad vigentes (APPCC) no aseguran suficientemente una ausencia de riesgos microbiológicos en los productos listos para el consumo, y de hecho, se han dado casos de intoxicaciones alimentarias en productos cárnicos de empresas con una excelente planificación y cumplimiento de los sistemas APPCC (Anónimo, 1999b).

Las demandas de los consumidores de alimentos con menos conservantes y el desarrollo de nuevos sistemas alimentarios para satisfacer estas demandas, hacen necesario la aplicación de nuevas barreras u obstáculos para evitar el crecimiento de patógenos. La combinación de las técnicas tradicionales (temperatura, a_w , etc.) y las nuevas técnicas de conservación podría establecer una serie de barreras más efectivas contra los microorganismos alterantes y patógenos sin afectar a la microbiota no alterante.

Entre las nuevas tecnologías disponibles, las de mayor proyección en la industria alimentaria son: el tratamiento por alta presión hidrostática (HHP), la descompresión instantánea controlada, los campos magnéticos oscilantes (calentamiento óhmico, calentamiento dieléctrico, microondas), la luz pulsada y la irradiación.

Actualmente, la irradiación con haz de electrones acelerados y sobretodo la HHP, son las técnicas que ofrecen posibilidades reales para su uso en carne y productos cárnicos.

1.7.1. HHP como método de higienización de embutidos fermentados

Desde que en 1992 se comercializara el primer alimento tratado por HHP en Japón, esta nueva técnica de conservación ha adquirido una relevancia especial. En España actualmente, existe una empresa de productos cárnicos (Esteban Espuña, S.A.) que dispone desde hace varios años de un piloto de altas presiones con el que están comercializando distintos grupos cárnicos. Además, la empresa Hyperbaric del grupo Nicolás Correa comercializa un piloto industrial para la industria cárnica del que han vendido varias unidades a otras empresas españolas.

Actualmente los tratamientos comerciales más interesantes a nivel higiénico-sanitario y coste comprenden una combinación de presiones entre 400-600 MPa, a temperaturas entre 5-90°C durante 10-30 minutos (Mozhaev *et al.*, 1994). La inversión inicial del equipo es elevada, no obstante el coste del tratamiento es razonable (0,1 € por kg) ya que los cambios de presión son prácticamente instantáneos, uniformes y sin pérdidas de energía.

La mayor ventaja de la HHP radica en que a tratamientos a temperaturas inferiores a 50°C, la inactivación microbiana puede ser realizada con o sin cambios en el color y el flavor del alimento; aunque en la práctica esto depende de las condiciones tecnológicas y del tipo de

alimento. La carne fresca puede ver alterado su color y oxidarse más rápidamente cuando se trata por HHP a 400 MPa, mientras que el jamón cocido mantiene el color y la textura (Carlez *et al.*, 1995; Schöberl *et al.*, 1997; Garriga *et al.*, 2003).

Diversos autores han demostrado que el nivel de inactivación bacteriana depende de varios factores como el tipo de microorganismo, la fase de crecimiento del mismo, el nivel de presión, la temperatura, el tiempo de proceso, el pH y la composición del alimento o la dispersión del medio, así como la presencia de sustancias antimicrobianas (Kalchayanand *et al.*, 1998). Las bacterias gram-negativas y las células en fase exponencial son, respectivamente, más sensibles que las bacterias gram-positivas y las células en fase estacionaria (Hoover *et al.*, 1989). Las células microbianas que sobreviven a la presurización pueden estar dañadas de forma sub-letal en su pared y membrana celular.

La resistencia de los microorganismos a la presión es generalmente mayor en alimentos que en soluciones tamponadas, y aumenta cuando disminuye la actividad de agua. Diversos estudios han mostrado la sensibilidad a la presión. Diferentes estudios han mostrado la sensibilidad a la presión de varios microorganismos presentes de forma natural o inoculados en carne fresca. Carlez *et al.* (1994) procesó carne fresca picada a 200-300 MPa retrasando el crecimiento microbiano de 2 a 6 días durante el posterior almacenamiento de la carne a 3°C (en aire o al vacío). El procesado a 400 y 500 MPa inactivó completamente los microorganismos ensayados (*Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp. y coliformes), y redujo la flora total que se de 3 a 5 log ufc/g. Sin embargo, después de un período de latencia que dependió de la intensidad de la presión, se detectaron células de *Pseudomonas* spp. que pudieron recuperar su viabilidad.

El procesado con altas presiones frecuentemente combinado con otros procesos como el pre-ensado en vacío, podría ser aplicado de manera útil a un amplio tipo de carnes y productos cárnicos, incluyendo productos curados.

2. IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

El análisis microbiológico de alimentos es necesario para asegurar tanto la seguridad como la calidad de los alimentos. Los métodos microbiológicos convencionales están basados en medios de cultivo específicos para aislar y enumerar las células bacterianas viables. Estos métodos son sensibles, de bajo coste y proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre el número y naturaleza de los microorganismos presentes en las muestras de alimentos. Sin embargo, los métodos convencionales requieren varios días para la obtención de resultados ya que se basan en la habilidad de los microorganismos de multiplicarse y formar colonias visibles. Además, la preparación del medio de cultivo, la inoculación de las placas, el recuento de las colonias y la caracterización bioquímica hacen de estos métodos técnicas muy laboriosas. La industria alimentaria requiere de métodos rápidos para obtener la información adecuada sobre la posible presencia de patógenos en las materias primas y en el producto final, para el control del proceso de elaboración y para la monitorización de las prácticas de higiene y limpieza.

Los métodos rápidos constituyen un área en constante evolución dentro del campo de la microbiología aplicada. Estos métodos tratan de conseguir la detección y el recuento de microorganismos en un corto periodo de tiempo, la caracterización de los aislados mediante el uso de técnicas microbiológicas, químicas, bioquímicas, biofísicas, de biología molecular, inmunológicas y serológicas (Fung, 1995). Los métodos rápidos alternativos pueden dividirse en las siguientes categorías (De Boer y Beumer, 1999):

- métodos convencionales modificados y automatizados;
- bioluminiscencia;
- métodos de recuento de células;
- impedimetría;
- métodos inmunológicos;
- técnicas de ácidos nucleicos.

En la Tabla 5 se detallan las principales características de diferentes métodos rápidos.

Método	Límite de detección (cfu/ml o g)	Tiempo ^a	Especificidad ^b
Técnicas de plaqueo	1	1-3 días	Buena
Bioluminiscencia	10 ⁴	30 minutos	No
Citometría de flujo	10 ² -10 ³	30 minutos	Buena
DEFT ^c	10 ³ -10 ⁴	30 minutos	No
Impedimetría	1	6-24 h	Moderada/Buena
Métodos inmunológicos	10 ⁵	1-2 h ^d	Moderada/Buena
Técnicas de ácidos nucleicos	10 ³	6-12 h ^d	Excelente

Tabla 5. Características de algunos métodos rápidos. ^a Tiempo necesario para la obtención de los resultados. ^b Posibilidad de detectar grupos específicos de microorganismos. ^c Técnica de filtro de epifluorescencia directa. ^d Tras una etapa de enriquecimiento. Adaptado de de Boer y Beumer, 1999.

Entre todos estos métodos unos de los que han tenido mayor auge son las técnicas de ácidos nucleicos. En los últimos años, la garantía de la calidad en la industria alimentaria ha supuesto la aceptación e implementación de una gran variedad de métodos moleculares para conseguir una detección rápida y sensible de microorganismos, especialmente de los microorganismos patógenos con más incidencia en alimentos.

2.1. TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

En la década pasada se observó un incremento significativo en el desarrollo de métodos moleculares para la detección y caracterización de microorganismos en alimentos. Estos métodos se basan en la hibridación de un ADN diana con una sonda de ADN específica. Dependiendo de la especificidad deseada en la detección (de género, de especie o de cepa), pueden utilizarse como diana diferentes regiones del genoma (Scheu *et al.*, 1998).

La reciente secuenciación de un número importante de genomas bacterianos y el desarrollo de las técnicas analíticas tendrán un gran impacto en nuestra habilidad para comprender, manipular, detectar, explotar o combatir las bacterias (Pennisi, 1999). El incremento exponencial de las bases de datos de secuencias de ADN permite el diseño de mejores sondas y el perfeccionamiento de los métodos de detección y cuantificación (Olsen *et al.*, 1995).

2.1.1. Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación de ácidos nucleicos tiene lugar entre una molécula de ADN o ARN presente en el organismo diana y una sonda de ADN que presenta la secuencia complementaria a la secuencia diana. La sonda de ADN normalmente consta de 18 a 30 nucleótidos. La especificidad de un ensayo de hibridación depende de la secuencia nucleotídica de la sonda. El primer paso en este método molecular es la lisis celular y frecuentemente también la purificación de los ácidos nucleicos para que puedan hibridarse con la sonda de ADN. Una vez se ha formado el híbrido, pueden utilizarse diferentes técnicas de detección. La mayoría de estas técnicas son similares a las que se utilizan para la detección de antígeno-anticuerpo en los inmunoensayos. La hibridación directa utiliza sondas de ADN marcadas para la hibridación con el ácido nucleico contenido en la muestra. Las sondas para hibridación directa suelen estar marcadas radiactivamente o con moléculas fluorescentes.

Las sondas que no se hibridan con el ADN diana se eliminan fácilmente por inmovilización del ADN o de la sonda, previamente a la hibridación. Para ello se utilizan como soportes sólidos membranas de nylon o de nitrocelulosa y partículas de polímeros. Entre éstas técnicas destacan la técnica de transferencia Southern (más comúnmente conocida como *Southern blot*) y la técnica de *dot blot*, en las que el ácido nucleico diana se inmoviliza en una membrana tras su separación en un gel de electroforesis (*Southern blot*) o de una solución (*dot blot*) (Barbour and Tice, 1997). La hibridación indirecta ofrece una mayor sensibilidad, mediante la inmovilización de las sondas y la unión posterior del ácido nucleico diana a la fase sólida, seguido de la hibridación de una sonda reportera (*reporter*) a una secuencia adyacente en la misma molécula de ADN diana. Tras un paso de lavado para eliminar la sonda no unida a la diana se procede a la detección del *reporter* que suele ser colorimétrica o mediante quimioluminiscencia.

Se han comercializado ensayos de hibridación para algunos patógenos de alimentos. El sistema Gene-Trak utiliza sondas específicas para ARN ribosómico diana en las bacterias y un sistema colorimétrico para la detección específica de los híbridos sonda-diana. En este sistema es necesaria una fase de enriquecimiento previo para obtener la sensibilidad analítica requerida.

Una de las principales desventajas de los métodos de hibridación es que es necesario un número relativamente alto (generalmente 10^4 - 10^5) de células diana para obtener resultados fiables en un medio con un elevado número de microorganismos no diana (Wernars y Notermans, 1990). La hibridación con colonias bacterianas en placas de agar se usa con frecuencia en microbiología de los alimentos y existen métodos para la detección de patógenos en alimentos basados en la hibridación en colonia (Moseley *et al.*, 1980; Hill *et al.*, 1983; Datta *et al.*, 1987).

2.1.2. Métodos de amplificación: PCR

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos presentan una sensibilidad muy superior a las técnicas de hibridación. Aunque existen varios métodos de amplificación, como por ejemplo la reacción en cadena de la Ligasa (LCR), el de mayor aplicación en el análisis microbiológico de alimentos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A finales de los años 1980, la PCR fue presentada como una prometedora técnica para la amplificación enzimática de secuencias diana de ácidos nucleicos utilizando una pareja de cebadores específicos y una DNA polimerasa termoestable (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). La PCR se consideró como una técnica extremadamente sensible, teóricamente capaz de realizar sucesivas amplificaciones a partir de una sola copia inicial de ADN diana. En los años 1990 se describieron los primeros métodos para la detección de microorganismos patógenos en alimentos mediante la PCR (Border *et al.*, 1990; Besessen *et al.* 1990).

La amplificación de ARN se ha conseguido con el desarrollo de técnicas como la PCR de transcripción inversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*; Compton, 1991), la replicación de secuencia autosostenida (*self-sustained sequence replication*, 3SR; Guatelli *et al.*, 1990) y el sistema de amplificación de la transcripción (*Transcription-based amplification system* TAS, Kwoh *et al.*, 1989). Estas técnicas están basadas en la conversión inicial del ARN a ADN copia (ADNc) mediante la transcriptasa inversa. En el caso de la RT-PCR, el ADNc se amplifica mediante una PCR estándar, mientras que en las otras técnicas la amplificación se realiza una transcripción *in vitro* del ADNc mediante una ARN polimerasa. En el NASBA y en la 3SR, se utiliza la ribonucleasa H para la degradación del ARN del dúplex ARN: ADN; en el TAS, el dúplex se desnaturaliza por acción del calor. El promotor para la ARN polimerasa se liga a uno (NASBA) o ambos (3SR) cebadores de la reacción (Rijpens y Herman, 2002).

Las técnicas más utilizadas para la amplificación del ADN y el ARN son la PCR y la RT-PCR respectivamente. Dependiendo de las circunstancias específicas (región del gen, sistema de detección, muestra de alimento), los límites de detección conseguidos por la mayoría de sistemas de PCR se encuentran entre las 10 y 10⁴ ufc/g (Scheu *et al.*, 1998).

La comparación de los métodos de PCR con los métodos tradicionales de cultivo en la detección de microorganismos patógenos en alimentos indica que la PCR es una técnica de mayor sensibilidad (Allman *et al.*, 1995). Esto puede ser debido a que células no viables que no son cultivables si pueden ser, en cambio, detectadas mediante técnicas de ácidos nucleicos (Pedersen y Jacobsen, 1993). La diferenciación entre células cultivables y no cultivables, pero aún viables, puede realizarse mediante un enriquecimiento previo. En el caso de microorganismos no cultivables, la viabilidad puede ser probada mediante aislamiento de ARN seguido de RT-PCR (Bej *et al.*, 1991; de Wit *et al.*, 1991).

2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

2.1.2.1.1. Concepto y etapas

La PCR es un procedimiento para la amplificación de secuencias de ADN específicas basado en el mecanismo de replicación del ADN celular. Desde su aparición se ha aplicado en biología molecular, en diagnósticos médicos y en la detección de patógenos en alimentos (Jones y Bej, 1994; Rijpens y Herman, 2002), pero su interés como método de análisis de microorganismos responsables del deterioro de alimentos y de microorganismos que intervienen

en los procesos de fermentación en biotecnología alimentaria es muy reciente (Scheu *et al.*, 1998).

La PCR se basa en la reiteración cíclica de tres etapas (Figura 4):

1. Desnaturalización del ADN

Durante la desnaturalización la doble cadena de ADN se abre y se separa en dos cadenas sencillas. Todas las reacciones enzimáticas se inhiben (por ejemplo, la fase de extensión de un ciclo previo). La desnaturalización se consigue aplicando temperaturas superiores a 90°C, habitualmente 95°C (Innis y Gelfand, 1990).

2. Unión específicas de los cebadores

Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos que presentan movimiento browniano. Continuamente se forman y se rompen puentes de hidrógeno entre la cadena sencilla del ADN y el oligonucleótido. La unión se produce por complementariedad de bases; cuando el cebador se hibrida con la secuencia complementaria, se forman puentes de hidrógeno más estables y en esta pequeña porción de ADN de cadena doble se une la polimerasa, que comienza a copiar la cadena de ADN. Se necesitan un mínimo de dos cebadores que, unidos cada uno a una cadena diferente, delimitaran la secuencia que se desea amplificar. La temperatura a la que se realiza la unión (T_A) es crítica para controlar la especificidad de la reacción y depende exclusivamente de la composición de bases, tamaño y concentración de los cebadores (Innis y Gelfand, 1990).

3. Extensión

La ADN-polimerasa es una enzima que reconoce la unión de cebadores a las cadenas de ADN de la muestra. Cuando el cebador se une a la secuencia complementaria, se establece una fuerza de atracción entre éste y el ADN debida a los puentes de hidrógeno que se forman y que superan a las fuerzas que se oponen a la atracción. Cuando los cebadores se sitúan en posiciones no complementarias, no se establecen los suficientes puentes de hidrógeno como para superar la alta temperatura a la que tiene lugar esta etapa (68-72°C), por lo que no se da la extensión del fragmento (Rodríguez, 1996).

Las bases complementarias a la secuencia de ADN de la muestra son acopladas al extremo 3' del cebador; la polimerasa lee la cadena de ADN de la muestra en dirección 3'-5' y dispone los desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) en la cadena molde de ADN en dirección 5'-3'.

La polimerasa que lleva a término la extensión debe ser termoestable y no inactivarse durante la desnaturalización. Se utiliza la Taq polimerasa, enzima procedente de *Thermus aquaticus*, microorganismo que habita en aguas termales y géiseres y que por tanto dispone de una ADN-polimerasa que resiste temperaturas superiores a 90°C. La actividad de estas enzimas requiere la presencia de iones magnesio (Mg^{2+}); la concentración de este ión es un parámetro importante para la optimización de la PCR y suele estar comprendida entre 0,5 y 2,5 mM (Innis y Gelfand, 1990).

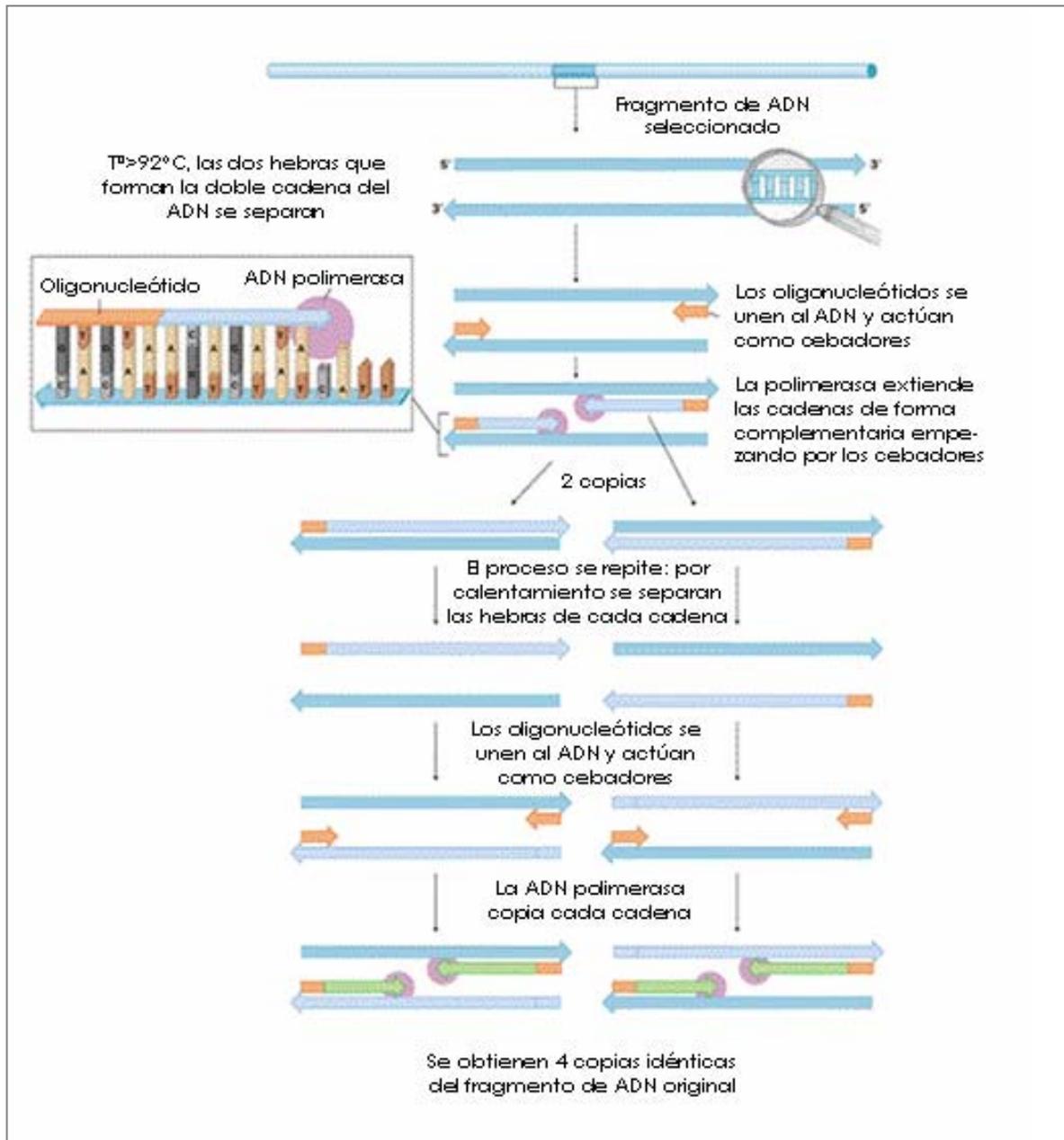


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia del ADN diana delimitada por la pareja de cebadores. Las nuevas copias generadas sirven como nuevos patrones en los ciclos posteriores, de forma que la cantidad de ADN generado se incrementa de forma exponencial. En la PCR se generan 2^n copias de la secuencia de ADN diana, siendo n el número de ciclos del proceso; una amplificación típica, de entre 20 y 40 ciclos, generará entre 1 millón y 1 billón de copias del fragmento de ADN diana que exista a la muestra original.

2.1.2.1.2. Diseño de cebadores

Un punto clave en la determinación de microorganismos por PCR es la disponibilidad de cebadores específicos. Hoy en día, gracias a los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos y al desarrollo de los equipos y reactivos para la síntesis rápida de oligonucleótidos, es posible conseguir cebadores específicos para los diferentes microorganismos.

En función de la especificidad deseada (de género, de especie o de cepa) se pueden utilizar diferentes regiones del genoma como dianas. La elección de la mejor diana para la identificación de taxones específicos depende de la heterogeneidad que existe dentro del taxón y la distancia filogenética de los otros taxones (Rijpens y Herman, 2002). Aunque las zonas altamente conservadas de los genes 16S y 23S ARN ribosomal (ARNr) se han utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas entre taxones bacterianos alejados, son las regiones más variables de estos genes las más útiles para la diferenciación de géneros y especies por lo que son muy utilizadas como dianas en PCR específicas de género y en ocasiones también de especie (Rijpens y Herman, 2002). Para el desarrollo de sondas específicas de especie para la detección de microorganismos muy próximos filogenéticamente se prefieren las regiones espaciadoras intergénicas 16S-23S ARNr, ya que las regiones no codificantes están bajo una presión selectiva mínima durante la evolución y por tanto presentan muchas más variación que los genes que tienen roles funcionales (Barry *et al.*, 1991). En los últimos años, la región espaciadora 16S-23S ARNr se ha utilizado con éxito como fuente de sondas de ADN específicas (Rijpens y Herman 2002). Para la identificación de BAL se han descrito sondas específicas a nivel de 16S y 23S ARNr (Hensieck *et al.*, 1992; Hertel *et al.*, 1993; Ehrmann *et al.*, 1994; Frahm *et al.*, 1998; Guarneri *et al.*, 2001) y de la región espaciadora 16S-23S ARNr (Tilsala-Timisjärvi y Alatosava, 1997; Berthier y Ehrlich, 1998). Estas mismas dianas se han utilizado en la detección por PCR específica a nivel de especie en CGC+ (Gory *et al.*, 1999; Forsman *et al.*, 1997).

Las dianas más comunes para la identificación de algunos microorganismos patógenos son genes que determinan la producción de toxinas, como la verotoxina en *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) (Willshaw *et al.*, 1985; Bülte, 1991), enterotoxina B en *Staphylococcus aureus* (Notermans *et al.*, 1985), hemolisina en *Listeria monocytogenes* (Datta *et al.*, 1988), neurotoxina tipo A en *Clostridium botulinum* (Fach *et al.*, 1993) y toxina colérica en *Vibrio cholerae* (Koch *et al.*, 1993).

De forma alternativa, se pueden utilizar como diana para PCR fragmentos de ADN desconocidos, escogidos al azar (Fitts *et al.*, 1983; Gopo *et al.*, 1988; Scholl *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1991). Estos fragmentos pueden formar parte de un gen de vital importancia o de una secuencia de ADN sin función esencial. Sin embargo, no se tienen datos sobre su estabilidad y variabilidad genética.

No todos los cebadores descritos en la bibliografía internacional se han validado adecuadamente para determinar su especificidad. Muchos de ellos deberían probarse sobre un panel adecuado de las bacterias más relevantes antes de su uso rutinario en laboratorios (ISO Validación métodos alternativos). No obstante, un sistema de PCR específico adecuadamente

evaluado puede ser una valiosa herramienta de identificación, especialmente en bacterias atípicas fenotípicamente (Rijpens y Herman, 2002).

2.1.2.2. Límites de la PCR

2.1.2.2.1. Diferenciación entre microorganismos viables y no viables

Los productos de amplificación que se obtiene en la PCR sólo demuestran que la secuencia diana delimitada por los cebadores escogidos está presente en la muestra original. Pero esto no implica que los microorganismos detectados estén vivos. Mientras que el ADN de la muestra esté intacto puede ser amplificado mediante la PCR; por tanto, los ácidos nucleicos de microorganismos muertos pueden dar falsos positivos si lo que se desea es detectar la presencia de microorganismos viables (Scheu *et al.*, 1998).

La presencia de ARN intacto como signo de metabolismo activo puede ser un indicador de la viabilidad de los microorganismos. Se puede utilizar ARN ribosómico (ARNr) o como diana de la RT-PCR ya que la degradación celular va acompañada de la desaparición de los ribosomas (Silva *et al.*, 1987) y por tanto la detección de una diana de este tipo es indicativo de viabilidad. Sin embargo, estudios recientes (Nogva *et al.*, 2000) indican que la utilización de ARN debe cumplir ciertas premisas: el gen diana debe expresarse continuamente, el producto de la transcripción debe ser relativamente inestable y, finalmente, se debe identificar una región específica en el gen diana. Por tanto, cuando sea posible, es preferible el uso de ADN como diana, ya que, además, la degradación del ADN de células muertas en alimentos parece ser rápida (Nogva *et al.*, 2000).

Una forma de prevenir la detección de microorganismos no viables es realizar un paso de propagación previo a la PCR. De esta forma es posible, no sólo incrementar la sensibilidad del método, sino que también limita la detección a las células cultivables (Josephson *et al.*, 1993).

2.1.2.2.2. Inhibición de la PCR

Uno de los problemas más importante del uso de técnicas de PCR en matrices alimentarias es la inhibición de la reacción que puede concluir en resultados falsos negativos motivados por varias razones:

- Presencia de sustancias quelantes de los iones Mg^{2+} necesarios para la PCR.
- Degradación de las dianas de ácidos nucleicos y/o cebadores por acción de nucleasas (DNasa, RNasa).
- Inhibición de la ADN-polimerasa.

Debido a esto, es necesario monitorizar el ensayo de PCR para verificar su fiabilidad. Para este propósito se incluyen controles positivos de amplificación, en la misma reacción (control interno) o en una reacción por separado (control externo). El control interno consiste en ADN exógeno que se añade a cada reacción de PCR y que también es reconocido por los cebadores, de manera que se amplifica de forma simultánea al ADN diana de la muestra (Ulrich *et al.*,

1993; Kolk *et al.*, 1994). La inhibición de la reacción puede detectarse si no se produce señal de amplificación a partir del ADN de control (o si esta señal es muy débil).

Sustancias inhibidoras de la PCR

Se ha demostrado que muchas sustancias pueden inhibir de forma directa la actividad de la ADN-polimerasa (Demeke y Adams, 1992; Ahokas y Erkkila, 1993; Katcher y Schwartz, 1994; Wiedbrauk *et al.*, 1995). Rossen *et al.* (1992) investigaron la influencia de diferentes alimentos homogeneizados (jamón cocido, salami, ensalada de pollo, diferentes tipos de queso) demostrando que el grado de inhibición depende en gran medida del tipo de alimento. Hay estudios que demuestran que determinados componentes del alimento como aceite, sal, carbohidratos y aminoácidos, no tienen ningún efecto inhibitorio; en cambio, hidrolizados de caseína añadidos a la mezcla de PCR en concentraciones superiores al 0,1% p/v pueden causar problemas, debido presumiblemente a la coagulación de la proteína durante la PCR. Los iones Ca^{2+} han sido identificados como posible causa de inhibición en la detección de *L. monocytogenes* en leche (Bickley *et al.*, 1996). Algunos caldos de enriquecimiento pueden ser tolerados, incluso cuando se añaden directamente a la mezcla de PCR. Otros componentes químicos de medios de cultivo, como el citrato amónico de hierro, las sales biliares, la esculina y la acriflavina requieren una dilución previa (1/10-1/50) para no inhibir la reacción. Los detergentes iónicos (sarkosyl, dodecil sulfato sódico, desoxicolato sódico) también pueden tener efectos inhibitorios (Weyant *et al.*, 1990).

Prevención de la inhibición

Se han descrito diferentes métodos para eliminar las posibles sustancias inhibidoras de las matrices alimentarias. Uno de los procedimientos más sencillos consiste en la dilución de la muestra de alimento (Wang *et al.*, 1992); el problema de esta técnica es que no sólo se atenúa la inhibición sino que también se disminuye la sensibilidad de la PCR si la cantidad de ADN diana se convierte en un factor limitante. Otro método consiste en separar las bacterias de la matriz alimentaria antes de realizar la extracción del ADN. Esto se puede conseguir preparando un subcultivo de la muestra de alimento en medio sólido selectivo y utilizando las colonias bacterianas aisladas para realizar la PCR (Furrer *et al.*, 1991; Goldsteyn Thomas *et al.*, 1991). Otras formas de captura de microorganismos para evitar los inhibidores presentes en las muestras son la centrifugación diferencial o la separación inmunomagnética (IMS) (Widjoatmodjo *et al.*, 1992; Fluit *et al.*, 1993; Kapperud *et al.*, 1993, Olsvik *et al.*, 1994).

La purificación del ADN por filtración en gel o por columnas de intercambio aniónico también puede ser una buena solución a los problemas de inhibición. Estos métodos tienen como principio básico la unión del ADN a una matriz para lavar y eliminar las sustancias contaminantes y posteriormente eluir el ADN purificado. Hay sistemas de este tipo comercializados, pero tiene el inconveniente de ser procesos largos (Khan *et al.*, 1991).

Un método rápido y simple para eliminar inhibidores de la ADN-polimerasa es la utilización de Chelex[®] 100, una resina quelante que tiene una gran afinidad por los iones metálicos polivalentes. Esta resina también tiene un efecto protector del ADN, ya que quela los

iones metálicos que catalizan la ruptura del ácido nucleico (Singer-Sam *et al.*, 1989). También se ha observado una mejora de la lisis de bacterias gram-positivas con la utilización de Chelex[®] 100 (Walsh *et al.*, 1991). El efecto quelante puede incrementarse si se realiza un calentamiento en condiciones alcalinas para desnaturalizar el ADN de la muestra y así incrementar la señal de amplificación (Poli *et al.*, 1993).

Para evitar la inhibición en muestras que presentan actividad proteasa endógena puede ser muy útil la adición de albúmina sérica bovina (BSA) (Powell *et al.*, 1994). La adición de BSA a la mezcla de PCR consigue disminuir entre 10 y 1000 veces la inhibición (Kreader, 1996). Algunas de las sustancias inhibidoras de la PCR contienen grupos fenólicos que se unen a proteínas (entre ellas, la polimerasa) formando puentes de hidrógeno con el oxígeno del enlace peptídico. La BSA captura estas sustancias y de esta forma previene su unión y la subsiguiente inhibición de la polimerasa.

2.1.2.2.3. Contaminación de la PCR. Precauciones para evitarla

Debido a su gran sensibilidad, la PCR es especialmente susceptible de contaminación por lo que se deben extremar las precauciones para evitar falsos positivos. La contaminación puede darse de muestra a muestra, pero la fuente más común es el DNA remanente de una amplificación previa de la misma diana.

Una de las medidas más importantes para la estrategia de control de contaminación es la separación física de la pre-PCR y la post-PCR; los puestos de trabajos deben estar localizados en lugares diferentes (Kwok y Higushi, 1989). Todos los reactivos utilizados en la PCR deben prepararse, alicuotarse y almacenarse en áreas libres del producto de amplificación. Otras medidas están basadas en procesos de esterilización de la pre- y post-amplificación. Longo *et al.* (1990) describieron el uso de uracil DNA-glycosilasa (UNG) y desoxiuridin trifosfato (dUTP) en lugar de desoxitimidin trifosfato (TTP). El UNG cataliza la eliminación del uracilo del ADN mono y bicatenario que se ha sintetizado en presencia de dUTP; los polinucleótidos apirimidínicos son subsecuentemente escindidos a elevadas temperaturas en condiciones alcalinas (durante la fase inicial de desnaturalización de la PCR). La radiación ultravioleta de onda corta se ha descrito como un proceso de esterilización pre-amplificación (Sarkar y Sommer, 1990; Cimino *et al.*, 1991), aunque la luz UV también puede utilizarse para la esterilización de superficies de laboratorio, pipetas, etc. Según Sarkar y Sommer (1990), la radiación UV es menos efectiva si el fragmento de ADN es menor de 300 pares de bases.

La centrifugación es una fuente importante de contaminación entre muestras, pero puede evitarse con el uso de tubos de centrifuga con sistema anti-aerosol (microtubo Safe-Lock[®], Eppendorf, Hamburgo, Alemania). También se recomienda el uso de puntas para pipetas con filtro y utensilios de vidrio y plástico estériles (Rijpens y Herman, 2002).

Para ensayos muy sensibles de PCR se puede utilizar una capa de aceite mineral encima de la reacción de PCR, incluso en aquellos termocicladores que no lo precisa, ya que disminuye los problemas de contaminación. Se recomienda también el uso de hipoclorito sódico para la limpieza y desinfección. Éste compuesto destruye tanto las bacterias como los ácidos nucleicos,

mientras que el etanol y otros desinfectantes son activos sólo ante las bacterias y no sobre sus ácidos nucleicos (Rijpens y Herman, 2002).

Finalmente, siguiendo estrictamente las precauciones, los problemas de contaminación pueden evitarse con métodos de 30 ciclos de amplificación. Cuando se aplican sistemas de PCR de >35-40 ciclos o PCR anidada, es casi imposible evitar las contaminaciones ocasionales, especialmente en laboratorios de rutina; estos sistemas de PCR tan sensibles deben restringirse a bacterias y alimentos para los que no existen otras alternativas (Rijpens y Herman, 2002).

2.1.2.3. PCR cuantitativa: PCR a tiempo real

La cantidad de producto de una PCR aumenta exponencialmente durante los primeros ciclos, pero se nivela en los últimos ciclos, por lo que no refleja la cantidad inicial de la muestra de ADN. Por tanto la mayoría de ensayos de PCR convencional sólo proporcionan resultados cualitativos, limitando su uso a aplicaciones donde sólo es necesario determinar la presencia o ausencia de una molécula específica de ADN o ARN. Para compensar estas limitaciones, se han desarrollado una serie de técnicas de PCR basadas en la cuantificación indirecta mediante PCR y número más probable (MPN-PCR) o en la cuantificación directa por PCR utilizando un estándar o competidor que puede ser interno (PCR cuantitativa competitiva) o externo (PCR cinética cuantitativa)(Rijpens y Herman, 2002).

La alternativa de mayor éxito en PCR cuantitativa es la PCR a tiempo real en la que el producto de la amplificación es detectado a medida que se va acumulando. La cantidad de producto generado es proporcional al incremento en la señal que se produce ciclo tras ciclo y que puede ser monitorizado. Un ciclo básico de amplificación por PCR puede dividirse en tres fases: exponencial, lineal y meseta. La información cuantitativa en la PCR proviene sólo de aquellos pocos ciclos en los que la cantidad de ADN aumenta de forma logarítmica hasta alcanzar la fase de meseta. Con frecuencia tan sólo 4-5 ciclos de los 30-40 que comprenden la PCR se encuentran en la fase logarítmica/lineal de la curva. El progreso de la reacción de PCR se mide mediante datos adquiridos a intervalos regulares y las unidades de fluorescencia relativa se representan gráficamente como una función del número de ciclos en el eje de las abscisas en un gráfico típico (McKillip and Drake, 2004). Actualmente existen diferentes sistemas químicos para la detección po PCR cuantitativa. La señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto amplificado, puede ser generada mediante una estrategia de detección inespecífica, independiente de la secuencia diana (agentes intercalantes fluorescentes) o mediante una detección específica (sondas de hidrólisis y sondas de hibridación).

El sistema SYBR Green (agente intercalante fluorescente) está basado en la unión no específica del fluoróforo SYBR Green I que se une al surco menor del ADN bicatenario. El SYBR Green I sólo es fluorescente cuando está unido, y esta unión característica es utilizada para monitorizar el proceso de amplificación mientras que el producto de PCR se va generando. La confirmación de la secuencia del producto amplificado se realiza mediante un análisis de la curva de fusión. Una vez finalizada la PCR se va incrementando lentamente la temperatura de la cámara térmica y se mide la fluorescencia de cada tubo o reacción. Tan pronto como el ADN bicatenario comienza a desnaturalizarse, el fluoróforo SYBR Green I se libera resultando una

disminución de la fluorescencia. Dado que cada ADN bicatenario tiene su propia temperatura de fusión, dependiendo ésta de su contenido en guanina-citosina (GC), el análisis de la curva de fusión puede compararse con el análisis del tamaño del producto de PCR en un gel de agarosa (Rijpens y Herman, 2002). Este sistema está comercializado por Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.) y Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Las sondas de hidrólisis y las sondas de hibridación están basadas en el fenómeno de la transferencia de fluorescencia resonante (FRET; Stryer, 1978), en el que la energía de un fluoróforo donador excitado se transfiere a un fluoróforo aceptor (a distancias de hasta 70-100 Å). Cuando donador y aceptor están próximos los niveles de fluorescencia generados son muy bajos o casi indetectables. Cuando éstos se separan, se emite una señal fluorescente detectable a la longitud de onda apropiada.

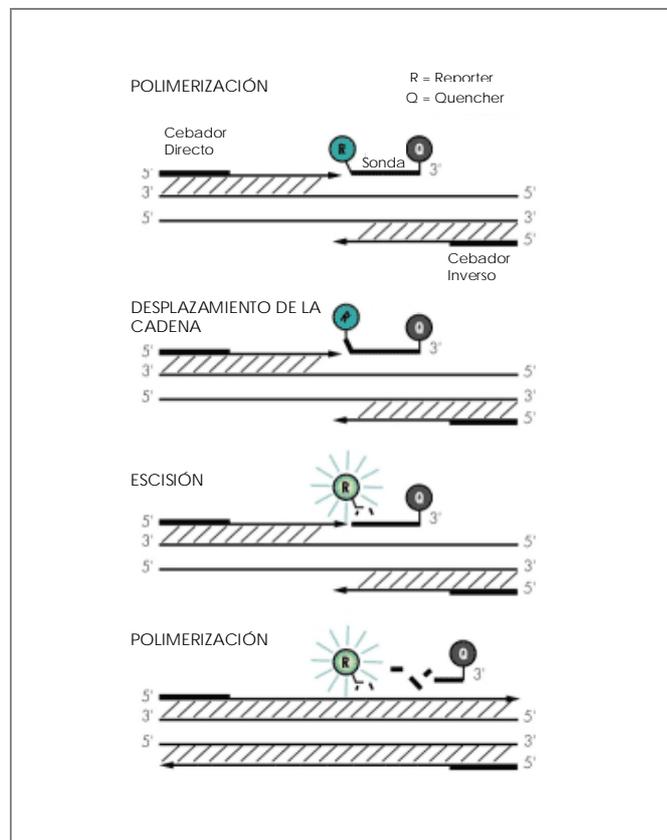


Figura 5. Proceso del método de la nucleasa 5' (Taqman™) de PCR a tiempo real.

En las sondas de hidrólisis se utiliza la actividad nucleasa 5'→3' de la *Taq* ADN-polimerasa para digerir la sonda que está marcada con un fluoróforo reportero (*reporter*) y un fotocromo extintor de fluorescencia (*quencher*) (Holland *et al.*, 1991). La fluorescencia del *reporter* está eficientemente mitigada por el *quencher* presente en la misma molécula de sonda. Como la *Taq* ADN-polimerasa extiende la cadena de ADN desde el cebador, se desplaza y escinde la sonda, separando el fotocromo *reporter* del *quencher* (Figura 5). Como resultado de la hidrólisis de la

sonda y de la consecuente separación de los dos fotocromos, la intensidad de la fluorescencia aumenta. El proceso térmico cíclico de la PCR resulta en una amplificación exponencial del producto de PCR y de la intensidad de fluorescencia. Esta técnica está comercializada como sistema TaqMan™ (Applied Biosystems).

Las *molecular beacons*™ son sondas de hibridación formadas por oligonucleótidos que son complementarias a la secuencia de ADN diana contenidas en el gen a estudio (Tyagi y Kramer, 1996). Estas sondas presentan una estructura en forma de horquilla flanqueada por secuencias repetidas invertidas complementarias; disponen de un fluoróforo en un extremo y de un extintor de fluorescencia (*quencher*) en el otro, ambos unidos a los extremos 3' y 5' respectivos por enlaces covalentes (Figura 6). En la configuración de horquilla original, el extintor próximo al fluoróforo impide la emisión de fluorescencia por parte de éste. Cuando la sonda forma un híbrido perfecto con una secuencia perfectamente complementaria pierde su forma de horquilla, el extintor se aleja del fluoróforo y éste emite fluorescencia detectable (McKillip y Drake, 2004). Aunque aún no se utilizan de forma rutinaria en sistemas alimentarios, las *molecular beacons*™ ofrecen muchas ventajas, incluyendo la detección y confirmación simultánea del ácido nucleico diana cuando se incorporan en reacciones de PCR que incluyen cebadores específicos de secuencia (McKillip y Drake, 2004).

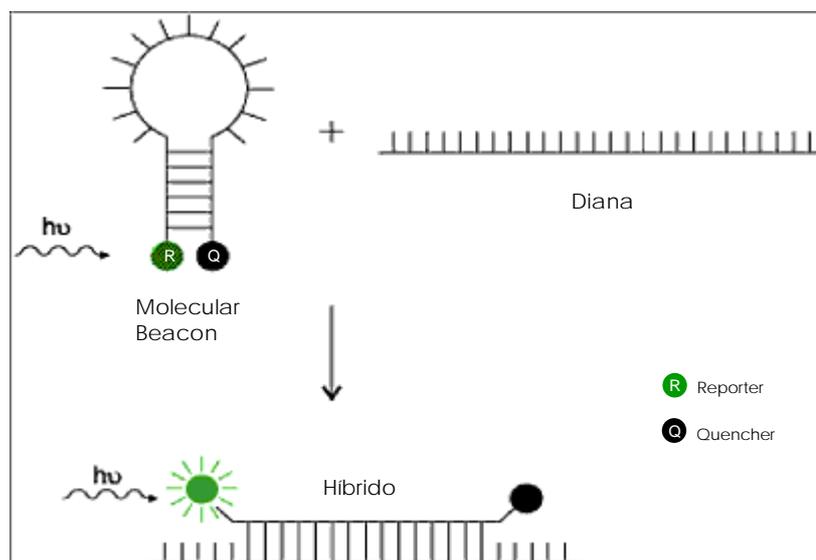


Figura 6. Estructura de una sonda *Molecular Beacon*.

2.1.2.4. Implementación de la PCR

La PCR en la detección de microorganismos y su potencial especificidad (que depende de los cebadores empleados) es indudable, la industria alimentaria ha tardado en aceptar esta técnica como "método rápido". Esto podría ser debido a la falta de criterios de estandarización para la validación de los métodos de preparación de las muestras, componentes de la reacción y

condiciones de amplificación para la detección de microorganismos en varias matrices alimentarias (Hines, 1999; Jaykus, 2003; McKillip y Drake, 2004). La composición del alimento afecta directa y significativamente a la sensibilidad del ensayo de PCR. Cada matriz alimentaria presenta dificultades propias dependiendo de su composición que deben ser solucionadas en función de su naturaleza. De hecho, existen muchos factores que afectan a la eficiencia de la purificación de la muestra de ADN a partir de la matriz alimentaria y por tanto también afecta a la robustez de la PCR (McKillip y Drake, 2004).

Existen varios factores que deben ser considerados antes de adaptar una nueva alternativa o método rápido (Fung, 1995; Notermans *et al.*, 1997):

1. Exactitud (Precisión). Los resultados falsos-positivos y falsos negativos deben ser minimizados o preferiblemente cero. El método debe ser tan sensible como sea posible y el límite de detección lo más pequeño posible.

2. Validación. Los métodos de análisis alternativos deben ser validados utilizando técnicas estándar y evaluándolos en estudios de colaboración. Estos estudios deben realizarse preferentemente en muestras de alimento contaminadas artificialmente. En los EE.UU. los programas de evaluación que lleva a cabo la AOAC (Association of Analytical Chemists) Internacional tienen una amplia aceptación. En Francia la AFNOR (Association Française de Normalisation) tiene una posición similar. Para tratar estos problemas la Unión Europea ha iniciado el Proyecto Europeo MICROVAL.

3. Rapidez. Los métodos rápidos de detección de patógenos y toxinas deberían ofrecer resultados precisos en pocas horas o 1 día. Sin embargo, muchos sistemas de detección necesitan un enriquecimiento de la muestra, ya que necesitan un mínimo de 10^4 - 10^5 organismos /ml para obtener resultados fidedignos (de Boer y Beumer, 1999).

4. Automatización. La capacidad de analizar muchas muestras al mismo tiempo es imprescindible en los métodos rápidos, aunque también es importante la posibilidad de formatos más simples para el uso en pequeños laboratorios.

5. Matriz de la muestra. Los nuevos sistemas deben funcionar bien en las diferentes matrices a analizar. La microbiota acompañante, los componentes de la matriz, etc. Pueden interferir con el método e invalidar el resultado.

6. Coste. Reactivos, costes operacionales, instrumentos, etc. La financiación inicial de métodos rápidos puede ser elevada, porque muchos sistemas requieren instrumentación cara.

7. Simplicidad. Los métodos deben ser fáciles de realizar y manipular.

8. Disponibilidad. Los reactivos y suministros deben ser de rápida disponibilidad.

9. Soporte técnico. El entrenamiento, servicio técnico y respaldo por parte de la compañía que desarrolla el método es esencial.

10. Requerimientos de espacio. Los instrumentos deben ser preferiblemente de tamaño reducido.

2.2. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

A nivel de especie bacteriana, existe suficiente diversidad genética como para poder identificar los diferentes clones. Un clon bacteriano se define como los aislados genéticamente relacionados y que son indistinguibles entre sí mediante una serie de métodos moleculares de tipificación, o bien, aislados que son tan similares que presumiblemente derivan de un ancestro común (Tenover *et al.*, 1995). En un inicio, los diferentes aislados de una misma especie se diferenciaban mediante serotipado y/o biotipado (estudiando sus propiedades metabólicas y /o fisiológicas). Utilizando métodos moleculares de tipificación se puede obtener información que va más allá del biotipo y el serotipo, pudiendo incluso identificar si diferentes aislados son una misma cepa (Farber, 1996). Una cepa puede definirse como el aislado o grupos de aislados que pueden diferenciarse de otros pertenecientes al mismo género y especie utilizando características fenotípicas y/o genotípicas (Tenover *et al.*, 1995).

Los criterios generales para la evaluación de sistemas de tipificación incluyen factores como la reproducibilidad, la capacidad para tipificar diferentes microorganismos, el poder de discriminación, la facilidad de interpretación de los resultados y de realización de la técnica empleada. En el pasado, toda tipificación de microorganismo a nivel de subespecies se realizaba analizando uno o varios marcadores fenotípicos. Los métodos fenotípicos son aquellos que detectan características que están expresadas por los microorganismos e incluyen técnicas como el biotipado, el serotipado, el fago-tipado, tipado de bacteriocinas, etc. El problema de muchos de estos métodos incluye la no reproducibilidad, la falta de poder discriminatorio y la falta de capacidad para tipificar las cepas. En la Tabla 6 se describen las características más relevantes de los principales métodos de tipificación de bacterias.

El genotipado, que incluye un análisis directo del ADN cromosómico o extracromosómico, presenta muchas ventajas sobre los métodos tradicionales de tipificación mediante caracteres fenotípicos (Versalovic, *et al.*, 1993; Farber, 1996). La mayor de ellas es sin duda el gran poder discriminatorio que presentan los métodos de genotipado, capaces de diferenciar dos cepas muy próximas filogenéticamente (Farber, 1996). Otras ventajas del genotipado son:

- el ADN bacteriano siempre puede ser extraído, por lo que todas las cepas son tipificables (con la excepción del ADN plasmídico),
- las estrategias analíticas de los métodos genotípicos son similares y pueden ser aplicadas a ADN de cualquier origen,

- en general, el ADN genómico es una característica estable y su composición es independiente de las condiciones de cultivo o métodos de preparación, y
- permite un análisis estadístico de los datos.

Sistema de tipificación	Proporción de cepas tipificables	Reproducibilidad	Poder de discriminación	Interpretación de los resultados	Facilidad técnica
Métodos fenotípicos					
Biotipado	Todas	E-D	E	A	A
Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos	Todas	D	E	A	B- A
Serotipado	La mayoría	C	D	C-A	D-C
Tipado de bacteriófagos	Variable	D	D	D-C	E- D
Electroforesis de enzimas multilocus	Todas	A	C	A	D-C
Métodos genotípicos					
Análisis del perfil plasmídico	Variable	D-C	C	C	A
Análisis de restricción con endonucleasas	Todas	B	C	E	A
Ribotipado	Todas	A	D-C	B-A	D-C
Electroforesis de campo pulsante	Todas	A	A	A	D-C
PCR-ribotipado	Todas	B-A	C	A	B-A
PCR –restricción	Todas	A	C	A	B-A
RAPD	Todas	C	B-A	B	B-A
AFLP	Todas	C	B-A	D	D
Análisis de la secuencia nucleotídica	Todas	A	A	A	D

Tabla 6. Características de los sistemas de tipificación de bacterias. Adaptado de Farber, (1996). A: Excelente; B: Muy bueno/a; C: Bueno/a; D: Moderado/a; E: Bajo/a.

Los métodos moleculares de tipificación más comúnmente utilizados en microbiología de los alimentos incluyen el análisis de la restricción del ADN cromosómico, el análisis del perfil plasmídico, ribotipado, electroforesis de campo pulsante y los métodos basados en la PCR como la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD, *randomly amplified polymorphic DNA*).

2.2.1. Análisis del perfil plasmídico

El tipado de plásmidos es uno de los métodos genotípicos más antiguos y simples, y el único que analiza tan sólo ADN extracromosómico. Los plásmidos son pequeños fragmentos de ADN de doble cadena superenrollado, que son diferentes del ADN cromosómico. Los plásmidos multicopia se replican de forma autónoma y generalmente codifican productos y/o funciones que modifican el fenotipo de la célula. Su tamaño oscila desde 1,5 kb hasta unas 300 kb.

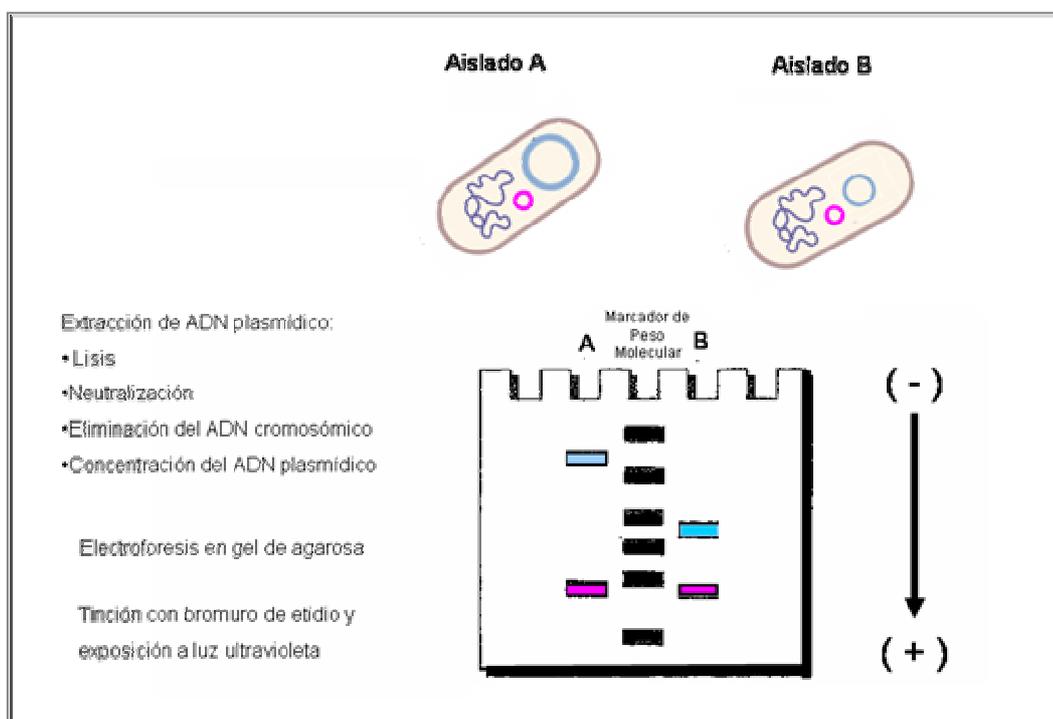


Figura 7. Representación esquemática de un análisis de perfiles plasmídicos.

Para el análisis del perfil plasmídico, los plásmidos se extraen de cada aislado bacteriano y se separan mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar su número y tamaño (Figura 7). No obstante, plásmidos del mismo tamaño pueden tener secuencias nucleotídicas diferentes. Para solventar este inconveniente los plásmidos pueden tratarse con enzimas de restricción. Si los plásmidos digeridos son diferentes, serán cortados en diferentes regiones, por lo que se obtendrán varios fragmentos de ADN que migrarán de forma distinta en el gel de

agarosa. El análisis del perfil plasmídico se ha utilizado tanto en microbiología de alimentos (Garriga *et al.*, 1996) como en microbiología clínica como herramienta epidemiológica (Pfaller y Hollis, 1989; Sloos *et al.*, 2000).

2.2.2. Análisis de la restricción del ADN cromosómico

El análisis de la restricción del ADN cromosómico fue uno de los primeros métodos genotípicos que se utilizaron para la tipificación de microorganismos. Generalmente se refiere al análisis de la restricción con endonucleasa (REA) o análisis de microrestricción del ADN (Farber, 1996). En este método el ADN cromosómico se aísla del organismo, se corta con enzimas de restricción de corte frecuente, y los fragmentos de ADN se separan por electroforesis en gel de agarosa en función de su tamaño (el movimiento relativo de las moléculas de ADN en un campo eléctrico es inversamente proporcional a su tamaño). Los fragmentos obtenidos, que normalmente presentan tamaños entre 1.000 y 20.000 pb, se visualizan mediante luz UV tras su tinción con bromuro de etidio, un colorante fluorescente que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y fluoresce cuando se expone a la luz UV (Figura 8).

Dada la estabilidad del ADN cromosómico y la alta especificidad de las enzimas de restricción, se obtienen patrones de bandas reproducibles. Las diferencias en los patrones de bandas entre diferentes aislados se denomina polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *restriction-fragment length polymorphism*). Las variaciones en los patrones de bandas entre cepas son debidos a diferencias básicas en la composición de bases del ADN y, entre otras cosas, la sustitución de un par de bases puede ser debida a la inserción o delección de ADN o a la reorganización de fragmentos de ADN (Farber, 1996). El mayor inconveniente de este método radica en la complejidad de los patrones de bandas que se obtienen (Maslow *et al.*, 1993). Sin embargo el uso de enzimas apropiados y de condiciones específicas hacen de ésta técnica una valiosa herramienta para el genotipado de microorganismos.

2.2.3. Ribotipado

El ribotipado consiste en el uso de sondas de ácidos nucleicos para el reconocimiento de los genes ribosomales. El ARN ribosomal (ARNr), presente en todas las bacterias, constituye aproximadamente el 82% del total del ARN en una célula bacteriana típica y está compuesto por tres especies denominadas ARNr 23S, 16S y 5S. Los genes que codifican para el ARNr están muy conservados, incluso bacterias muy distantes filogenéticamente presentan genes de ARNr muy similares. Mientras que de la mayoría de genes bacterianos existe una sola copia, pueden existir de 2 a 11 copias del operón *rnn* en una sola célula microbiana. Cuanto más copias del operón *rnn* presente una especie bacteriana más discriminativo será el ribotipado para esa especie en concreto (Farber, 1996).

En la práctica el ribotipado se realiza a partir del aislamiento de ADN cromosómico y, como en el RFLP, se emplea una enzima de restricción para cortar el ADN en pequeños fragmentos. Tras una electroforesis en gel de agarosa, el ADN se transfiere electroforéticamente o por capilaridad a una membrana de nylon o de nitrocelulosa (Lipuma y Stull, 1991;

Richardson *et al.*, 1991; Bingen *et al.*, 1994). Generalmente se utilizan sondas marcadas que contienen secuencias de los genes ARNr 23S, 16S y 5S de *E. coli* (tanto la naturaleza como tipo de marcaje de las sondas son variables). Cada fragmento de ADN bacteriano que contenga el gen ribosomal será marcado, creando un patrón que contendrá aproximadamente de 1 a 15 bandas y que podrá ser comparado fácilmente con los patrones de otras cepas. Para el marcaje de las sondas se utilizan sistemas no isotópicos de marcaje (quimioluminiscencia) y también sondas marcadas radiactivamente (Bingen *et al.*, 1994).

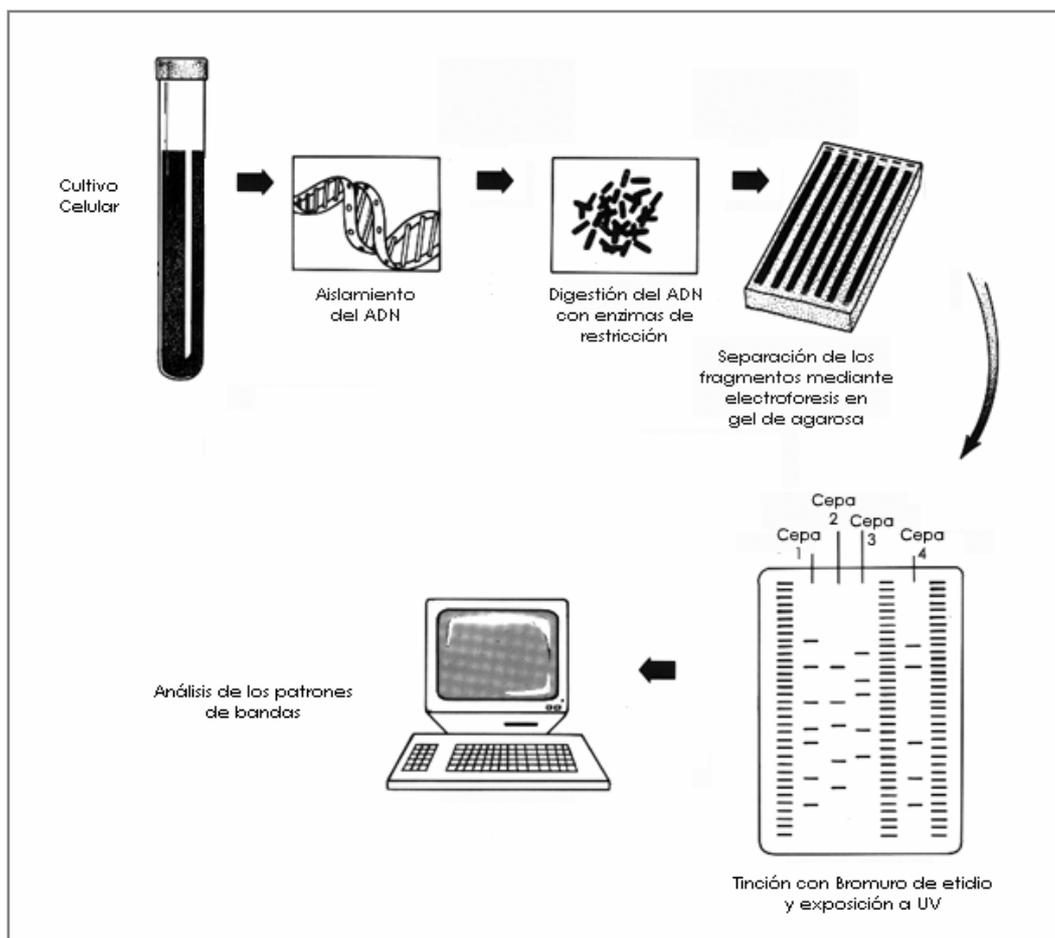


Figura 8. Representación esquemática del análisis de restricción del ADN con endonucleasas (REA).

Una de las mayores ventajas del ribotipado es que, gracias a la gran similitud que presentan los genes ribosomales, pueden utilizarse sondas universales. El ribotipado presenta, además, una gran reproducibilidad y puede ser automatizado (Riboprinter™ Characterization System).

Además de los métodos tradicionales de ribotipado, existen diferentes variaciones metodológicas (Schmidt, 1994). En lugar de usar ARNr como sonda se pueden utilizar otras sondas marcadas para identificar moléculas de ADN complementarias. Entre otras, se utilizan

sondas que contienen genes de toxinas (Swaminathan y Matar, 1993), secuencias de inserción (Mazurec, 1993) o ADN de bacteriófagos (Samadpour *et al.*, 1993).

2.2.4. Electroforesis de campo pulsante

La electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE, *pulsed- field gel electrophoresis*) es un método de genotipado muy discriminativo y reproducible por lo que se considera la técnica de referencia para la tipificación de microorganismos a nivel molecular (Fernández-Cuenca, 2004). En la Figura 9 se puede apreciar un esquema del análisis típico mediante PFGE. El uso de la PFGE ayuda a paliar algunos de los problemas que presenta el análisis mediante enzimas de restricción (análisis de microrestricción), como la complejidad de los patrones de bandas. En la PFGE, una forma de análisis de macrorestricción, se utilizan enzimas de restricción de corte infrecuente. De esta forma, los patrones que se obtienen presentan un número pequeño (entre 5 y 20) de fragmentos de gran tamaño (de 10 a 800 kb) perfectamente separados. Se conocen muchos factores que afectan a la resolución de fragmentos de ADN de gran tamaño durante la separación por PFGE: la fuerza de campo eléctrico, la forma y ángulo del campo, tipo y concentración de agarosa, el tiempo del pulso, la fuerza iónica y la temperatura (Farber, 1996).

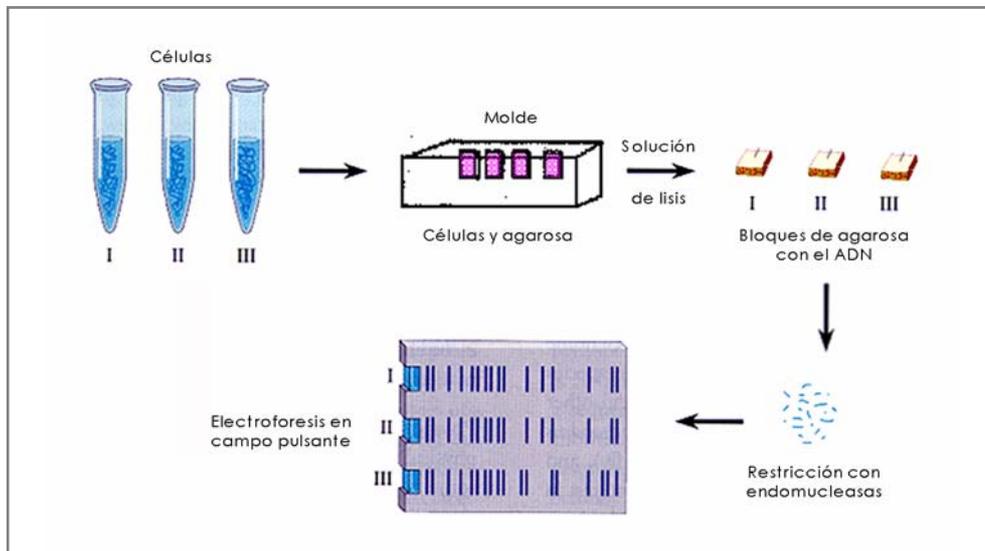


Figura 9. Ilustración esquemática de la PFGE.

Hay dos factores principales que afectan a la PFGE. El primero de ellos se refiere al tamaño de los fragmentos de ADN que se obtienen; fragmentos de tamaños superiores a 25 kb no se separan o bien la separación obtenida es muy pobre por lo que se necesita una variación de la electroforesis convencional para su separación. Esta modificación comprende cambios periódicos en la orientación del campo eléctrico a través del gel. Esto puede realizarse mediante

muchas técnicas diferentes, pero las más comunes son la electroforesis de inversión de campo y los métodos basados en la alternancia del ángulo del campo, como la electroforesis de campo eléctrico homogéneo de contornos limitados (*contour clamped homogeneous electric field electrophoresis*, CHEF).

El segundo factor único para PFGE es el corte al azar del ADN; debido a que la PFGE trabaja con fragmentos de ADN de gran tamaño se necesita una metodología especial que evite el corte del ADN en fragmentos aleatorios. Para evitarlo, el ADN se prepara incrustando los microorganismos intactos en bloques de agarosa. Las células contenidas en los bloques se lisan y a se tratan con proteinasa K para digerir las proteínas celulares. A continuación los bloques se tratan con el inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Tras varios lavados con Tris-EDTA para eliminar los tres compuestos anteriores, el ADN se digiere *in situ* con enzimas de restricción de corte infrecuente y se somete a la electroforesis de campo pulsante (Farber, 1996). Algunos de los problemas más frecuentes que se dan en la PFGE incluyen la lisis celular inadecuada o la digestión incompleta de las proteasas que concluyen en una restricción incompleta del ADN. Además, la producción de DNasas por parte de algunos organismos (como por ejemplo *Campylobacter jejuni*) ocasiona la degradación del ADN antes de la PFGE (Gibson *et al.*, 1994).

La PFGE se ha aplicado a una gran variedad de organismos y se ha convertido en el método genotípico de elección por ser una técnica con un gran poder de discriminación, reproducible y capaz de tipificar a cualquier microorganismo (Tenover *et al.*, 1995). La PFGE se ha utilizado para el estudio de brotes epidémicos de origen alimentario (Proctor *et al.*, 1995; Welinder-Olsson *et al.*, 2004), en epidemiología clínica (Miragaya *et al.*, 2002) y en la monitorización de cultivos iniciadores añadidos a alimentos (Di Maria *et al.*, 2002).

2.2.5. Técnicas de tipificación basadas en la PCR

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR se fundamentan en el mismo principio general común: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación (van Belkum, 1994; Olive y Bean, 1999). Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos. Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE, y permiten trabajar con un mayor número de muestras (van Belkum, 1994; Olive y Bean, 1999).

2.2.5.1. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)

La amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, *randomly amplified polymorphic DNA*) es una de las técnicas más utilizadas para la tipificación de microorganismos en alimentos, tanto patógenos (Tansel *et al.*, 2003; Betancor *et al.*, 2004) como microorganismos de interés tecnológico (Cocconcelli *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2001; Di Maria *et al.*, 2002). Es una técnica

sencilla y rápida que presenta un gran número de ventajas (Tabla 7). Se diferencia de la PCR convencional en que los cebadores utilizados presentan secuencias de nucleótidos aleatorias de corta longitud (8-12 nucleótidos) y se hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja astringencia (temperatura de hibridación a 30-45°C y concentraciones de MgCl₂ superiores a 2mM) (Welsh y McClelland, 1990). Generalmente se utiliza un solo cebador que puede, teóricamente, tener muchos sitios complementarios en todo el genoma y dado que las condiciones son poco astringentes pueden unirse en diferentes sitios, aun cuando la homología no sea completa. Cuando se dan 2 uniones adecuadas, aunque sean imperfectas, en sitios separados entre 200 y 2000 pb entre si y en la orientación correcta (5'→3') en cadenas opuestas del ADN, la secuencia comprendida entre ambos sitios puede ser amplificada (Farber, 1996). Cada fragmento de ADN amplificado dará lugar a la aparición de una banda en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 10). Las diferencias en los patrones de bandas o polimorfismo entre cepas puede ocurrir como resultado de la delección de un sitio unión del cebador, por la inserción de ADN que desplaza el sitio de unión demasiado lejos como para que se de la amplificación o a inserciones o delecciones de ADN que cambian el tamaño de un segmento del ADN sin impedir su amplificación.

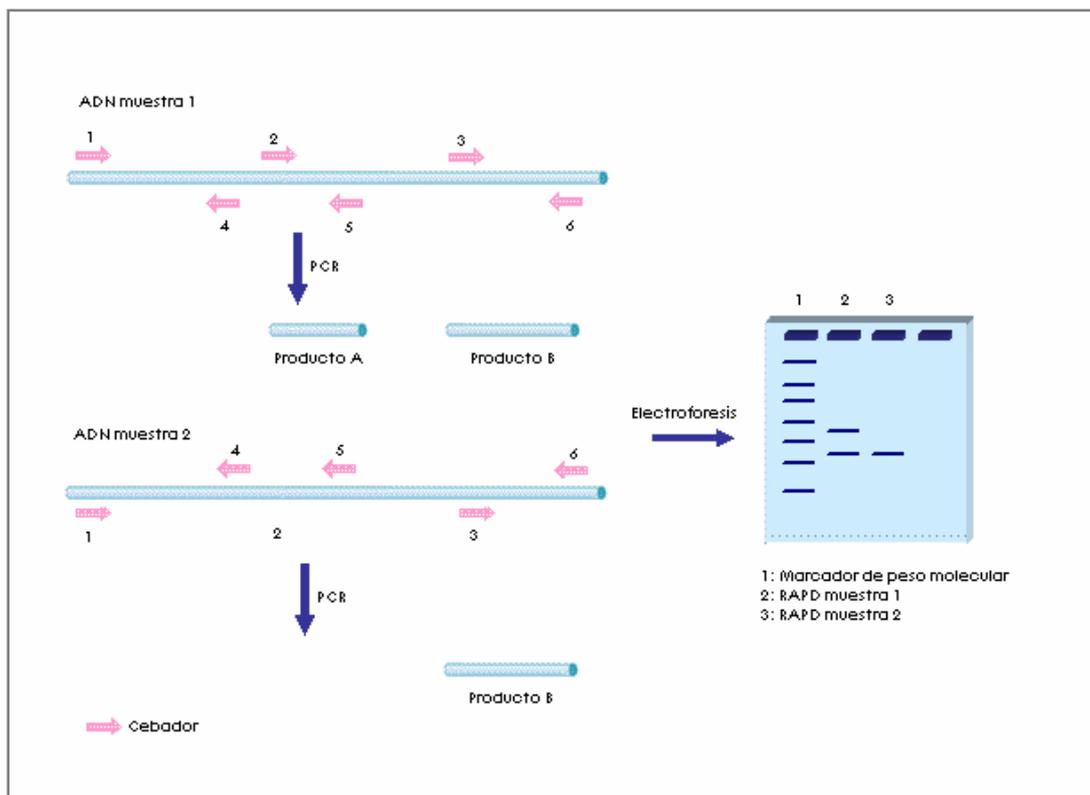


Figura 10. RAPD análisis de dos muestras de ADN. Para que se de la amplificación los cebadores deben unirse al ADN en la orientación adecuada y a una distancia apropiada unos de otros. Las flechas de color rosa representan múltiples copias del cebador de secuencia arbitraria. La dirección de la flecha indica la dirección de la síntesis del ADN. Los números representan las diferentes localizaciones del ADN muestra en las que el cebador se une.

Aunque existen muchas ventajas para la utilización de RAPD para el genotipado de microorganismos uno de los mayores inconvenientes de esta técnica es su baja reproducibilidad. Esto se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de ADN, la temperatura de hibridación de los cebadores, la concentración de iones Mg^{2+} , etc. (Tyler *et al.*, 1997). No obstante el método puede ser reproducible si se trabaja bajo condiciones cuidadosamente controladas (Farber, 1996). En general la técnica de RAPD tiene un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de las condiciones de PCR (Fernández-Cuenca, 2004).

2.2.5.2. PCR-ribotipia

La PCR-ribotipia aprovecha la heterogeneidad de las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S (van Belkum, 1994; Olive y Bean, 1999). En los organismos procariotas las tres subunidades del operón *rrn* (16S, 23S y 5S) están separadas por regiones espaciadoras que pueden presentar una gran variabilidad tanto en la secuencia como en el tamaño a nivel de género y especie (Campbell *et al.*, 1993; Swaminathan y Matar, 1993). De esta forma, tras la amplificación del ADN, se obtiene múltiples bandas que corresponden al distinto tamaño de las regiones espaciadoras de los diferentes operones *rrn* que presentan las bacterias (Farber, 1996). En este método, en lugar de utilizar cebadores arbitrarios se utilizan cebadores para amplificar los genes que codifican el ARNr. Esta técnica es reproducible aunque posee un poder de discriminación bajo, que puede incrementarse con la utilización de enzimas de restricción (Farber, 1996). En el estudio realizado por Vila *et al.* (1996) se observó que el análisis de los patrones de restricción de los amplificadores de los genes ribosomales (ARDRA) y/o las regiones espaciadoras que separan los genes 16S y 23S es una técnica con un poder de discriminación bastante inferior a las técnicas de RAPD y PFGE.

2.2.5.3. PCR-RFLP

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas (van Belkum, 1994; Olive y Bean, 1999). Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma, con frecuencia genes de virulencia (Samadpour, 1995), por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de tipificación citados anteriormente.

En este método, se realiza una PCR utilizando cebadores que amplifican una región de virulencia en particular. El amplicón resultante se digiere con endonucleasas de restricción, que se escogen en función de la composición conocida de bases de la región diana. Los productos obtenidos se separan electroforéticamente en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio. Las principales ventajas de esta técnica son su rapidez, su simplicidad y su reproducibilidad. El poder de discriminación es inferior al de la PFGE aunque puede aumentarse utilizando varias enzimas de restricción.

2.2.5.4. Rep-PCR

La amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR, *repetitive element PCR fingerprinting*) es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) o presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de bacterias gram-negativas y gram-positivas (Lupski y Weinstoc, 1992). Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) de unas 35-40 pb, las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) de 124-127 pb y los elementos BOX de 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994). Estas secuencias están localizadas en diferentes regiones intergénicas a lo largo de todo el genoma y en ambas orientaciones, dependiendo de la especie o cepa que se trate. La amplificación por PCR de las regiones genómicas situadas entre estos elementos repetitivos genera fragmentos de varios tamaños, dependiendo de la longitud de la región genómica comprendida entre las diferentes secuencias repetitivas. Los productos de PCR pueden ser separados electroforéticamente en un gel de agarosa para obtener diferentes patrones de bandas.

La técnica de REP-PCR (amplificación de secuencias REP) se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo coste, una vez que se dispone de un termociclador.

Los patrones de bandas suelen ser sencillos, aunque en algunos microorganismos como *Escherichia coli*, la interpretación de los patrones es algo más dificultosa debido a la proximidad que existe entre algunas bandas y al mayor número de bandas (Fernández-Cuenca, 2004). Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE, aunque para algunas bacterias, se ha visto que la REP-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE (Vila *et al.*, 1996). Estudios realizados por Tenover *et al.* (1994) y Van Belkum (1995) indican que la rep-PCR es tan discriminativa como RAPD y la PFGE para tipificar *Staphylococcus aureus*.

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias. Los patrones de bandas que se obtiene suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR (Fernández-Cuenca, 2004).

La rep-PCR además de permitir el estudio de la diversidad intraspecífica, también tiene utilidad en la identificación y clasificación de microorganismos y en el estudio epidemiológico de microorganismos patógenos (van Belkum *et al.*, 1995; Louws *et al.*, 1996; Versalovic *et al.*, 1997; Deplano *et al.*, 2000; Dasen *et al.*, 2003).

2.2.5.5. AFLP

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, *amplified fragment length polymorphism*) es un método de reciente desarrollo para el genotipado de microorganismos. Esta técnica se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos (Vos *et al.*, 1995) (Figura 11). Existen

variaciones metodológicas del AFLP dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 ó 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de restricción utilizadas (1 ó 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear 2 enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que la PFGE, aunque para algunos microorganismos como *Enterococcus faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares (Antonishyn *et al.*, 2000). En cepas de *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, se ha observado que la técnica de AFLP es mucho más discriminativa que la PFGE (Desai *et al.*, 2001).

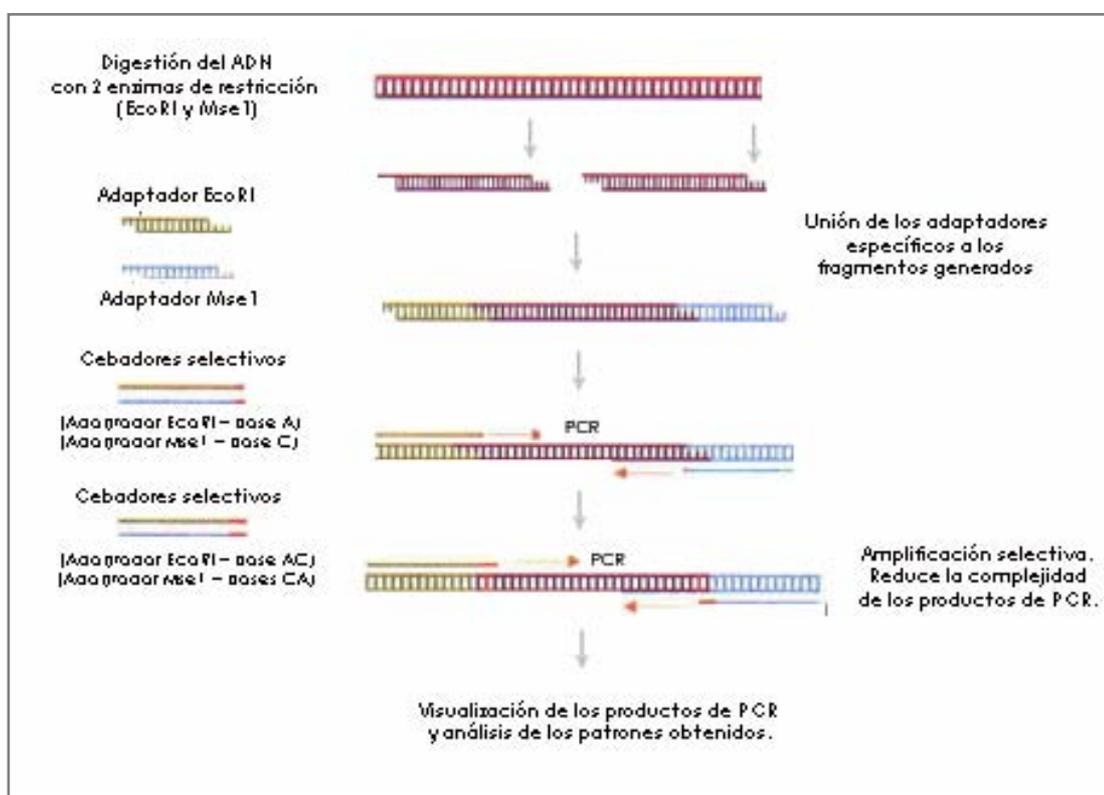


Figura 11. Representación esquemática del análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado coste del equipo, la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de distinto tamaño) y el análisis de los mismos con programa informático adecuado (Fernández-Cuenca, 2004). Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia.

2.2.5.6. Tipificación de secuencias multilocus

La tipificación de secuencias multilocus (*Multilocus sequence typing*, MLST) es una técnica de tipificación basada en la amplificación y secuenciación de genes constitutivos (*housekeeping*), generalmente genes ribosomales y/o genes relacionados con factores de virulencia (Vázquez y Berrón, 2004). El MLST está basado en los principios del análisis de isoenzimas (*multi locus enzyme electrophoresis*), pero difiere en que detecta variaciones en diferentes *locus* de forma directa, por secuenciación del ADN de fragmentos internos (de aproximadamente 500 pb) de 7 genes constitutivos. Para cada gen, las diferentes secuencias existentes en una misma especie bacteriana son asignadas como alelos distintos y, para cada aislado, los alelos de cada uno de los 7 *loci* definen el perfil alélico o secuencia tipo (ST) (Maiden *et al.*, 1998). Esto permite caracterizar de modo inequívoco los diferentes aislados de una especie con la ventaja adicional que la secuencia de ADN es un dato objetivo fácilmente intercambiable entre diferentes laboratorios.

El principio del desarrollo del MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información obtenida mediante secuenciación de los genes analizados (Smith *et al.*, 1999; Feil *et al.*, 1996). En este proceso se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presentaba un alto grado de conservación. Así se decidió analizar en cada gen un solo fragmento interno de entre 450-500 pb cuyo nivel de variabilidad, combinado, entre los genes analizados, proporcionaba un alto grado de discriminación.

Existen bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado MLST, accesibles a través de internet (<http://mlst.net>) y también se han diseñado programas informáticos específicos para la aplicación en MLST (Chan *et al.*, 2001)

El principal inconveniente de esta técnica es su laboriosidad, el elevado coste del equipo y el requerimiento de personal con experiencia, por lo que sólo se utiliza en centros especializados o laboratorios de referencia.

La gran variedad de métodos genotípicos de tipificación que existen en la actualidad ha permitido aumentar nuestra capacidad de discriminar entre microorganismos y se han convertido en una valiosa herramienta en el área de epidemiología molecular. La investigación alimentaria también se ha beneficiado en gran medida de estas técnicas, no sólo como ayuda en la investigación de brotes epidémicos de origen alimentario, sino también en los estudios de trazabilidad de la diseminación de patógenos alimentarios durante el procesado de los alimentos, de gran ayuda en la implementación de los programas de APPCC (análisis de puntos críticos) (Farber, 1996). Estos métodos de genotipado también se han utilizado con éxito en la monitorización de la capacidad de colonización de microorganismos utilizados como cultivos iniciadores y en el estudio del desarrollo de las poblaciones microbianas en embutidos y quesos (Veyrat *et al.*, 1999; Gardiner *et al.*, 1998; Di Maria *et al.*, 2002).

Aún existen muchos temas para resolver en la tipificación molecular como por ejemplo la falta de una referencia con la que evaluar los métodos de tipificación, la falta de estandarización de los protocolos de laboratorio y la clasificación de las cepas mediante genotipado (Farber, 1996). Un aspecto muy importante es el que afecta a la interpretación de las diferencias de los patrones de bandas de diferentes cepas. En una discusión realizada por Tenover *et al.* (1995) respecto a la interpretación de los patrones de restricción obtenidos mediante PFGE las cepas se clasifican en muy relacionadas filogenéticamente, posiblemente relacionadas o diferentes, basándose en diferencias de 2 a 3, de 4 a 6 o más de 7 fragmentos, respectivamente.

Método	Ventajas	Desventajas
Análisis del perfil plasmídico	Rápido y sencillo Los resultados pueden estandarizarse utilizando marcadores de peso molecular.	Los plásmidos pueden ser inestables Algunos organismos no contienen plásmidos o presentan muy pocos. Plásmidos diferentes pueden tener el mismo tamaño
REA	De aplicación universal Rápido, de coste asequible y de sencilla realización	Los fragmentos genómicos de restricción generalmente son muy numerosos y poco separados Se deben ensayar diferentes enzimas de restricción
Ribotipado	Una sola sonda puede utilizarse par tipificar todas las eubacterias. Se obtienen patrones reproducibles y con un número adecuado de fragmentos Puede automatizarse	Técnica más laboriosa y larga (múltiples pasos) y menos discriminativa que otros métodos genotípicos. Poco útil en bacterias que tan sólo contiene 1 ó 2 operones <i>rrn</i> .
PFGE	Útil para estudios taxonómicos y epidemiológicos Muy reproducible y discriminatoria Produce entre 10 y 15 bandas visibles	Más laboriosa y larga que otros métodos genotípicos Coste elevado (equipamiento especializado)
RAPD	Rápido y sencillo de realizar No se requieren marcajes isotópicos ni el uso de endonucleasas de restricción. No requiere el conocimiento previo de la secuencia de ADN.	Baja reproducibilidad sin una estandarización adecuada Tan sólo determina posibles diferencias en una pequeña proporción del genoma cuando se utiliza un solo cebador. La comparación de bandas del mismo tamaño pero de diferente intensidad puede ser problemático

Tabla 7. Ventajas y desventajas de varios métodos genotípicos de tipificación (Farber, 1996).

En la actualidad el estudio de los patrones de bandas generados mediante métodos de tipificación genotípicos se realiza mediante un análisis computerizado de los datos utilizando algoritmos para el análisis de grupos o *clusters*. El análisis de *clusters* es una técnica que se emplea para encontrar grupos dentro de una serie compleja de datos. Cuando se deben comparar un elevado número de patrones de bandas el análisis computerizado de los mismos es imprescindible. Existen una gran variedad de programas informáticos diseñados para el análisis de este tipo de datos, entre los que destaca el programa GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgium; Vauterin y Vauterin, 1992), unos de los más utilizados. Estos programas normalizan los patrones de bandas obtenidos en función de marcadores de pesos moleculares incluidos en los geles (Versalovic *et al.*, 1994; Rossbach *et al.*, 1995; Schneider y de Bruijn, 1996).

La elección del método genotípico más adecuado depende de muchos factores (Tabla 8), entre los que destacan los de tipo técnico (técnica rápida, poco laboriosa, fácil de interpretar y con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico (bajo coste) (Fernández-Cuenca, 2004). El método de tipificación molecular ideal debería ser poco laborioso, de coste asequible, relativamente rápido, con posibilidad de análisis estadístico y automatización, útil para la tipificación de todas las cepas posibles, reproducible y con un alto poder de discriminación (Farber, 1996). Aunque este método ideal no existe la rápida evolución que experimentan las técnicas moleculares en la actualidad permite que este objetivo esté cada día más próximo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue el estudio de la calidad higiénico-sanitaria de los embutidos fermentados ligeramente acidificados así como el conocimiento y caracterización de las principales comunidades bacterianas de interés tecnológico en este tipo de productos. Para la consecución de los objetivos planteados el estudio se estructuró en 4 bloques principales: identificación de las principales especies bacterianas de interés tecnológico y estudio de la calidad microbiológica e higiénico-sanitaria de los embutidos fermentados (1), desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de patógenos alimentarios en productos cárnicos (2), estudio de la biodiversidad genética y caracterización tecnológica e higiénico-sanitaria de las principales comunidades microbianas de interés tecnológico en los embutidos fermentados (3) y estandarización y mejora higiénico-tecnológica de los embutidos poco ácidos.

3.1. Identificación de las principales especies bacterianas de interés tecnológico y estudio de la calidad microbiológica e higiénico-sanitaria de los embutidos fermentados ligeramente ácidos.

Se realizó un estudio de los parámetros físico-químicos y microbiológicos de embutidos fermentados ligeramente acidificados adquiridos en comercios locales para evaluar la calidad higiénico-sanitaria de los mismos. Asimismo, se desarrollaron técnicas de PCR específica de especie para la detección directa de muestra de las principales especies de BAL y CGC+ en estos embutidos.

3.2. Desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de patógenos alimentarios en productos cárnicos.

Consistió en el desarrollo de técnicas rápidas para la enumeración de *Listeria monocytogenes* y para la detección simultánea de éste patógeno y *Salmonella* spp. en productos cárnicos.

3.3. Estudio de la biodiversidad genética y caracterización tecnológica e higiénico-sanitaria de las principales comunidades microbianas de interés tecnológico en los embutidos fermentados ligeramente ácidos

3.3.1 Bacterias lácticas

Se identificaron y tipificaron 250 aislados de BAL de embutidos fermentados ligeramente acidificados. De cada aislado, se estudió su capacidad antagonista contra *L. monocytogenes*, la actividad aminoácido descarboxilasa y la susceptibilidad a antibióticos.

3.3.2. Enterococos

Se evaluó la biodiversidad presente en 106 enterococos aislados de embutidos fermentados ligeramente acidificados a nivel de especie y cepa así como la incidencia de factores de virulencia y la susceptibilidad a antibióticos de las cepas.

3.3.3 Cocos gram-positivos catalasa-positivos.

Para el estudio de la comunidad de CGC+ se caracterizaron 240 aislados de embutidos fermentados ligeramente acidificados a nivel de especie y cepa y se determinaron propiedades de interés tecnológico (proteólisis y lipólisis) y aspectos higiénico-sanitarios (producción de aminas, genes de enterotoxinas y susceptibilidad a antibióticos) de las cepas.

3.4. Estandarización y mejora higiénico-tecnológica de los embutidos fermentados ligeramente ácidos.

Tras el estudio pormenorizado de las comunidades microbianas de los EFLA se escogieron 2 cepas de *L. sakei* y 2 cepas de *S. xylosus* con características óptimas para su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de dos tipos de embutidos fermentados ligeramente acidificados, chorizo y fuet. Para el estudio de la efectividad y utilidad de las cepas propuestas se elaboraron diversos lotes de embutidos en los que se inocularon microorganismos patógenos (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*). Como complemento al uso de cultivos iniciadores se evaluó la efectividad del tratamiento de la alta presión hidrostática en la mejora higiénico tecnológica de los embutidos fermentados ligeramente acidificados.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIALES

4.1. MUESTRAS DE EMBUTIDOS FERMENTADOS LIGERAMENTE ACIDIFICADOS

Los productos seleccionados para la realización del presente trabajo de investigación fueron embutidos crudos curados fermentados adquiridos en comercios de las provincias de Girona y Barcelona. Se seleccionaron únicamente productos que presentaron un pH comprendido entre 5,3 y 6,4 que constituyeron dos tipos principales de productos: embutidos elaborados con pimienta negra (fuet y salchichón) y embutidos elaborados con pimentón y ajo (chorizo).

4.2. CEPAS BACTERIANAS

En la Tabla 8 se recopilan todas las cepas utilizadas y su procedencia.

Especie	Cepa	Origen/Procedencia
<i>Bacillus pumilus</i>	CECT1541	Embutidos fermentados
<i>Enterococcus faecium</i>	CTC492, CTC496 CECT410	Embutidos fermentados Equivalente a ATCC19434
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT481 CECT184 CECT795	Equivalente a ATCC19433, DSMZ20033 Equivalente a ATCC 27285 Equivalente a ATCC 29212
<i>Kocuria varians</i>	CECT230, LMG14231	Equivalente a ATCC15306, DSMZ20033
<i>Kocuria rosea</i>	CECT52	Equivalente a ATCC186, DSMZ20447
<i>Lactobacillus curvatus</i>	CTC 435, CTC371	Embutidos fermentados
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CTC 305, CTC300	Embutidos fermentados
<i>Lactobacillus sakei</i>	CTC 494, CTC232	Embutidos fermentados
<i>Lactococcus lactis</i>	LMG 2350	Leche
<i>Listeria grayi</i>	CECT931	ATCC 19120.

Especie	Cepa	Origen/Procedencia
<i>Listeria innocua</i>	CTC1014	Productos cárnicos
	CECT910	ATCC 33090
	CECT4030	NCTC 12210
<i>Listeria ivanovii</i>	CECT913	ATCC 19119
<i>Listeria monocytogenes</i>	CTC1010, CTC1011,	Productos cárnicos
	CTC1034	Embutidos fermentados
	CECT911,	ATCC 19112
	CECT932	ATCC 35152
	CECT933	ATCC 19113
	CECT934	ATCC 19114
	CECT935	ATCC 13932
	CECT 936	CCM 5879
	CECT938	CCM 5881
CECT4031	ATCC 15313	
<i>Listeria seeligeri</i>	CECT917	ATCC 35967
<i>Listeria welshimeri</i>	CECT919	ATCC 35897
	CTC1013	Productos cárnicos
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT410	Equivalente a ATCC19434, DSMZ20477
<i>Pediococcus acidilactici</i>	F	Productos cárnicos
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CTC745	Productos cárnicos
<i>Salmonella</i> London	CTC1003	Productos cárnicos
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	CTC1015	Productos cárnicos
<i>Salmonella</i> Derby	CTC1022	Productos cárnicos
<i>Staphylococcus aureus</i>	CTC1008	Embutidos fermentados
	CECT794	Equivalente a ATCC27664
	CECT976	Equivalente a ATTCC13565 (<i>sea+</i>)
	CECT5191	Equivalente a ATTCC14458 (<i>seb+</i>)
	CECT4465	Equivalente a ATTCC19095 (<i>sec+</i>)
	CECT4466	Equivalente a ATTCC23235 (<i>sed+</i>)
CECT5192	Equivalente a ATTCC27664 (<i>see+</i>)	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	DSM20501/ LTH2102	Colección alemana de productos cárnicos
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CECT235	Equivalente a DSMZ20229
<i>Staphylococcus simulans</i>	CECT4538	Equivalente a ATCC 27848, DSMZ20322
<i>Staphylococcus warneri</i>	CECT236, CIT863	Equivalente a ATCC 27836, DSMZ 20316 Productos cárnicos
<i>Staphylococcus xylosus</i>	CTC 3001, CTC3050, CECT237	Embutidos fermentados ATCC 29971, DSMZ20266

Tabla 8. Cepas de colección. Especie, denominación y procedencia.

CTC- IRTA. Colección del Centre de Tecnologia de la Carne (Monells, Girona). LMG- Laboratory of Microbial Gene Technology Collection. Universidad de Agricultura de Noruega. DSMZ- German collection of microorganisms and cell culture. CECT- Colección Española de Cultivos Tipo. CIT- Colección INRA. Theix (Francia).LTH- Institut für Lebensmitteltechnologie Collection. Universidad de Hohenheim. Stuttgart. Alemania. NCTC- National Collection of Type Cultures. Londres, Reino Unido. CCM: Czech Collection of Microorganisms, República Checa.

4.2.1. Conservación de las cepas de colección

Las BAL se cultivaron en caldo MRS (apartado 4.3.1., M3), los CGC+ en MSA (apartado 4.3.1., M4), *Salmonella* spp. y *E. coli* en TSBYE (apartado 4.3.1, M17). La incubación de las BAL se realizó a 30°C durante 15-20 horas y las demás especies a 37°C durante 15-20 horas. El cultivo crecido se repartió en viales, se añadió un 20% de glicerol estéril y se almacenó a -80°C.

4.3. MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y TAMPONES

4.3.1. Medios de cultivo

M1. ID

Solución salina utilizada para la homogeneización de las muestras y en la realización de las diluciones decimales.

	g/L	
Bactopeptona (Difco Lab., Detroit, Michigan, EE.UU.)	1,0	
Cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania)	8,5	pH: 7,0 ± 0,2

M2. Agua de peptona (PW. Merck, Darmstadt, Alemania)

Medio base al que se pueden añadir carbohidratos e indicadores para estudios de fermentación. En este trabajo se utilizó para la homogeneización y dilución de las muestras cárnicas y también en la investigación de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra.

	g/L	
Bactopeptona	10,0	
Cloruro sódico	5,0	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	9,0	
KH ₂ PO ₄	1,5	pH: 7,0 ± 0,2

M3. MRS. (De Man, Rogosa, Sharpe; Lactobacilli MRS Broth. Merck, Darmstadt, Alemania)

Medio de enriquecimiento para el crecimiento abundante de BAL. Puede ser líquido (Caldo MRS) o sólido (Agar MRS). También puede prepararse MRS soft, disminuyendo a 7 g/L el contenido en agar del medio.

	g/L	
Proteosa peptona n°3	10,0	
Extracto de carne	5,0	
Extracto de levadura	5,0	
Glucosa	20,0	
Tween 80	1,0	
Citrato de hidrógeno diamonio	2,0	
Acetato sódico trihidrato	5,0	
Sulfato de magnesio	0,1	
Sulfato de manganeso	0,05	
Monohidrógeno fosfato de potasio	2,0	
Agar	15	pH: 6,5 ± 0,2

M4. *Agar Sal Manitol (MSA, Difco Laboratorie, Detroit, Michigan, EE.UU.)*

Medio selectivo para el aislamiento de CGC+. La selectividad de este medio se basa en la elevada tolerancia a la salinidad de este grupo de microorganismos. También puede prepararse caldo MSA con los mismos componentes pero sin la adición del agar.

	g/L	
Proteosa peptona nº3	10,0	
Extracto de buey	1,0	
D-manitol	10,0	
Cloruro sódico	75,0	
Agar	15,0	
Rojo Fenol	0,025	pH: 7,4 ± 0,2

M5. *Agar nutritivo, Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Alemania)*

Medio de uso general.

	g/L	
Peptona	7,0	
Glucosa	5,0	
Fosfato dipotásico	5,0	
Agar	15,0	pH: 6,9 ± 0,2

M6. *Agar Base Baird- Parker (BP, Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia)*

Medio selectivo y diagnóstico para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

	g/L	
Glicina	12,0	
Piruvato sódico	10,0	
Proteasa peptona	10,0	
Extracto de carne	5,0	
Cloruro de litio	5,0	
Extracto de levadura	1,0	
Agar	15,0	pH: 6,9 ± 0,2

Se suplementó con RPF (fibrinógeno de plasma de conejo) (Biomerieux Marcy l'Etoile, Francia).

M7. *Agar- Violeta Cristal -Rojo Neutro- Bilis -Glucosa (VRBG, Merck, Darmstadt, Alemania)*

Medio selectivo con glucosa para la detección y recuento de enterobacterias en productos alimentarios. El medio es selectivo debido a la presencia de sales biliares y cristal violeta.

	g/L	
Peptona de carne	7,0	
D (+) –glucosa	10,0	
Cloruro sódico	5,0	
Extracto de levadura	3,0	
Sales biliares	1,5	
Rojo neutro	0,03	
Cristal violeta	0,002	
Agar	13,0	pH: 7,3 ± 0,2

M8. Caldo Base de enriquecimiento de *Listeria* (UVM, Oxoid, Hampshire, Reino Unido)

Medio selectivo para *Listeria* spp.

	g/L	
Proteosa peptona	5,0	
Triptona	5,0	
Polvo "Lab-lemco"	5,0	
Extracto de levadura	5,0	
Cloruro sódico	20,0	
Fosfato disódico	12,0	
Fosfato potásico	1,35	
Esculina	1,0	pH: 7,4± 0,2

Se suplementó con UVM-I (RS0142, *selective supplements*, OXOID, Hampshire, reino Unido) que contiene ácido nalidíxico y clorhidrato de acriflavina.

M9. Caldo Half Fraser (HF; Oxoid, Hampshire, Reino Unido)

Medio selectivo para el aislamiento de *Listeria* spp. en alimentos y muestras ambientales.

	g/L	
NaCl	20,0	
Na ₂ HPO ₄	12,0	
Extracto de carne	5,0	
Proteosa peptona	5,0	
Digerido pancreático de caseína	5,0	
Extracto de levadura	5,0	
LiCl	3,0	
KH ₂ PO ₄	1,35	
Esculina	1,0	pH 7,2± 0,2

Se le añadió el suplemento Fraser de media concentración (SR166E, Oxoid) que contiene citrato férrico amónico, ácido nalidíxico y acriflavina.

M10. Agar Verde Brillante (BGA; Difco lab, Detroit, Michigan, EE.UU.)

Medio selectivo para la investigación de *Salmonella* spp. en alimentos.

	g/L	
Proteosa peptona	10,0	
Extracto de levadura	3,0	
Lactosa	10,0	
Sacarosa	10,0	
Cloruro sódico	5,0	
Verde brillante	0,0125	
Rojo fenol	0,08	
Agar	20,0	pH: 7,0 ± 0,2

M11. *Agar Xilosa Lisina Descarboxilato (XLD, Merck, Darmstadt, Alemania)*

Medio de aislamiento diferencial selectivo para *Salmonella* spp.

	g/L	
Extracto de levadura	3,0	
Xilosa	3,75	
L-lisina	5,0	
Descarboxilato sódico	2,5	
Lactosa	7,5	
Sacarosa	7,5	
Cloruro sódico	5,0	
Tiosulfato sódico	6,8	
Citrato férrico amónico	0,8	
Rojo fenol	0,08	
Agar	15,0	pH: 7,4 ± 0,2

M12. *Agar Base Kanamicina Esculina Azida (KAA, Oxoid)*

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterococos en alimentos. Se utiliza con el suplemento kanamicina SR092E (Oxoid) de forma que la presencia de sulfato de kanamicina (del suplemento) y azida sódica inhibe la microbiota competitiva. La hidrólisis de la esculina por los presuntos enterococos ennegrece los alrededores de las colonias debido a la formación de compuestos fenólicos con el hierro.

	g/L	
Triptona	20,0	
Extracto de levadura	5,0	
Cloruro sódico	5,0	
Citrato sódico	1,0	
Esculina	1,0	
Citrato férrico amónico	0,5	
Azida sódica	0,15	
Sulfato de kanamicina	0,02	
Agar	15	pH: 7,0 ± 0,2

M13. *Medio Base Rappaport Vassiliadis Semi-Sólido Modificado (MSRV)*

Medio utilizado para observar la movilidad de las cepas de *Salmonella* spp.

	g/L	
Triptona	4,59	
Hidrolizado de caseína	4,59	
Cloruro sódico	7,84	
Fosfato potásico	1,47	
Cloruro magnésico	10,93	
Oxalato verde de malaquita	0,037	
Agar	2,7	pH: 5,2 ± 0,2

Se suplementó con un vial de suplemento selectivo MSRV (SR161, Oxoid).

M14. Caldo Tetracionato (TT, Oxoid)

Caldo de enriquecimiento selectivo para el aislamiento de *Salmonellae* en alimentos y heces.

	g/L
Peptona de caseína	2,5
Peptona de carne	2,5
Sales biliares	1,0
CaCO ₃	10,0
Na ₂ S ₂ O ₃	30,0
Solución yodo-yoduro:	
Iodo	6,0
KI	5,0
Agua destilada	20 ml

M15. Agar Palcam (Merck, Darmstadt, Alemania)

Medio selectivo diferencial para la detección de *Listeria monocytogenes*.

	g/L	
Peptona	23,0	
Almidón	1,0	
Cloruro sódico	5,0	
Agar	13,0	
D(-)manita	10,0	
Citrato de amonio y hierro III	0,5	
Esculina	0,8	
Glucosa	0,5	
Cloruro de litio	15,0	
Rojo de fenol	0,08	pH: 7,0 ± 0,2

Se añadió el suplemento selectivo Palcam SR0150 (Oxoid), que contiene polimixina, clorhidrato de acriflavina y ceftacidina.

M16. Caldo Triptona Soja (TSB, Difco).

Medio de uso general muy nutritivo para el crecimiento de bacterias.

	g/L	
Digerido pancreático de caseína	17,0	
Digerido pancreático de harina de soja	3,0	
Cloruro sódico	5,0	
Fosfato de potasio dibásico	2,5	
Dextrosa	2,5	pH: 7,3 ± 0,2

M17. Caldo Triptona Soja y Extracto de levadura (TSBYE)

Medio líquido de uso general y muy nutritivo para el crecimiento de bacterias. Se preparó a partir del TSB comercial (M16, Difco), al que se añadió el extracto de levadura y el agua destilada necesaria.

	g/L	
Digerido pancreático de caseína	15,0	
Digerido pancreático de harina de soja	30,0	
Cloruro sódico	5,0	
Fosfato de potasio dibásico	2,5	
Extracto de levadura	6,0	pH: 7,3 ± 0,2

M18. *Agar Triptona Soja (TSA).*

Medio general para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. Se preparó a partir del TSB comercial (M16, Difco), al que se añadió el agar.

	g/L	
Triptona	15,0	
Peptona de soja	5,0	
Cloruro sódico	5,0	
Fosfato de potasio dibásico	2,5	
Agar	15,0	pH: 7,3 ± 0,2

M19. *Caldo Triptona Soja y Extracto de levadura (TSAYE)*

Medio general para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. Se preparó a partir del TSB comercial (M16, Difco) al que se le añadió el agar y el extracto de levadura. También puede prepararse TSAYE soft, medio con un menor contenido en agar (7 g/L).

	g/L	
Digerido pancreático de caseína	15,0	
Digerido pancreático de harina de soja	30	
Cloruro sódico	5,0	
Fosfato de potasio dibásico	2,5	
Extracto de levadura	6,0	
Agar	15,0	pH: 7,3 ± 0,2

M.20. *Agar Sulfito-polimixina-sulfadiazina. (SPS, Merck)*

Medio selectivo para clostridios sulfito-reductores, utilizado para el aislamiento y detección de *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* en alimentos y otros materiales.

	g/L	
Peptona	15,0	
Extracto de levadura	10,0	
Citrato férrico	0,5	
Sulfito sódico	0,5	
Sulfato polimixina B	0,01	
Sulfadiazina sódica	0,12	
Agar	14,0	pH: 7,0 ± 0,2

M21. Agar Mueller Hinton (MHA, Oxoid).

Medio recomendado para la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos de varias especies microbianas mediante la técnica de difusión en disco.

	g/L	
Extracto de carne	300,0	
Hidrolizado de caseína	17,5	
Almidón	1,5	
Agar	17,0	pH: 7,4± 0,2

M22. Agar tributirina (Oxoid)

Medio utilizado para el estudio de la capacidad lipolítica de las cepas bacterianas.

	g/L	
Tributirina (Gliceril tributirato)	10,0	
Extracto de levadura	3,0	
Peptona	5,0	
Agar	15,0	pH: 7,5± 0,2

M23. Agar caseinato cálcico (según Frazier y Rupp, modificado para microbiología, Merck).

Medio rico en proteínas utilizado para el estudio de la capacidad proteolítica de las cepas bacterianas.

	g/L	
Peptona de carne	4,0	
Extracto de carne	2,0	
Peptona de caseína	2,0	
Caseinato cálcico	3,5	
Cloruro cálcico dihidrato	0,2	
Citrato tripotásico monohidrato	0,35	
Hidrógenofosfato disódico	0,105	
Dihidrógenofosfato potásico	0,035	
Cloruro sódico	5,0	
Agar	13,0	pH: 7,0 ± 0,2

4.3.2. Tampones y soluciones**T1. Tampón STE**

Sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania)	6,7% (p/v)
Tris (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)	50 mM
EDTA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)	1 mM

pH: 8,0

Se esterilizó por filtración (filtro de 0,45 µm de diámetro) y se almacenó en refrigeración.

T2. Tampón ET

EDTA (Roche Diagnostics)	250 mM
Tris (Roche Diagnostics)	50 mM

pH: 8,0

Se autoclavó 15 minutos a 121°C y se almacenó en refrigeración.

T3. Solución SDS

Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE.UU.)	20% (p/v)
Tris (Roche Diagnostics)	50 mM
EDTA (Roche Diagnostics)	20 mM

pH: 8,0

Se esterilizó por filtración (filtro de 0,45 µm de diámetro) y se almacenó a 30°C.

T4. Solución de Lisozima

Se disolvió la lisozima (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Ind., EE.UU.) a una concentración de 20 mg/ml en Tris-HCl 25 mM pH 8,0. Se preparó el mismo día de su utilización.

T5. Solución de Lisostafina

Se disolvió la lisostafina (Sigma) a una concentración de 10 mg / ml en acetato sódico (pH 4,5) previamente autoclavado. Se alicuotó y almacenó a -20°C.

T6. Solución de Mutanolisina

Mutanolisina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EE.UU.)	2U/µl
Tris (Roche Diagnostics)	20 mM

pH: 8,2

Se disolvió la mutanolisina en Tris-HCl 20mM, se alicuotó y almacenó a -20°C.

T7. Solución de Ribonucleasa

Es importante que la RNasa, que se utiliza en el aislamiento del ADN, esté libre de DNasas. Para conseguirlo, se disuelve RNasa pancreática (Ribonucleasa A, Roche) a una concentración de 10 mg/ml o 100 mg/ml en acetato sódico 0,01 M (pH 5,2). Se calienta a 100°C durante 15 minutos y a continuación se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. Se ajusta el pH adicionando 0,1 volúmenes de Tris-HCl 1M (pH 7,4). Se alicuota y almacena a -20°C.

T8. Tampón TE

EDTA(Roche Diagnostics)	1 mM
Tris (Roche Diagnostics)	10 mM

pH: 8,0

Se autoclavó durante 15 minutos a 121°C y se almacenó en refrigeración.

T9. Solución de TE-fenol

Se licuó el fenol redestilado (Sigma-Aldrich) a 60°C. Posteriormente se mezclaron 250 ml de fenol con el mismo volumen de tampón TE (T8) y con 0,375 gramos de hidroxiquinolina (0,1% p/v de la fase del fenol). Se dejó reposar para obtener la separación de las fases polar y orgánica y se conservó en refrigeración en un recipiente de vidrio topacio (protegido de la luz).

T10. Tampón de lisis enzimática para bacterias gram-positivas

Tris (Roche Diagnostics)	20mM
EDTA (Roche Diagnostics)	2mM
Tritón® X-100 (Sigma-Aldrich)	1,2%

pH: 8,0

Se autoclavó durante 15 minutos a 121°C y se almacenó en refrigeración.

T11. Suspensión de Chelex® 100.

Se resuspendieron 0,3 g de Chelex® 100 (BioRad, Munich, Alemania) en 5 ml de agua bidestilada estéril. La suspensión se agitó con un agitador magnético a velocidad moderada para mantener la resina en suspensión.

T12. Tampón TAE50

Tris (Roche Diagnostics)	242 g
EDTA (Roche Diagnostics)	0,5 M
Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich)	57,1 ml

pH: 8,0

Se autoclavó durante 15 minutos a 121°C y se almacenó en refrigeración.

T13. Solución transportadora I

Sacarosa	40% (p/v)
EDTA	50 mM
Tris-HCl	20mM
Azul de bromofenol	0,25% (p/v)

T14. Solución transportadora II

Sacarosa	40% (p/v)
EDTA	50 mM
Tris-HCl	20mM
Xilen cianol FF	0,25% (p/v)

La diferencia que existe entre ambas soluciones transportadoras es la migración que realizan los colorantes en los geles de agarosa. El azul de bromofenol migra aproximadamente a la misma velocidad que el ADN bicatenario de 300 pb de longitud; la velocidad de migración del xilen cianol FF es muy similar a la del ADN bicatenario de 4 kb de longitud.

4.3.4. Oligonucleótidos

Microorganismo diana	Cebador	*R/F	Secuencia (5'-3')	Gen Diana/Posición	Referencia
Lactobacillus sakei	LS	R	ATGAAACTATTAATTGGTAC	Región espaciadora 16S/23S	Berthier y Ehrlich (1998)
	16S	F	GCTGGATCACTCCCTTTC	Extremo 3' gen ARNr 16S	
Lactobacillus curvatus	Lc	R	TTGGTACTATTTAATTCCTAG	Región espaciadora 16S/23S	Berthier y Ehrlich (1998)
	16S	F	GCTGGATCACTCCCTTTC	Extremo 3' gen ARNr 16S	
Lactobacillus plantarum	Lpl	R	ATGAGGTATTCACCTTATG	Región espaciadora 16S/23S	Berthier y Ehrlich (1998)
	16S	F	GCTGGATCACTCCCTTTC	Extremo 3' gen ARNr 16S	
Enterococcus faecium	Ef	R	CACACAATCGTAACATCCTA	gen ARNr 23S	Frahm et al. (1998) Berthier y Ehrlich (1998)
	16S	F	GCTGGATCACTCCCTTTC	Extremo 3' gen ARNr 16S	
Enterococcus spp.	Ent1	F	TACTGACAAACCATTATGATG	Gen tuf	Ke et al. (1999)
	Ent2	R	AACCTTCGTCACCACAACGGGAAC		
Enterococcus faecium	EFM1	F	GCAAGGCTTCTTAGAGA	Gen ddl de E. faecium	Dutka-Malen et al. (1995)
	EFM2	R	CATCGTGTAAAGCTAATCTC		
Enterococcus faecalis	EFK1	F	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	Gen ddl de E. faecalis	Dutka-Malen et al. (1995)
	EFK2	R	ACGATTCAAAAGCTAATCTG		
Lactococcus lactis	Lac	F	GCTGAAGGTTGGTACTTGTA	ARNr 16S (V1)	Kiljn et al. (1991) Berthier y Ehrlich 1998
	23S	R	AGTGCCAAAGGCATCCACC	Extremo 5' 23S rRNA	
Pediococcus acidilactici/ pentosaceus	Pda	F	CTGAATGAGATTTTAAACACGAA	16s rRNA (V1)	Cai et al. (1999) Berthier y Ehrlich (1998)
	23S	R	AGTGCCAAAGGCATCCACC	Extremo 5' 23S rRNA	
Staphylococcus carnosus	Sca1	F	GAACCGCATGGTTCTGCAA	gen ARNr 16S	Gory et al. (1999)
	Sca2	R	CCGTCAAAGGCGTGCACACAGT	gen ARNr 16S	
Staphylococcus warneri	Swa	F	TAGTGAAGGCGGCTTTGCTG	gen ARNr 16S	Gory et al. (1999)
	Sla2	R	CCGTCAAAGCAGTGCACACAGT	gen ARNr 16S	
Kocuria varians	Kva	R	CACGTTTACCTCCCGGATC	ARNr 23S (región de inserción)	Este estudio
	Kva2	F	GGTTTGTGCGCTCTTCTGTG	ARNr 16S (V3-559-578pb).	
Staphylococcus xylosus	Sxyl FA	F	AAATCGGCTGAAAACCTAAA	Región espaciadora 16S/23S	Este estudio
	Sxyl FB	F	AAAAATCGGCTGAAAACCTAAA		
	Sxyl RA	R	CATTGACATATTGCTTTCAG		
	Sxyl RB	R	CATTGACATATTGTAATTCAG		
Staphylococcus simulans	SII	F	ATTGGAAACAGTTTCGCAG	Región espaciadora 16S/23S	Forsman et al. (1997)
	SIII	R	ATTGTGAGTAATCGTTTGCC		

Microorganismo diana	Cebador	*R/F	Secuencia (5'-3')	Gen Diana/Posición	Referencia
Staphylococcus epidermidis	Epi1	F	TCTACGAAGATGAGGGATA	Región espaciadora 16S/23S	Forsman et al. (1997)
	Epi2	R	TTTCCACCATAATTTGAATTGT		
Listeria monocytogenes	Lip1	F	GATACAGAAACATCGTTGGC	Gen prfA	Simon et al. (1996)
	Lip2	R	GTGTAAC TTGATGCCATCAGG		
	Lip3	R	TGACCCGCAATAGAGCCCAAG		
Salmonella spp.	139	F	GTGAAATTTATGCCACGTTCCGGCAA	Gen invA	Rahn et al. (1992)
	141	R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
Amplificación del gen ARNr 16S	BSF8		AGAGTTTGATCATGGCTCAG	ARNr 16S (V1) ARNr 16S (V2) ARNr 16S (V3)	Poyart et al. (2000)
	BSF343		TACGGGAGGCCAGCAG		
	BSF1541		AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		
Amplificación del gen sodA de enterococos	sodA1	F	CCITAYICITAYGAYGCIYTIIGARCC	SodA de enterococos	Poyart et al. (2000)
	sodA2	R	ARRTARTAIAGCRTGYTCCCAIACRTC		
RAPD-PCR	R1		GGTGGGGAA	Cebador arbitrario Cebador arbitrario Cebador arbitrario Cebador arbitrario	Este estudio Este estudio Este estudio Este estudio
	R2		GTTTCGCTCC		
	R5		AACGGCGAAC		
	M13R2		GGAACAGCTATGACCATGA		

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la detección, identificación y caracterización de microorganismos

Determinación	Cebador	*R/F	Secuencia (5'-3')	Gen Diana	Referencia
Detección del gen esp en enterococos	esp1	F	TTGTAATGCTAGTCCACGACC	esp	Eaton y Gasson (2001)
	esp2	R	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
Detección del gen agg en enterococos	agg1	F	AAGAAAAAGAGTAGACCAAC	agg	Eaton y Gasson (2001)
	agg2	R	AAACGGCAAGACAAGTAAATA		
Detección del gen gelE en enterococos	gelE1	F	ACCCCGTATCATTGGTTT	gelE	Eaton y Gasson (2001)
	gelE2	R	ACGCATTGCTTTTCCATC		
Detección del gen efaAfs en enterococos	efaAfs1	F	GACAGACCCTCACGAATA	efaAfs	Eaton y Gasson (2001)
	efaAfs2	R	AGTTCATCATGCTGTAGTA		
Detección del gen efaAfm en enterococos	efaAfm1	F	AACAGATCCGCATGAATA	efaAfm	Eaton y Gasson (2001)
	efaAfm2	R	CATTTTCATCATCTGATAGTA		
Detección de Enterococos vanA+	vanA1	R	GGGAAAACGACAATTGC	vanA	Dutka-Malen et al. (1995)
	vanA2	F	GTACAATGCGGCCGTTA		
Detección de enterococos vanB +	vanB1	R	ATGGGAAGCCCGATAGTC	vanB	Dutka-Malen et al. (1995)
	vanB2	F	GATTTGTTCTCCTCGACC		

Determinación	Cebador	* R/F	Secuencia (5'-3')	Gen Diana	Referencia
Detección de enterococos vanC1+	vanC1-F vanC1-R	F R	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCGGCCATCATAGCT	vanC1	Dutka-Malen et al. (1995)
Detección de enterococos vanC2/C3+	vanC2/C3-F vanC2/C3-F	F R	CTCTACGATTTCTTTG CGAGCAAGACCCTTTAAG	vanC2/C3	Dutka-Malen et al. (1995)
Detección del gen meca	meca1 meca2	F R	TGGCTATCGTGTACACAATCG CTGGAACCTTTGTGAGCAGAG	meca	Vannuffel et al. (1995)
Detección del gen sea	sea1 sea2	F R	GGTATCAATGTGGGGGTGG CGGCACCTTTTTCTCTTCGG	sea	Mehrotra et al. (2000)
Detección del gen seb	seb1 seb2	F R	GTATGGTGTGTAAC TGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAAG	seb	Mehrotra et al. (2000)
Detección del gen sec	sec1 sec2	F R	AGATGAAGTAGTTGATGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	sec	Mehrotra et al. (2000)
Detección del gen sed	sed1 sed2	F R	CCAATAATAGGAGAAAAATAAAG ATTGTAATTTTTTTTCGTTTC	sed	Mehrotra et al. (2000)
Detección del gen see	see1 see2	F R	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	see	Mehrotra et al. (2000)
Construcción del CIA	iaclp1 iaclp2	F R	ACAGAAACATCGGTTGGCATCTATTAACACTGCTGC TAAC TTGATGCCATCAGGCCCTCAGGCTTATCCTG	CIA CIA	Este estudio Este estudio
Construcción del CIA	iacl39 iacl41	F R	ATGCCACGTTCCGGCAATCTATTAACACTGCTGC TCGCACCGTCAAAAGGAAACCCTCAGGCTTATCCTG	CIA CIA	Este estudio Este estudio
Amplificación del gen tyrdc de BAL	P1-for P2-rev	F R	CCRTARTCIGIATIGRRAARTCIGTRTG GAYATATIGGIATIGGIYTI GAYCARG		Lucas y Lonvaud-Funel (2002)
Amplificación del gen tyrdc de L. curvatus	tdcc1 tdcc2	F R	CTGGTGGATTGCTATTC TTCGTTCAATTTCCACAAGG		Este estudio Este estudio

Tabla 10. Otros oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de interés y para la construcción de un control interno de amplificación (CIA): la zona subrayada en los cebadores para la construcción del CIA es homóloga al gen de ACCg8 de *Brassica napus*. (*) F: cebador directo; R: cebador inverso.

5. MÉTODOS

5.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

Para el análisis microbiológico de las muestras de embutido se siguieron las recomendaciones de Pascual-Anderson (1992). La porción de muestra restante se congeló (a -20°C) para, posteriormente, proceder al análisis de los parámetros físico-químicos y de la determinación de aminos biógenas.

5.1.1. Preparación de la muestra

Para iniciar el estudio microbiológico de los embutidos es necesario preparar las soluciones madre que servirán de punto de partida para las diferentes determinaciones. Una vez retirados los extremos y la tripa de las muestras, se extrajo asépticamente una porción representativa de la muestra (10-20 g), se introdujo en una bolsa estéril y se añadió ID (M1) en una proporción 1:10. La homogeneización se realizó en un triturador de paletas (*Stomacher Lab-Lender*, Modelo 400. Cooke Laboratory Products, Alexandria, Va., EE.UU.) durante 2 minutos. A partir de esta solución madre se preparó una batería de diluciones decimales seriadas que se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización para la siembra. De la misma forma se prepararon dos diluciones madre más a partir de 25 g de muestra con UVM (M8) y 25 g de muestra con agua de peptona (M2) que se utilizaron en el recuento de *Listeria monocytogenes* y en la investigación de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra, respectivamente.

Para la determinación del número de microorganismos o unidades formadoras de colonias (EFC) por gramo de muestra se utilizaron métodos de recuento en placa: en profundidad o en superficie, según el tipo de microorganismo. Las siembras en superficie se realizaron manualmente y/o mediante siembra automática en espiral (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP. Don Whitley Scientific Limited, Shipley, Reino Unido) según la concentración de microorganismos esperada. El recuento de las placas sembradas en espiral se realizó automáticamente con el sistema contador de colonias Protos (Synoptics Ltd, Cambridge, Reino Unido). Los resultados se expresaron como \log_{10} (ufc/g), y para su cálculo, a partir del número de colonias, se tuvieron en cuenta la dilución y la cantidad de inóculo sembrado en cada caso.

5.1.2. Recuento de bacterias del ácido láctico

Para el recuento de BAL se realizó la siembra automática en espiral de 50 µl de las diluciones apropiadas por duplicado en placas de MRS (M3). También se realizó de forma manual a partir de 100 µl de la dilución adecuada y con la ayuda de un asa de vidrio estéril. Las placas sembradas se incubaron a 30°C durante 48-72 h en una estufa de anaerobiosis.

5.1.3. Recuento de cocos gram-positivos catalasa-positivos

La enumeración de CGC+ se realizó, del mismo modo que en las BAL, mediante siembra manual y automática en espiral en placas de MSA (M4) a partir de las diluciones decimales adecuadas. La incubación se realizó a 30°C durante 48-72 h en aerobiosis.

5.1.4. Recuento de enterococos

En este caso se utilizó la técnica de siembra en profundidad en el medio KAA (M12) de las diluciones apropiadas por duplicado. Se transfirió 1 ml de la dilución más adecuada a una placa de Petri estéril y se añadieron 15 ml de medio KAA licuado y atemperado a 48-50°C. Se mezcló con suavidad para homogeneizar medio e inóculo. Se dejó solidificar las placas y posteriormente se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis.

Las colonias de enterococos presentaron un color negro y un halo de precipitado del mismo color. Para comprobar que las colonias que presentaron la morfología descrita eran realmente enterococos se pasaron a placas de agar nutritivo (M5) para facilitar su crecimiento (y evitar falsos negativos) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Para la confirmación se utilizó el método Strepto B (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) basado en la aglutinación de partículas de látex recubiertas de los antígenos específicos para la identificación de los enterococos, con antígenos del grupo D de Lancefield.

5.1.5. Recuento de *Enterobacteriaceae*

Se realizó mediante la técnica de siembra en profundidad en medio VRBG (M7) de las diluciones apropiadas por duplicado. Se pipeteó 1 ml de la dilución en placa de Petri estéril y se añadieron 15 ml de medio VRBG licuado y atemperado a 48-50°C. Después de mezclar perfectamente medio e inóculo, se dejó solidificar el agar. Las placas se cubrieron con 10-15 ml adicionales del mismo medio (doble capa), a fin de evitar el crecimiento excesivo y la extensión de las colonias, lo que facilita su recuento. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. En este medio, las colonias de *Enterobacteriaceae* son de color púrpura, claramente visibles, y rodeadas de un halo del mismo color de las sales precipitadas. Para la confirmación se realizó la prueba de la oxidasa (Bactident® Oxidase, Merck). Esta prueba se basa en la reducción del reactivo NaDI (1-naftol+ dimetilparafenilendiamina) por el sistema citocromooxidasa/citocromo c de las bacterias con formación de la molécula de condensación, aul de indofenol. Todos los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* son oxidasa-negativos.

5.1.6. Recuento de *Staphylococcus aureus*

A partir de las diluciones decimales apropiadas se sembró 0,1 ml en medio Baird-Parker con RPF (M6). Se realizó una siembra en superficie manualmente, diseminando el inóculo con un asa de vidrio estéril hasta su absorción en el medio. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. En este medio las colonias de *S. aureus* presentan un color negro brillante con un halo de precipitación.

5.1.7. Investigación de *Salmonella* spp.

En los alimentos, a consecuencia del origen de la contaminación, las *Salmonellae* están en recuentos bajos y acompañadas de otras *Enterobacteriaceae* y/o de microorganismos de propiedades muy similares a *Salmonella* spp. Por eso es necesario enriquecer la muestra en varios medios selectivos para conseguir el aislamiento de esta especie bacteriana. La investigación de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra se realizó según la norma ISO 6579:1990 (Anónimo, 2002) modificada.

Se partió de una dilución madre, preparada con 25 g de embutido y 225 ml de agua de peptona (M2) que se homogeneizó en el *stomacher* durante 2 minutos. El homogeneizado cárnico se traspasó asepticamente a matraces estériles de 500 ml, por duplicado. Se incubó a 37°C entre 16 y 20 h.

Se inoculó 1 ml del pre-enriquecimiento en tubos de caldo TT (M14) y se incubó a 37°C durante 24 h. Paralelamente, para observar la movilidad, se dispusieron 3 gotas (100µl) del pre-enriquecimiento en placas de MSR/V (M13) y se incubó a 42°C durante 24 h. La presencia de un halo de crecimiento alrededor de las gotas inoculadas indica la movilidad de la colonia y la presunta presencia de *Salmonella* spp. en la muestra.

Las colonias que indicaron movilidad en MSR/V, así como todos los tubos de TTN se sembraron en placas de BGA (M10) que se incubaron a 37°C durante 24h. Las colonias características (colonias rosa pálido) se confirmaron mediante pruebas bioquímicas: prueba de fluorescencia (MUCAP test, Biolife Italiana), prueba de la catalasa (con H₂O₂), prueba de la oxidasa (Bactident Oxidase, Merck), API 20E (Biomérieux) o bien por PCR (apartado 5.5.2.2.2).

5.1.8. Identificación y recuento de *Listeria monocytogenes*

A partir de la solución madre, que se preparó con 25 gramos de muestra y 225 ml de medio PW (M2) se prepararon dos diluciones decimales sucesivas para realizar la técnica del número más probable (sugerido por la FDA para la enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos; Anónimo, 1992). Se prepararon tres series de tres tubos con 10 ml de medio HF (M9) una serie para cada dilución. Los tubos de cada serie se inocularon con 1 ml de la correspondiente dilución y se incubaron a 37°C durante 24-48 h. Los tubos que presentaron crecimiento, se sembraron sobre placas de agar Palcam (M15) que se incubaron a 30°C durante 48 h. En este medio las colonias de *L. monocytogenes* presentan un color gris verdoso con un halo negro alrededor debido a que las cepas de *Listeria* spp. hidrolizan la esculina del medio a

6,7-dihidroxicumarina, que reacciona con los iones Fe^{3+} originando el ennegrecimiento del medio.

Las colonias sospechosas se confirmaron mediante PCR (apartado 5.5.2.2.2) y/o mediante API *Listeria* (Biomerieux).

5.1.9. Recuento de clostridios sulfito-reductores

Se realizó en medio SPS (M20) distribuidos en tubos, que se licuó y atemperó a 48-50°C. A partir de la serie de diluciones decimales se sembró, por duplicado, 1 ml de cada dilución en los tubos de SPS. La pipeta se introdujo hasta el fondo del tubo y se depositó el inóculo lentamente. Una vez realizada la siembra, se cubrió la superficie de los tubos con parafina estéril para crear condiciones anaerobias. Una vez solidificado el medio se incubó a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo, las colonias de clostridios sulfito-reductores aparecen de color negro debido a la formación de sulfuro ferroso a partir del sulfito

5.1.10. AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

A partir de las placas de MRS, MSA y KAA de las muestras de embutido se procedió al aislamiento de algunas colonias para su posterior estudio y caracterización.

Del conjunto de colonias que crecieron en las placas de MRS, MSA y KAA se seleccionaron al azar un total de 12 colonias por muestra de embutido. Algunas muestras presentaron recuentos bajos de enterococos (menos de 10 colonias por placa de KAA); en estos casos se recuperaron todas las colonias posibles. De cada una de estas colonias se realizaron siembras en estría por agotamiento y, posteriormente se obtuvo un cultivo puro en caldo MRS de las BAL, o en TSBYE de los CGC+ y enterococos.

Las cepas seleccionadas fueron observadas al microscopio para comprobar que presentaban la morfología propia de su grupo microbiano. En las cepas de enterococos, además, se comprobó su capacidad para aglutinar el látex (Slidex Strepto B, BioMérieux) y en los CGC+ se comprobó la presencia de la enzima catalasa. Esta enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno creando efervescencia debido a la degradación del peróxido a agua y oxígeno. Una porción de cultivo puro o una colonia de la cepa objeto de estudio se pone en contacto con 30 μ l de H_2O_2 . La aparición de burbujas indica que la reacción es positiva y que el microorganismo es catalasa-positivo.

Después de un cultivo de noche de las colonias se procedió a su acondicionamiento para la congelación. Se transfirió una alícuota del cultivo a un tubo de 1,5 ml (Rubilabor S.L., Barcelona) con un 40% de glicerol estéril (Panreac) como agente crioprotector. Las cepas se conservaron a -80°C hasta su utilización para la identificación y caracterización fenotípica y genotípica de cada aislado.

5.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LAS MUESTRAS¹

El pH se determinó mediante la lectura directa del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio especialmente diseñado para la medida de los valores de pH de muestras de alimento sólidas (modelo Xerolyt, Crison Instruments, S.A., Barcelona) y conectado a un pHmetro (modelo 2001, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona).

La actividad de agua (a_w) se midió con el criómetro awk-10 (Nagy, Gäufelden, Germany) o con Novasina Thermoconstanter TH-500 (Novasina, Switzerland) a 25°C.

La humedad y el contenido en grasa, proteína y fosfatos se determinaron según los métodos oficiales españoles para el análisis de productos cárnicos (B.O.E. 207:2022, 1979).

El contenido en nitratos y nitritos se evaluó en un autoanalizador segmentado de flujo continuo (Technicon Ltd., Dublín, Irlanda).

5.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS

5.3.1. Determinación de la actividad antagonista contra *Listeria monocytogenes*

La determinación de la actividad antagonista contra *L. monocytogenes* de las cepas de BAL aisladas de los embutidos fermentados ligeramente acidificados se realizó mediante el método descrito por Tagg *et al.* (1976). Se utilizó la cepa *Listeria monocytogenes* CTC1011 y como control positivo la cepa CTC494, productora de sakacina k.

Se realizó un cultivo de noche de las cepas de BAL en medio MRS (M3) y de *L. monocytogenes* CTC1011 en medio TSBYE (M17). Se transfirió 1 ml del cultivo de BAL a tubos de 1,5 ml (Rubilabor) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido se pasteurizó a 80°C durante 10 min y se neutralizó con NaOH 5 M, hasta obtener un pH de 6,5. Se prepararon tubos con 7 ml de TSBYE soft (M17) que se licuaron y atemperaron a 50°C. Estos tubos se inocularon con 50 µL del cultivo de noche de *L. monocytogenes* CTC1011 y se vertieron sobre placas de Petri preparadas con 15 ml de TSBYE. A continuación se realizó una segunda capa con los 7 ml de medio TSBYE soft licuado y atemperado. Sobre esta capa se dispusieron 10 µL del sobrenadante pasteurizado y se incubó a 30°C durante 24-48 h. Las cepas con actividad antagonista presentaron un halo de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* alrededor de la gota de sobrenadante depositada. Finalmente, se midió (en mm) el diámetro de los halos obtenidos.

5.3.2. Determinación de la actividad proteolítica

Para el estudio de la actividad proteolítica de las cepas de CGC+ se utilizó un medio rico en proteína, el agar caseinato cálcico (M23). Las cepas con actividad proteolítica presentan un halo transparente alrededor de su crecimiento debido a la presencia de peptidasas que

¹ El análisis físico-químico de las muestras fue realizado por Ángel Valero en la *Unitat de Química Alimentaria i Bromatologia* del *Centre de Tecnologia de la Carn* (CTC- IRTA).

hidrolizan las proteínas del medio. La determinación se realizó a partir de un cultivo de noche en caldo TSBYE (M17). La incubación del cultivo se realizó a 37°C y con agitación a 150 rpm. Se inoculó 10 µl de cada cultivo de noche en placas de agar caseinato cálcico y se incubaron a 30°C durante 2-4 días. Se midieron (en mm) los diámetros de los halos transparentes que aparecieron alrededor de las gotas de cultivo depositadas.

5.3.3. Determinación de la actividad lipolítica

El estudio de la actividad lipolítica de las cepas de CGC+ se realizó en el medio agar tributirina (M22). Las cepas que con actividad lipolítica presentan un halo transparente alrededor de su crecimiento debido a la presencia de lipasas que hidrolizan el gliceril tributirato del medio. La determinación se realizó a partir de un cultivo de noche en caldo TSBYE (M17) de las cepas de CGC+ que se incubó 37°C con agitación a 150 rpm. Se inoculó 10 µl de cada cultivo de noche en placas de agar tributirina y se incubaron a 37°C durante 2-4 días. Se midieron (en mm) los diámetros de los halos que aparecieron alrededor de las gotas de cultivo depositadas.

5.3.4. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos

La prueba de susceptibilidad a antimicrobianos se realizó en base al método de difusión en disco descrito por Charteris *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Se realizó un cultivo de noche de las cepas de CGC+ y de enterococos en TSBYE (M17) a 37°C, con agitación a 150 rpm para los CGC+ y condiciones anaeróbicas para los enterococos. El cultivo de noche de las cepas de BAL diferentes de enterococos se realizó en caldo MRS (M3) a 30°C y condiciones de anaerobiosis. Se prepararon tubos con 8 ml de MHA (M21) licuado y atemperado a 50°C que se inocularon con 0,2 ml del cultivo de noche de las cepas de CGC+ y enterococos. Para las BAL se utilizó 8 ml de agar MRS (M3) licuado y atemperado que se inoculó de la misma forma con el cultivo de noche de cada cepa de BAL. Se realizó una sobrecapa con los 7,2 ml del MHA o agar MRS inoculados sobre placas de Petri con 15 ml de MHA o agar MRS, respectivamente. Una vez solidificadas las placas, se dispusieron los discos de antibiótico (Oxoid) sobre la superficie del medio inoculado y las placas se incubaron a 30°C (las placas de MRS de las BAL) y a 37°C (las placas de MHA de enterococos y CGC+). Para las cepas de enterococos y del resto de BAL se ensayaron los antibióticos ampicilina (10 µg), cloramfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (120 µg para enterococos, 10 µg para el resto de BAL), eritromicina (15 µg), linezolid (30 µg), nitrofurantoina (300 µg), penicilina G (10 unidades), quinupristin/dalfopristin (15 µg), rifampicina (5 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg) y vancomycin (30 µg). Para los CGC+ se ensayaron, además de los anteriores, amoxicilina (10 µg), cefotaxima (30 µg), clindamicina (2 µg), imipenem (10 µg), meticilina (5 µg) y sulfonamidas (300 µg). Los resultados se interpretaron según las directrices del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). *Enterococcus faecalis* CECT795 y *Staphylococcus aureus* CECT794 se utilizaron como cepas controles para la monitorización del ensayo.

5.3.5. Determinación de la actividad aminoácido-descarboxilasa²

La capacidad aminogénica de los aislados se determinó mediante la detección de las aminas biógenas en medio de cultivo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). La base del medio fue triptona, extracto de carne y levadura (0,5% cada uno) a los que se incorporó cloruro sódico (0.25%), glucosa (0,05%), sulfato de manganeso (0.005%), sulfato de hierro (0.004%), sulfato de magnesio (0.02%), citrato de amonio (0.1%), Tween 80® (0.1%), piridoxal 5'-fosfato como cofactor de la reacción de descarboxilación y los diferentes aminoácidos precursores (L-tirosina base libre, monoclóhidrato de L-histidina, monoclóhidrato de L-ornitina, monoclóhidrato de L-lisina y eventualmente L-triptófano y L-fenilalanina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. EE.UU.) a una concentración del 1,0%. Las aminas biógenas se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia. La separación de las diferentes aminas se realizó mediante una columna de fase reversa (fase estacionaria) y seguidamente (de forma automática) se procedió a la derivatización post-columna de las aminas separadas con *orto*-ftalaldehído y a la inmediata detección fluorimétrica de los derivados.

5.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES BACTERIANAS

La identificación bioquímica de una selección de cepas de CGC+ se realizó mediante el sistema API STAPH (Biomerieux) que permite la identificación de las especies de *Staphylococcus*, *Kocuria* y *Micrococcus* a partir de pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas. Las diferentes pruebas se agrupan en galerías y se presentan en forma deshidratada. La identificación se basa en la capacidad de las cepas para hidrolizar o no los compuestos que contienen las diferentes pruebas de la galería y que se traduce en un perfil numérico con la ayuda de una tabla de lectura. Se preparó un inóculo con API STAPH Médium (Biomerieux) a partir de un cultivo de noche del microorganismo a estudio, hasta conseguir una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland (que se corresponde con una D.O. de 0,125 medida a una longitud de onda de 550 nm) con el que se inoculó las diferentes pruebas de las galerías. La incubación se realizó a 35-37°C durante 18-24 h. El perfil numérico obtenido se introdujo en el programa APILAB (Biomerieux) y así se identificó la especie de la cepa bacteriana ensayada.

5.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

El estudio de las comunidades microbianas de los embutidos fermentados ligeramente acidificados se realizó mediante técnicas moleculares. Las cepas aisladas se caracterizaron a nivel de especie mediante PCR específica de especie y a nivel de cepa mediante RAPD-PCR y el

² El análisis de las aminas biógenas de las muestras fue realizado por el *Departament de Nutrició i Bromatologia* de la Facultad de Farmacia de la *Universitat de Barcelona*.

análisis de los perfiles plasmídicos. También se desarrollaron métodos para la detección de especies patógenas y de interés tecnológico en embutidos a partir de muestra.

5.5.1. Tratamiento pre-PCR de las muestras de embutido

Dada la complejidad de la matriz alimentaria objeto de estudio y las características de los microorganismos diana (las BAL y los CGC+ necesitan una lisis enzimática para la ruptura de la pared celular) se estudiaron diferentes tratamientos de la muestra para evitar las posibles inhibiciones de la PCR y para asegurar un ADN de buena calidad. Para el estudio de las especies microbianas de interés tecnológico (BAL y CGC+) se optó por el aislamiento del ADN bacteriano y para la detección de patógenos (*Salmonella* y *Listeria monocytogenes*) se ensayaron procedimientos más sencillos como la filtración y la purificación del ADN con el método basado en la resina Chelex[®] 100.

5.5.1.1. Extracción del ADN bacteriano de las muestras de embutido

Todas las muestras se aislaron por duplicado mediante dos metodologías: el método de Anderson y McKay (1983) modificado y el kit comercial Dneasy Tissue Kit (ref. n°69506, Qiagen, Hilden, Germany).

La extracción se realizó a partir del homogeneizado filtrado de embutido con o sin enriquecimiento. Dos porciones de 10 g de muestra se homogeneizaron con 90 ml de MRS (M3) y 90 ml de caldo MSA (M4) en el *stomacher* Lab-Lender durante 1 min. Se traspasaron una alícuota de 1,5 ml de cada homogeneizado a tubos de 1,5 ml (Rubilabor) y el resto del homogeneizado se incubó a 30°C durante 24 h, en condiciones de anaerobiosis el homogeneizado con caldo MRS) y en agitación (140 rpm) el homogeneizado con caldo MSA. Tras la incubación, se transfirió una alícuota de cada homogeneizado a un tubo de 1,5 ml (Rubilabor).

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de colección se utilizaron 2 métodos, uno basado en el método de Anderson y McKay (1983) y otro basado en columnas de intercambio aniónico (Dneasy Tissue Kit, Qiagen). Los cultivos de las cepas se realizaron en el medio apropiado para cada especie (MRS para BAL, TSBYE para el resto de microorganismos). La incubación se realizó a 30-37°C (según la especie) durante 16-20 h.

5.5.1.1.1. Aislamiento del ADN cromosómico. Método de Anderson y McKay (1983) modificado

1. Centrifugar 1,5 ml del cultivo bacteriano en tubos de 1,5 ml (Rubilabor) durante 10 min a 8000 x g.
2. Eliminar el sobrenadante y se resuspende con 1 ml de tampón STE (T1). Se centrifuga 5 min a 14.000 x g.
3. Eliminar el sobrenadante y se resuspende con 380 µl de STE (T1).

4. Añadir 96 µl de solución de lisozima (T4) y 10 µl de solución de mutanolisina (T6). Para el aislamiento de CGC+, además de las soluciones anteriores, también se adiciona 1 µl de solución de lisostafina (T5).
5. Incubar en un baño a 37°C un mínimo de 30 min.
6. Añadir 48 µl de tampón ET (T2)
7. Añadir 28 µl de solución SDS (T3). Se mezcla suavemente inmediatamente después de la adición del SDS. Si las células se han lisado correctamente la solución debe aclararse y quedar totalmente transparente.
8. Añadir 10 µl de RNasa 10 mg/ml (T7) y se incuba 30 min a 50°C.
9. Añadir 600 µl de solución TE-fenol (T9) y se centrifuga a 14.000 x g durante 5 min. La fase superior se recoge y se traspasa a otro tubo de 1,5 ml. Se añade 300 µl de TE-fenol (T9) y 300 µl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar 5 min a 14000 tg.
10. Traspasar la fase superior a un nuevo tubo y adicionar 600 µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 14.000 x g durante 5 min.
11. Recoger la fase superior y se traspasa a un nuevo tubo de 1,5 ml. Se añade 1 µl de NaCl 5M por cada 10 µl de solución recuperada.
12. Adicionar 2-2,5 volúmenes de etanol frío y se mezcla por inversión del tubo.
13. Mantener a -80°C durante un mínimo de 30 min.
14. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
15. Eliminar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 70%.
16. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
17. Eliminar el sobrenadante y secar a 60°C durante 10 min.
18. Añadir 25 µl de agua destilada estéril (pH 8,0) para resuspender el ADN obtenido. Dejar resuspender 30 min a temperatura ambiente
19. Almacenar a -20°C.

5.5.1.1.2. Aislamiento del ADN cromosómico. Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania)

(Protocolo para el aislamiento de bacterias gram-positivas)

Los kits de Qiagen para la purificación del ADN cromosómico se basan en el uso de columnas de intercambio aniónico. Los grupos dietilaminoetilo (DEAE, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) de la columna, cargados positivamente, interactúan con los grupos fosfato del ADN que presentan carga negativa. La purificación consiste en 5 pasos básicos: lisis celular, unión del ADN a la columna, lavado, elución del ADN y precipitación del ADN con etanol.

1. Se centrifuga 1,5 ml de cultivo bacteriano durante 10 min a 8.000 x g.
2. Resuspensión del precipitado con 180 µl de tampón de lisis enzimática (T10) al que se le añade 20 mg/ml de lisozima (T4). Añadir 10 µl de solución de mutanolisina (T6). Para el aislamiento de cocos gram-positivos catalasa-positivos se adiciona, además, 1 µl de solución de lisostafina (T5).
3. Incubar \geq 30 min a 37°C.

4. Añadir 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml; Qiagen) y a continuación 200 µl de Tampón AL (Qiagen). Agitar con agitador.
5. Incubar 30 min a 70°C.
6. Añadir 4µl de RNasa (100 mg/ml; T7). Incubar 2 min a temperatura ambiente.
7. Añadir 200 µl de etanol (96-100%). Mezclar bien con el agitador.
8. Pipetear toda la mezcla dentro de la mini-columna. Centrifugar a 8.000 x g durante 1 min. Descartar el tubo colector con el líquido obtenido.
9. Colocar la mini-columna en un nuevo tubo colector de 2 ml (Qiagen). Añadir 500 µl de tampón AW1 (Qiagen). Centrifugar a 8.000 x g durante 1 min.
10. Descartar el tubo colector con el líquido obtenido.
11. Colocar la mini-columna en un nuevo tubo colector de 2 ml (Qiagen). Añadir 500 µl de tampón AW2 (Qiagen).
12. Centrifugar a 14.000 x g durante 3 min.
13. Descartar el tubo colector con el líquido obtenido. La mini-columna no puede entrar en contacto con el líquido que contiene etanol; si esto pasara, debe repetirse la centrifugación a 14.000 x g durante 1 min.
14. Colocar la mini-columna en un tubo de 1,5 ml. Pipetear 200 µl de tampón AE directamente a la membrana. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
15. Centrifugar a 8.000 x g durante 1 min y recoger el efluente.
16. Repetir el paso de elución (14 y 15).
17. Añadir 40 µl de NaCl 5M y 980 µl de etanol frío. Mezclar por inversión del tubo.
18. Mantener a -80°C durante un mínimo de 30 min.
19. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
20. Eliminar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 70%.
21. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
22. Eliminar el sobrenadante y secar a 60°C durante 10 min.
23. Añadir 25 µl de agua destilada estéril (pH 8,0) para resuspender el ADN obtenido. Dejar resuspender 30 min a temperatura ambiente
24. Almacenar a -20°C.

La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante el GeneQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

5.5.1.2. Extracción del ADN con la resina Chelex® 100

Para la detección de microorganismos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, que se lisan fácilmente, sin la necesidad de tratamiento enzimático, se emplearon técnicas de extracción de ADN más sencillas y rápidas, como la purificación del ADN con la resina Chelex® 100 y/o el método basado en la filtración de la muestra. La muestra de partida fueron los enriquecimientos de los embutidos en agua de peptona (para la detección de *Salmonella* spp. mediante PCR) y en caldo HF (para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* mediante PCR) incubados durante 48 h a 37°C.

1. Centrifugar 5 min a 9500 x g, 2 ml del enriquecimiento en PW (M2) o en caldo HF (M9) o bien 1ml de cada enriquecimiento (para la detección simultánea de *Salmonella* spp y *L. monocytogenes*) en tubos de 2 ml (Rubilabor)
2. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el precipitado en 200 µl de suspensión de Chelex® 100 (T11) agitando el tubo con el agitador. Es importante conseguir la resuspensión completa del precipitado.
4. Incubar a 56°C durante 20 min. Agitar a alta velocidad durante 10 s.
5. Incubar a 100°C durante 8 min. Agitar a alta velocidad durante 10 s e inmediatamente enfriar en hielo.
6. Centrifugar durante 5 min a 14.000 x g y 4°C; transferir cuidadosamente 50 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml (Rubilabor).
7. Almacenar el sobrenadante a -20°C.

5.5.1.3. Método de filtración para la purificación del ADN

El método de filtración se utilizó para la detección y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en embutidos fermentados. Se partió del homogeneizado en PW (M2) o caldo HF (M9) realizado a partir de 10 g de la muestra. Se inóculo 1 ml de tres diluciones sucesivas de la muestra en una serie de tres tubos con 10 ml de caldo HF (técnica del número más probable). Los tubos inoculados se incubaron durante 40 h a 30°C con agitación (150 rpm). Los tubos de caldo HF que mostraron crecimiento se sometieron al tratamiento por filtración para la posterior confirmación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR.

1. Filtrar el cultivo bacteriano (en caldo HF) con filtros de nylon de 25 µm de diámetro (Miracloth®, Calbiochem, La Jolla, Ca., EE.UU.)
2. Traspasar 1,5 ml del cultivo filtrado a un tubo de 1,5 ml (Rubilabor) y centrifugar durante 10 min a 2400 x g.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Lavar el precipitado con 1 ml de PW (M2) y centrifugar a 14.000 x g.
5. Eliminar el sobrenadante y repetir el paso 4.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 µl de agua bidestilada estéril.
7. Almacenar a -20°C.

5.5.2. Identificación de microorganismos y genes bacterianos de interés mediante PCR

La identificación de los microorganismos patógenos y de las especies de interés tecnológico en los embutidos fermentados se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La primera fase de la identificación se realizó a partir de la muestra directa tras un tratamiento adecuado para evitar la presencia de posibles inhibidores de la reacción. También se identificaron por PCR las cepas de BAL, enterococos y CGC+ que se aislaron de las muestras comerciales de embutidos fermentados.

5.5.2.1. Selección y diseño de cebadores

En esta tesis doctoral se han utilizado cebadores descritos en la bibliografía y se han diseñado nuevos cebadores para aquellas bacterias o genes que, por la falta de referencias o bien por sus peculiares características, no se disponía de cebadores adecuados (Tablas 9 y 10).

El diseño de los cebadores se realizó a partir de las secuencias de los genes seleccionados presentes en el GeneBank® del NCBI (National Centre for Biotechnology Information, EE.UU.). El GeneBank® es una base de datos, una colección de todas las secuencias de ADN disponibles que forma parte de la *Internacional Nucleotide Sequence Database Collaboration* que está formada por el DNA DataBank of Japan (DDBJ), el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL Hinxton, Reino Unido) y el propio GenBank del NCBI.

En algunos casos fue necesaria la secuenciación del gen seleccionado para el diseño de cebadores adecuados, como por ejemplo en el diseño de cebadores para la detección de *S. xylosus* y en el diseño de cebadores para la detección del gen *tyrdc* en bacterias del ácido láctico.

Para el análisis de las secuencias se utilizaron diferentes herramientas bio-informáticas tales como el software *Clustal-W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>; EMBL, Hinxton, Reino Unido) y el software *Blast-n* 2.2.6. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; NCBI, EE.UU.).

Todos los cebadores, tanto los seleccionados de trabajos anteriores como los diseñados en esta tesis doctoral, se han analizado mediante las diferentes herramientas bioinformáticas disponibles para comprobar su especificidad y evitar las posibles reacciones cruzadas.

5.5.2.2. Optimización de las condiciones de PCR

Los termocicladores utilizados para la realización de la PCR fueron los modelos 2400 y el GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, Ca., EE.UU.). El programa de amplificación típico consistió en:

Fase de desnaturalización inicial: 5 min a 94°C

Fase cíclica (que se repite un número apropiado de ciclos optimizado para cada reacción):

- **Desnaturalización:** 1 min a 94°C
- **Unión de los cebadores:** 1 min a la temperatura adecuada (T_A), según la pareja de cebadores utilizados
- **Extensión:** 1 min a 72°C.

Extensión final: 5 min a 72°C.

La mezcla estándar de PCR (25 μ l por reacción) que se utilizó está detallada en la Tabla 11.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (μ l)	Concentración final
Agua bidestilada estéril pH 7,0	-	18,15-18,35 ¹	-
Tampón de PCR ² (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)	10X	2,5	1X
MgCl ₂ (Roche Diagnostics)	50 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, Ca., EE.UU.) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	25 mM cada nucleótido	0,2	200 μ M cada nucleótido
Cebador directo e inverso (Roche Diagnostics)	10 μ M cada cebador	1 cada cebador	0,4 μ M cada cebador
Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics)	5U/ μ l	0,2	1U/ 25 μ l
ADN muestra	20 –100 ng/ μ l	1	20 –100 ng /25 μ l

(¹) Con el agua se enrasa la mezcla hasta el volumen final de 25 μ l. (²) El tampón de PCR 10X se adquirió junto con la Taq ADN polimerasa en Roche Diagnostics y contiene: 500 mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 8,3), La concentración final de estos componentes en la mezcla de PCR fue de: 50 mM KCl, y10 mM Tris-HCl.

Tabla 11. Componentes, volúmenes y concentraciones de una mezcla de PCR estándar.

La optimización de las condiciones de PCR para los diferentes análisis realizados supuso, en ocasiones, la modificación de las condiciones estándares descritas. Cada sistema de PCR se probó en diferentes cepas para comprobar su sensibilidad y en especies bacterianas próximas filogenéticamente para asegurar su especificidad.

5.5.2.2.1. Detección de microorganismos de interés tecnológico mediante PCR

La detección por PCR de BAL y CGC+ se empleó para la investigación de la presencia de estas especies en las muestras de embutido y para la identificación de las cepas aisladas de los embutidos. Se emplearon las condiciones estándar (con modificaciones en algunos casos, Tabla 12) y el programa de amplificación descrito anteriormente.

Microorganismo diana	Cebadores (μM^*)	Nº ciclos	T _A (°C)	TAQ (U/reacción)	Tamaño amplicón (bp)
<i>Lactobacillus sakei</i>	Ls – 16S (0,48)	30	45	1	293
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Lc – 16S (0,48)	25	51	1	305
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lpl – 16S (0,48)	30	51	1	269
<i>Enterococcus faecium</i>	Ef-16S (0,48)	20	55	2	676 / 578
Multiplex <i>Enterococcus faecium</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	EFM1-EFM2 EFK1-EFK2 (0,4)	30	54	1	550 (<i>E. faecium</i>) 941 (<i>E. faecalis</i>)
<i>Lactococcus lactis</i>	Lac – 23S (0,48)	20	59	2	2060
<i>Pediococcus acidilactici</i> / <i>pentosaceus</i>	Pda – 23S (0,48)	20	55	2	2023 / 1767
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Sta2 – Sca (0,48)	35	65	1	305
<i>Kocuria varians</i>	Kva – Kva2 (0,48)	35	67	2	3362
<i>Staphylococcus warneri</i>	Sta2 – Swa (0,48)	20	72	2	289
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SxylFA-SxylFB SxylRA-Sxyl RB (0,4)	35	58	1	417 / 317 / 217
<i>Staphylococcus simulans</i>	Sim1 – Sim2 (0,4)	30	55	1	220
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Epi1 – Epi2 (0,4)	30	55	1	240

Tabla 12. Condiciones de PCR para la detección de BAL y CGC+; Número de ciclos, temperatura de anillamiento (T_A) y tamaño del producto de PCR. (*) Concentración final de cada cebador (μM).

5.5.2.2.2. Detección de microorganismos patógenos en embutidos

La puesta a punto de los sistemas de PCR para la detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* se realizó en el marco del proyecto europeo "Validation and standardisation of diagnostic polymerase chain reaction for detection of foodborne pathogens" (FOOD-PCR, QLK1-CT-1999-00226). En este proyecto, se validaron sistemas de detección de patógenos alimentarios mediante PCR en laboratorios de toda Europa. La Unidad de Microbiología y Biotecnología Alimentarias del *Centre de Tecnologia de la Carn* (IRTA) participó en la validación de los sistemas de PCR para la detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

***Salmonella* spp.**

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón de PCR (Invitrogen)	1X
dNTPs (Invitrogen) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	200 µM cada nucleótido
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM
Cebadores139-141 (Roche Diagnostics)	0,4 µM cada cebador
BSA (1 mg/ml)	1 mg/ml
CIA Salm	100 copias
Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen)	1U/ 20 µl
ADN muestra	2 µl
Volumen final	20 µl

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Desnaturalización inicial: 1 min a 95°C

38 ciclos de:
 Desnaturalización: 30 s a 95°C
 Unión cebadores: 30 s a 64°C
 Extensión: 30 s a 72°C

Extensión final: 4 min a 72°C.

Tamaño del producto de PCR: 284 pb

Tamaño del producto de amplificación del CIA: 404 pb

Listeria monocytogenes

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón de PCR (Invitrogen)	1X
dNTPs (Invitrogen) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	150 µM cada nucleótido
MgCl ₂ (Invitrogen)	2,5 mM
Cebador Lip1-Lip2 (Roche Diagnostics)	0,3 µM
BSA (1 mg/ml)	1 mg/ml
CIAList	100 copias
Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen)	1 U/ 50 µl
ADN muestra	2 µl
Volumen final	50 µl

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

40 ciclos de:
 Desnaturalización: 30 s a 95°C
 Unión cebadores: 30 s a 55°C
 Extensión: 1 min a 74°C

Extensión final: 5 min a 74°C

Tamaño del producto de PCR: 274 pb

Tamaño del producto de amplificación del CIA: 406 pb

Multiplex-PCR para la detección simultánea de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón de PCR (Invitrogen)	1X
dNTPs (Invitrogen) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	150 µM cada nucleótido
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM
Cebadores 139 ,141, Lip1, Lip3	0,3 µM cada cebador
BSA (1 mg/ml)	1 mg/ml
CIASalm	100 copias
Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen)	0,75 U/ 20 µl
ADN muestra	2 µl
Volumen final	20 µl

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN
Denaturalización inicial: 2 min a 94°C
40 ciclos de: Desnaturalización: 30 s a 94°C Unión cebadores: 30 s a 63°C Extensión: 30 s a 74°C
Extensión final: 5 min a 74°C.
Tamaño de los productos de PCR: <i>Salmonella</i> : 284 pb <i>L. monocytogenes</i> : 215 pb
Tamaño del producto de amplificación del CIA: 404 pb

5.5.2.2.3. PCR para la detección de genes relacionados con factores de virulencia y resistencia a vancomicina en enterococos.

Las condiciones de PCR aplicadas fueron las descritas en la reacción estándar (Tabla11). La detección de los genes de resistencia a vancomicina se realizó mediante 2 sistemas de multiplex-PCR, uno para la detección de los genes *vanA* y *vanB* y otro para los genes *vanC1* y *vanC2/C3*.

Gen diana	Cebadores	T _A (°C)	Tamaño amplicón (pb)
<i>esp</i>	esp1-esp2	61	933
<i>agg</i>	agg1-agg2	56	1.553
<i>gelE</i>	gelE1-gelE2	60	419
<i>efaAfs</i>	efaAfs1-efaAfs2	55	705
<i>efaAfm</i>	efaAfm1-efaAfm2	50	735
<i>vanA</i> y <i>vanB</i>	vanA1-vanA2 vanB1-vanB2	57	732 (vanA) 635 (vanB)
<i>vanC1</i> y <i>vanC2/C3</i>	vanC1F- vanC1R vanC2/C3F- vanC2/C3R	55	822 (vanC1) 439 (vanC2/C3)

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN
Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C
30 ciclos de: Desnaturalización: 1 min a 94°C Unión de los cebadores: 1 min a T _A Extensión: 1 min a 74°C
Extensión final: 5 min a 74°C
(*) Excepto en los multiplex-PCR para la detección de los genes <i>vanA-vanB</i> y <i>vanC1-vanC2/C3</i> en que el número de ciclos fue 25.

5.5.2.2.4. PCR para la detección de genes de enterotoxinas y resistencia a meticilina en CGC+

La detección de las enterotoxinas estafilocócicas se realizó con los cebadores descritos por Mehrotra *et al.* (2000). Estos autores diseñaron un sistema de multiplex-PCR para la detección simultánea de las enterotoxinas A, B, C, D, y E. Sin embargo, el uso de un número excesivo de cebadores puede originar interferencias en la amplificación. Para evitar problemas en la PCR y para facilitar la identificación posterior de los productos de PCR se realizaron 3 sistemas de PCR para la identificación de las genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*) en las cepas de CGC+ aisladas de embutidos. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en la Tabla 11, excepto por la concentración de los cebadores *sed1*- *sed2* que fue de 0,8 μ M cada uno.

Gen diana	Cebadores	Tamaño amplicón (pb)	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN:
<i>sea</i>	<i>sea1</i> - <i>sea2</i>	102	Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C
<i>seb</i> y <i>sed</i>	<i>seb1</i> - <i>seb2</i> <i>sed1</i> - <i>sed2</i>	164 (<i>seb</i>) 278 (<i>sed</i>)	35 ciclos de: Desnaturalización: 2 min a 94°C Unión de los cebadores: 2 min a 57°C Extensión: 1 min a 72°C
<i>sec</i> y <i>see</i>	<i>sec1</i> - <i>sec2</i> <i>see1</i> - <i>see2</i>	451 (<i>sec</i>) 209 (<i>see</i>)	Extensión final: 7 min a 72°C

Para la detección del gen de resistencia a meticilina (*mecA*) se utilizaron las condiciones estándar de PCR descritas en la Tabla 11. El producto de amplificación del gen *mecA* fue de 310 pb. El programa de amplificación aplicado fue:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C

Unión de los cebadores: 1 min a 56°C

Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 5 min a 72°C

5.5.2.2.5. Detección del gen *tyrdc* en BAL

La detección del gen de la tirosin descarboxilasa (*tyrdc*), enzima que cataliza la descarboxilación del aminoácido tirosina produciendo tiramina, se realizó a partir de las condiciones de PCR estándar descritas en la Tabla 11 con los cebadores P1-for/P2-rev, que permiten la amplificación del gen *tyrdc* de las bacterias lácticas. El producto de amplificación obtenido fue de 800 pb. El programa de amplificación consistió en:

Desnaturalización inicial: 10 min a 94°C

30 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C
Unión de los cebadores: 1 min a 45°C
Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 10 min a 72°C

5.5.2.2.6. Detección del gen *tyrdc* en *L. curvatus*

Se diseñó un sistema de PCR para la detección específica del gen *tyrdc* en *L. curvatus*. Se realizó a partir de las condiciones de PCR estándar con los cebadores *tdcC1* y *tdcC2*. El producto de amplificación del gen *tyrdc* fue de 372 pb. El programa de amplificación consistió en:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

35 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C
Unión de los cebadores: 1 min a 58°C
Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 5 min a 72°C

5.5.2.2.7. Amplificación del gen ARNr 16S

Se utilizaron las condiciones estándar descritas en la Tabla 11, utilizando los cebadores BSF8 y BSF1541 (Tabla 10). El programa de amplificación consistió en:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C
Unión de los cebadores: 1 min a 50°C
Extensión: 1,5 min a 74°C

Extensión final: 5 min a 74°C

5.5.2.2.8. Amplificación de la región espaciadora 16S-23S ARNr

Se utilizaron las condiciones estándar (Tabla 11) con los cebadores 16S y 23S (Tabla 9). El programa de amplificación consistió en:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C
Unión de los cebadores: 1 min a 55°C
Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 5 min a 72°C

La amplificación de la región espaciadora 16S-23S ARNr se utilizó para la identificación a nivel de especie de los aislados de CGC+ y también para la posterior secuenciación del fragmento amplificado.

5.5.2.2.9. Amplificación del gen *sodA*

Se utilizaron las condiciones estándar excepto por la concentración de los cebadores *sodA1* y *sodA2* que fue de 0,6 μM para cada oligonucleótido. El programa de amplificación aplicado fue:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

Desnaturalización: 1 min a 94°C

Unión de los cebadores: 1 min a 50°C

Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 5 min a 72°C

5.5.2.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Se utilizaron concentraciones de agarosa del 2% para fragmentos menores de 200 pb, del 1,8% para fragmentos entre 200 y 300 pb, del 1.5% para fragmentos entre 300 y 500 pb y del 1% para aquellos fragmentos mayores de 500 pb.

El gel se preparó con Agarosa (BioRad, Munich, Alemania) y tampón TAE 0,5X y se calentó en un horno microondas hasta la fusión y completa disolución de la agarosa. Una vez atemperado el gel de agarosa (aproximadamente a 60°C) se añadió 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio (Sigma) y se dejó solidificar en un molde adecuado.

A las muestras de ADN (tras la amplificación por PCR) se les añadió 1-2 μl de solución transportadora (1 μl de solución transportadora por cada 20-25 μl de volumen de muestra). Se utilizó solución transportadora I ó II (T13 y T14) dependiendo del tamaño del fragmento de ADN a separar; en fragmentos mayores de 500 pb se utilizó la solución transportadora I (T13) y en fragmentos menores de 500 pb la solución transportadora II (T14).

Los marcadores de peso molecular utilizados para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN fueron el marcador *1Kb DNA ladder* y el *100 bp DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, Ca., EE.UU.). La electroforesis se realizó a 5V/cm en tampón TAE 0,5X. El gel se visualizó con luz UV en el transiluminador LKB2011 Macrovue (Farmacia LKB, Uppsala, Suecia), se fotografió y se archivó.

5.5.2.4. Diseño de un control interno de amplificación (CIA)

Se diseñaron CIA para los sistemas de PCR para la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*. El ADN quimérico consistió en un fragmento de la región codificante del gen ACCg8 de *Brassica napus* (número de acceso X77576) flanqueado por las secuencias de los cebadores específicos de *Salmonella* o *L. monocytogenes*. El diseño se realizó mediante dos pasos de PCR. En la primera reacción de PCR, 50 ng de ADN de *B. napus* se amplificó con oligonucleótidos quiméricos (ipclip1 y ipclip2, Tabla 10) que contenían las secuencias de los cebadores de *Salmonella* o *L. monocytogenes* en el extremo 5'. El programa de amplificación consistió en: 2 min a 94°C, 40 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 55°C y 1 min a 74°C y una extensión final a 72°C durante 5 min. Se realizó una dilución (1: 10.000) del producto de PCR en agua bidestilada estéril y se utilizó como muestra en la segunda PCR realizada con los cebadores correspondientes 139-141 o Lip1-Lip2 y las condiciones descritas en la sección 2.5.2.2.2. El producto resultante se purificó mediante QIAquick PCR purification kit (Qiagen) y se cuantificó por densidad óptica a 260 nm utilizando el GeneQuant II (Pharmacia Biotech).

5.5.3. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se ha utilizado para la identificación de microorganismos y para el diseño de cebadores específicos para su posterior uso en la identificación por PCR. De esta forma, se realizó la secuenciación parcial del gen ARNr 16S, del gen *sodA*, de la región espaciadora 16S-23S del ARNr y del gen *tyrdc* de las cepas microbianas a estudio.

5.5.3.1. Amplificación del fragmento o gen a secuenciar

El primer paso para la secuenciación de los fragmentos de ADN o genes seleccionados consistió en la amplificación de éstos por PCR. Los genes empleados fueron el ARNr 16S, el *sodA*, la región espaciadora del 16S-23S ARNr y el gen *tyrdc*; la amplificación se realizó según las condiciones descritas en el apartado 5.5.2.2.

Tras la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para la separación del fragmento o fragmentos de ADN obtenidos. Cuando en la PCR se obtuvo un único fragmento, éste se purificó sin necesidad de electroforesis en gel de agarosa utilizando el kit QIAquick PCR (Qiagen).

5.5.3.2. Extracción del ADN del gel de agarosa. GeneClean® II

Para la obtención del fragmento de ADN deseado del gel de agarosa se utilizó el kit GeneClean® II (BIO 101, Q-BIOgene, Carslbad, EE.UU.)

1. Escindir la banda de ADN del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con la ayuda de un bisturí y iluminando con luz UV.
2. Determinar el peso de la porción de agarosa y traspasarla a un tubo de 1,5 ml (Rubilabor)

3. Añadir 3 volúmenes de solución de NaI (BIO 101) e incubar en un baño a 45-55°C durante 1 min.
4. Agitar el contenido del tubo pipeteando o por inversión. Continuar la incubación hasta la completa disolución de la agarosa (3-5 min).
5. Resuspender la resina Glassmilk® (BIO 101) agitando durante 1 min en posición vertical.
6. Añadir 5 µl de Glassmilk a la solución del ADN en NaI y agitar para la resuspensión de la resina.
7. Incubar en hielo durante 5 min. Agitar cada 1-2 min para asegurar que el Glassmilk permanezca en suspensión.
8. Centrifugar a 14.000 X g durante 5 s. Descartar el sobrenadante.
9. Añadir 500 µl de New Wash (BIO 101) previamente preparado. Resuspender el precipitado pipeteando con suavidad.
10. Centrifugar a 14.000 X g durante 5 s. Descartar el sobrenadante.
11. Repetir los pasos 9 y 10.
12. Centrifugar una vez más a 14.000 X g durante 5 s y retirar el resto de sobrenadante para evitar una mayor dilución final del ADN.
13. Secar al aire el precipitado durante 5-10 min para eliminar el etanol residual.
14. Añadir 5 µl de TE (T8) o agua bidestilada estéril (pH 8) y resuspender el precipitado pipeteando cuidadosamente.
15. Centrifugar a 14.000 X g durante 30 s y retirar el sobrenadante que contiene el ADN y disponerlo en un nuevo tubo de 1,5 ml.

5.5.3.3. Purificación del producto de PCR. QIAquick PCR purification kit (Qiagen)

Este kit se utilizó cuando el producto de PCR fue un único fragmento de ADN y por tanto no fue necesaria la electroforesis en gel de agarosa para su separación. Este kit está diseñado para purificar fragmentos (con tamaños comprendidos entre 100 pb y 10 kb) de cebadores, nucleótidos, polimerasa y sales.

1. Añadir 5 volúmenes de buffer PB a un volumen de la muestra de PCR y mezclar.
2. Colocar la columna QIAquick spin en un tubo colector (Qiagen).
3. Aplicar la muestra en la columna para unir el ADN. Centrifugar 30-60 s.
4. Descartar el líquido obtenido. Colocar la columna en el mismo tubo colector.
5. Para lavar el ADN, añadir 0,75 ml de tampón PE (Qiagen) a la columna y centrifugar durante 30-60 s.
6. Descartar el líquido obtenido y colocar la columna de nuevo en el mismo tubo colector. Centrifugar la columna 1 min adicional (para eliminar el etanol residual del tampón PE).
7. Colocar la columna QIAquick en un tubo de 1,5 ml (Rubilabor)
8. Para eluir el ADN, añadir 40 µl de H₂O (pH 7.0-8.5) al centro de la columna y centrifugar durante 1 min.

5.5.3.4. Reacción de secuenciación

El ADN se secuenció utilizando el *BigDye™ Terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, Ca., EE.UU.).

MEZCLA PARA LA REACCIÓN		PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN:
ADN muestra	10 ng	3 minutos a 94°C
BigDye Terminator Mix	3 µl	25 ciclos de:
Cebadores		10 s a 96°C
		5 s a 50°C
		4 min a 60°C
Agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 10 µl		

El secuenciador utilizado fue el ABI PRISM 310 (Applied Biosystems; Foster City, Ca. EE.UU.)³

5.5.4. Genotipado de las cepas aisladas de los embutidos fermentados

La tipificación genotípica de las cepas de BAL, enterococos y CGC+ aisladas de embutidos fermentados ligeramente acidificados se realizó mediante el análisis del perfil plasmídico de las cepas y mediante RAPD-PCR. La elección de estas técnicas se debió al elevado número de cepas que debían analizarse (594 en total) y a que estas técnicas ya se habían utilizado con éxito en anteriores proyectos del grupo de investigación. Ambas técnicas son rápidas y sencillas y permiten un grado de discriminación adecuado para el estudio de la diversidad intraespecie en las comunidades microbianas de los embutidos.

5.5.4.1. Determinación del perfil plasmídico

(Método de Anderson y McKay, 1983, modificado).

1. Centrifugar 1,5 ml del cultivo bacteriano en tubos de 1,5 ml (Rubilabor) durante 10 min a 8000 x g.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 1 ml de tampón STE (T1). Se centrifuga 5 min a 14.000 x g.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 380 µl de STE (T1).

³ La secuenciación del ADN se realizó en la *Unitat de Biologia Molecular, Serveis Tècnics de Recerca* de la *Universitat de Girona*, por *Vicenç Oliveras*.

4. Añadir 96 µl de solución de lisozima (T4) y 10 µl de solución de mutanolisina (T6). Cuando se trate de cepas de CGC+, además de las soluciones anteriores, también se adiciona 1 µl de solución de lisostafina (T5).
5. Incubar en un baño a 37°C un mínimo de 30 min.
6. Añadir 48 µl de tampón ET (T2)
7. Añadir 28 µl de solución SDS (T3). Se mezcla suavemente inmediatamente después de la adición del SDS. Si las células se han lisado correctamente la solución debe aclararse y quedar totalmente transparente.
8. Añadir 28 µl de NaOH 3M preparada en el mismo momento y mezclar de forma suave durante 10 min. Con esta solución se aumenta el pH de la preparación consiguiendo la desnaturalización del ADN cromosómico mientras que el ADN plasmídico se mantiene intacto debido a su estructura circular cerrada covalentemente (ccc) y súper enrollada.
9. Añadir 50 µl de Tris-HCl 2M y agitar de forma suave durante 3 min. En este paso vuelve a disminuir el pH de la preparación, de forma que el ADN cromosómico desnaturalizado coagula y precipita mientras que el ADN plasmídico se mantiene intacto.
10. Añadir 72 µl de NaCl 5M que favorece la precipitación de todos los componentes celulares no plasmídicos.
11. Añadir 800 µl de solución TE-fenol (T9) y se centrifuga a 14.000 x g durante 5 min. La fase superior se recoge y se traspasa a otro tubo de 1,5 ml. Se añade 400 µl de TE-fenol (T9) y 400 µl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar 5 min a 14000 xg.
12. Traspasar la fase superior a un nuevo tubo y adicionar 800 µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 14.000 x g durante 5 min.
13. Recoger la fase superior y traspasarla a un nuevo tubo de 1,5 ml.
14. Adicionar 2,5 volúmenes de etanol frío y se mezcla por inversión del tubo.
15. Mantener a -80°C durante un mínimo de 30 min.
16. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
17. Eliminar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 70%.
18. Centrifugar 5 min a 14.000 x g.
19. Eliminar el sobrenadante y secar a 60°C durante 10 min.
20. Añadir 9 µl de TE (pH 8,0) y 1µl de solución de ribonucleasa (10 mg/ml, T7) para resuspender el ADN plasmídico obtenido y eliminar el ARN. Dejar resuspender 30 min a 37°C.
21. Añadir 1 µl de solución transportadora I (T13).
22. Separar los plásmidos obtenidos en un gel de agarosa del 0,7% durante 2 horas a 80 mA.

5.5.4.2. RAPD-PCR

El genotipado mediante RAPD-PCR se realizó utilizando dos cebadores. Se probaron cuatro cebadores (R1, R2, R5 y M3R, Tabla 9) considerando su capacidad para discriminar entre cepas de la misma especie (de enterococos, lactobacilos y CGC+) y su reproducibilidad. Los cebadores R5 y M13R2 resultaron ser los más apropiados para la caracterización de las cepas de las comunidades microbianas a estudiar.

Las condiciones para la RAPD-PCR fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración final
Tampón de PCR (Roche Diagnostics)	1X
dNTPs (Invitrogen) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	200 μ M cada nucleótido
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM (M13R2) 2,5 mM (R5)
Cebador (R5 ó M13R2)	0,8 μ M
Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics)	1 U/ 25 μ l
ADN muestra	100 ng/reacción
Volumen final	25 μ l

Se utilizaron 2 programas de amplificación diferentes, dependiendo del cebador utilizado:

Cebador R5	Cebador M13R2
Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C	Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C
40 ciclos de:	35 ciclos de:
Desnaturalización: 1 min a 94°C	Desnaturalización: 1 min a 94°C
Unión de los cebadores: 1,5 min a 29°C	Unión de los cebadores: 1 min a 38°C
Extensión: 2 min a 72°C	Extensión: 1 min a 72°C
Extensión final: 5 min a 72°C	Extensión final: 5 min a 72°C

Tras la amplificación, 10 μ l del producto de PCR se mezcló con 1 μ l de solución transportadora I (T13). Y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos de ADN amplificados. Se utilizó geles de 1,5% de agarosa (BioRad, Hercules, Ca., EUA) teñidos con 0,1 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma Chemical Comp., Missouri, EE.UU.). En dos calles de cada gel se dispuso el marcador de pesos moleculares 1 kb *DNA ladder* (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) para la normalización del gel. La electroforesis se realizó a 80 mA durante 100 min. Los perfiles de bandas obtenidos se visualizaron con luz UV y se digitalizaron utilizando el *Gelprinter photodocumentation equipment* (TDI, Barcelona, España).

5.5.4.3. Análisis informático de los patrones de bandas obtenidos

Los patrones de bandas obtenidos en la técnica de RAPD-PCR y los perfiles plasmídicos se analizaron utilizando el programa informático Fingerprinting II Informatrix (BioRad, Hercules, Ca., EUA). Este programa permite la conversión, normalización y análisis de los patrones de bandas obtenidos. Los perfiles de RAPD obtenidos con cada cebador se combinaron y compararon utilizando el coeficiente Dice y el análisis de grupos o *clusters* se realizó utilizando el algoritmo UPGMA (método de pares o grupos no ponderados empleando medias aritméticas, *unweighted pair-group method with arithmetic average*).

5.6. ELABORACIÓN DE EMBUTIDOS

Se elaboraron dos tipos de productos, fuet y chorizo con la siguiente composición:

Fuet	g/kg	Chorizo	g/kg
Carne de cerdo (-4 ^a C)	500	Carne de cerdo (-4 ^a C)	500
Tocino	500	Tocino	500
NaCl	20	NaCl	20
Pimienta negra	2,5	Pimentón dulce	15
Dextrosa	1	Pimentón picante	15
Nitrato sódico	0,1	Ajo en polvo	3
Nitrito potásico	0,1	Dextrosa	1
Ascorbato	0,5		

La carne y el tocino de cerdo se trituraron hasta un tamaño de partícula de 6 mm a temperatura de refrigeración (4-5°C) en una cutter (Tecmaq, España). A esta mezcla se le añadieron las cepas de cultivos iniciadores seleccionadas ($2 \cdot 10^5$ ufc/g de mezcla, cada cepa) y/o los microorganismos patógenos (generalmente a niveles de $2 \cdot 10^2$ ufc/g de mezcla) según las características a evaluar.

La mezcla se homogeneizó con el resto de ingredientes en una mixer (modelo 35P; Tecnotrip S.A., Terrassa, Barcelona, España), y la massa final se embutió en tripas artificiales de colágeno (Fribran, Sant Joan de les Abadesses, Girona) utilizando una máquina embutidora (modelo H15, Tecnotrip, S.A.). Cada embutido presentó un peso aproximado de 250 g y un diámetro de 32 mm.

El proceso de fermentación y maduración se realizó en una cámara climática (modelo MLR-350H. Sanyo Electric Co., Ora-Gun, Japón) a 12°C con una humedad relativa >95% al inicio del proceso que disminuyó hasta el 80% (al décimo día) durante 21 días.

5.7. TRATAMIENTO DE ALTA PRESIÓN

Las muestras de embutido, una vez finalizado el proceso de fermentación y maduración, se envasaron al vacío en bolsas de poliamida-polietileno (Sacoliva, España). El tratamiento por alta presión consistió en 400 MPa a 17°C durante 10 min y se llevó a cabo en una unidad industrial de presurización hidrostática (Alstom, Francia) con una cámara de 320 l de volumen y 280 mm de diámetro. El fluido de presurización fue agua y el calor adiabático generado fue 5°C.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante dos programas informáticos, el ya comentado Fingerprinting II Informatrix (BioRad, Hercules, Ca., EUA) y el SAS (SAS Institute Inc., 1988).

El programa SAS se utilizó para el estudio de las características de las muestras. Para determinar la significancia de las diferencias entre resultados se realizó el análisis de la varianza utilizando el método no-paramétrico one-way ANOVA. Las variables analizadas fueron los recuentos microbianos y los parámetros físico-químicos considerando los dos tipos de embutido (fuet-salchichón y chorizo). Los datos se representaron mediante gráficos de box-and-whiskers ("caja y bigotes"). Este tipo de representación gráfica proporciona información sobre el mínimo, el máximo la mediana de la distribución, el primer y tercer cuartil (25 por ciento y 75 por ciento de los valores respectivamente). Los cuartiles delimitan los bordes de la caja, y los valores mínimo y máximo la longitud de los bigotes.

El programa Fingerprinting II Informatrix se utilizó en el análisis de los patrones de bandas obtenidos en la determinación de los perfiles plasmídicos y mediante RAPD-PCR. Los datos se transforman a formato binario; la presencia de banda se representa por la unidad y su ausencia por el cero y con ellos se construyó la matriz de similitud utilizando el coeficiente Dice. El análisis de clusters y la construcción del dendograma se realizó mediante el algoritmo UPGMA. Este programa informático permite, además, el estudio de otro tipo de datos, como por ejemplo caracteres fenotípicos (susceptibilidad a antibióticos, capacidad proteolítica y lipolítica, la producción de aminas biógenas, etc.) o la presencia o ausencia de genes (como los relacionados con factores de virulencia en enterococos) y su utilización simultánea con los patrones obtenidos mediante las técnicas de genotipado para una caracterización global de los organismos. Todos estos caracteres se tradujeron a valores numéricos antes de su utilización: La presencia/ausencia de un determinado gen y la resistencia/sensibilidad a un determinado antibiótico se representó con los valores "1"/"0", respectivamente. Para el tratamiento de estos datos mediante el programa Fingerprinting II Informatrix se definió la matriz de similitud utilizando el coeficiente *Simple matching* (Sm), el cual mide las coincidencias y diferencias entre los fenotipos o características estudiadas. De esta forma se obtuvo una matriz de similitud que fue sujeta al análisis de grupos o clusters utilizando el algoritmo UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES ESPECIES BACTERIANAS DE INTERÉS TECNOLÓGICO Y ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA E HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS LIGERAMENTE ÁCIDOS.

ARTÍCULO I

Teresa Aymerich, Belén Martín, Margarita Garriga y Marta Hugas (2003)

Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Non-pathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages.

Applied and Environmental Microbiology. **69**, 4583-4594.

En este primer bloque del trabajo se estudiaron muestras de fuet y chorizo adquiridas en comercios locales. Se evaluaron tanto las características físico-químicas como microbiológicas de los productos para conocer la calidad microbiológica de este tipo de embutidos. Todas las muestras presentaron valores de pH comprendidos entre 5,3 y 6,4, aunque se estableció que los fuets presentaban un pH significativamente mayor (5,94 de media) comparado con los chorizos (5,52). El 70,6% de las muestras presentaron una buena calidad microbiológica, ya que no se detectaron los patógenos estudiados (*L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* spp.) y los recuentos de enterobacterias y enterococos fueron inferiores a 10^2 y 10^4 , respectivamente.

Para la detección de las principales especies de BAL y CGC+ en estos embutidos, se desarrollaron técnicas de PCR específica de especie. Las especies más relevantes fueron *L. sakei* y *S. xylosum*, detectadas en todas las muestras analizadas. El resto de especies presentaron

diferencias con respecto al tipo de embutido. *L. curvatus* se detectó en el 80% de fuets y en el 57% de chorizos. *L. plantarum*, en cambio, se detectó en un 50% de los fuets y en el 100% de los chorizos. *S. epidermidis* y *S. carnosus* se detectaron sólo en el 11,8% y 5,9% de los chorizos, respectivamente. *Lactococcus lactis*, *S. warneri* y *S. simulans* no se detectaron en ninguna de las muestras.

La identificación de las principales especies de BAL y CGC+ directamente de las muestras enriquecidas, sin aislamiento previo de las colonias, permitió reducir el trabajo y tiempo empleado para la identificación de la composición bacteriana de las muestras.

6.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS.

ARTÍCULO II

Belén Martín, Anna Jofré, Margarita Garriga, Marta Hugas y Teresa Aymerich (2004).
Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method.
Letters in Applied Microbiology **39**, 290-295

ARTÍCULO III

Anna Jofré , Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas, Maria Pla, David Rodríguez-Lázaro y Teresa Aymerich (2005)
Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham.
Food Microbiology **22**, 109-115.

Para un control eficiente de la seguridad microbiológica de los embutidos fermentados se necesitan técnicas rápidas para la identificación y/o recuento de los microorganismos patógenos a estudiar.

En el presente trabajo, se desarrolló una técnica para la enumeración de *L. monocytogenes* que combinó el método del número más probable (NMP) y la identificación mediante PCR específica validada en el proyecto europeo FOOD PCR. El método desarrollado se comparó con el recuento de *L. monocytogenes* mediante plaqueo en agar Palcam. Sólo el uso del método de NMP-PCR permitió el recuento de *L. monocytogenes* en todas las muestras analizadas. Esta técnica resultó ser un método útil para la enumeración de *L. monocytogenes* en embutidos fermentados, incluso en muestras con bajos niveles de contaminación. Se consiguió, además, reducir el tiempo de análisis necesario; el recuento e identificación se completó en 2 días mientras que el método tradicional (ISO11290-2) requiere un mínimo de siete días para la identificación inequívoca de *L. monocytogenes*.

Para la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* se desarrolló un sistema de PCR-multiplex que permitió la identificación de ambos patógenos de forma simultánea en una sola reacción. Para asegurar la detección de ambos patógenos se realizaron enriquecimientos independientes en agua de peptona y caldo Half Fraser de las muestras. Además, se diseñaron controles internos de amplificación (CIA) para monitorizar los ensayos y reducir al máximo la posibilidad de obtener resultados falsos negativos. La PCR-multiplex desarrollada permitió la detección simultánea de ambos patógenos a partir del enriquecimiento de las muestras y también la confirmación de colonias de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. directamente de las placas de agar, sin extracción previa del ADN.

6.3. ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD GENÉTICA Y CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA E HIGIÉNICO-SANITARIA DE LAS PRINCIPALES COMUNIDADES MICROBIANAS DE INTERÉS TECNOLÓGICO EN LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

ARTÍCULO IV

Teresa Aymerich, Belén Martín, Margarita Garriga, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Marta Hugas

Safety properties and strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages (enviado).

ARTÍCULO V

Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas y Teresa Aymerich.

Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages.

Journal of Applied Microbiology (aceptado).

ARTÍCULO VI

Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Teresa Aymerich.

Molecular, technological and safety characterization of gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages (enviado).

El estudio de la calidad microbiológica de los EFLA se completó con la caracterización de las comunidades microbianas más importantes en estos productos. Esta caracterización consistió en la identificación a nivel de especie de 250 aislados de BAL, 106 aislados de enterococos y 240 aislados de CGC+ de muestras de fuet, chorizo y salchichón. Posteriormente se realizó una tipificación molecular de los aislados mediante RAPD y análisis del perfil plasmídico (sólo en BAL y CGC+) y se estudiaron las principales características de interés higiénico-sanitario y tecnológico de las cepas. El objetivo final de esta caracterización fue conseguir un detallado conocimiento de las comunidades así como la evaluación individual de las cepas para su posible uso como cultivos iniciadores en la elaboración de EFLA.

Mediante PCR específica de especie se identificó un 74% de los aislados de BAL como *L. sakei* y un 21,2% como *L. curvatus*. El resto de cepas de BAL (4,8%) se identificó mediante secuenciación del gen ARNr 16S como *Leuc. mesenteroides*. La variabilidad intra-específica, determinada por RAPD-PCR y perfiles plasmídicos, fue elevada en *L. sakei* y *Leuc. mesenteroides* (60,5% y 75%, respectivamente), y bastante inferior en *L. curvatus* (43,4%).

La actividad aminoácido-descarboxilasa se asoció a la especie *L. curvatus* (el 67,9% de los aislados de esta especie presentaron actividad aminoácido descarboxilasa). Mediante la secuenciación parcial del gen *tyrdc* de 2 cepas de *L. curvatus* productoras de tiramina (CTC6513 y CTC6677), se diseñó una pareja de cebadores para la detección por PCR del gen *tyrdc* de *L. curvatus*.

L. sakei y *L. curvatus* no presentaron grandes diferencias en cuanto a perfil de resistencias a antibióticos, excepto por la mayor prevalencia de resistencia a β -lactámicos en *L. sakei* respecto a *L. curvatus*.

La identificación de los aislados de enterococos se realizó mediante PCR-multiplex y por secuenciación de los genes ARNr 16S y *sodA*. *E. faecium* fue la especie de enterococos predominante (51,9%) en los EFLA, seguida por *E. faecalis* (14,2%), *E. hirae* (13,2%), *E. durans* (13,2%), *E. casseliflavus/flavescens* (5,7%), *E. mundtii* (0,94%) y *E. gallinarum* (0,94%). El análisis numérico de los patrones de bandas obtenidos por RAPD-PCR permitió el establecimiento de 60 perfiles diferentes indicando una gran variabilidad genética.

Todas las cepas de *E. faecalis* presentaron genes asociados a factores de virulencia (*efaAfs*, *esp*, *agg* and *gelE*) y todos los aislados de *E. faecium* presentaron el gen *efaAfm*. *E. faecalis* presentó mayor resistencia a antibióticos que el resto de las especies de enterococos estudiadas. Tan sólo una cepa de *E. faecium* presentó el genotipo *vanA* (que confiere resistencia de alto nivel a la vancomicina) y todos los aislados de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/flavescens* presentaron los genes *vanC1* y *vanC2/C3* (que confieren resistencia de bajo nivel a la vancomicina), respectivamente.

La identificación de los aislados de CGC+ (mediante PCR específica de especie y amplificación de la región intergénica 16S-23S ARNr) demostró que *S. xylosus* es la especie predominante en los EFLA (80,8%) seguida por *S. warneri* (8,3%), *S. epidermidis* (5,8%), *S. carnosus* (4,6%) y *K. varians* (0,4%). La combinación de RAPD-PCR y perfiles plasmídicos permitió la discriminación de 208 perfiles diferentes a partir de los 240 aislados de CGC+ estudiados, indicando asimismo una gran diversidad genética, superior a la obtenida en las BAL y los enterococos.

Un 23% de los aislados presentaron actividad proteolítica, siendo *S. warneri* la especie con mayor porcentaje de cepas proteolíticas. El 45,8% de los aislados presentó actividad lipolítica y *S. xylosus* fue la especie con mayor proporción de aislados lipolíticos.

La tiramina fue la amina biógena producida en mayor cantidad por los CGC+, aunque sólo por un pequeño porcentaje de aislados (4,6%). La amina biógena más común fue la feniletilamina, producida por un 10,8% de aislados, aunque a niveles más bajos que la tiramina.

Todos los aislados de CGC+ fueron susceptibles al linezolid y a la vancomicina y más de un 70% fueron resistente a la penicilina G, a la ampicilina y a las sulfonamidas. Un pequeño porcentaje de aislados fueron *mecA*⁺ (4,6%), presentando además resistencia a múltiples antibióticos. El potencial enterotoxigénico de las cepas de CGC+ fue muy reducido (3,3% de los aislados), detectándose únicamente el gen *entC*.

En base a las propiedades estudiadas y a su prevalencia en embutidos fermentados, *L. sakei* y *S. xylosus* se mostraron como las especie de elección para el uso como cultivo iniciador en la producción de embutidos fermentados. Por el contrario, *E. faecalis* fue la principal especie de enterococo asociada a factores de virulencia y resistencia a antibióticos, por lo que su presencia en embutidos fermentados debería ser evitada.

6.4. ESTANDARIZACIÓN Y MEJORA HIGIÉNICO-TECNOLÓGICA DE LOS EMBUTIDOS POCO ÁCIDOS

ARTÍCULO VII

Margarita Garriga, Begonya Marcos, Belén Martín, Marta Hugas, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Teresa Aymerich

Starter cultures and HHP in order to improve hygienic and sanitary properties of the slightly fermented sausages. (Enviado)

El estudio pormenorizado de las muestras de embutidos fermentados ligeramente acidificados y de las comunidades bacterianas de interés presentes en ellas permitió la selección de 2 cepas de *L. sakei* (CTC6626 y CTC6469) y 2 cepas de *S. xylosus* (CTC6013 y CTC6169) con características tecnológicas e higiénico-sanitarias óptimas para su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de estos embutidos. Para evaluar su efectividad como cultivos iniciadores se elaboraron dos tipos de productos, chorizo y fuet, inoculados con microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus*). De cada tipo de producto se elaboraron dos lotes, uno de ellos adicionado de los cultivos iniciadores y el otro sin la adición de las cepas seleccionadas.

Para la monitorización de la implantación de las cepas se utilizó las técnicas de RAPD-PCR y perfiles plasmídico empleadas en la caracterización previa de las cepas de las comunidades microbianas estudiadas. *L. sakei* CTC6626 y *S. xylosus* CTC6013 predominaron sobre *L. sakei* CTC6469 y *S. xylosus* CTC6169 en los dos tipos de embutidos fabricados.

El uso de cultivos iniciadores permitió el control de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus* spp. así como del contenido en aminos biógenos, ya que consiguen una reducción del pH hasta valores inferiores a 5,3 en el séptimo día del proceso de elaboración de los embutidos fermentados ligeramente acidificados. En los días posteriores de la maduración, el pH remontó hasta alcanzar los valores típicos de este tipo de embutidos ($\geq 5,3$). Los recuentos de *L. monocytogenes* y *S. aureus* fueron inferiores en los lotes de fuet, debido a la mayor proporción de nitratos y nitritos presentes en el fuet en comparación al chorizo. Los recuentos de *Salmonella* spp. disminuyeron de forma significativa durante la maduración de los embutidos, independientemente del uso de cultivos iniciadores.

El uso del tratamiento de alta presión (400 MPa) en los embutidos madurados consiguió la ausencia de *Salmonella* spp. en los lotes tratados. También permitió la reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* en los lotes elaborados sin cultivos iniciadores, aunque no alcanzaron valores tan bajos como los conseguidos con el uso de cultivos iniciadores. La presurización de los embutidos madurados disminuyó la acumulación de tiramina y evitó la producción de putrescina y cadaverina durante el almacenamiento del fuet sin cultivo iniciador.

6.5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES

Este trabajo contribuye a un mejor conocimiento de los embutidos fermentados, en concreto aquellos caracterizados por una baja acidificación. Los productos estudiados comprendieron chorizos de pequeño calibre y generalmente madurados en frío, fuets y salchichones de tipo tradicional, todos con un pH superior a 5,3. Se analizaron tanto parámetros físico-químicos como microbiológicos para el estudio de este tipo de embutidos con el fin de contribuir a la mejora de su calidad y salubridad.

Existen muy pocos estudios relacionados con productos cárnicos fermentados poco ácidos, pero sí se ha demostrado que deficiencias de tipo higiénico pueden causar pérdidas de hasta un 25% de la producción que, además de las graves consecuencias económicas que conlleva, supone la pérdida de confianza del consumidor en este tipo de productos (Demeyer *et al.*, 2000).

La mayoría de embutidos tradicionales se elaboran sin la adición de cultivos iniciadores por lo que en el proceso de fermentación participan microorganismos aportados por la contaminación natural de la materia prima e ingredientes utilizados. Esta microbiota no sólo está constituida por microorganismos de interés tecnológico para la elaboración de los embutidos (LAB y CGC+) sino que también pueden aparecer microorganismos patógenos y otros relacionados con el deterioro del producto.

La seguridad alimentaria es una de las principales preocupaciones de la Unión Europea (Anónimo, 1999c) y también de los consumidores, por lo que el estudio de la calidad microbiológica (tanto a nivel higiénico como tecnológico) de este tipo de embutidos es crucial para aportar a los productores una base para la estandarización de la producción y la obtención de productos seguros y de alta calidad.

En ninguna de las muestras de embutidos analizadas se detectó la presencia de *Salmonella* spp. Este patógeno se encuentra con frecuencia en las canales de cerdo (Giovanacci *et al.*, 2001; Pala y Sevilla, 2004) y aunque se le considera responsable del 30% de las muertes en intoxicaciones de origen alimentario (Mead *et al.*, 1999) muy pocos brotes de salmonelosis se han asociado con el consumo de embutidos fermentados (van Netten *et al.*, 1986; Hartog *et al.*, 1987).

La presencia de *S. aureus* se detectó en un 5,9% de las muestras. Este microorganismo está considerado como uno de los principales causante de gastroenteritis por consumo de alimentos contaminados (Balaban y Rasooly, 2000; Le Loir *et al.*, 2003). Su importancia como patógeno se debe a que combina la producción de toxinas con una importante capacidad invasiva y la resistencia a antibióticos (Le Loir *et al.*, 2003). *S. aureus* es endémico en el entorno fabril cárnico (Borch *et al.*, 1996) por lo que su presencia en la carne de cerdo no es infrecuente (Atanassova *et al.*, 2001; Pala y Sevilla, 2004). La presencia de *S. aureus* y sus enterotoxinas han producido varios brotes de intoxicaciones alimentarias por consumo de embutidos fermentados contaminados, especialmente salami (Smith y Palumbo, 1980).

L. monocytogenes, anteriormente considerada un patógeno emergente, se ha establecido en los últimos años como un importante patógeno alimentario. Aunque menos frecuente que *Salmonella* spp. y *S. aureus*, su elevada prevalencia en alimentos unido a la severidad de la listeriosis supone un importante riesgo para la salud humana, concretamente para los grupos más sensibles de la población (Anónimo, 1999a). En este trabajo, *L. monocytogenes* se detectó en un 17.6% de las muestras, aunque los recuentos no superaron los 4 NMP/g en ningún caso. *L. monocytogenes* se caracteriza por su ubicuidad por lo que con frecuencia se aísla en plantas de procesado de embutidos así como en carnes y productos cárnicos (Schuchat *et al.*, 1991; Ryser, 1999). Durante el proceso de elaboración de embutidos *L. monocytogenes*, que es psicrófila y relativamente resistente a los agentes curantes, puede sobrevivir (Johnson *et al.*, 1988; Junttila *et al.*, 1989) aunque los niveles en el producto final suelen ser bajos. En estudios europeos recientes se han detectado entre un 1-16% de *Listeria* en productos cárnicos fermentados (AFSSA, 2000). Sin embargo, no se conoce ningún brote de listeriosis relacionado con el consumo de embutidos fermentados. Actualmente, no existe norma microbiológica para este microorganismo en la legislación española, pero la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) ha establecido que 100 ufc de *L. monocytogenes* por gramo de alimento es el límite aceptable para consumidores de bajo riesgo (International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1996; Nørrung, 2000). El gobierno de Estados Unidos, en cambio, mantiene una política más rígida con respecto a *L. monocytogenes* y ha establecido un nivel de tolerancia cero en alimentos listos para el consumo (Ryser, 1999).

De las muestras analizadas, el 94% cumplían las normas microbiológicas establecidas en las legislación española para este tipo de productos cárnicos (BOE, 1977). Sin embargo, desde un punto de vista higiénico más estricto, la presencia de *L. monocytogenes* así como recuentos elevados de enterobacterias y enterococos (superiores a 10^2 y 10^4 , respectivamente) no son deseables. Tanto enterobacterias como enterococos son microorganismos con un gran potencial aminogénico y, dado que la mayoría de las muestras presentan recuentos bajos, pueden considerarse parámetros de calidad. Unas buenas prácticas higiénicas de fabricación y materias primas de calidad són importante parámetros para obtener embutidos sin *L. monocytogenes* y con recuentos de enterobacterias y enterococos bajos. De esta forma, puede minimizarse el riesgo para la salud de los consumidores.

En el estudio de las propiedades físico-químicas de las muestras, el pH fue la característica más destacable. Se observó que estaba correlacionado con los recuentos de BAL, CGC+ y enterococos de forma significativa. También el contenido en cloruro sódico pudo correlacionarse de forma significativa con los recuentos de CGC+ y enterococos. Los recuentos de enterobacterias no pudieron correlacionarse ni con pH ni con a_w , aunque sí se observó que todas las muestras que presentaron microorganismos patógenos y mayores recuentos de enterobacterias y enterococos mostraron valores de a_w superiores a 0,85.

Para un control eficiente de la seguridad microbiológica de los embutidos fermentados se necesitan técnicas rápidas para la identificación y/o recuento de los microorganismos patógenos a estudiar. También en el establecimiento de sistemas de análisis y control de puntos críticos

(APPCC) la disponibilidad de técnicas rápidas agiliza los controles a realizar y de esta manera la producción no se ve entorpecida.

Tradicionalmente la identificación de microorganismos patógenos se ha basado en métodos de cultivo e identificación bioquímica, pero estos procedimientos suelen ser largos y laboriosos. Concretamente, el recuento de *L. monocytogenes* y la investigación *Salmonella* spp. suelen requerir entre una semana y 10 días si se siguen los estándares de la ISO (ISO 11290-2 y ISO 6579:2002; Anónimo 1998 y 2002a). En los últimos años han aparecido un gran número de métodos de PCR para la detección de microorganismos en muestras clínicas y alimentos (Stone *et al.*, 1994; Rijpens y Herman, 2002; Hoorfar y Cook, 2003; Malorny *et al.*, 2003). El principal inconveniente que presenta esta técnica radica en que algunos compuestos de los alimentos así como determinados componentes de los caldos de enriquecimiento pueden influir en la efectividad de la PCR e incluso inhibir la reacción (Rossen *et al.*, 1992; Abu Al-Soud y Radström, 2001; Lantz *et al.*, 2000). Por eso, la implementación de técnicas de PCR como métodos de rutina en los laboratorios de diagnóstico requiere un control para verificar la exactitud de los resultados obtenidos. En este trabajo se han desarrollado técnicas de PCR para la investigación de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra y para la identificación y recuento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos. Para evitar la presencia de inhibidores de PCR se desarrollaron tratamientos pre-PCR de las muestras a analizar y se diseñaron controles internos de amplificación (CIA) para monitorizar los ensayos y reducir al máximo la posibilidad de obtener resultados falsos negativos.

A nivel europeo, se ha desarrollado el proyecto FOOD-PCR (QLK-CT-1999-00226) con el objetivo de validar métodos de PCR para la detección de patógenos en alimentos. A partir de las técnicas validadas en este proyecto se desarrolló un sistema de PCR-multiplex que permitió la identificación de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* de forma simultánea en una sola reacción.

Este método tiene aplicación tanto en la identificación de colonias de las placas de agar como en la detección directa de muestra de *Salmonella* y *L. monocytogenes*. En este último caso, la técnica requiere de un paso previo de enriquecimiento de la muestra. Aunque se intentó un enriquecimiento simultáneo de la muestra en ambos patógenos, el crecimiento de *Salmonella* spp. superó siempre al de *Listeria* de forma similar a los resultados obtenidos por Bailey y Cox (1992). El enriquecimiento por separado en agua de peptona y HF permitió recuperar *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, respectivamente. Posteriormente, la mezcla de ambos caldos de enriquecimiento y la purificación del ADN (mediante tratamiento con Chelex-100) permitió la identificación simultánea de ambos microorganismos por PCR.

Una estrategia importante para evaluar la validez de los resultados de PCR es el uso de CIA (Hoorfar *et al.*, 2003). El uso de un CIA facilita la interpretación de los resultados negativos de PCR, ya que siempre debe aparecer su señal cuando la secuencia diana no está presente. De esta forma pueden detectarse fallos o inhibiciones de la PCR, por lo que su uso es de especial importancia en muestras complejas como los productos cárnicos.

En el presente trabajo, se desarrolló una técnica para la enumeración de *L. monocytogenes* que combinó el método del número más probable (NMP) y la identificación mediante PCR específica desarrollada en el proyecto europeo FOOD PCR (D'Agostino *et al.*,

2004). El medio de enriquecimiento utilizado para el NMP fue Half Fraser (HF). Este medio permite el crecimiento selectivo de *Listeria* spp., de gran importancia en aquellos alimentos que como los embutidos fermentados se caracterizan por un elevado número de microbiota acompañante que puede interferir en el ensayo (Buchanan *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1995, Cápita y Alonso-Calleja, 2003). No obstante el medio HF inhibe la PCR por lo que fue necesario un tratamiento previo a la reacción. Se ensayaron dos tratamientos pre-PCR: una técnica de filtración en filtro de nylon (25 μm de diámetro de poro) y un tratamiento con la resina Chelex-100. Con ambos métodos se consiguieron evitar los inhibidores presentes en el caldo HF. La principal ventaja del uso de la técnica de NMP acoplada a PCR es la gran sensibilidad que se consigue (pueden detectarse niveles de *L. monocytogenes* comprendidos entre 1-3 NMP/g de muestra); además, en tan sólo 2 días se completa la enumeración sin necesidad de equipos adicionales y/o complejos.

El estudio de la calidad microbiológica de los EFLA se completó con la caracterización de las comunidades microbianas más importantes en estos productos. Las BAL y los CGC+ son los principales grupos bacterianos de interés tecnológico en la fermentación y maduración de los embutidos curados. Los recuentos de BAL y CGC+ de los embutidos estudiados fueron muy similares, a diferencia de otros embutidos más ácidos en los que las BAL predominan (Hugas *et al.*, 1993). Un acusado predominio de las BAL respecto a los CGC+ se traduce en un producto de menor aroma y gusto más ácido (Metaxopoulos *et al.*, 2001) mientras que los embutidos con recuentos elevados de CGC+ contienen más compuestos aromáticos (Demeyer *et al.*, 2000). Según Montel *et al.* (1998) en los embutidos fermentados de pH elevado, especies de estafilococos de elevada capacidad lipolítica podrían contribuir a la formación de compuestos volátiles. El pH, además, es un factor limitante en el desarrollo del aroma, dado que a valores inferiores a 5,0 las reacciones metabólicas se ven desfavorecidas.

La elucidación de la composición de la microbiota tecnológica de los embutidos se realizó mediante técnicas moleculares. En una primera aproximación, se procedió a la detección de las principales especies de interés mediante PCR específica de especie a partir de muestra directa con o sin enriquecimiento. En una segunda estrategia se seleccionaron de forma aleatoria 250 cepas de BAL, 240 cepas de CGC+ y 106 cepas de enterococos de las muestras de EFLA y posteriormente se procedió a su identificación utilizando los sistemas de PCR desarrollados.

Tradicionalmente, la identificación de BAL y CGC+ se ha realizado mediante métodos bioquímicos. Este tipo de identificación no sólo es laboriosa, sino que además no siempre es fiable debido a la expresión variable de algunos caracteres fenotípicos (Kandler y Weiss, 1986; Hastings y Holzapfel, 1987; Sierra *et al.*, 1995). En los últimos años, el desarrollo de técnicas moleculares ha facilitado en gran medida la identificación de estos microorganismos. Métodos como la secuenciación del gen ARNr 16S (Kloos *et al.*, 1997; Angeletti *et al.* 2001) y del gen *sodA* (Poyart *et al.*, 2000 y 2001), PCR específica de especie (Dutka-Malen *et al.*, 1995; Morot-Bizot *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004) y PCR a tiempo real (Edwards *et al.*, 2001; Furet *et al.*, 2004) se han utilizado con éxito en la identificación de BAL y CGC+.

En este estudio se diseñaron sistemas de PCR para la detección de 6 especies de BAL y 6 especies de CGC+. La identificación por PCR directa de muestra requirió un paso previo de enriquecimiento (en caldo MRS y MSA para la detección de BAL y CGC+, respectivamente) para incrementar el nivel de detección. Mediante este procedimiento se detectó *L. sakei* y *S. xylosus* en todos los embutidos analizados. De la misma forma, en todas las muestras se identificó uno o más aislados pertenecientes a estas especies.

L. plantarum sólo fue detectado en muestra directa, ninguno de los aislados de embutidos que posteriormente se identificaron pertenecieron a esta especie. *L. curvatus* se detectó en más muestras por PCR que en la selección de aislados. Esto parece indicar que, en estas muestras, *L. plantarum* y *L. curvatus* presentaban recuentos inferiores a los de *L. sakei*, por lo que todos los aislados pertenecieron a esta última especie. No obstante, el enriquecimiento en caldo MRS pareció favorecer el crecimiento de *L. plantarum* y *L. curvatus* alcanzando niveles similares o incluso superiores a los de *L. sakei*, facilitando así su identificación.

De forma contraria, *S. warneri* y *K. varians* no se detectaron directamente de las muestras enriquecidas en caldo MSA y sin embargo se identificaron algunos aislados pertenecientes a estas especies. El enriquecimiento de las muestras en caldo MSA parece favorecer el crecimiento de *S. xylosus* respecto a *S. warneri* y *K. varians*, lo que dificulta la identificación de los últimos en la muestra enriquecida.

Una selección de cepas de las placas de agar y su posterior identificación permite la detección de aquellas especies que se encuentran en mayor número en los embutidos. En la detección por PCR directa, el enriquecimiento puede dar lugar al crecimiento diferencial de determinadas especies o cepas. Esto permite que se detecten especies que, aunque estén presentes en menor número, crezcan eficazmente en los caldos de enriquecimiento. Como inconveniente, las especies con un crecimiento menos competitivo pueden no detectarse.

La prevalencia de *L. sakei* y *S. xylosus* sobre otras especies de BAL y CGC+ obtenida mediante las dos estrategias llevadas a cabo está de acuerdo con los resultados de otros estudios en embutidos del sur de Europa (Comi *et al.*, 1992; Coppola *et al.*, 1996; Hugas *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1998; García-Varona *et al.* 2000; Rossi *et al.*, 2001).

Además de la identificación de las especies bacterianas más relevantes en los embutidos se realizó una caracterización más amplia de las comunidades microbianas que comprendió una tipificación molecular de las cepas y el estudio de características de interés tecnológico e higiénico-sanitario. El objetivo final de esta caracterización fue conseguir un detallado conocimiento de las comunidades y la evaluación individual de las cepas para su posible uso como cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos.

Para la caracterización de la comunidad de BAL se estudiaron 250 aislados de muestras de fuet, chorizo y salchichón. Mediante PCR específica de especie se identificó un 74% de los aislados como *L. sakei* y un 21,2% como *L. curvatus*. El resto de los aislados (4,8%) se identificó mediante secuenciación del gen ARNr 16S como *Leuc. mesenteroides*. Estos resultados son muy similares a los descritos por otros autores en embutidos fermentados

similares del sur de Europa (Hugas *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1998; Parente *et al.*, 2001).

La tipificación molecular de los aislados se realizó mediante 2 técnicas, RAPD-PCR y perfil plasmídico. El uso combinado de ambas metodologías permitió una identificación detallada de las cepas ya que se caracterizaron a nivel cromosómico y extracromosómico. La variabilidad intra-específica en *L. sakei* y *Leuc. mesenteroides* fue elevada (60,5% y 75%, respectivamente), y bastante inferior en *L. curvatus* (43,4%). Se identificaron aislados con perfiles moleculares idénticos que se comprobó que presentaban las mismas características en cuanto a resistencia antibióticos y producción de aminas, por lo que se constató que pertenecían a la misma cepa. Sin embargo, no pudo agruparse todas aquellas cepas que presentaron propiedades fenotípicas comunes en el mismo clúster, hecho que parece indicar la existencia de intercambio de material genético entre la comunidad de BAL. La transferencia genética horizontal entre BAL se ha descrito tanto *in vitro* (Vogel *et al.*, 1991) como en embutidos fermentados (Hertel *et al.*, 1995; Cocconcelli *et al.*, 2003). Para un conocimiento más exhaustivo de los aislados se determinó su capacidad antagonista contra *L. monocytogenes*, su potencial aminogénico y la susceptibilidad a antibióticos.

La producción de bacteriocinas es una característica interesante en aquellas cepas seleccionadas para su uso como cultivo iniciador. Sin embargo, ninguno de los aislados mostraron actividad antagonista contra *L. monocytogenes* y de hecho, la actividad bacteriocinogénica entre lactobacilos es poco frecuente según lo descrito en trabajos previos (Schillinger y Lücke, 1989; Garriga *et al.*, 1993).

La producción de aminas biógenas es un parámetro importante a controlar, ya que éstas suponen un riesgo toxicológico y por tanto, comprometen la seguridad y la calidad de los embutidos. En este estudio, la producción de aminas biógenas se asoció a la especie *L. curvatus*. El 66% de los aislados de *L. curvatus* presentaron actividad aminoácido descarboxilasa, mientras que sólo dos cepas de *L. sakei* (1.1%) produjeron alguna amina biógena (triptamina y putrescina, respectivamente) a bajos niveles. Silla-Santos (1998) en un estudio de lactobacilos aislados de embutidos fermentados españoles no encontró ninguna cepa productora de aminas biógenas. Sin embargo, Bover-Cid *et al.* (2001a) en un estudio de cepas aisladas también de embutidos fermentados, describieron un 94.6% de *L. curvatus* y un 30.8% de *L. sakei* productores de aminas biógenas. De acuerdo con estudios anteriores, la producción de feniletilamina y triptamina fue siempre menor y estuvo ligada a la producción de elevadas cantidades de tiramina (Bover-Cid *et al.*, 2001a). De esta forma, la detección del gen de la tiramina descarboxilasa (*tyrdc*) en una cepa podría utilizarse como referencia de la producción de tiramina y/o feniletilamina y triptamina. Con esta premisa, y mediante la secuenciación parcial del gen *tyrdc* de 2 cepas de *L. curvatus* productoras de tiramina (CTC6513 y CTC6677), se diseñaron una pareja de cebadores para la detección por PCR del gen *tyrdc* de *L. curvatus*. Con anterioridad ya se habían descrito técnicas de PCR para la detección de BAL productoras de tiramina (Lucas y Lonvaud-Funel, 2002; Coton *et al.*, 2004), pero no para la amplificación específica del gen *tyrdc* de *L. curvatus*.

La ausencia de genes de resistencia a antibióticos transferibles está considerada como un importante pre-requisito para la selección de cepas probióticas y cultivos iniciadores seguros (Comisión Europea, 2003). La existencia de genes transferibles supone un riesgo ya que pueden transferirse a microorganismos patógenos dificultando el tratamiento terapéutico de las infecciones causadas por estos patógenos. La mayoría de aislados estudiados en este trabajo presentaron resistencias a pocos antibióticos. Todos los aislados presentaron resistencia a vancomicina de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (Handwerger *et al.*, 1994; Hamilton-Miller y Shah, 1998; Danielsen and Wind, 2003) lo que confirma que en estas especies de BAL (*L. sakei*, *L. curvatus* y *Leuc. mesenteroides*) la resistencia a vancomicina es intrínseca. *L. sakei* y *L. curvatus* no presentaron grandes diferencias en cuanto a perfil de resistencias a antibióticos, excepto por la mayor prevalencia de resistencia a β -lactámicos en *L. sakei* respecto a *L. curvatus*. Tan sólo 8.8% de los aislados (mayoritariamente *L. sakei*) presentaron resistencia a un número elevado de antibióticos, incluyendo resistencias a cloramfenicol y tetraciclina potencialmente transferibles (Comisión Europea, 2003; Danielsen y Wind, 2003).

En base a las propiedades estudiadas y a su prevalencia en embutidos fermentados, *L. sakei* se mostró como la especie de elección para el uso como cultivo iniciador en la producción de embutidos fermentados.

El género *Enterococcus*, aunque numéricamente menos importante que los lactobacilos, puede aparecer en recuentos de hasta 10^5 ufc/g en los embutidos fermentados (Teuber *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2003). Su presencia en los embutidos fermentados es controvertida; mientras algunos autores los consideran microorganismos indeseables, indicadores de contaminación fecal y responsables del deterioro de los productos cárnicos (Franz *et al.*, 1999) durante años se han utilizado como cultivos iniciadores en la producción de quesos, en prebióticos y como cultivos bioprotectores en productos lácticos y cárnicos (Coppola *et al.*, 1998; Centeno *et al.*, 1996; Aymerich *et al.*, 2000).

El estudio de la comunidad de enterococos se realizó a partir de 106 aislados de EFLA. Para su identificación a nivel de especie se empleó PCR específica de especie (Dutka-Malen *et al.*, 1995) y la secuenciación de los genes *sodA* (Poyart *et al.*, 2000) y ARNr 16S. De esta forma se identificó *E. faecium* como la especie predominante (51,9%) seguida por *E. faecalis* (14,2%), *E. hirae* (13,2%), *E. durans* (13,2%), *E. casseliflavus/flavescens* (5,7%), *E. mundtii* (0,94%) y *E. gallinarum* (0,94%). Reuter (1995) también identificó a *E. faecium* como la especie más frecuente en productos cárnicos, aunque en estudios más recientes se ha descrito *E. faecalis* como la especie predominante en alimentos de origen animal (Peters *et al.*, 2003). Las otras especies de enterococos descritas también se han identificado en productos de origen animal aunque en menor proporción que las dos anteriores (Devriese *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2003).

La tipificación molecular de los aislados de enterococos se llevó a cabo mediante RAPD-PCR. El análisis numérico de los patrones de bandas obtenidos permitió el establecimiento de 60 perfiles diferentes que se agruparon en 8 clusters específicos de especie y cuatro cepas independientes. Los distintos grupos y sub-grupos obtenidos no pudieron diferenciarse por las propiedades estudiadas (resistencia a antibióticos y genes de virulencia), hecho que evidencia la

existencia de mecanismos de transferencia genética en la población de enterococos. La identificación de aislados con el mismo perfil molecular dentro de una misma muestra y en muestras de distinta procedencia podría explicarse por el hecho que diferentes productores pueden obtener la carne de los mismos mataderos o salsa de despiece por lo que estas cepas pueden tener un origen común.

En los últimos años, los enterococos han adquirido relevancia clínica dado que se han convertido en la 3ª causa de enfermedades nosocomiales (CDC NNIS System, 1998), especialmente *E. faecalis*, que ha sido implicado en el 80% de las infecciones por enterococos (Morrison *et al.*, 1997). Aunque hasta el momento no se ha demostrado la implicación de enterococos de origen alimentario en infecciones clínicas (Adams, 1999) sí se ha cuestionado su estatus GRAS y por tanto, su uso como cultivo iniciador o probiótico. Los mecanismos de virulencia de los enterococos no se conocen en su totalidad, pero sí se han identificado genes que codifican factores de virulencia (Dunny *et al.*, 1990; Jett *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1998). En este estudio la incidencia de genes de virulencia fue mayor en *E. faecalis* que en *E. faecium* de acuerdo con los resultados de diversos autores, tanto en alimentos como en aislados clínicos (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Semedo *et al.*, 2003; Duprè *et al.*, 2003). El resto de especies identificadas no presentaron ninguno de los factores de virulencia estudiados.

Contribuye también a la patogenicidad, la resistencia de los enterococos a una gran variedad de antibióticos (Murray, 1990; Mundy *et al.*, 2000). Entre todas, la resistencia a vancomicina es la más preocupante, ya que este antibiótico es una de las últimas opciones terapéuticas en el tratamiento de algunas infecciones por bacterias gram-positivas (Wegener *et al.*, 1999). De los 106 aislados estudiados sólo una cepa de *E. faecium* presentó el gen *vanA* (que confiere resistencia de alto nivel a vancomicina y teicoplanina). Las cepas de *E. casseliflavus/flavescens* y *E. gallinarum* presentaron los genes *vanC2/C3* y *vanC1*, respectivamente. Estos genes confieren resistencia de bajo nivel sólo a vancomicina y son intrínsecas en estas especies de enterococos, por lo que no presentan el riesgo de transferencia que se da en los genes *vanA* y *vanB*. Respecto a los otros antibióticos estudiados, *E. faecalis* presentó mayor incidencia de resistencia a antibióticos que el resto de especies de enterococos. *E. faecium*, sin embargo, presentó una mayor incidencia de resistencia a penicilina, tal como mostraron Murray (1990) y Franz *et al.* (2001).

Aunque el riesgo potencial para la salud humana asociado a la presencia de enterococos en embutidos fermentados es bajo, la producción de embutidos sin enterococos con factores de virulencia y resistencias a antibióticos es posible. Por tanto, estas características pueden considerarse no sólo un factor higiénico-sanitario de los EFLA sino también un parámetro de calidad de estos productos. Los factores de virulencia y la resistencia a antibióticos se relacionaron principalmente con *E. faecalis*, por lo que esta especie debe ser evitada en los embutidos y sustituida por *E. faecium* en el uso de enterococos como cultivos iniciadores y/o bioprotectores.

La caracterización de la población de CGC+ se realizó como en las anteriores comunidades a partir de aislados de muestras de EFLA. En la identificación de estos aislados se

empleó la amplificación de la región intergénica 16S-23S ARNr y PCR específica de especie. La mayoría de aislados se identificaron como *S. xylosus* (80,8%) y en menor proporción como *S. warneri* (8,3%), *S. epidermidis* (5,8%), *S. carnosus* (4,6%) y *Kocuria varians* (0,4%). *S. xylosus* predomina en la mayoría de embutidos del sur de Europa (Coppola *et al.*, 1996; García-Varona *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2001). Como en las BAL, la tipificación molecular de los aislados se realizó mediante RAPD-PCR y perfil plasmídico. En los CGC+, el estudio del perfil plasmídico fue la técnica más resolutive ya que, a diferencia de las BAL, la mayoría de cepas presentaron un elevado número de plásmidos. La diversidad genética fue muy elevada en todas las especies de estafilococos estudiadas excepto en *S. carnosus*. En total, mediante la combinación de los resultados de RAPD-PCR y los perfiles plasmídicos, se consiguió distinguir 208 perfiles moleculares diferentes. Por tanto, la diversidad genética de la comunidad de CGC+ fue mayor que la obtenida en los lactobacilos y enterococos estudiados. Como en los casos anteriores, los clusters obtenidos no presentaron propiedades fenotípicas que los diferenciaron entre sí. El elevado número de cepas con plásmidos puede contribuir a la gran biodiversidad de las cepas (Rodríguez *et al.*, 1996) ya que algunos de estos plásmidos pueden intercambiar información genética (Kloos *et al.*, 1980).

Las características organolépticas de los embutidos fermentados están originadas por la actividad enzimática de las BAL y los CGC+ (Demeyer *et al.*, 1974) y por enzimas tisulares de la carne (Hierro *et al.*, 1997 y 1999). Sin embargo, el género *Staphylococcus* parece tener un efecto mayor que las BAL en el desarrollo del flavor de los embutidos (Berdagué *et al.*, 1993), sobretodo en estos embutidos fermentados menos ácidos en los que los CGC+ alcanzan recuentos elevados y próximos a los de las BAL. En la selección de bacterias para su uso como cultivos iniciadores en la producción de embutidos fermentados es importante la elección de cepas con ligera actividad proteolítica y lipolítica para la obtención de productos con propiedades tecnológicas y sensoriales adecuadas (García-Varona *et al.*, 2000). Un 45,8% de los aislados mostró actividad lipolítica moderada; *S. xylosus* fue la especie con el mayor porcentaje de aislados con esta propiedad. El porcentaje de aislados con proteasas fue inferior (23%), aunque algunas cepas (mayoritariamente *S. warneri*) mostraron una elevada actividad proteolítica. Las actividades proteolíticas y lipolíticas descritas en estudios de aislados de embutidos fermentados similares presentaron resultados diversos. García-Varona *et al.* (2000) describieron un elevado porcentaje de aislados con actividad proteolítica y lipolítica en chorizo. Rossi *et al.* (2001), en cambio, encontraron una baja proporción de cepas proteolíticas en embutidos italianos. Por tanto, parece que estas propiedades dependen en gran medida del tipo de producto y de su origen.

En la selección de cultivos iniciadores no sólo deben tenerse en cuenta propiedades tecnológicas, sino que también deben considerarse aspectos higiénico-sanitarios como la actividad aminoácido descarboxilasa y la resistencia a antibióticos de las cepas.

El potencial aminogénico de los CGC+ estudiados fue muy inferior al presentado por las BAL; tan sólo un 14,6% de los aislados produjeron aminas biógenas. Por tanto, la actividad aminoácido descarboxilasa no es una propiedad ampliamente distribuida en la comunidad de CGC+, especialmente en comparación con otros grupos bacterianos importantes en la

fermentación (Masson *et al.*, 1996; Bover-Cid *et al.*, 2001a). La amina producida en mayor cantidad fue la tiramina, especialmente por cepas pertenecientes a las especies más comunes (*S. xylosus* y *S. warneri*). Straub *et al.* (1995) describió un remarcable potencial aminogénico en *S. carnosus*. El 90,9% de los aislados de *S. carnosus* de este estudio produjeron bajas cantidades de feniletilamina, sin producir ninguna otra amina. Sin embargo, las cepas productoras se aislaron de una misma muestra y presentaron perfiles moleculares muy próximos, por lo que la producción de feniletilamina no puede ser asociada a esta especie sino a cepas concretas. Estos resultados confirman que la actividad aminoácido descarboxilasa es cepa-dependiente (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) y dado que los CGC+ pueden alcanzar recuentos elevados en los EFLA es importante evitar la presencia de cepas aminogénicas para reducir el riesgo de acumulación de aminas biógenas en los productos finales.

La presencia de genes de enterotoxinas estafilocócicas no parece común en los CGC+ de embutidos fermentados. En este trabajo sólo un 3,3% de los aislados (principalmente *S. epidermidis*) presentaron el gen *entC* y en la mayoría de estudios sólo se han detectado la presencia de genes de enterotoxinas en *S. aureus*, pero no en otras especies de estafilococos (Rosec y Gigaud, 2002; Blaiotta *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque el porcentaje de cepas con genes de enterotoxinas sea bajo, debe comprobarse que estos genes no están presentes en las cepas seleccionadas para su uso como cultivos iniciadores en embutidos (Rodríguez *et al.*, 1996).

La presencia de resistencia a antimicrobianos en CGC+ de alimentos es preocupante ya que pueden constituir un reservorio, tanto de genes de resistencia a antibióticos de interés clínico como de microorganismos resistentes, que pueden diseminarse vía cadena alimentaria hasta los seres humanos (Wielders *et al.*, 2001; Swartz, 2002; OMS, 2002). En este estudio se detectaron cepas multirresistentes, incluso algunas (4,6%) resistentes a la metilicina, aunque todos los aislados fueron sensibles a la vancomicina. Gardini *et al.* (2003) encontró CGC+ resistentes a metilicina y a vancomicina en embutidos fermentados italianos. Mauriello *et al.* (2000), en cambio, no encontró ningún CGC+ resistente a estos antibióticos en salami italiano. Dado que pueden existir cepas de CGC+ resistentes a antibióticos de interés clínico, la susceptibilidad a antibióticos debe determinarse en todas aquellas cepas de interés para su uso como cultivos iniciadores.

Teniendo en cuenta todas las propiedades estudiadas y la prevalencia de *S. xylosus* en este tipo de embutidos, esta especie es la más recomendable en la elaboración de EFLA. No obstante, para la selección de las cepas deben tenerse en cuenta no sólo la capacidad proteolítica y lipolítica de las mismas, sino que también deben considerarse aspectos higiénico-sanitarios (potencial enterotoxigénico, producción aminas biógenas y resistencia a antibióticos) para asegurar la obtención de productos seguros y de calidad óptima.

Los EFLA son embutidos tradicionales de fabricación local y con procedimientos, hasta hace relativamente poco, totalmente artesanales. El conocimiento y control de la microbiota natural y de los procesos de producción son críticos para obtener una apropiada calidad microbiológica y las características organolépticas deseadas en estos productos. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto en numerosas ocasiones se opta por utilizar

cultivos de microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación del embutido además de inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación (Frey, 1983). Sin embargo, el uso de cultivos iniciadores presentes en el mercado, generalmente destinados a embutidos de tipo más ácido, podría modificar las características organolépticas de los embutidos poco ácidos tradicionales.

El estudio pormenorizado de las muestras de EFLA y de las comunidades bacterianas de interés presentes en ellas permitió la selección de 2 cepas de *L. sakei* (CTC6626 y CTC6469) y 2 cepas de *S. xyloso* (CTC6013 y CTC6169) con características tecnológicas e higiénico-sanitarias óptimas para su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de estos embutidos. Para evaluar su efectividad como cultivos iniciadores se elaboraron dos tipos de productos, chorizo y fuet, inoculados con microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus*). De cada tipo de producto se elaboraron dos lotes, uno de ellos adicionado de los cultivos iniciadores y el otro sin la adición de las cepas seleccionadas.

Los lotes elaborados con cultivos iniciadores presentaron mayores recuentos de BAL y CGC+ durante los primeros días de la fermentación, según lo descrito en estudios previos (Hugas *et al.*, 1995, Bover-Cid *et al.*, 2001b), alcanzando al final del proceso recuentos similares a los obtenidos en las muestras comerciales estudiadas (Aymerich *et al.*, 2003) y en los descritos en otros estudios (Lois *et al.*, 1987; Papa *et al.*, 1990; Comi *et al.*, 1992; Dellapina *et al.*, 1994). De la misma forma, y relacionado con estos mayores recuentos microbianos, el pH de los lotes elaborados con cultivos iniciadores fue inferior durante los primeros días de la fermentación, recuperándose posteriormente hasta alcanzar valores próximos a los característicos de estos productos al final de la maduración (Aymerich *et al.*, 2003).

El uso de cultivos iniciadores impidió el crecimiento de los patógenos inoculados en los embutidos. Los embutidos fermentados constituyen productos estables respecto al crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que constituyen productos de bajo riesgo siempre que el pH sea inferior a 4,5, si presentan una a_w por debajo de 0,90 o bien cuando se combinan un pH <5,5 con una a_w < 0,95 (Anónimo, 2002b). La disminución de pH que se consigue en los lotes elaborados con cultivos iniciadores durante los primeros días de la fermentación permiten inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* de forma similar a los resultados obtenidos por Rödel *et al.* (1993). Los niveles iniciales de *Listeria* spp. en la formulación inicial de los embutidos es baja (Encinas *et al.*, 1999), por lo que una elaboración adecuada que consiga valores de a_w y pH adecuados evitaran el desarrollo de *L. monocytogenes* y el riesgo relacionado con este patógeno en los EFLA. En los lotes de fuet, el crecimiento de *L. monocytogenes* también se vio inhibido, independientemente del uso de cultivos iniciadores. A diferencia del chorizo, en la formulación del fuet se incluyó nitratos y nitritos (100 ppm cada uno) y, aunque el pimentón del chorizo también aporta nitratos y nitritos, la concentración de estos agentes curantes en el chorizo fue muy inferior (54 ppm de nitratos y 0.38 ppm de nitritos). *L. monocytogenes* es relativamente resistente a los agentes curantes (Johnson *et al.*, 1988; Junttila *et al.*, 1989), pero la acción de los nitritos y nitratos acompañados de la reducción de pH y actividad de agua evitan el crecimiento de este patógeno.

Staphylococcus aureus se encuentra frecuentemente en la carne fresca y en embutidos fermentados, pero generalmente en niveles bastante bajos (Lücke *et al.*, 1998). En los lotes de fuet se observó una reducción del crecimiento de *S. aureus* mientras que en chorizo los recuentos se mantuvieron constantes a lo largo del proceso, por lo que los agentes curantes y la disminución de pH resultan efectivos en el control de *S. aureus*. Metaxopoulos *et al.* (1981 a, b) demostró que el pH inicial y la actividad de las BAL son parámetros críticos para el control de este patógeno. Una reducción rápida del pH a 5,3 en los primeros días de fermentación es crítica para evitar el riesgo asociado a *S. aureus* (Lücke *et al.*, 1998). También es eficaz para el control de *S. aureus* una a_w inicial por debajo de 0,955 y realizar la maduración a temperaturas inferiores a 15°C hasta que la a_w haya descendido a valores inferiores a 0,90.

Salmonella es el principal agente etiológico de enfermedades de origen alimentario (Mead *et al.*, 1999, Haeghebaert *et al.*, 2002). Los recuentos iniciales de *Salmonella* spp. disminuyeron significativamente en todos los lotes de embutido. Una disminución rápida de pH a niveles inferiores a 5,3 es suficiente para inhibir el crecimiento de *Salmonella* (Schillinger y Lücke, 1988; Lücke 2000). Los recuentos mínimos de *Salmonella* spp. coincidieron con los valores mínimos de pH (séptimo día de fermentación). Otros factores que inhiben el crecimiento de *Salmonella* spp. son una baja a_w , un elevado número de lactobacilos en la mezcla de carne inicial y el uso de nitratos y/o nitritos (Hechelmann *et al.*, 1974).

El uso de cultivos iniciadores también resultó de gran utilidad en el control de microorganismos relacionados con el deterioro de los embutidos, principalmente enterobacterias y enterococos. Ambos grupos microbianos son importantes productores de aminas biógenas por lo que sus recuentos deben ser reducidos para la obtención de embutidos de calidad óptima.

Las enterobacterias experimentaron un importante crecimiento durante los primeros días de fermentación de los productos elaborados sin cultivos iniciadores, aunque rápidamente disminuyeron hasta los valores iniciales. En los lotes elaborados con cultivos iniciadores, en cambio, los recuentos de enterobacterias se mantuvieron constantes durante todo el proceso, debido al menor pH y mayores recuentos de BAL presentados por estos lotes. En general, las bacterias gram-negativas crecen con dificultad en condiciones ambientales hostiles como las que se dan en la maduración de los embutidos (Lücke *et al.*, 1986 y 1998; Hernández-Jover *et al.*, 1997b; Lizaso *et al.*, 1999). Los enterococos, en cambio son microorganismos muy resistentes a condiciones adversas. Toleran el cloruro sódico, el nitrito y resisten valores bajos de pH y a_w por lo que pueden sobrevivir, e incluso multiplicarse, durante la fermentación de los embutidos (Giraffa, 2002). El uso de cultivos iniciadores evitó el crecimiento de enterococos mientras que los lotes elaborados sin la adición de estos cultivos presentaron un aumento de los recuentos de enterococos.

La inhibición del crecimiento de enterobacterias y enterococos provocada por el uso de los cultivos iniciadores también se vio reflejada en la producción de aminas biógenas. En los lotes elaborados con cultivos iniciadores no se observó la formación de tiramina, putrescina ni cadaverina durante la maduración. Bover-Cid *et al.* (2000) también observaron que el uso de cultivos de lactobacilos y estafilococos no aminogénicos reducían drásticamente la acumulación de tiramina, cadaverina y putrescina y evitaban la presencia de histamina, feniletilamina y

triptamina en embutidos más ácidos. El uso de cultivos iniciadores mixtos unido al uso de materia prima de buena calidad higiénica y a unas condiciones tecnológicas adecuadas, permite la elaboración de embutidos con las características organolépticas típicas y sin aminos biógenos.

El uso del tratamiento de alta presión (400 MPa) en los embutidos madurados consiguió la ausencia de *Salmonella* spp. en los lotes tratados. También permitió disminuir los recuentos de *L. monocytogenes*, aunque los lotes sin cultivo iniciador tratados con alta presión no alcanzaron recuentos tan bajos como los presentados por los lotes elaborados con cultivo iniciador. La presurización disminuyó la acumulación de tiramina y evitó la producción de putrescina y cadaverina durante el almacenamiento del fuet sin cultivo iniciador. En el chorizo sin cultivo iniciador, la presurización no fue efectiva en la inhibición de la acumulación de aminos biógenos, aun cuando los recuentos de enterobacterias fueron inferiores en las muestras tratadas con alta presión.

El uso de cultivo iniciador resultó útil en la mejora de la higiene y seguridad de los embutidos fermentados ligeramente acidificados. Se consiguió el control de los recuentos de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y *L. monocytogenes* y la reducción del contenido en aminos biógenos en el producto final. La presurización de los embutidos madurados fue necesaria para conseguir ausencia de *Salmonella* spp. en las muestras. La combinación del tratamiento de alta presión y el uso de cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos es recomendable para la producción de embutidos de alta calidad y bajo riesgo alimentario.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los embutidos fermentados ligeramente acidificados pueden considerarse productos de alta calidad microbiológica; la mayoría de las muestras comerciales analizadas no han presentado ninguno de los microorganismos patógenos y deteriorantes estudiados.
2. Los recuentos de bacterias del ácido láctico (BAL) y de cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+) están más equilibrados en los embutidos fermentados ligeramente acidificados que en los embutidos más ácidos.
3. Las técnicas de PCR desarrolladas para la identificación de especies de interés tecnológico, BAL y CGC+, permiten la detección rápida y eficiente de las mismas a partir de las muestras de embutido y la identificación de la mayor parte de aislados. El uso de ambas estrategias ha constatado la presencia de *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus xylosus* en todos los productos estudiados.
4. Las técnicas de PCR desarrolladas para la identificación de patógenos permiten agilizar el análisis microbiológico de los embutidos. La técnica de PCR-multiplex desarrollada constituye un método útil y rápido para la identificación simultánea de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. La combinación del método del número más probable y PCR específica de especie permite el recuento de *L. monocytogenes* de forma rápida y consistente, incluso en muestras de baja contaminación.

5. El uso de RAPD-PCR en combinación con el análisis de perfiles plasmídicos permite una caracterización eficiente de las cepas de BAL y CGC+. Mediante estas técnicas se ha comprobado la gran variabilidad genética que presentan las comunidades de BAL, CGC+ y enterococos de los embutidos fermentados ligeramente acidificados.
6. El potencial aminogénico es mayor en las BAL que en los CGC+. La tiramina es la principal amina biógena producida por los lactobacilos mientras que la feniletilamina es la principal amina producida por los estafilococos.
7. *Lactobacillus curvatus* es la especie de lactobacilo con mayor actividad aminoácido-descarboxilasa en los embutidos estudiados. El ensayo de PCR desarrollado para la detección del gen de la tirosina-descarboxilasa en *L. curvatus* es un método útil para la caracterización de las cepas productoras de tiramina de esta especie.
8. *Enterococcus faecium* es la especie de enterococos predominante en embutidos fermentados ligeramente acidificados. *Enterococcus faecalis* es la principal especie asociada con factores de virulencia y multi-resistencia a antibióticos, por lo que su presencia en embutidos debería ser evitada para la obtención de productos de alta calidad higiénica.
9. La resistencia a vancomicina en los enterococos de embutidos fermentados ligeramente acidificados es poco frecuente y principalmente ligada a los genes *vanC1* y *vanC2/C3*, que confieren resistencia de bajo nivel a este glicopéptido.
10. La presencia de enterotoxinas en los estafilococos de embutidos fermentados ligeramente acidificados es poco común. Asimismo los genes *mecA*, que confieren resistencia a la meticilina, son poco frecuentes en esta población microbiana.
11. La tipificación molecular de los aislados en conjunción con el estudio de su potencial aminogénico, la determinación de resistencia a antibióticos y la evaluación de sus propiedades de interés tecnológico, proporcionan una caracterización detallada de las cepas que permite la selección de cultivos iniciadores capaces de incrementar la calidad y seguridad de los productos.
12. En base a sus propiedades tecnológicas, características higiénico-sanitarias y predominancia en los embutidos estudiados, *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus xylosus* son las especies de elección para su uso como cultivo iniciador en la elaboración de este tipo de productos.

13. El uso de un cultivo iniciador mixto, seleccionado a partir de los aislados de *L. sakei* y *S. xylosus* analizados, permite el control del crecimiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *S. aureus*, enterococos y enterobacterias y evita la acumulación de aminos biógenas en el producto final. De esta forma, se mejora la calidad higiénica y tecnológica de los embutidos fermentados ligeramente acidificados y permitiría su estandarización.

14. El tratamiento de alta presión a 400 MPa aplicado a embutidos madurados aumenta significativamente la seguridad alimentaria de los mismos, asegurando la ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra. La combinación de cultivos iniciadores y el tratamiento de alta presión tras la maduración permite la obtención de embutidos fermentados ligeramente acidificados de alta calidad y bajo riesgo alimentario.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abu Al-Soud, W., y Radstrom, P. (2001). Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J. Clin. Microbiol* **39**, 485-493.
- AFSSA (2000). Rapport de la commission d'etudes des risques liés à *Listeria monocytogenes*.
- Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **68**,171-178.
- Agvald-Öhman, C, Lund, B., Edlund, C. (2004). Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit. Care* **8**, 42-47.
- AICE (Asociación Española de Industrias Cárnicas) (2004). Panorama del sector cárnico, <http://www.aice.es/carne.asp> (20 diciembre, 2004).
- Allmann, M., Höfelein, C., Köppel, E., Lüthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmüller, B. y Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res. Microbiol.* **146**, 85-97.
- Álvarez-Barrea, V., Pearson, A.M., Price, J.F., Gray, J.I. y Aust, S.D. (1982). Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages. *J. Food Sci.* **47**, 1773-1775.
- Ahokas, H. & Erkkilä, M. J. (1993). Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine. *PCR Methods Appl.* **3**, 65-68.
- Anderson, D.G. y McKay, L.L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549-552.
- Angeletti, S., Lorino, G., Gherardi, G., Battistoni, F., De Cesaris, M. y Dicuonzo, G.R. (2001). Routine Molecular Identification of Enterococci by Gene-Specific PCR and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *J. Clin. Microbiol* **39**, 794-797.
- Anónimo (1992). *FDA Bacteriological Analytical Manual*. Washington D.C. EE.UU. AOAC Int.
- Anónimo (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 2: Enumeration method. ISO 11290-2, 1998. International Organization for Standardization (ISO).

- Anónimo (1999a). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Bruselas, Bélgica.
- Anónimo (1999b). Update: multistate outbreak of listeriosis—United States, 1998-1999. *Morb. Mortal Wkly Rep.* **47**, 1117-1118.
- Anónimo (1999c) Europe's Agenda 2000. Strengthening and widening the European Union. Comisión Europea. Bruselas, Bélgica.
- Anónimo (2001). El sector cárnico español. Dirección General de Alimentación, Subdirección General De Fomento y Desarrollo Agroindustrial. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe Abril, 2001. (http://www.aice.es/Industria_carnica.pdf)
- Anónimo (2002a). Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. International Organization for Standardization (ISO).
- Anónimo (2002b). FSIS Directive 10,240.3. Microbial Sampling of Ready-To-Eat (RTE) Products of the FSIS verification Testing Program. Washington, D.C.: Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture.
- Anónimo (2003). FSIS Directive 10,240.4. Verification procedures for the *Listeria monocytogenes* regulation and microbial sampling of ready-to-eat products for the FSIS verification program. Food Safety and Inspection Service. US Department of Agriculture. Washington, D.C., EE.UU..
- Antonishyn, N.A., McDonald R.R., Chan, E.L., Horsman, G., Woodmansee, C.E., Falk, P.S., *et al.*, (2000). Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4058-4065.
- Archer, G.L., Niemeyer, D.M., Thanassi, J.A. y Pucci, M.J. (1994). Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 447-454.
- Atanassova, V., A. Meindl y C. Ring. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham--a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **68**:105-113.
- Aymerich, M. T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J. M. y Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* **63**:721-726.
- Aymerich, M.T., Martín, B., Garriga, M., y Hugas, M. (2003) Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4583-4594.

B

- Bacus, J. (1984). Utilization of microorganisms in meat processing. A handbook for meat plant operators. Research Studies Press LTD., Letchworth, Hertfordshire, Reino Unido.

- Balaban, N. y Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **61**, 1-10.
- Bannerman, T.L. y Kloos, W.E. (1991). *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus* subsp. nov. from human skin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 144-147.
- Barbour, W.M. y Tice, G., (1997). Genetic and immunologic techniques for detecting foodborne pathogens and toxins. En *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Bechat, L.R., Montville, T.J. (eds.), pp 710-727. ASM press, Washington DC, EE.UU.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 341-346.
- Barry, T., Collieran, G., Glennon, M., Dunican, L. y Gannon, F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify Eubacteria. *PCR Methods Appl.* **1**, 51-56.
- Baumgartner, A., Kueffer, M. y Rohner, P. (2001). Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. *Arch. Lebensm. Hyg.* **52**, 16-19.
- Bautista, L., Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 566-569.
- Bailey, J.S., y Cox, N.A. (1992). Universal Preenrichment Broth for the Simultaneous Detection of *Salmonella* and *Listeria* in Foods. *J. Food Prot.* **4**, 256-259.
- Bej, A. K., Dicesare, J. L., Haff, L. y Atlas, R. M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella spp.* in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1013-1017.
- Bell, R. G., y DeLacey, K. M. (1984). Heat injury and recovery of *Streptococcus faecium* associated with the souring of chub-packed luncheon meat. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 229-236.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., and Talon, R. (1993) Effects of Starter Cultures on the Formation of flavour Compounds in Dry Sausage. *Meat Sci.* **35**, 275-287.
- Berthier, F. y Ehrlich, S. D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 97-106.
- Bessesen, M.T., Luo, Q.L., Rotbar, H.A., Blaser, M.J. y Ellison III, R.T. (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 2930-2932.
- Betancor, L., Schelotto, F., Martinez, A., Pereira, M., Algorta, G., Rodriguez, M.A., Vignoli, R. YChabalgoity, J.A. (2004). Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1155-1162.
- Bickley, J., Short, J.K., McDowell, D.G. y Parkes, H.C. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 153-158.
- Bingen, E.H., Denamur, E. y Elion, J. (1994). Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Revs.* **7**, 311-327.

- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O. y Villani, F. (2004). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. *J Appl Microbiol.* **97**, 719-730.
- B.O.E. (1984). Real Decreto 379/1984, de 25 de enero. Reglamentación técnico-sanitaria de industrias, almacenes al por mayor y envasadores de productos y derivados cárnicos elaborados y de los establecimientos de comercio al por menor de la carne y productos elaborados. *Boletín Oficial del Estado*, 49 (27/2/1984):5273-5280.
- B.O.E. (2002). Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, 44 (20/2/2002): 6756-6799.
- B.O.E. (1979). Métodos de análisis de productos cárnicos. *Boletín Oficial del Estado*, 207:2022.
- B.O.E. (1977) Orden de 21 de junio de 1977. Normas microbiológicas para chorizo, salchichón y lomo embuchado. *Boletín Oficial del Estado*, 11 y 12/7/77.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., y Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 103-120.
- Border, P.M., Howard, J.J., Plastow, G.S. y Siggens, K.W. (1990). Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 158-162.
- Bottazi, V. (1988). An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 303-315
- Bover-Cid, S., Hozapfel, W., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. y Mariné-Font, A. (1998). Production of fermented sausages with low biogenic amine levels. En *Proceedings Fifth Workshop of the COST-Action 917: Biologically active amines in foods*. Málaga, Spain.
- Bover-Cid, S., y Holzapfel, W.H. (1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53**, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., y Vidal-Carou, M.C. (2000). Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *J. Food Prot.* **63**, 237-243.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M. C. (2001a). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **66**, 185-189.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. (2001b). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **65**,113-123.
- Boyle, J. F., Soumakis, S. A., Rendo, A., Herrington, J. A., Gianarkis, D. G., Thurberg, B. E. y Painter, B. G. (1993). Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1280-1285.

- Bremer, V., Leitmeyer, K., Jensen, E., Metzler, U., Meczulat, H., Weise, E., Weber, D., Tschaepe, H., Kreinbrock, L., Glaser, S., y Ammon, A. (2004). Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiol. Infect.* **132**, 881-887.
- Brink, B.T., Damink, C., Joosten, H. y Huis in't Veld, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73-84.
- Buckenhüskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 253-271.
- Buchanan, R. L. y Palumbo, S. A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J. Food Saf.* **7**, 15-29.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Bencivengo, M.M., y Del Corral, F. (1989). Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 599-603.
- Bülte, G. (1996). Enterohemorrhagische *E. coli* (EHEC)- aktuelle Infektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. *Fleischwirtschaft* **76**, 88-91.
- Bülte, M. (1991). "Dot blot"-Verfahren mit Digoxigenin-markierten Gensonden zum Nachweis von verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen (VTEC) in Verdünnungskulturen und Lebensmittel-proben. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **42**, 77-100.
- C**
- Campbell, K.D., East, A.K., Thompson, D.E. y Collins, M.D. (1993). Studies on the large subunit ribosomal RNA genes and intergenic spacer regions of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B,E and F. *Res. Microbiol.* **144**, 171-180.
- Capita, R., y Alonso-Calleja, C. (2003). Comparison of different most-probable-number methods for enumeration of *Listeria* in poultry. *J. Food. Prot.* **66**, 65-71.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, M.T., and Cheftel, J.C.V. (1994). Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebens. Wiss. Technol.* **27**, 48-54.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, M.T., and Cheftel, J.C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced meat due to high pressure processing. *Lebens. Wiss. Technol.* **28**, 528-538.
- Carroll, S.A., Carr, L.E., Mallinson, E.T., Lamichanne, C., Rice, B.E., Rollins, D.M., y Joseph, S.W. (2000). Development and Evaluation of a 24-Hour Method for the Detection and Quantification of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. *J. Food Prot.* **63**, 347-353.
- Centeno, J. A., Menéndez, S. y Rodríguez-Otero, J. L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 307-313.
- CDC NNIS System (1998). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986 - April 1998, issued June 1998. *Am. J. Infect. Control* **26**, 522-533. 13

- Chan, M.S., Maiden, M.C., Spratt, B.G. (2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* **17**, 1077-1083
- Chang, S.F., Huang, T.C., Pearson, A.M. (1996). Control of the dehydration process in production of intermediate-moisture meat products: a review. En *Advances in food and nutrition research*, Vol. 39. Taylor, S.L. (ed), pp 71-161. Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU.,
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **61**, 1636-1643.
- Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H. y El Solh, N. (1993). *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 237-244.
- Christiansen, L. N., Tompkin, R. B., Shaparis, A. B., Johnston, R. W. & Kautter, D. A. (1975). Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in a summer-style sausage. *J. Food Sci.* **40**, 488-490.
- Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J.C y Issaacs, S.T. (1991). Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 99-107.
- Clewell, D. B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **9**,90-102.
- Cocconcelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Cappa, F. Y Botazzi, V. (1997). Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 8-12.
- Cocconcelli, P. S., Cattivelli, D. y Gazzola, S. (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 315-323.
- Cogan, J. F., Walsh, D. y Condon, S. (1989). Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 77-84.
- Comi, G., Citterio, B., Manzano, M. y Cantoni, C. (1992). Evaluation and characterization of *Micrococcaceae* strains in Italian dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft* **72**, 1679-1685.
- Comisión Europea (2003). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Health and Consumer Protection Directorate-General. Bruselas, Bélgica.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* **350**, 91-92.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 269-280.
- Coppola, S., Parente, E., Dumontet, S. y La Peccerella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait* **6**, 295-310.

- Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. y Grazia, L. (1996). Characterization of micrococci and staphylococci isolated from Soppressata Molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* **12**, 1-6.
- Coppola, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M. y Grazia, L. (1998). Characterization of lactobacilli involved in the ripening of sopressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* **15**, 347-353.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P., and A., L. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* **21**, 125-130.
- Cruz, J. (2004). Principales variables económicas de la industria cárnica española. *Eurocarne* **123**, 53-66.

D

- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 164-167.
- D'Agostino, M., Wagner, D., Vazquez, J.A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., Novella, S., Scotti, M., Ellison, J., Murray, A., Fernandes, I., Kuhn, M., Pazlarova, J., Heuvelink, A., y Cook, N. (2004). A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-Towards an international standard. *J. Food Prot.* **67**, 1646-1655.
- Dahl, T. A., Midden, W. R. y Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxigen. *J. Bacteriol.* **171**, 2188-2194.
- Danielsen, M., and Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 1-11.
- Danty, R. H., Shaw, B. G. y Roberts, T. A. (1983). Microbial and chemical changes in chill-stored red meat. En *Food Microbiology: Advances and Prospects.*, Roberts, T.A. y Skinner, F.A. (eds.), pp. 151-178. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A.G. y Banks, J. (2003). Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 595-607.
- Datta, A. R., Wentz, B. A. y Hill, W. E. (1988). Identification and enumeration of beta-hemolytic *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 673-675.
- Datta, A.R., Wentz, B.A. y Hill, W.E. (1987). Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2256-2259. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1874-1878.
- de Boer, E. y Beumer, R.R. (1999). Methodology for detection of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 119-130.

- De la Fuente, R., Suárez, G. y Schleifer, K.H. (1985). *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 99-102.
- Dellapina, G., Blanco, D., Pancini, E., Barbuti, S. y Campanini, M. (1994). Microbiological evolution in Italian Felino, Milan and Hungarian-style salami. *Industria Conserve* **69**, 85-90.
- de Wit, M. Y. L., Faber, W. R., Krieg, S. R., Douglas, J. T., Lucas, S. B., Montreewasuwat, N., Pattyn, S. R., Hussain, R., Ponninghaus, J. M., Hartskeerl, R. A. y Klatser, P. R. (1991). Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 906-910.
- DeMasi, T.W., Wardlaw, F.B., Dick, R.L. y Acton, J.C. (1990). Nonprotein nitrogen (NPN) and free aminoacid contents of dry, fermented and nonfermented sausages. *Meat Sci.* **27**, 1-12.
- Demeke, T. y Adams, R.P. (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* **12**, 332-334.
- Demeyer, D.I., Verplaetse, A. y Gistelinc, M. (1986). Fermentation of meat: an integrated approach. En *Proceedings 32th European Meeting of Meat Research Workers*, pp 241-247.
- Demeyer, D.I. (1992). Meat fermentation as an integrated process. En *New technologies for meat and meat products*. F.J.M. Snulders, F. Toldrá, J. Flores y M. Prieto (eds.), Utrecht: ECCEAMST, Nijmegen: Audet Tijdschriften, Holanda, pp 21-36.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Vandendriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L.H., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R., y Eerola, S. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Res Intern.* **33**, 171-180.
- Demeyer, D.I., Hoozee, J., y Mesdon, H. (1974). Specificity of lipolysis during dry sausage ripening. *J. Food Sci.* **39**, 293-296.
- Deplano, A., Schuermans, A., van Eldere, J., Witte, W., Meugnier, H., Etienne, J., Grundmann, H., Jonas, D., Noordhoek, G.T., Dijkstra J., van Belkum, A., van Leeuwen, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., van der Zee, A., Bergmans, A., Blanc, D.S., Tenover, F.C., Cookson, B.C., O'Neil, G., Struelens, M.J. y The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. (2000). Multicenter Evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J. Clin Microbiol.* **38**, 3527-3533.
- Desai M., Threlfall, E.J. y Stanley, J. (2001). Fluorescent amplified –fragment length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage type 4 clone complex. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 201-206.
- Devriese, L.A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., y Haesebrouck, F. (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 187-197.

- Devriese, L.A., Poutrel, B., Kilpper-Bälz, R. y Schleifer, K.H. (1983). *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 480-486.
- Devriese, L.A., Hajek, V., Oeding, P., Meyer, S.A. y Schleifer, K.H. (1978). *Staphylococcus hyicus*, Sompolinsky 1953 comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 482-490.
- Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L. y Coppola, R. (2002). Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 158-164.
- Domínguez-Fernández, M. C. y Zumalacárregui- Rodríguez, J. M. (1991). Lipolytic and oxidative changes in "chorizo" during ripening. *Meat Sci.* **29**, 1991.
- Dunny, G. M. (1990). Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **4**, 689-696.
- Dunny, G.M., Leonard, B.A. y Hedberg, P.J. (1995). Pheromone inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Appl. Bacteriol.* **177**, 871-876.
- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A.M., Fadda, S., y Sechi, L.A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* **52**, 491-498.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., y Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 24-27.

E

- Eaton, T. J. y Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1628-1635.
- Edwards, K.J., Kaufmann, M.E., y Saunders, N.A. (2001). Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **399**, 3047-3051.
- Eerola, S., Roig-Sagués, A. y Hirvi, T. (1998). Biogenic amines in Finnish dry sausages. *J. Food Saf.* **18**, 127-138.
- Eerola, S., Roig-Sagués, A., Lilleberg, L. y Aalto, H. (1997). Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. *Z. Lebensm. Unters Forsch A.* **205**, 351-355.
- Ehlert, K. (1999). Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* – molecular basis, novel targets and antibiotic therapy. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 45-55.
- Ehrmann, M., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1994). Reverse dot blot: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 143-150.
- Encinas, J.P., Sanz, J.J., García-López, M.L., y Otero, A. (1999) Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 167-171.

Entis, P., y Lerner, I. (2000) Twenty four-hour direct presumptive enumeration of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples using the ISO_GRID method with LM-137 agar. *J. Food Prot.* **63**, 354-363.

F

Fach, P., Hauser, D., Guillou, J.P. y Popoff, M.R. (1993). Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 234-239.

Farber, J.M. y Addison, C.J. (1994). Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 357-358.

Farber, J.M. (1996). An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Prot.* **59**, 1091-1101.

Feil, E., Zhou, J., Maynard Smith, J. y Spratt, B.G. (1999). A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *recA* genes of pathogenic and commensal Neisseria species: evidences for extensive interspecies recombination within *adk*. *J. Mol. Evol.* **43**, 631-640.

Fernández-Cuenca, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**, 355-360.

Fernández-Gonzalez, M.J., García-García, P., Garrido-Fernández, A. y Durán-Quintana, M. (1993). Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 226-233.

Ferrer, J. y Arboix, P. (1986). The "Salchichón de Vich" (Vich sausage) I.- Technology and evolution of the microbial flora during its maturing and curing process. *En Proceedings 32nd European Meeting of Meat Reseach Workers*. Ghent. Bélgica, pp. 277-271

Fischer, U. y Schleifer, K. H. (1980). Vorkommen von staphylokokken un mikrokokken in Rohwurst. *Fleischwirtsch* **60**, 1046-1049.

Fitts, R., Daimon, M., Hamilton, C. y Neri, M. (1983). DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1146-1151.

Fleming, H. P., McFeeters, R. F. y Daeschel, M. A. (1986). The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 343-356.

Flores, J. (1997). Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chem.* **59**, 505-510.

Flores, J. (1999). Propuesta de clasificación de los embutidos crudos curados españoles. *AICE* **64**, 5-8.

Fluit, A. C., Torensma, R., Visser, M. J. C., Aarsman, C. J. M., Poppelier, M. J. J. G., Keller, B. H. I., Klapwijk, P. y Verhoef, J. (1993). Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1289-1293.

Foegeding, P. M., Thomas, A. B., Pilkington, D. H. y Klaenhammer, T. R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 884-890.

- Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A. y Alatosava, T. (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* **143**, 3491-3500.
- Foster, G., Ross, H.M., Hutson, R.A. y Collins, M.D. (1997). *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 724-726.
- Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K. H. y Obst, U. (1998). Application of 23S rDNA- targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 450-453.
- Fraizer, W. C. y Westhoff, D. C. (1993). *Microbiología de los Alimentos*, 4ª edn. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Franz, C. M., Holzapfel, W. y Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**,1-24.
- Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 4385-4389.
- Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Nervi, C. y Fleurette, J. (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 168-172.
- Frey, W. (1983). Fabricación fiable de embutidos. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- Fung, D.Y.C. (1995). What's needed in rapid detection of foodborne pathogens. *Food Technol.* **49**, 64-67.
- Furet, J.P., Quenee, P. y Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 197-207.
- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C. y Luethy, J. (1991). Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 372-379.

G

- García, M.L., Selgas, M.D., Fernández, M. y Ordóñez, J.A. (1992). Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages. *Int. J. Food Sci. Technol.* **27**, 675-682.
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I. y Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int. J. Food Microbiol.* **54**, 189-195.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Stanton, C. (1998). Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 2192-2199.
- Gardini, F., Tofalo, R. y Suzzi, G. (2003). A survey of antibiotic resistance in *Micrococcaceae* isolated from Italian dry fermented sausages. *J Food Prot.* **66**, 937-945.

- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J. y Montfort, J.M. (1996). Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *Int.J Food Microbiol.* **32**, 173-183.
- Garriga, M., Marcos, B., Aymerich, M.T. y Hugas, M. (2003). Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío. *Eurocarne* **121**, 93-99.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. (1993). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 142-148.
- Gibson, J.R., Sutherland, K. y Owen, R.J. (1994). Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 357-358.
- 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.
- Gilliland, S. E. (1986). Bacterial Starter Cultures for Foods. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. De Vuyst, L. y Vandamme, J. (eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, EE.UU.
- Giovannacci, I., S. Queguiner, C. Ragimbeau, G. Salvat, J.L. Vendevre, V. Carlier y G. Ermel. (2001). Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 131-147.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 163-171.
- Girard, J.P., Denoyer, C. y Maillard, T. (1991). El picado grosero. La reestructuración de las pastas finas. En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*, pp. 231-295. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- Glass, K. A., Loeffelholz, J. M., Ford, J. P. y Doyle, M. P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. *Environ. Microbiol.* **58**, 2513-2516.
- Goldsteyn-Thomas, E. J., King, R. K., Burchak, J. y Gannon, V. P. J. (1991). Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2576-2580.
- Gopo, J. M., Melis, R., Filipaska, E., Meneveri, R. y Filipaska, J. (1988). Development of a *Salmonella* specific biotinylated DNA probe for rapid routine identification of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* **2**, 271-279.
- Gory, L., Millet, L., Godon, J. J. y Montel, M.C. (1999). Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* isolated from meat by fluorescent in situ hybridization with 16S RNA targeted oligonucleotide probes. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 225-228.
- Guarneri, T., Rossetti, L. y Giraffa, G. (2001). Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**, 377-381.
- Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. y Gingeras, T.R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1874-1878.

- Gürtler, V. y Barrie, H. D. (1995). Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology* **141**, 1255-1265.
- Gürtler, V. y Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **141**, 3-16.

H

- Haas, W. y Gilmore, M. S. (1999). Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 183-190.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A. Bouvet, P., Gómez, M. y Vaillant, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebd.* **23**, 105-109.
- Hájek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J. y Freney, J. (1996). *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 792-796.
- Hájek, V., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Springer, N., Zitzelsberger, W., Kroppenstedt, R.M. y Kocur, M. (1992). *Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 97-101.
- Hájek, V., Devriese, L.A., Mordarski, M., Goodfellow, M., Pulverer, G. y Varaldo, P.E. (1986). Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes*, Devriese *et al.* 1978 to species status: *Staphylococcus chromogenes*, Devriese *et al.* 1978 comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**, 169-173.
- Hájek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 401-408.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sakardi, L. y Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 42-49.
- Hamilton-Miller, J.M.T. y Shah, S. (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 153-154.
- Hammes, W. P., Bantleon, A. y Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 165-174.
- Handwerger, S., Pucci, M.J., Volk, K.L., Liu, J. y Lee, M.S. (1994). Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Appl. Bacteriol.* **176**, 260-264.
- Hartog, B.J., de Boer, E., Lenssick, J.B. y de Wilde, G.J. (1987). The microbiological status of dry sausage in East Netherlands. *Tijdschr Diegeneeskde* **112**, 322-333.
- Hastings, J.W. y Holzapfel, W.H. (1987). Conventional taxonomy of lactobacilli surviving radurization of meat. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 209-216.
- Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.* **48**, 311-373.
- Hechelmann, H., Bem, Z. y Leistner, L. (1974). Mikrobiologie der Nitrat/Nitritminderung bei Rohwurst. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach.*, 4059-4064.

- Hedin, G. y Hambræus, A. (1991). Screening tests for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 681-694.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E. y Wagner, M. (2001). Detection and quantification on the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbiol.* **152**, 37-46.
- Hensieck, R., Krupp, G. y Stackebrandt, E. (1992). Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 123-128.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, M. C. (1997a). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2098-2102.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, M. C. (1997b). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J. Food Prot.* **60**, 825-830.
- Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K. y Schleifer, K. H. (1993). Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotides probes and electrophoretic protein profiles. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 463-467.
- Hertel, C., Probst, A.J., Cavadini, C., Meding, E. y Hammes, W.P. (1995). Safety assessment of genetically modified microorganisms applied in meat fermentations. *System. Appl. Microbiol.* **18**, 469-476.
- Hierro, E., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1997). Contribution of Microbial and Meat Endogenous Enzymes to the Lipolysis of Dry Fermented Sausages. *J. Agricult. Food. Chem.* **45**, 2989-2995.
- Hierro, E., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1999). Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *J. Agricult. Food. Chem.* **47**, 1156-1161.
- Hill, W. E., Madden, J. M., McCardell, B.A., Shah, D. B., Jagow, J. A., Payne, W. L. y Boutin, B. K. (1983). Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: detection and enumeration by DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1324-1330.
- Hines, E. (1990). Food Microbiology: still seeking the holy grail. *Food Qual.* June/July, 49-53.
- Hirooka, E. Y., Muller, E. E. y Santo, A.E. (1982). Bacterimetría de *Staphylococcus aureus* en productos cárneos comercializados en Londina, Paraná. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **2**, 111-122.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. y Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.
- Holley, R. A., Jui, P. A., Wittmann, M. y Kwan, P. (1988a). Survival of *S. aureus* and *S. typhimurium* in raw ripened dry sausages formulated with mechanically separated chicken meat. *Fleischwirtschaft* **68**, 194-201.

- Holley, R. A., Lammerding, A. M. y Tittiger, F. (1998b). Microbiological safety of traditional and starter-mediated processes for the manufacturer of Italian dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **7**, 49-62.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. (1994). Gram-positive cocci. En *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Holt, J.G. (ed.), pp. 527-558. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, EE. UU.
- Hoorfar, J. y Cook, N. (2003). Critical aspects in standardization of PCR. In *Methods in Molecular Biology: PCR detection of microbial pathogens*. Sachse K. & Frey, J. (eds), pp. 51-64. Humana Press. Totowa.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., y Fach, P. (2003). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5835.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. y Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* **43**, 99-107.
- Houle, J. F., Lafrance, M., Julien, J. O., Brochu, E. y Champagne, C. P. (1989). Selection of mixed cultures for meat fermentation. *J. Food Sci.* **54**, 839-842.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. y Monfort, J. M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 107-113.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M. T. y Monfort, J. M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 322-330.
- Hugas, M. y Roca, M. (1997). Selección de cepas autóctonas de *Staphylococcus* spp. como cultivos iniciadores en embutidos cárnicos. *Eurocarne* **54**, 45-47.
- I**
- Igimi, S., Kawamura, S., Takahashi, E. y Mitsuoka, T. (2000). *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 373-377.
- Igimi, S., Takahashi, E. y Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 409-411.
- Incze, K., Mihályi, V. & Frank, H. K. (1976). Besteht eine Mykotoxingefahr bei der ungarischen Salami? III. Teil: Chemisch-analytische und biologische Untersuchungen an schnittfesten Salamiprüben. *Fleischwirtschaft* **56**, 1616-1618.
- Incze, K. (1992). Raw fermented and dried meat products. *Fleischwirtschaft* **72**, 58-62.
- Innis, M. A. y Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. En: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J., (eds.), pp. 3-12. Academic Press. San Diego, California, EE.UU.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996). Establishment of sampling plans for microbiological safety criteria for foods in international trade, including recommendations for control *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter* and enterohemorrhagic *E. coli*. Codex Committee on Food Hygiene, sesión

29, 21-25 de octubre, 1996. CX/FH 96/91-16. Codex Alimentarius Commission. Roma, Italia.

J

- Jacoby, G. A. (1996). Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu. Rev. Med.* 47, 169-179.
- Jarvis, W.R. y Martone, W.J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, **29**, 19-24.
- Jay, J.M. (1992). Staphylococcal gastroenteritis. *Modern Food Microbiology*, 4th ed. pp 455-478. Van Nostrand, New York, EE.UU.
- Jaykus, L. (2003). Challenges to developing real-time methods to detect pathogens in foods. *ASM News* **69**, 341-347.
- Jett, B., Huycke, M. M. y Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 162-478.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. y Schoeni, J.L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 497-501.
- Johnston, R. W., Green, S. S., Chiu, J., Pratt, M. y Rivera, J. (1982). Incidence of *Salmonella* in fresh pork sausage in 1979 compared with 1969. *J. Food Sci.* 47, 1369-1371.
- Jones, D. D. y Bej, A. K. (1994). Detection of foodborne microbial pathogens using polymerase chain reaction methods. En *PCR Technology: Current Innovations*, pp. 341-365. H. G. Griffin y A.M. Griffin (eds). Londres, Reino Unido: CRC Press Inc.
- Josephson, K. L., Gerba, C. P. y Pepper, I. L. (1993). Polymerase Chain Reaction Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3513-3515.
- Junttila, J., Him, J., Hill, P. y Nurmi, E. (1989). Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *J. Food Prot.* **52**, 158-161.

K

- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.
- Kandler, O., y Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Holt, J.G. and Sneath, P.H.A. (eds). pp. 1208-1234. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, EE.UU.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1998). Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* **15**, 207-214.
- Kapperud, G., Varbund, T., Skjerve, E., Hornes, E. y Michaelsen, T. E. (1993). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2938-2944.

- Katcher, H.L. y Schwartz, I. (1994). A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques* **16**, 84-92.
- Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. y Bergeron, M.G. (1999). Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol* **37**, 3497-3503.
- Khan, G., Kangro, H. O., Coates, P. J. y Heath, R. B. (1991). Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J. Clin. Pathol.* **44**, 360-365.
- Kilpper-Bälz, R. y Schleifer, K.H. (1983). Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus*, Foubert and Douglas comb. nov. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe C*, 1981, **2**, 324-331.
- Kinsman, D. M. (1980). Principal characteristics of sausages of the world listed by country of origin. American Press. Boston, Massachusetts, EE.UU.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie* **70**, 337-349.
- Kleemann, J. y Bergann, T. (1996). Model experiments to establish behaviour of *Yersinia enterocolitica* s: 9 strains in various types of fresh dry sausage. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 10-12.
- Klettner, P. G. y Rödel, W. (1978). Überprüfung und Steuerung wichtiger Parameter bei der Rohwurstreifung. *Fleischwirtschaft* **58**, 57-60, 63-64, 66.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H. y de Vos, W. M. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3390-3393.
- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., Van Pelt, L., Mckinnon, M.L., Zimmer, B.L., Muller, E., Weinstein, M.P. y Mirrett, S. (1998). *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 799-812.
- Kloos, W.E. (1997). Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. En *The staphylococci in human disease*, Croosley, K.B. y Archer, G.L. (eds.) pp. 113-137. Churchill Livingston. New York, N.Y., EEUU.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., Webster, J.A., Hubner, R.J., Tomasz, A., Couto, I., Sloan, G.L., Dehart, H.P., Fiedler, F., Schubert, K., De Lencastre, H., Santos Sanches, I., Heath, H.E., Leblanc, P.A. y Ljungh, A. (1997). Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 313-323.
- Kloos, W.E. (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 559-592.
- Kloos, W.E. y Schleifer, K.H. (1983). *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 9-14.
- Kloos, W.E. y Schleifer, K.H. (1975). Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus*

- capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 62-79.
- Kloos, W.E. y Wolfshohl, J.F. (1991). *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 284-289.
- Koch, W.H., Payne, W.L., Wentz, B.A. y Cebula, T.A. (1993). Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 556-560.
- Kolk, A. H. J., Noordhoek, G. T., de Leeuw, O., Kuijper, S. y van Embden, J. D. A. (1994). *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1354-1356.
- Kong, S. y Davidson, A. J. (1980). The role of interactions between $O_2:H_2O_2$: OH , e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 13-29.
- Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1102-1106.
- Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. En *Fermented Meats*. Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (eds). Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitfield, K.M., Chapelle, H.L., DiMichelle, L.J. y Gingeras, T.R. (1989). Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1173-1177.
- Kwok, S. y Higushi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**, 237-238.
- Kwon, H.S., Yang, E.H., Yeon, S.W., Kang, B.H. y Kim, T.Y. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 267-275.
- L**
- Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rosselló-Mora, R.A., Del Cueto, C., Dodge, D.E., Orkand, P. y Cano, R.J. (1998). *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 511-518.
- Lambert, A. D., Smith, J. P. y Dopdds, K. L. (1991). Shelf life extensions and microbiological safety of fresh meat. A review. *Food Microbiol.* **8**, 267-297.
- Lantz, P.G., Knutsson, R., Blixt, Y., Abu Al-Soud, W., Borch, E. y Radström, P. (1998). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int. J. Food Microbiol.* **45**, 93-105.
- Lechowich, R.V. (1971). Microbiology of meat. En *The science and meat products*. Price, J.F. y Schweigert, B.F. (eds). W.H. Freeman and Co. San Francisco, Ca., EE.UU.

- Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J. y Courvalin, P. (1989). Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**,10-15.
- Leclercq, R. (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24**, S80-S84.
- Leistner, L., Hechelmann, H. y Lücke, F.K. (1982). Auswirkungen der neuen Nitrit-VO in der Mikrobiologie. *Mitteilungsblatt der bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach*, **76**, 5001-5005.
- Leistner, L. (1986). Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft* **47**, 1320-1326.
- Leistner, F. (1992). The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. En *New technologies for meat and meat products*. Smulders, F.J.M., Toldrà, F., Flores, J. y Prieto, M.(eds.) pp 1-19. Utrecht: ECCEAMST, Nijmegen: Audet Tijdschriften, Holanda.
- Leistner, L. y Hechelmann, H. (1993). Food preservation by hurdle-technology. En *Proceedings Food preservation 2000 conference*. 19-21 October, Nattick, Massachusetts. EE.UU., pp. 511-520.
- Le Loir, Y., Baron, F. y Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.***2**, 63-76.
- Liepe, H. U. (1983). Starter cultures in meat production. In *Biotechnology and food Processing*. Eds S.D. Kung, D.D. Bills and R. Quatrano, pp. 273-286. Butterworths, Boston, Massachusetts, EE.UU.
- Lindgren, S. E. y Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonist activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 149-164.
- Lipuma, J.J. y Stull, T.L. (1991). Ribotyping - a new tool for molecular epidemiology. *Infect. Dis. Newslett.* **10**, 59-61.
- Lizaso, G., Chasco, J., y Beriain, M.J. (1999) Microbial and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiol.* **16**, 219-228.
- Lois, A. L., Gutiérrez, M. L., Zumalacárregui, J. M. y López, A. (1987). Changes in several constituents during the ripening of "Chorizo" - a Spanish dry sausage. *Meat Sci.***19**, 169-177.
- London, J. (1990). Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 103-112.
- Longo, M.C., Berninger, M.S. y Hartley, J.L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**, 125-128.
- Louws F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. y de Bruijn, F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2286-2295.
- Lowe, A. M., Lambert, P. A. y Smith, A. W. (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* **63**,703-706.
- Lucas, P., y Lonvaud-Funel, A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**, 85-89.

- Lücke, F. K. (1998). Fermented sausages. En *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, B. J. B. (ed), pp. 441-483. Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.
- Lücke, F.K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausages and raw ham. *Fleischwirtschaft* **66**,1505-1509.
- Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and to preserve meat. *Meat Sci.* **56**, 105-115.
- Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* **174**, 4525-4529.
- Lüthy, J. y Schlatter, C. (1983). Biogene Amine in Lebensmitteln: zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Phenylethylamin auf den Menschen. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A.* **177**, 439-443.

M

- Mabilat, C., Bukwalt, S., Machabert, N., Desvarenes, S., Kurfürst, R. y Cros, P. (1996). Automated RNA probe assay for the identification of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 333-340.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, QW., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. y Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing; a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 3140-3145
- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P. y Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J. Food Sci.* **60**, 1187-1190.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., y Helmuth, R. (2003). Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 290-296.
- Marchesino, B., Bruttin, A., Romailier, N. y Moreton, R.S. (1992). Microbiological events during commercial meat fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 203-209.
- Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T. y Hernández-Jover, T. (1995). Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol.* **88**, 119-140.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E. y Arbeit, R.D. (1993). Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 153-164.
- Masson, F., L. Eclache, T. Compte, R. Talon y M.C. Montel. (1996) Qui produit des amines biogènes dans les produits carnés? *Viandes et Produits Carnés* **17**, 287-289.
- Mauriello, G., Moschetti, G., Villani, F., Blaiotta, G., y Coppola, S. (2000). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from artisanal Naples-type salami. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **51**, 19-24.
- Mazurec, G. (1993). Modern typing methods in the investigation of nosocomial infections. *Curr. Opinions Infect. Dis.* **6**, 538-543.

- McKercher, P.D., Blackwell, J.H. y Callis, J.J. (1982). Residual viruses in processed meat products- a review. En *Proceedings of the 28th European Congress of Meat Research Workers*. Madrid, pp. 291-293.
- Mckillip, J.L. y Drake, M (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food. Protec.* **67**, 823-832.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCraig, L.F., Bresee, S., Shapiro, C., Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. (1999). Food-Related illness and death in the United States. *Emerg. infect. Dis.* **5**, 607-625.
- Mehrotra, M., Wang, G. y Johnson, W.M. (2000). Multiplex PCR detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1032-1035.
- Mercasa (2003). Alimentación en España 2003. Producción, industria, distribución y consumo. Editado por Empresa Nacional MERCASA.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M. J., Franti, E. y Cosma, E. (1981a). Production of Italian dry salami. I. Initiation of staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *J. Food Prot.* **44**, 347-352.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M. J., Franti, E. y Cosma, E. (1981b). Production of Italian dry salami. II. Effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 863-871.
- Metaxopoulos, J., Samelis, J., y Papadelli, M. (2001). Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Ital. J. Food Sci.* **1**, 3-18.
- Michels, P. A. M., Michels, J. P. J., Boonstra, J. y Konings, W. N. (1979). Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiol. Lett.* **5**, 357-364.
- Miragaia, M., Couto, I., Pereira, S.F.F., Kristinsson, K.G., West, H., Jarlöv, J.O., Carriço, J., Almeida, J., Santos-Sanches, I. y Lencastre, H. (2002). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 430-438.
- Miralles, M. C., J. Flores y Pérez-Martínez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiol.* **13**:227-236.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. y Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* **59**, 539-545.
- Montel, M. C., Talon, R. y Champomier, M. C. (1989). Identification of some lactic acid bacteria from meat. En *Proceedings 35th International Congress of meat Science and Technology*, pp. 299-301.
- Montel, M. C., Masson, F. y Talon, R. (1998). Bacterial Role in Flavour Development. *Meat Sci.* **49**, S111-S123.

- Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J. y Champomier, C. (1991). A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 469-472.
- Morot-Bizot, S., Talon, R., y Leroy-Setrin, S. (2003). Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J. Microbiol. Methods* **55**, 279-286.
- Moreno, B., Prieto, M., García Armesto, M. R. y Sierra, M. L. (1993). Introducción en los mataderos del sistema de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC). *Eurocarne* **14**, 15-29.
- Morris, J. G. (1979). Nature of oxygen toxicity in anaerobic microorganisms. En *Strategies of Microbial life in Extreme Environments*. Shilo, M. (ed.), pp. 149-162. Verlag Chemie. Berlín, Alemania.
- Morrison, D., Woodford, N. y Cookson, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**, 89S-99S.
- Moseley, S. L., Huq, I., Alim, A.R.M., So, M., Samadpour-Motalebi, M. y Falkow, S. (1980). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J. Infect. Dis.* **142**, 892-898.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. and Balny, C. (1994) Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Tibtech*, **12**, 493-501.
- Mulligan, M.E., Murray, K.A. y Ripner, B.S. (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. *Am. J. Med.* **94**, 313-328.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T. y Erlich, H. A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Mundy, L. M., Sahm, D. F. y Gilmore, M. S. (2000). Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 513-522.
- Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 46-65.

N

- Nicas, T. I., Cole, C. T., Preston, D. A. , Schabel, A. A. y Nagarajan, R. (1989). Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**,1477-1481.
- Noble, W. C., Virani, Z. y Cree, R. G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 195-198.
- Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A. y Rudi, K. (2000). Application of the 5'-Nuclease PCR assay in evaluation and development of method for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4029-4036.
- Nørnung, B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *Int. J. Food. Microbiol.* **62**, 217-221.

- Norton, D.M. (2002). Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.* **85**, 505-515.
- Notermans, S., Heuvelman, C. J. y Wernars, K. (1988). Syntetic enterotoxin B DNA probes for detection of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 531-533.
- Notermans, S., Beumer, R. y Rombouts, F. (1997). Detection of food-borne pathogens and their toxins, conventional versus rapid and automated methods. En *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P. Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (eds.) pp. 697-709. ASM Press. Washington DC, EE.UU.

O

- Olive, D.M. y Bean, P. (1999). Principles and Applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1661-1669.
- Olsen, J. E., Aabo, S., Nielsen, E. O. y Nielsen, B. B. (1991). Isolation of a *Salmonella* specific DNA hybridization probe. *APMIS* **99**, 114-120.
- Olsen, J.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T., Rasmussen, H.N. y Olsvik, Ø. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 71-78.
- Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E. U., J y Uhlen, M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 43-54.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2002). Antimicrobial resistance, Fact sheet n°. 194, (Online), <http://www.who.int/inf-fs/en/fact194.html> (20 agosto, 2004).
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **39**, 329-367.
- Orla-Jensen, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria. *Anhr. Ed. Host and Son, Copenhagen*.

P

- Padmapriya, B.P., Ramesh, A., Chandrashekar, A. y Varadaj, M.C. (2003). Staphylococcal accessory gene regulator (*sar*) as a signature gene to detect enterotoxigenic staphylococci. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 974-981.
- Pala, T.R., y Sevilla, A. (2004). Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *J. Food Prot.* **67**, 1624-1629.
- Palumbo, S. A. y Smith, J. L. (1977). Chemical and microbiological changes during sausages fermentation and ripening. En *Enzymes in food beverage processing*. Ory, R. L. y St Angelo, A.L (Eds.) A.C.S. Symposium series n° 47.
- Panina, G. F., Civardi, A., Massirio, I., Scatozza, F., Baldini, P. y Palmia, F. (1989). Survival of foot-and-mouth-disease viruses in sausage meat products (Italian salami). *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 141-148.
- Papa, F., Grazia, L. y Romano, P. (1990). Alterazione in salami tipo Felino provocate da enterococchi. *Ind. Alim.*, 676-679.

- Parente, E., Griego, S., y Crudele, M.A. (2001). Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J. Appl. Microbiol.* **90**, 943-952.
- Pascual-Anderson, M. (1992). Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid.
- Paulsen, I.T., Firth, N. y Skurray, R.A. (1997). Resistance to antimicrobials other than β -lactams, pp 175-212. En *The staphylococci in human disease*. Crossley, K.B. y Archer, G.L. (eds.) Churchill Livingstone. New York, EE.UU.
- Pedersen, J. C. y Jacobsen, C. S. (1993). Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106 (pRO101) in soil during water stress: effects on culturability and viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1560-1564.
- Pennisi, E. (1999). First food-borne pathogen sequenced. *Science* **283**, 1243.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G. y Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 311-314.
- Pfaller, M.A. y Hollis, R.J. (1989). Use of plasmid profiles and restriction endonuclease analysis of plasmid DNA as epidemiologic and diagnostic tools in the clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Newsl.* **11**, 137-141.
- Piard, J. C. y Desmazeud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* **71**, 525-541.
- Piard, J. C. y Desmazeud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* **72**, 113-142.
- Pirone, G. y Manganelli, E. (1990). Caratterizzazione di *Micrococcaceae* isolate da salami tipo Napoli. *Industria delle Conserve* **65**, 220-223.
- Pittet, D., Tarara, D. y Wenzel, R.P. (1994). Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA.* **271**, 1598-1601.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. y Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 30-37.
- Place, R.B., Hiestand, D., Burri, S. y Teuber, M. (2002). *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened Cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 353-359.
- Poli, F., Cattaneo, R., Crespiatico, L., Nocco, A. y Sirchia, G. (1993). A rapid and simple method for reversing the inhibitory effect of heparin on PCR for HLA class II typing. *PCR Methods Appl.* **2**, 356-358.
- Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 125-148.
- Powell, H. A., Gooding, C. M., Garrett, S. D., Lund, B. M. y McKee, R. A. (1994). Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 59-61.

- Poyart, C., Quesnes, G., y Trieu-Cuot, P. (2000). Sequencing the Gene Encoding Manganese-Dependent Superoxide Dismutase for Rapid Species Identification of Enterococci. *J. Clin. Microbiol* **38**, 415-418.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., y Trieu-Cuot, P. (2001). Rapid and Accurate Species - Level Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Using the *sodA* Gene as a Target. *J. Clin. Microbiol* **39**, 4296-4301.
- Probst, A.J., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W. y Hammes, W.P. (1998). *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus*, Schleifer and Fischer 1982 subsp. *utilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 651-658.
- Proctor, M.E., Brosch, R., Mellen, J.W, Garret, L.A., Kaspar, C.W. y Luchansky, J.B. (1995). Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk . *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3177.-3179.

Q

- Quednau, M., Ahrné, S., Petersson, A. C. y Molin, G. (1998). Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *J. Appl. Microbiol.* **84**,1163-1170.

R

- Rahn, K., De Grandis, S.S., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C., Curtiss, R. y Gyles, C.L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* **6**, 271-279.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. y Coconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 1043-1049.
- Reuter, G. (1971). Laktobazillen und enverwandle microorganismen in fleisch und fleischwaren. S. Mitt. Lipolytische aktivitäten. *Fleischwirtschaft* **51**, 67-70.
- Richardson, J.F., Aparicio, P., Marples, R.R. y Cookson, B.D. (1991). Ribotyping of *Staphylococcus aureus*: an assessment using well-defined strains. *Epidemiol. Infect.* **112**, 93-101.
- Rijpens, N.P. y Herman, L.M.F. (2002). Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J. AOAC Int.* **85**, 984-995.
- Ripoll, M. (1992). Característiques del xoliç elaborat a la comarca del Pallars Jussà. Escola Superior d'Agricultura. Barcelona
- Roca, M. y Incze, K. (1990). Fermented sausages. *Food Rev. Int.* **6**, 91-118.
- Rödel, W., Stiebing, A. y Kröckel, L. (1993). Ripening parameters for traditional dry sausages with a mould covering. *Fleischwirtschaft* **73**, 848-853.
- Rodríguez, J. M. (1996). Detección de microorganismos patógenos en la carne y productos cárnicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Eurocarne* **52**.

- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. & *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 329-335.48,
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, E. Asensio, M.A. (1996). Gram-positive, catalase-cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1897-1902.
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, M.T., Hugas, M. y Pla, M. (2004). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1-3.
- Rodríguez-Rebollo, M. (1998). Manual de industrias cárnicas. Editado por Publicaciones técnicas Alimentarias, S.A., Cárnica 2000.
- Rosec, J.P. y Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 61-70.
- Rosenbach, F.J. (1884). Microorganismen bei den wund-infections-krankheiten des menschen. Bergmann, J.F. (ed.), pp. 1-122. Wiesbaden, Alemania.
- Rossbach, S.R., Rasul, G., Schneider, M., Eardley, B. y de Bruijn, F.J. (1995). Structural and functional conservation of the rhizopine catabolism (moc) locus is limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 549-559.
- Rosselló, C., Barbas, J. I., Berna, A. y López, N. (1995). Microbial and chemical changes in "Sobrasada" during ripening. *Meat Sci.* **40**, 379-385.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. y Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 37-45.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. y Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 365-371.
- Rubin, L. G., Tucci, V., Cercenado, E., Eliopoulos, G. y Isenberg, H. D. (1992). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in hospitalized children. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **13**, 700-705.
- Ryser, E.T. y Richard, J.A. (1992). Detection of bacteriocin activity in bacteria using hydrophobic grid membrane filters. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 104-107.
- Ryser, E.T. (1999). Food borne listeriosis. In *Listeria, Listeriosis and Food safety*. Ryser, E.T. y Marth, E.H. (eds). pp. 299-358. Marcel Dekker. New York, EE.UU.

S

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Samadpour, M., Grimm, L.M., Desai, B., Alfi, D., Ongerth, J.E. y Tarr, P.I. (1993). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 strains by bacteriophage λ restriction

- fragment length polymorphism analysis: application to a multistate foodborne outbreak and a day-care center cluster. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 3179-3183.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. y Metaxopoulos, J. (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 179-196.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlasi, M. y Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami- a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 69-82.
- Santos, E. M., González- Fernández, C., Jaime, I. y Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "chorizo". *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 123-128.
- Sarkar, G. y Sommer, S. (1990). Shedding light on PCR contamination. *Nature* **343**, 27.
- SAS Institute Inc. (1988). *SAS User's Guide: Statistics*. 5ª Edn. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Scanlan, R. (1995). Volatile nitrosamines in foods – an update. En *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Charalambous, G. (ed.) pp. 685-704. Elsevier Science B.V.
- Scheu, P.M., Berghof, K. y Stahl, U., (1998). Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* **15**, 13-31.
- Scheuer, R. (1995). Untersuchungen zur Bildung von Verrucosidin auf Rohwurst. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* **34**, 199-205.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* **4**, 199-208.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K. (1988). Hemmung des Salmonellenwachstums in frischer, streichfägiger Mettwurst ohne Zuckerstoffe. *Fleischwirtschaft* **68**, 1056-1067.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901-1906.
- Schillinger, U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. En *Biotechnology and Food Safety*, Bills, D.D. y Kung, S-D. (eds.), pp. 55-74. Butterworth-Heinemann Publishing. Boston, Massachusetts, EE.UU.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R. y Devriese, L.A. (1985). *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 501-509.
- Schleifer, K.H., Geyer, U., Kilpper-Bälz, R. y Devriese, L.A. (1983). Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *Lentus*, *Kloos et al.* to species status: *Staphylococcus lentus*, *Kloos et al.* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 382-387.
- Schleifer, K.H. y Fischer, U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 153-156.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R., Fischer, U., Faller, A. y Endl, J. (1982). Identification of "Micrococcus candidus" ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of "Micrococcus caseolyticus" ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 15-20.

- Schleifer, K.H. y Kloos, W.E. (1975). Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 50-61.
- Schmidt, T.M. (1994). Fingerprinting bacterial genomes using ribosomal RNA genes and operons. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 3-12.
- Schneider, M. y de Bruijn, F.J. (1996). Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* **12**, 163-174.
- Schöberl, H., Ruß, W., Schmid, J. y Meyer-Pittroff, R. (1997). High pressure treatment of minced beef. *Fleischwirtschaft. Int.* 34-36.
- Scholl, D. R., Kaufmann, C., Jollic, J. D., York, C. K., Goodrum, G. R. y Charache, P. (1990). Clinical application of novel sample processing technology for the identification of *Salmonellae* by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 237-241.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. y Broome, C.V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 169-183.
- Seager, M. S., Banks, J. G., Blackburn, C. y Board, R. G. (1986). A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. isolated from fermented sausages. *J. Food Sci.* **51**, 295-297.
- Sechi, L. A. y Daneo-Moore, L. (1993). Characterization of intergenic spacers in two *rrn* operons of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *J. Bacteriol.* **175**, 3213-3219.
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T. y Tenreiro, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 13-22.
- Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Kindahl, G. y Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* **67**, 193-200.
- Shankar, N., Lockett, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S. y Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69**, 4366-4372.
- Shaw, C., Stitt, y J.M. y Cowan, S.T. (1951). Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 1010-1023.
- Sheridan, G. E., Masters, C. I., Shallcross, J. A. y MacKey, B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1313-1318.
- Sheuer, R. y Rödel, W. (1995). Bestimmung von Biogenen Aminen in fermentierten Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft.* **75**, 73-75.
- Sierra, M., Gonzales Fandos, M.E., García, M.C., García, M.L. y Moreno, B. (1995). Numerical taxonomy of an "atypical" population of Gram-positive cocci isolated from freshly dressed lamb carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 363-373.

- Sidebottom, D. G., Freeman, J., Platt, R., Epstein, M.F. y Goldmann, D.A. (1988). Fifteen-year experience with bloodstream isolates of coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 713-718.
- Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213-231.
- Silla-Santos, M.H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 227-230.
- Silva, M. T., Appelberg, R., Silva, M. N. T. y Macedo, P. M. (1987). *In vivo* killing and degradation of *Mycobacterium aurum* within mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **55**, 2006-2016.
- Simon, M.C., Gray, D.I. y Cook, N. (1996). DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 822-824.
- Simonetti, P. y Cantoni, C. (1983). Coagulase negative staphylococci for dry sausage ripening. *Industrie Alimentari* **22**, 262-264.
- Singh, K. V., Coque, Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (1998a). *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **21**, 323-331.
- Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (1998b). Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* **17**, 1416-1420.
- Singer-Sam, J., Tanguay, R. L. y Riggs, A. D. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* **3**, 11.
- Sloos, J.H., Dijkshoorn, L., Vogel, L. y van Boven, C.P. (2000). Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J. Clin Microbiol.* **38**, 2488-2493.
- Smith, J.L., y Palumbo, S.A. (1980). Inhibition of aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Saf.* **4**, 221-233.
- Spencer, R.C. (1996). Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 281-5.
- Spergser, J., Wieser, M., Täubel, M., Rosselló-Mora, R.A., Rosengarten, R. y Busse, H.J. (2003). *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2007-2011.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. y Schumann, P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 682-692.
- Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., McVey, S. y Chengappa, M.M. (1994). Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol* **32**, 1742-1749.

- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. y Hammes, W.P. (1995). The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* **201**, 79-82.
- Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819-846.
- Swaminathan, B. y Matar, G.M. (1993). Molecular typing methods. En *Diagnostic molecular microbiology, principles and applications*. Persing, D. H., Smith, T.F., Tenover, F.C. y White, T.J. (eds.), pp. 26-50.
- Swartz, M.N. (2002). Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin. Infect. Dis.* **34**, S111-122.

T

- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
- Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M. y Komagata, K. (1992). *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 577-581.
- Tansel, O., Kuloglu, F., Mutlu, B., Anthony, R.M., Uyar, A., Vahaboglu, H. y French, G.L. (2003). A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a new University hospital due to a strain transferred with an infected patient from another city six months previously. *New Microbiol.* **26**, 175-180.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. y Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 1-10.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing D.H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239.
- Tenover, F. C. y Hughes, J. M. (1996). The challenges of emerging infectious diseases. *J. Am. Med. Ass.* **275**, 300-304.
- Tenover, F. C. y McGowan, J.E. (1996). Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am. J. Med. Sci.* **311**, 9-16.
- Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitramm J., McAllister S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevittm, L., Patel, J.B. y Bozdogan, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 275-280.
- Teuber, M., Meile, L. y Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 115-137.
- Thomas, T. D., Ellwood, D. C. y Longyear, V. M. C. (1979). Changes from homo- to heterofermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat culture. *J. Bacteriol.* **138**, 109-117.

- Tilsala-Timisjärvi, A. y Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 49-56.
- Toldrá, F. (1992). The enzymology of dry-curing of meat products. En *New technologies for meat and meat products*. F.J.M. Snulders, F. Toldrá, J. Flores y M. Prieto (eds.), Utrecht: ECCEAMST, Nijmegen. Audet Tijdschriften, Holanda, pp 209-231.
- Torriani, S., Dellaglio, F. y Palummeri, M. (1990). Characterization of Lactobacilli Isolated from Italian Salami. *Ann. Microbiol.* **40**, 225-233.
- Tricker, A. y Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat. Res.* **259**, 277-289.
- Trovatelli, L. D. y Schiesser, A. (1987). Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft* **42**:717-719.
- Tseng, C. P. y Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol.* **9**, 113-121.
- Tyagi, S. y Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.* **14**, 303-308.
- Tyler, K.D., Wang, G., Tyler, S.D., Johnson W.M. (1997). Factors affecting the reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 339-346.

U

- Udo, E.E., Al-Bustan, M.A., Jacob, L.E. y Chugh, T.D., (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol.* **48**, 819-823.
- Ulrich, P.P., Romeo, J.M., Daniel, L.J. y Vyas, G.N. (1993). An improved method for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma utilizing heminested primers and internal control RNA. *PCR Methods Appl.* **2**, 241-249.

V

- Van Belkum, A., de Jonckheere, J. y Quint, W.G.V. (1992). Genotyping *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2595-2598.
- Van Belkum, A. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 174-178.
- Van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W.G.V., Peters, E. *et al.* (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1537-1547.
- Vandekerkhove, P. (1977). Amines in dry fermented sausages. *J. Food Sci.* **42**: 283-285.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.
- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 221-237.

- van Netten, P., Leenaerts, J., Heikant, G.M., y Mossel, D.A. (1986). A small outbreak of salmonellosis caused by Bologna sausage. *Tijdschr Dieegeneeskde* **24**, 1271-1275.
- Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G. y Gala, J. (1995). Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2864-2867.
- Varaldo, P.E., Kilpper-Bälz, R., Biavasco, F., Satta, G. y Schleifer, K.H. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 436-439.
- Varnan, A.H. y Sutherland, J.P. (1998). Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- Vauterin, L.A y Vauterin, P. (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **1**, 37-41.
- Vázquez, A.J. y Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de internet. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**, 113-120.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J. y Freney, J. (2000). *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1521-1527.
- Verplaetse, A., De Bosschere, M. y Demeyer, D. (1989). Proteolysis during dry sausage ripening. En *Proceedings 35th ICoMST*, Vol. III, Copenhagen, Dinamarca, pp. 815-818.
- Verplaetse, A. (1994). Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products. En *Proceedings 40th International Congress of Meat Science Technology*, La Haya, Holanda, pp 45-65.
- Versalovic, J.T., Woods, J.R. Jr, Georgiou, P.R. Hamill, R.J. y Lupski, J.R. (1993). DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **117**, 1088-1098.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. y Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 25-40.
- Versalovic, J., F. J. De Bruijn y J. R. Lupski. (1997). Rep-PCR based DNA fingerprinting of bacterial genomes. En *Bacterial genomes: physical structure and analysis*. De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. y Weinstock, G. M. (eds.), pp. 437-454. Chapman & Hall. New York, N.Y, EE.UU.
- Veyrat, A., Miralles, M.C. y Pérez-Martínez, G. (1999). A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 49-61.
- Vicini, E. y Raczynski, R. G. (1977). The microflora of "Felino" type salami. *Industria Conserve* **52**, 235-242.
- Vila, J., Marcos, M.A. y Jiménez de Anta, M.T. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* **44**, 482-489.

Vogel, R.F., Lohmann, M., Weller, A.N., Hugas, M. y Hammes, W.P. (1991). Structural similarity and distribution of small cryptic plasmids of *Lactobacillus curvatus* and *L.sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**, 183-190.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M. *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.

W

Walsh, P. S., Metzger, D. A. y Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506-513.

Wall, P. G., Morgan, D., Lamden, K., Ryan, M., Griffin, M., Threlfall, E. J., Ward, L. R. y Rowe, N. (1994). A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis. Rep.* **4**, R130-R135.

Wang, R.-F., Cao, W.-W. y Johnson, M. G. (1992). 16S rRNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2827-2831.

Warthesen, J., Scanlan, R., Bills, D. y Libbey, L. (1975). Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *J. Agricult. Food. Chem.* **23**, 898-902.

Waters, C. M. y Dunny, G. M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J. Bacteriol.* **183**, 5659-5667.

Webster, J.A., Bannerman, T.L., Hubner, R.J., Ballard, D.N., Cole, E.M., Bruce, J.L., Fiedler, F., Schubert, K. y Kloos, W.E. (1994). Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with *EcoRI* fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 454-460.

Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Jensen, L. B., Hammerum, A. M. y Bager, F. (1999). Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 329-335.

Welinder-Olsson, C., Stenqvist, K., Badenfors, M., Brandberg, A., Floren, K., Holm, M., Holmberg, L., Kjellin, E., Marild, S., Studahl, A. y Kaijser B. (2004). EHEC outbreak among staff at a children's hospital-use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. *Epidemiol. Infect.* **132**, 43-49.

Welsh, J. y McCelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.

Wernars, K. y Notermans, S. (1990). *Gene Probes for Bacteria*. Macario, A. J.L. y Conway de Macario, E. (eds.), pp 353-356. Academic Press. San Diego, California, EE.UU.

Weyant, R. S., Edmunds, P. y Swaminathan, B. (1990). Effect of ionic and noionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques* **9**, 308-309.

- Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R., Verdonk, G. P. H. T. y Verhoef, J. (1992). The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* in faecal samples. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3195-3199.
- Wiedbrauk, D. L., Werner, J. C. y Drevon, A. M. (1995). Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2643-2646.
- Wielders, C.L.C., Vriens, M.R., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L.A.M., Troelstra, A., Fleer, A., Schmitz, F.J., Verhoof, J. y Fluit, A.C. (2001). Evidence for *in vivo* transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1674-1675.
- Wilson, S. G., Chan, S., Deroo, M., Vera-García, M., Johnson, A., Lane, D. y Halbert, D. N. (1990). Development of a colorimetric, second generation nucleic acid hybridization method for detection of *Salmonella* in foods and a comparison with conventional culture procedure. *J. Food Sci.* **55**, 1394-1398.
- Willshaw, G. A., Smith, H. R., Scotland, S. M. y Rowe, B. (1985). Cloning of genes determining the production of Verocytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 3047-3053.
- Wirth, R. (1994). The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis* more than just a plasmid-collection mechanism? *Eur. J. Biochem.* **222**, 235-246.
- Witte, W. (1999). Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **44** (Supl. A), 1-9.
- Wortberg, B. y Woller, R. (1982). Zur Qualität und Frische von Fleisch und Fleischwaren im Hinblick auf ihren Gehalt an biogenen Aminen. *Fleischwirtschaft*, **62**, 1457-1460, 1463.

Y

- Yu, L.S.L., Prasai, R.K. y Fung, D.Y.C. (1995). Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility enrichment. *J. Food Prot.* **66**, 65-71.

Z

- Zakrzewska-Czerwinska, J., Gaszewska-Mastalarz, A., Lis, B., Gamian, A. y Mordarski, M. (1995). *Staphylococcus pulvereri* sp. nov., isolated from human and animal specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 169-172
- Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentations. En *Fermented meats*. G. Campbell-Platt y P.E. Cook (eds.), pp. 53-68. Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de embutidos fermentados según Roca e Incze (1990).	7
Tabla 2. Clasificación de embutidos fermentados (Lücke, 1998).	7
Tabla 3. Reclasificación de las especies del género <i>Micrococcus</i> (Stackebrandt <i>et al</i> , 1995). ...	27
Tabla 4. Especies y subespecies del género <i>Staphylococcus</i> y clasificación en función de la producción de coagulasa (en plasma de conejo).....	28
Tabla 5. Características de algunos métodos rápidos	42
Tabla 6. Características de los sistemas de tipificación de bacterias	56
Tabla 7. Ventajas y desventajas de varios métodos genotípicos de tipificación (Farber, 1996).	67
Tabla 8. Cepas de colección. Especie, denominación y procedencia.....	76
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la detección, identificación y caracterización de microorganismos.....	87
Tabla 10. Otros oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de interés y para la construcción de un control interno de amplificación (IAC)	88
Tabla 11. Componentes, volúmenes y concentraciones de una mezcla de PCR estándar.	101
Tabla 12. Condiciones de PCR para la detección de BAL y CGC+	102
Artículo I. Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas en el estudio	123
Artículo I. Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR, secuencia, especificidad y localización en el operón ARNr	123
Artículo I. Tabla 3. Protocolo de PCR optimizado para cada especie estudiada.	124

Artículo I. Tabla 4. Análisis físico-químico de los productos.....	124
Artículo I. Tabla 5. Recuentos microbianos.....	126
Artículo II. Tabla 1. Resultados de los recuentos de <i>L. monocytogenes</i> en chorizo inoculado artificialmente utilizando el método de NMP-PCR y plaqueo en agar Palcam	141
Artículo III. Tabla 1. Genes diana, secuencias de los cebadores empleados y tamaño del producto de PCR	149
Artículo III. Tabla 2. Cepas bacterianas y serotipos de <i>L. monocytogenes</i> utilizados para evaluar la especificidad del ensayo de PCR Lip1-Lip-3.....	151
Artículo IV. Tabla 1. Cebadores utilizados en el estudio y condiciones de PCR	171
Artículo IV. Tabla 2. Comparación de la variabilidad intra-específica de las bacterias del ácido láctico obtenida con las diferentes técnicas utilizadas	172
Artículo IV. Tabla 3. Porcentaje de cepas productoras de aminas biógenas	172
Artículo IV. Tabla 4. Prevalencia de bacterias del ácido láctico resistentes a antibióticos en los embutidos fermentados ligeramente acidificados	174
Artículo V. Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas en este estudio.....	196
Artículo V. Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en este estudio	197
Artículo V. Tabla 3. Prevalencia de enterococos resistentes a antibióticos en los embutidos fermentados ligeramente acidificados.....	198
Artículo VI. Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas en este estudio	220
Artículo VI. Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio y condiciones de PCR	221
Artículo VI. Tabla 3. Porcentaje de cepas de cocos gram-positivos-catalasa positivos con capacidad proteolítica y lipolítica	222
Artículo VI. Tabla 4. Porcentaje de cepas de cocos gram-positivos-catalasa positivos productoras de aminas biógenas	223

Artículo VI. Tabla 5. Prevalencia de cocos gram-positivos-catalasa positivos resistentes a antibióticos en los embutidos fermentados ligeramente acidificados.....	224
Artículo VI. Tabla 6. Comparación de la variabilidad intra-específica de los cocos gram-positivos catalasa-positivos obtenida con las diferentes técnicas utilizadas	225
Artículo VII. Tabla 1. Recuentos microbianos y valores de pH obtenidos en fuet, elaborado con y sin la adición de cultivos iniciadores y envasado al vacío, durante los 28 días de almacenamiento a 20°C.....	253
Artículo VII. Tabla 2. Recuentos microbianos y valores de pH obtenidos en chorizo, elaborado con y sin la adición de cultivos iniciadores y envasado al vacío, durante los 28 días de almacenamiento a 20°C.....	254

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de elaborados cárnicos en España (1994-2003).	5
Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de un embutido. Adaptado de Lücke (1998). ...	14
Figura 3. Interacciones entre BAL y CGC+ que se establecen durante la fermentación de los productos cárnicos (Buckenhüskes, 1993).....	30
Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa	46
Figura 5. Proceso del método de la nucleasa 5' (Taqman™) de PCR a tiempo real.	52
Figura 6. Estructura de una sonda <i>Molecular Beacon</i>	53
Figura 7. Representación esquemática de un análisis de perfiles plasmídicos.	57
Figura 8. Representación esquemática del análisis del análisis de restricción del ADN con endonucleasas (REA).	59
Figura 9. Ilustración esquemática de la PFGE.	60
Figura 10. RAPD análisis de dos muestras de ADN.	62
Figura 11. Representación esquemática del análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	65
Artículo I. Figura 1. Gráficos de “caja y bigotes” (box-and-whiskers) del análisis físico-químico de los embutidos fermentados ligeramente acidificados.....	125
Artículo I. Figura 2. Gráficos de “caja y bigotes” (box-and-whiskers) de los recuentos microbianos de los embutidos fermentados ligeramente acidificados.....	127
Artículo I. Figura 3. Comparación de las secuencias de las regiones separadoras intergénicas del 16S-23S ARNr de cepas de <i>Staphylococcus xylosus</i> de orígenes diferentes	128

Artículo I. Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de <i>L. sakei</i> y <i>S. xylosus</i>	129
Artículo I. Figura 5. Porcentajes de embutidos que contienen las diferentes especies bacterianas estudiadas.....	130
Artículo II. Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del NMP-PCR de la muestra XB1 utilizando el método de filtración como tratamiento pre-PCR del enriquecimiento en caldo Half Fraser	142
Artículo II. Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de muestras tratadas con el método de filtración y con la resina Chelex® 100.....	142
Artículo III. Figura 1. Amplificación del gen diana de <i>Listeria monocytogenes</i> o <i>Salmonella</i> spp. con o sin el correspondiente control interno de amplificación.....	150
Artículo III. Figura 2. Detección por PCR multiplex de <i>Salmonella</i> London y <i>Listeria monocytogenes</i> empleando el mismo número de moléculas de ADN y células y diferentes cantidades de células de cada microorganismo.....	151
Artículo III. Figura 3. Detección por PCR multiplex de <i>Salmonella</i> London y <i>Listeria monocytogenes</i> en jamón cocido contaminado artificialmente	152
Artículo IV. Figura 1. Dendograma obtenido mediante la combinación de los perfiles de bandas obtenidos por RAPD-PCR y perfiles plasmídicos de las cepas de <i>Lactobacillus sakei</i> estudiadas.	173
Artículo V. Figura 1. Perfiles de RAPD-PCR de las cepas de enterococos	199
Artículo V. Figura 2. Dendograma obtenido de los 60 perfiles de RAPD-PCR diferentes obtenidos a partir de las 106 cepas de enterococos estudiadas.....	200
Artículo V. Figura 3. Dendograma generado a partir de los 78 perfiles diferentes obtenidos de los datos higiénico-sanitarios de los aislados de enterococos estudiados	201
Artículo VI. Figura 1. Dendograma obtenido mediante la combinación de los perfiles de bandas obtenidos por RAPD-PCR y perfiles plasmídicos de las cepas de <i>Staphylococcus xylosus</i> estudiadas.	226

Artículo VII. Figura 1. Evolución del pH durante la maduración de los embutidos (chorizo y fuet) elaborados con y sin cultivos iniciadores. 249

Artículo VII. Figura 2. Perfiles plasmídicos y de RAPD-PCR de los 20 aislados de bacterias del ácido láctico de chorizo elaborado con cultivos iniciadores tras 21 días de maduración. 250

Artículo VII. Figura 3. Evolución de los recuentos de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y *Listeria monocytogenes* durante la maduración de los embutidos (chorizo y fuet) elaborados con y sin cultivos iniciadores. 251

Artículo VII. Figura 4. Contenido en aminas biógenas en fuet y chorizo con y sin cultivos iniciadores tras 21 días de maduración. 252

Artículo VII. Figura 5. Contenido en aminas biógenas en fuet y chorizo con y sin cultivos iniciadores tras 28 días de almacenamiento envasados al vacío. 255

ÍNDICE DE PUBLICACIONES

ARTÍCULO I	121
Teresa Aymerich, Belén Martín, Margarita Garriga y Marta Hugas (2003)	
Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Non-pathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . 69 , 4583-4594.	
ARTÍCULO II	139
Belén Martín, Anna Jofré, Margarita Garriga, Marta Hugas y Teresa Aymerich (2004).	
Quantification of <i>Listeria monocytogenes</i> in fermented sausages by MPN-PCR method. <i>Letters in Applied Microbiology</i> 39 , 290-295	
ARTÍCULO III	147
Anna Jofré , Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas, Maria Pla, David Rodríguez-Lázaro y Teresa Aymerich (2005). Simultaneous detection of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i> by multiplex PCR in cooked ham. <i>Food Microbiology</i> 22 , 109-115.	
ARTÍCULO IV	161
Teresa Aymerich, Belén Martín, Margarita Garriga, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Marta Hugas. Safety properties and strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages (enviado).	
ARTÍCULO V	183
Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas y Teresa Aymerich. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. <i>Journal of Applied Microbiology</i> (aceptado).	
ARTÍCULO VI	209
Belén Martín, Margarita Garriga, Marta Hugas, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Teresa Aymerich. Molecular, technological and safety characterization of gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages (enviado).	
ARTÍCULO VII	237
Margarita Garriga, Begonya Marcos, Belén Martín, Marta Hugas, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana y Teresa Aymerich.	
Starter cultures and high pressure processing to improve hygiene and safety of slightly fermented sausages (enviado).	

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
3SR	(<i>self-sustained sequence replication</i>) replicación de secuencia autosostenida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AFLP	(<i>Amplified fragment length polymorphism</i>) polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNr 16S	Subunidad 16S del ARN ribosómico
a_w	Actividad de agua
BAL	Bacterias del ácido láctico
BSA	Albúmina sérica bovina
Cebador F/R	Cebador directo(<i>forward</i>)/ inverso (<i>reverse</i>)
CGC+	Cocos gram-positivos catalasa-positivos
CIA	Control interno de amplificación
D.O.	Densidad óptica
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
ECN	Estafilococos coagulasa negativos
EDTA	<i>Di-sodium ethylenediaminetetra-acetate.2H2O</i> (Di-sodio etilenediaminetetra-acetato. 2H2O)
EFLA	Embutidos fermentados ligeramente acidificados
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
g	Gramos
h	Horas
HHP	Alta presión hidrostática

HR	Humedad relativa
Kb	Quilobase
M	Molar
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
MLST	<i>(Multilocus sequence typing)</i> tipificación de secuencias multilocus
NASBA	<i>(nucleic acid sequence-based amplification)</i>
ng	Nanogramo
nmol	Nanomol
NMP	Número más probable
°C	Grados centígrados
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis de campo pulsado)
pmol	Picomol
ppm	Partes por millón
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN)
REA	<i>Restriction Enzyme Analysis</i> (Análisis de restricción enzimática)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic sequences (Secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas)
rep-PCR	<i>Repetitive Element PCR Fingerprinting</i> (Amplificación de elementos repetitivos)
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rrn	Operón del ARN ribosómico
RT-PCR	<i>(Reverse transcription-polymerase chain reaction)</i> PCR de transcripción inversa
T	Temperatura
T_A	Temperatura de anillamiento
Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> ADN polimerasa

TAS	(<i>Transcription-based amplification system</i>) sistema de amplificación de la transcripción
TM	Toneladas métricas
TRIS	Tris[hidroximetil]aminometano
Tris-HCl	Tris[hidroximetil]aminometano – ácido clorhídrico
<i>tyrdc</i>	Gen de la tiramin-descarboxilasa
ufc	Unidad formadora de colonia
UPGMA	<i>Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Averages</i> (Análisis de agrupamientos por ligamiento promedio)
v	Volumen