



Universidad de León

Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos

***“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE
LA CARNE DE CONEJO Y
ESTIMACIÓN DE LA EFICACIA DE
ALGUNOS TRATAMIENTOS
TECNOLÓGICOS DE
CONSERVACIÓN”***



TESIS DOCTORAL

Jose M^a
Rodríguez Calleja

León, 2006

Se permite la libre reproducción, distribución y exhibición de esta Tesis Doctoral, con las condiciones de que no sea para un uso comercial y se mencione la fuente y autor.

Esta Tesis Doctoral se presenta por el sistema de “compendio de publicaciones”, de acuerdo con la normativa complementaria del Real Decreto 778/1998, de 30 de abril, y de las normas para la aplicación del citado Real Decreto, aprobada por acuerdo de Junta de Gobierno de la Universidad de León el 10 de mayo de 1999.



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

La Dra. Dña. **María Luisa García López** y el Dr. D. **Andrés Otero Carballeira** como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “*Calidad microbiológica de la carne de conejo y estimación de la eficacia de algunos tratamientos tecnológicos de conservación*” realizada por D. **Jose M^a Rodríguez Calleja** en el **Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos**, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 9 de febrero de 2006.

M^a Luisa García López

Andrés Otero Carballeira

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

τ , amplitud de pulso	D ₁₀ , dosis de irradiación que produce una reducción decimal
A, absorbancia	E, eritromicina
AMACO, Asociación Nacional de Mataderos de Aves y Conejos	EAEC/EaggEC, <i>E. coli</i> enteroagregativo
APPCC, Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos	EAM, envasado en atmósfera modificada
AZM, azitromicina	EHEC, <i>E. coli</i> enterohemorrágico
b, parámetro de escala (curvas de supervivencia)	EIEC, <i>E. coli</i> enteroinvasivo
BAL, bacterias ácido-lácticas	Enter., <i>Enterobacteriaceae</i>
BT, <i>Brochothrix thermosphacta</i>	EPEC, <i>E. coli</i> enteropatógeno
C, cloranfenicol	ERV, volumen de extracto liberado
CA, California	ETEC, <i>E. coli</i> enterotoxigénico
ca., próximo a	F, nitrofurantoína
CAE, Código Alimentario Español	FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
CAMP, test de Christie-Atkins-Munch-Peterson	FAOSTAT, base de datos estadísticos de la FAO
CC1, supermercado 1	FDA, Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
CC2, supermercado 2	G, pequeño matadero
CE, Comunidad Europea	GN, gentamicina
CFC, suplemento ceftrimida, fucidina y cefaloridina	GNU, tarjetas de identificación de bacterias Gram negativas
CIN, suplemento cefsulodina, irgasan y novobiocina	HGs, genoespecies o grupos de hibridación
CIP, ciprofloxacina	HR, humedad relativa
CLR, claritromicina	IAEA, Agencia Internacional para la Energía Atómica
col., colaboradores	ICMSF, Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos
Colif., coliformes	Id, índice de poder discriminante
CPSR, clostridios psicrotrofos sulfito reductores	IL, Illinois
CV, cristal violeta	LEV, levofloxacina
CH, colitis hemorrágica	Levs, levaduras
DA, clindamicina	LIA, agar con hierro, lisina y arginina
DAEC, <i>E. coli</i> difuso-adherente	log ₁₀ , logaritmo decimal
DFD, condición de la carne seca, dura y firme	LOM, lomefloxacina
DL50, dosis letal 50%	LPS, lipopolisacárido
DNA, ácido desoxirribonucleico	M, matadero de gran capacidad
Dt, tiempo de reducción decimal en un tratamiento térmico	
D _{MS} , tiempo de reducción decimal en un tratamiento de manosonicación	

M.A.P.A., Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación	RFLP, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
M-A, grupo <i>Moraxella-Acinetobacter</i>	RNA, ácido ribonucleico
MN, Minesota	RPF, suplemento con plasma de conejo y fibrinógeno bovino
MRS, agar de Man, Rogosa y Sharpe	RTi-PCR, PCR a tiempo real
MS, manosonicación	S.a. ca+, <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positivos
MTS, manotermosonicación	SAA, agar almidón ampicilina
MUG, 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido	SIM, separación inmuno-magnética
n, parámetro de forma (curvas de supervivencia)	STAA, agar con acetato de talio, cicloheximida y sulfato de estreptomicina
NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido difosfato	STEC, cepas de <i>E. coli</i> productoras de toxina Shiga
ND, valor inferior al límite de detección de la técnica	Stxs, toxinas de la familia Shiga
NHS, biotipo sin hospedador específico	SUH, síndrome urémico hemolítico
NI, no investigado	SXT, trimetoprim/sulfametoxazol
NOR, norfloxacin	TC-SMAC, agar de MacConkey con sorbitol, telurito y cefixima
OFX, ofloxacin	TE, tetraciclina
OGYEA, agar extracto de levadura con glucosa y oxitetraciclina	TEC, teicoplanina
OX, oxacilina	TSA-YE, agar triptona de soja con extracto de levadura
p, nivel de significación	TSB-YE, caldo triptona de soja con extracto de levadura
P, penicilina	TSI, agar con tres azúcares e hierro
PCA, “agar para recuento en placa”	UE, Unión Europea
PCR, reacción en cadena de la polimerasa	ufc, unidad formadora de colonia
PEF, pulsos eléctricos de alto voltaje	UK, Reino Unido
PFGE, electroforesis en gel de campo pulsado	USDA, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
pH ₂₄ , pH a las 24 h <i>post-mortem</i>	VRBGA, agar glucosa rojo neutro con cristal violeta y bilis
PPT, púrpura trombótica trombocitopénica	VT1 y VT2, verotoxinas 1 y 2
PSBB, caldo de peptona, sorbitol y sales biliares	VTEC, <i>E. coli</i> verotoxigénico
Pseudom., <i>Pseudomonas</i>	W, trimetoprim
QIM/MIC, Método del Índice de Calidad	WHO, Organización Mundial de la Salud
r, coeficiente de correlación	XLD, agar con xilosa, lisina y desoxicolato
R.D., Real Decreto	z, grados para una variación logarítmica del valor D
r.p.m., revoluciones por minuto	
r ² , coeficiente de regresión	
RAM, microbiota aerobia mesófila	
RAP, microbiota aerobia psicrotrofa	
RAPD, análisis de perfiles del DNA por amplificación aleatoria	
RD, rifampicina	

◆ Introducción general_____	1
◆ Objetivos_____	29
◆ Relación de publicaciones originadas a partir de esta Tesis Doctoral_____	31
◆ <u>Capítulo 1</u> - Calidad microbiológica de la carne de conejo_____	33
◆ <u>Capítulo 2</u> - Desarrollo de la microbiota aerobia alterante de la carne de conejo almacenada a refrigeración_____	51
◆ <u>Capítulo 3</u> - Incidencia e identificación de bacterias patógenas aisladas en carne de conejo almacenada a refrigeración_____	67
◆ <u>Capítulo 4</u> - Tipificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de carne de conejo almacenada a refrigeración_____	95
◆ <u>Capítulo 5</u> - Resistencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas en carne de conejo al calor, los ultrasonidos bajo presión y los pulsos eléctricos de alto voltaje_____	117
◆ <u>Capítulo 6</u> - Tecnologías de conservación aplicadas a la carne de conejo: Envasado a vacío y envasado en atmósferas de 100% CO ₂ y mezcla de 35% CO ₂ : 35% O ₂ : 30% N ₂ _____	143
◆ <u>Capítulo 7</u> - Incidencia, radiorresistencia y comportamiento de <i>Psychrobacter</i> spp. en carne de conejo_____	175
◆ Conclusiones _____	193
◆ Bibliografía _____	199
◆ Índice de tablas y figuras_____	225

INTRODUCCIÓN GENERAL-



I. La carne de conejo_____	3
II. Microbiología de la carne_____	8
● Almacenamiento en presencia de oxígeno_____	11
● Almacenamiento a vacío y en atmósfera modificada_____	13
● Bacterias patógenas de transmisión alimentaria_____	18
III. Conservación de los alimentos_____	22

I. LA CARNE DE CONEJO

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es una de las especies animales con mayor eficacia biológica, estimándose que una hembra puede producir al año entre 16 y 18 veces su peso en gazapos; mientras que en el caso del vacuno, la media es de 0.64 (Rosell, 2000a). A estas características económicas relacionadas con la producción animal hay que añadir las características de su carne en cuanto a su composición y calidad, su textura y su digestibilidad, cualidades éstas muy apreciables tanto para la población en general como para determinados grupos con necesidades específicas (USDA, 1986). Por ello, algunas importantes asociaciones nacionales, como la Sociedad Española de Cardiología, la Sociedad Española de Arteriosclerosis y la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria fomentan el consumo de la carne de conejo (INTERCUN, 2005). En general y en comparación con otros tipos de carnes, el contenido proteico es mayor, su perfil aminoacídico la sitúa entre las de mayor valor biológico, además de presentar niveles de grasa y colesterol más bajos. También existen diferencias en el contenido de aminoácidos, algunas vitaminas y minerales, y en la composición lipídica ya que presenta importantes porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 (Dalle Zotte, 2002; Gracey y col., 1999; Lebas y col., 1997; Parigi Bini y col., 1992). A pesar de todas estas ventajas, el consumo de la carne de conejo no es habitual en muchos países, probablemente debido a la tradición y a factores culturales.

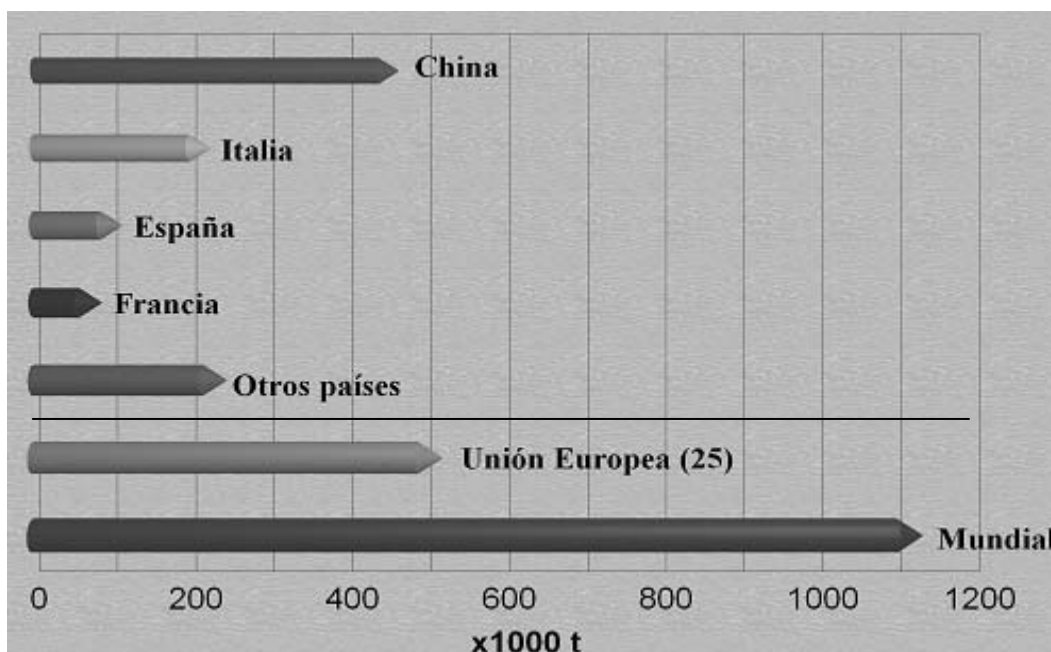
Un examen de la bibliografía pone de manifiesto que existe un número considerable de trabajos dedicados a los factores que influyen en la composición de la carne de conejo y en su calidad organoléptica (genética, alimentación, manejo, sacrificio, etc.). Sin embargo, información sobre aspectos esenciales como la calidad microbiológica de las canales y cortes y la posibilidad de incrementar su vida útil y de potenciar su comercialización mediante el empleo de nuevas tecnologías de envasado son prácticamente inexistentes.

Destaca en relación con la calidad microbiológica el hecho de que son muy escasos los trabajos en los que se investigan la carga microbiana o los indicadores de alteración, no existiendo datos acerca del tipo e incidencia de bacterias patógenas ni sobre la identidad y actividad de la flora alterante.

Entre las escasas publicaciones dedicadas a investigar la carga microbiana o los parámetros utilizados como indicadores de vida útil (pH, ERV, etc.) se encuentran las de un grupo francés liderado por el Dr. Ouhayoun (Cabanes y col., 1994; Hulot y col., 1999; Ouhayoun y col., 1989; Ouhayoun y col., 1996). Trabajos ocasionales han sido los siguientes: Gariepy y col. (1986), realizado en Canadá; Khalafalla (1993), realizado en Egipto; Pérez Chabela y col. (1999) realizado en México; y Bobbit (2002; 2003) realizados en Australia. También hay que citar algunos estudios realizados en China y el Capítulo IX de la obra “Enfermedades del Conejo” (Tantiñá y col., 2000) dedicado a la higiene de la carnización. Recientemente, se han publicado dos artículos de autores españoles (Berruga y col., 2005; Vergara y col., 2005) en los que se estudia el efecto del envasado en atmósfera modificada sobre la calidad de la carne de conejo. También en España, contamos con varios grupos dedicados a estudiar diversos aspectos de producción de la carne de conejo, encontrándose los más relevantes en la Universidad Politécnica de Valencia y en el IRTA.

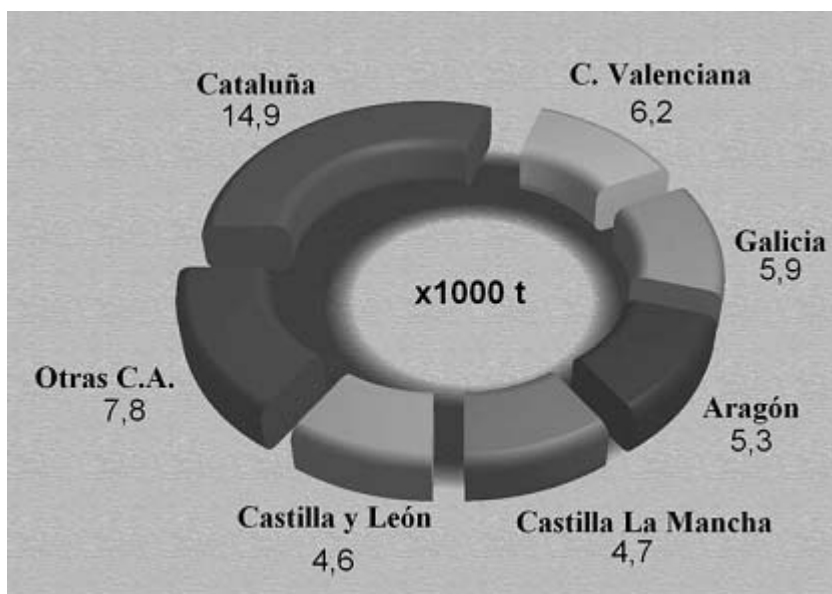
En el año 2004, la producción mundial de carne de conejo se estimó en 1121000 toneladas (FAOSTAT, 2005). En la figura 0.1 se representa la distribución mundial de la producción, donde destaca China como el mayor productor (460000 t), seguido por Italia (222000 t), España (110862 t) y Francia (85200 t). La producción de estos tres países europeos representa el 80% de la producción total de carne de conejo en los 25 países de la UE.

Figura 0.1.- Representación de la producción mundial de carne de conejo en el año 2004, en miles de toneladas (FAOSTAT, 2005).



En España el incremento de la producción de carne de conejo en los últimos 10 años se aproxima al 20% debido, entre otras razones, a los esfuerzos realizados para modernizar el sector. Por comunidades autónomas (figura 0.2) y según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A., 2003a), las zonas de mayor producción se encuentran en Cataluña y la Comunidad Valenciana. Tras éstas, Galicia, Aragón y las dos Castillas. En Castilla y León, la producción de canales de conejo en la provincia de Valladolid es muy superior al resto, aproximadamente representa el 82% del total, y en la provincia de León se produjo solamente el 1% (39.6 t) (M.A.P.A., 2004a).

Figura 0.2.- Producción de carne de conejo en mataderos españoles en el año 2003 agrupada por Comunidades Autónomas, en miles de toneladas (M.A.P.A., 2003a).



El sacrificio en mataderos representa un porcentaje variable dependiendo del país (ca. 50% en España) y generalmente coincide con la producción destinada al mercado. En algunos establecimientos coexisten líneas de sacrificio de conejos con líneas de sacrificio de aves. Refiriéndonos a los mataderos exclusivamente de conejos; en nuestro país, en el año 2003, eran 96, lo que suponía el 21% del total de los mataderos de ambas especies. En ese año, la Asociación Nacional de Mataderos de Aves y Conejos y Salas de Despiece llevó a cabo un estudio del sector, destacando en el informe final como características más importantes la atomización y la progresiva evolución hacia los productos elaborados como alternativa para rentabilizar y aumentar el valor añadido de estas carnes (AMACO, 2003). En los últimos años, el sector cunícola español ha estado sometido a cambios en su estructura tradicional y ha evolucionado, principalmente, hacia un proceso de concentración para intentar aumentar su competitividad. La mayoría de los mataderos de aves y conejos se localizan en el este y sur de España (Cataluña, Comunidad Valenciana y Andalucía), agrupando a más de la mitad del total. Sin embargo, según su actividad

cunícola, después de Cataluña y junto a la Comunidad Valenciana y Navarra, destaca Castilla y León. Esta última comunidad autónoma ha experimentado un importante desarrollo durante el periodo 1999 a 2001 (AMACO, 2003).

En 2004, el consumo de carne en España fue de 66.3 kg/persona (M.A.P.A., 2004b). El consumo de carne de conejo es bastante menor que el de carnes de otras especies, presentando un consumo *per capita* de aproximadamente 1.7 kg/año (M.A.P.A., 2003b), muy variable según el ámbito geográfico, el tamaño del núcleo urbano y la situación coyuntural de otros sectores cárnicos. Además, en España todavía es significativa la presencia de pequeñas explotaciones rurales y familiares que crían conejos principalmente para autoabastecimiento y que, también, representan un factor de variabilidad en los datos de consumo. Por otro lado, el consumo de carne de conejo representa aproximadamente el 2.6% del total de carne, por debajo del de carnes de otras especies, por ejemplo, del 20% que representa el consumo de la carne de pollo. Se reparte principalmente en el área mediterránea en donde este tipo de carne es bastante popular. Así, la comunidad autónoma con mayor producción es Cataluña y, además, el consumo y la producción están equilibrados. En contraposición, Castilla y León sólo consume el 65% de la carne de conejo obtenida en los mataderos de la propia comunidad, comercializando en otras comunidades limítrofes o exportando a la UE el resto de la producción.

Según la encuesta nacional de cunicultura del año 2003 elaborada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A., 2003a), el 89% del total nacional de carne de conejo se presenta en piezas enteras refrigeradas, y sólo en Cataluña y Galicia se comercializan canales enteras congeladas (2.83%). La venta de cortes o trozos envasados en bandejas y recubiertas con una película plástica permeable al oxígeno o en atmósfera modificada representa el 3.82% y está en constante aumento. Finalmente y según refleja la citada encuesta, sólo un 2% del total nacional de carne de conejo es sometida a un

procesado complejo. También hay que destacar que en Europa, principalmente en Italia, las industrias de elaboración de platos preparados o precocinados están incrementando la inclusión de la carne de conejo en sus productos.

II. MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE

Existen numerosas definiciones de carne y una de ellas es “parte muscular comestible de los animales de abasto sacrificados y faenados en condiciones higiénicas”. Básicamente, se trata de tejido muscular, cuya unidad anatómica es el músculo, obtenido tras el sacrificio de individuos de ciertas especies animales y que sirve de alimento para el hombre. Otros tejidos como el adiposo y el conectivo forman parte de la carne, siendo variable su importancia cuantitativa según la pieza de carne, la especie, el individuo, etc.

Aunque la composición química de la carne se ve influida por factores intrínsecos y extrínsecos, se puede considerar que su composición media es: 75% de agua en la que están disueltos compuestos de bajo peso molecular (hidratos de carbono, aminoácidos y ácido láctico que pueden ser utilizados fácilmente como nutrientes por los microorganismos), 18.5% de proteína, 3% de lípidos, 1% de hidratos de carbono (glucógeno mayoritariamente), 1.5% de compuestos nitrogenados no proteicos y 1% de compuestos inorgánicos. Su a_w es elevada 0.99, y su pH puede oscilar desde 5.4-5.5 hasta 7.0. Esta variabilidad está relacionada con los fenómenos *post-mortem* y también con la especie y el músculo. Cuando cesa el aporte de oxígeno al músculo, después del sacrificio, se produce la glucólisis anaerobia del glucógeno que se transforma en ácido láctico. La glucólisis continúa mientras existe glucógeno disponible o hasta que se alcanza un pH que inhibe a las enzimas glucolíticas. En general, el valor del “pH último” o valor pH_{24} (pH a las 24 h *post-mortem*) se ve afectado por el contenido en glucógeno del músculo y éste, a su vez, por el estrés previo al sacrificio. Bajas concentraciones de glucógeno dan lugar a

carnes con un pH elevado y a alteraciones como la denominada carne DFD (seca, dura y oscura), siendo, además, más susceptibles a la alteración microbiológica por una temprana utilización de los aminoácidos y al crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos sensibles a la acidez. En algunas especies animales, como ovino y conejo, el pH₂₄ de la carne, al menos en determinados músculos, suele aproximarse a 6 (Dainty y col., 1992; ICMSF, 2005).

Es evidente que, por sus características, la carne es un buen sustrato para la multiplicación de microorganismos, especialmente bacterias, tanto alterantes como patógenas. Aunque el músculo de un animal sano es estéril, la carne, incluso cuando se obtiene en condiciones higiénicas adecuadas, presenta una contaminación superficial de 10^2 - 10^4 ufc/cm². Durante el almacenamiento, dependiendo de la temperatura y composición de gases en la atmósfera, se multiplican diversos grupos microbianos que serán los responsables de los cambios organolépticos asociados con la alteración.

¿De dónde proceden los microorganismos presentes en la carne?. En primer lugar, del animal vivo y de su ambiente. En relación con los agentes patógenos, el control debe iniciarse en la explotación manteniendo a los animales sanos y limpios. La calidad del agua y de los piensos, la correcta alimentación, impedir el acceso de animales silvestres y domésticos, las prácticas correctas en la explotación, el bienestar de los animales, etc. son aspectos importantes. Durante el transporte al matadero, los animales sufren estrés y, además, están en estrecho contacto entre ellos y con material fecal. El ayuno tiene efectos beneficiosos pero también perjudiciales ya que se ha demostrado que el estrés asociado al transporte favorece la diseminación de algunos patógenos como *Salmonella*. Un reposo prolongado antes del sacrificio también favorece la diseminación de patógenos (Johnston, 2000). Ya en el matadero, el sacrificio y carnización, especialmente si se realizan de forma incorrecta, aportan microorganismos patógenos y alterantes procedentes del intestino del

animal, de su piel y aparato respiratorio y, por supuesto, del medio ambiente del matadero (aire, equipo, superficies, etc.). Las posibilidades de contaminación aumentan en las fases posteriores como puede ser el despiece (ICMSF, 2005).

Para minimizar los riesgos asociados a la presencia de peligros microbiológicos en las canales y sus cortes se recurre a la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). Los microorganismos o grupos microbianos utilizados para evaluar la higiene de los procesos y para la validación y verificación de este sistema son los recuentos de microbiota aerobia mesófila (30 °C) total, coliformes, *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*. Para asegurar una adecuada vida útil se recurre a: análisis sensorial, recuentos de bacterias psicrotrofas aerobias y recuentos de grupos específicos de microorganismos alterantes (*Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta*, bacterias acidolácticas –BAL-, clostridios psicrotrofos y mohos y levaduras). También se han recomendado la determinación del pH, de la capacidad de retención de agua y del contenido en ácido D- y L-láctico. Finalmente, el recuento de estafilococos coagulasa-positivos es un reconocido indicador de manipulación humana (Gill, 1986; Mead, 2000).

Los niveles de microbiota aerobia mesófila son buenos indicadores de la calidad microbiológica general tanto del producto como del equipo así como de la vida útil. El grupo de bacterias coliformes (capaces de crecer a 37 °C y fermentar la lactosa con producción de gas) incluye tanto a mesófilas como a psicrotrofas. Entre los coliformes mesófilos se encuentra *E. coli* que es un aceptado indicador de contaminación fecal como también lo son las enterobacterias (Gill, 2000; ICMSF, 2005). La importancia de los grupos de microorganismos psicrotrofos y de estafilococos coagulasa-positivos, sobre todo *S. aureus*, se expondrá más adelante. La utilidad del pH como indicador de alteración está bien documentada ya que aumenta de forma significativa cuando la microbiota total alcanza valores próximos a 10^8 ufc/cm², debido a la producción bacteriana de compuestos

como amoníaco y dimetil sulfuro (García-López y col., 1998). El volumen de extracto liberado (ERV) es una medida de la capacidad de la carne para retener total o parcialmente el agua propia y eventualmente el agua añadida durante su tratamiento. Desde que Jay y Kontou (1964) demostraron la relación inversa entre el grado de alteración de la carne picada y su ERV, este parámetro se ha venido utilizando como indicador de alteración en carne fresca. Finalmente, el ácido L-láctico producido durante los procesos *post-mortem* es utilizado por las bacterias alterantes durante el almacenamiento de la carne fresca en aerobiosis mientras que ciertas bacterias anaerobio-facultativas, como las BAL, son responsables de la producción de ácido D-láctico en productos envasados en condiciones reducidas.

● **Almacenamiento en presencia de oxígeno**

Durante el almacenamiento tanto en aerobiosis como en condiciones reducidas, la carne fresca se mantiene a refrigeración. Por ello, la microbiota mesófila no se multiplica y la psicrotrofa se hace dominante. En presencia de oxígeno, los síntomas incipientes de alteración están asociados con recuentos de microbiota total superiores a 10^7 ufc/g o cm^2 . Las bacterias responsables de la alteración son bacilos aerobios Gram negativos, móviles e inmóviles y psicrotrofos que pertenecen a los géneros y especies siguientes:

Pseudomonas: *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* y *P. putida*. En el momento de la alteración pueden constituir hasta el 90% de la microbiota y siempre más del 50%.

Psychrobacter: *P. immobilis* (< 5%). En superficies grasas puede llegar al 50%.

Acinetobacter: *A. johnsonii* (ca. 1%). En algunas muestras pueden llegar al 10%.

Enterobacteriaceae: Miembros de los géneros *Serratia*, *Hafnia*, *Pantoea*, etc. también están presentes en la carne alterada aunque su incidencia no suele ser alta. Su incidencia es mayor en carne de cerdo y cordero, especialmente en las superficies grasas y cuando la temperatura de almacenamiento es $\geq 5^\circ\text{C}$.

Brochothrix thermosphacta: Esta especie se comporta de forma similar a las *Enterobacteriaceae*.

Shewanella putrefaciens: Bacteria Gram negativa que produce compuestos azufrados como SH₂, que cuando reacciona con la mioglobina produce sulfomioglobina responsable de la coloración verde. No puede crecer a valores de pH inferiores a 6 por lo que no es un alterante importante de la carne de mamíferos pero sí de la carne de aves y, en general, cuando el pH es elevado.

Las especies de *Pseudomonas* se multiplican rápidamente y su ventaja aumenta a medida que la temperatura desciende de 15 °C, siendo su predominio muy marcado entre 0 y 5 °C. Inicialmente, las bacterias alterantes utilizan los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía. Cuando éstos se agotan, metabolizan los aminoácidos lo que se traduce en la producción de amoníaco y otros compuestos responsables de un incremento del pH. La utilización de los hidratos de carbono origina una mezcla de ésteres, ácidos grasos de cadena corta, cetonas, alcoholes y otros compuestos no especialmente ofensivos (olores a frutas y dulzones). La utilización de los aminoácidos da lugar a la aparición de los compuestos responsables de olores y sabores desagradables. A continuación se presenta un esquema de los principales fenómenos de alteración relacionados con los aminoácidos.

Cistina, cisteína y metionina utilizadas por *Pseudomonas* y/o *Enterobacteriaceae*

Mediante descarboxilación y desaminación

Producen: SH₂, metanotiol, dimetil-sulfuro y dimetil-disulfuro

Lisina utilizada por *Enterobacteriaceae*

Mediante descarboxilación

Producen: cadaverina

Ornitina utilizada por *Pseudomonas*

Mediante descarboxilación

Producen: putrescina

Otros aminoácidos utilizados por diferentes bacterias

Producen: NH₃, metilamina, dimetilamina y trimetilamina

Para que las bacterias utilicen las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas son necesarios niveles de 10^9 - 10^{10} ufc/cm² y para entonces, ya son muy evidentes los olores anómalos y la limosidad superficial.

● **Almacenamiento a vacío y en atmósfera modificada**

Entre las técnicas empleadas para incrementar la vida útil de la carne fresca se encuentra el envasado a vacío y en atmósfera modificada (EAM). El EAM implica la eliminación de aire del interior del envase y su sustitución por un gas o mezcla de gases mientras que el envasado a vacío supone la eliminación del aire y subsiguiente formación, por respiración microbiana, tisular y otros fenómenos, de hasta un 20% de CO₂. Por ello, se puede considerar el vacío como una forma de atmósfera modificada.

Su utilización presenta una serie de ventajas entre las que destacan:

- Notable incremento de la vida útil.
- Menores pérdidas de peso por evaporación.
- Transporte y almacenamiento más higiénicos.
- Eliminación del goteo y de los olores desagradables.
- Mejor presentación y posibilidad de examinar el producto.
- Menos desechos y disminución de costes por mano de obra durante la venta.
- Reducción de peso y espacio durante la distribución.
- Ampliación de las áreas de distribución.

Entre los inconvenientes se pueden reseñar:

- Se necesita un equipamiento específico (Davies, 1995; Farber, 1991).

- Costes superiores a los de la carne sin envasar.
- Es necesario elegir convenientemente las mezclas de gases según el tipo de carne.
- Es preciso evaluar su efecto sobre el crecimiento de algunos patógenos de transmisión alimentaria.

Para el envasado en atmósfera modificada se han ensayado diferentes gases como ozono (O₃), monóxido de carbono (CO), óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), He, H₂, Ne, Ar, óxido de propileno, óxido de etileno y Cl₂. Sin embargo, por diversos motivos como son las dificultades prácticas para su utilización (especialmente la seguridad de los operarios), los efectos negativos sobre las propiedades organolépticas de la carne, las limitaciones de tipo legal y/o el precio elevado, suele utilizarse el envasado a vacío y mezclas de gases con dióxido de carbono, como principal componente activo, combinado con oxígeno y, a veces, con nitrógeno (Dainty y col., 1992). Aunque el oxígeno estimula el crecimiento de las bacterias aerobias, su presencia en la atmósfera que rodea a las carnes rojas es esencial para mantener el pigmento responsable del color característico (oximioglobina) aunque en aves y, probablemente, en conejo este aspecto no es tan crítico. Niveles altos de oxígeno no sólo facilitan el crecimiento de las bacterias aerobias patógenas y alterantes sino también el enranciamiento de los lípidos. El CO₂, que es hidrófilo y liposoluble, es el principal responsable del efecto bacteriostático. Este gas actúa prolongando la fase de latencia y disminuyendo la tasa de crecimiento de las bacterias sensibles. La acción del CO₂ se ve afectada por un buen número de parámetros entre los que destaca la temperatura. Así, para que el efecto del EAM sea óptimo hay que mantener la temperatura lo más baja posible ya que de esta forma su solubilidad es máxima. El nitrógeno es un gas inerte con poca actividad antimicrobiana pero su utilización puede ser

conveniente por su efecto anóxico, para evitar el colapso del envase y para retrasar el enranciamiento.

Además de la correcta mezcla de gases y del control de la temperatura existen otros factores de gran importancia, entre ellos, el tipo de película (polietileno, poliamida, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, cloruro de polivinilideno, copolímero etilenoacetato de vinilo, ionómeros y combinaciones entre ellos), la calidad microbiológica del producto a envasar y la relación entre el volumen de gas y el del producto a envasar (Farber y col. (eds.), 1995; Church, 1994; Farber, 1991).

Como ya se ha señalado, cuando se envasa a vacío, la respiración microbiana y tisular hace que el oxígeno residual descienda a menos del 1% y que la concentración de CO₂ alcance el 20% v/v. Durante el almacenamiento, el crecimiento de las bacterias Gram negativas se ve muy restringido y la microflora característica está constituida por bacterias Gram positivas, especialmente BAL psicrotrofas.

Para que la vida útil pueda llegar a 10-14 semanas, es preciso que:

- La carne se haya obtenido en condiciones higiénicas adecuadas.
- El pH sea inferior a 6, preferiblemente <5.8.
- La película utilizada sea poco permeable al oxígeno (<100 ml/m² a 25 °C y 98% de HR)
- Controlar la temperatura durante el almacenamiento
- Evitar que se rompa el envase

Entre las BAL que participan en la alteración destacan:

- *Lactobacillus*: especies y cepas homofermentativas como *L. sake*, *L. curvatus*, *L. bavaricus* y *Lactobacillus* spp.
- *Carnobacterium*: *C. piscicola* y *C. divergens*.

- *Leuconostoc*: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. carnosum* y *L. divergens*.
- *Lactococcus*: *L. raffinolyticus*.

También pueden multiplicarse *B. thermosphacta*, enterobacterias e incluso *Pseudomonas* pero esto último no se trata de un hecho habitual. Los dos primeros grupos se multiplican, sobre todo, en carne de cerdo y ovino. Las enterobacterias son importantes en carne de vacuno cuando la contaminación inicial es elevada. Si el pH es mayor de 6, las enterobacterias y *S. putrefaciens* pueden desempeñar un papel destacado asociado a la producción de SH₂.

Las BAL metabolizan los hidratos de carbono y producen ácido láctico, isobutanóico, isopentanóico y acético. Esto hace que la carne presente olores y sabores descritos como “ácidos”, “agrios”, “a queso”, “amargos” y “parecidos a los del hígado”.

Algunas BAL, como *L. sake*, producen SH₂ a partir de la cisteína. El SH₂ reacciona con la mioglobina produciendo sulfomioglobina que, como ya se ha señalado, origina enverdecimiento. Este tipo de alteración se produce cuando el envase no es totalmente impermeable. Se ha sugerido que la producción de metanotiol y dimetil-sulfuro también podría ser responsable del agriado.

En carne de pH elevado suceden fenómenos debidos al crecimiento de enterobacterias y *S. putrefaciens* que producen cantidades importantes de SH₂ y otros compuestos conteniendo azufre. Este tipo de alteración ocasiona olores muy desagradables, denominados “a podrido”.

Otras bacterias que pueden crecer en este tipo de carne son *B. thermosphacta* que produce ácido isobutírico y ácido isovalérico y *Aeromonas* spp. Recientemente se ha descrito el papel alterante de cepas de clostridios psicrotrofos, como *C. laramie*, que producen grandes cantidades de O₂ y CO₂ por lo que los envases se hinchan. Estas cepas

también producen muchos compuestos como butanol, ácido butanoico, ácido acético, compuestos azufrados y otros que resultan muy desagradables. Además, pueden dar lugar a enverdecimiento y ablandamiento por proteólisis.

El envasado en atmósfera modificada es adecuado para cortes y porciones que se van a comercializar al por menor porque la carne mantiene un color rojo brillante, al menos, durante una semana. Esto se debe a la presencia de oxígeno (60-80%) que permite la formación de oximioglobina. La carne envasada en estas condiciones normalmente se comercializa en bandejas preformadas cubiertas con plásticos impermeables. Uno de los problemas que presenta es el exudado por lo que es habitual que se incorpore material absorbente.

En carne envasada en atmósfera modificada y mantenida a menos de 2 °C también dominan las BAL, siendo notable la participación de *Leuconostoc. B. thermosphacta* es otro alterante importante. Ambos son los principales responsables de la producción de compuestos como ácidos orgánicos, acetoina, diacetilo, putrescina y cadaverina que se asocian con la alteración. Con este tipo de envasado y mantenida la carne a 5 °C tienen también un papel destacado *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*. A temperaturas superiores (7 °C) se multiplica *Aeromonas* que puede ser de relativa importancia durante el almacenamiento prolongado.

El envasado en atmósferas con un 100% de CO₂, aumenta mucho la vida útil de la carne (hasta 15 semanas) pero se modifica el color. Al sacarla del envase se altera rápidamente por *Pseudomonas*. En general, la alteración de la carne envasada en atmósfera modificada es debida a las BAL y, si estaba inicialmente en número alto, a *B. thermosphacta*. Esta bacteria tiene, asimismo, un papel destacado si el pH es alto o si la película es algo permeable al oxígeno. Se manifiesta por un olor agrio y, en ocasiones, rancio y “a queso”. El primero no es debido a la alteración de los lípidos sino a productos

resultantes del metabolismo microbiano (Davies y col. (eds.), 1998; Dainty y col., 1992; ICMSF, 2005).

● **Bacterias patógenas de transmisión alimentaria**

Las bacterias patógenas presentes en la carne pueden proceder del propio animal o acceder a la misma durante su manipulación procedentes de diversos orígenes. Entre estas bacterias destacan: *Salmonella*, *Escherichia coli* verotoxigénico, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp. y *Staphylococcus aureus*.

El hábitat del género *Salmonella*, que incluye más de 2000 serovariedades, es el intestino del hombre y de los animales domésticos y silvestres. Los animales de abasto jóvenes son más susceptibles a las infecciones clínicas que los adultos, existiendo factores predisponentes como son escasa higiene en la explotación, hacinamiento, otras infecciones y el transporte. En conejos, la salmonelosis afecta en especial a conejas preñadas y gazapos lactantes y se manifiesta fundamentalmente en tres formas: diarrea, septicemia y abortos (Rosell, 2000b). Hay que señalar que, en todas las especies, individuos aparentemente sanos pueden ser portadores de esta bacteria. Su incidencia en canales de diferentes especies es muy variable aunque, en general, es del orden del 1% (ICMSF, 2005). Su prevalencia en carne fresca está relacionada con la colonización del animal vivo, la suciedad externa (pelo, lana, plumas, etc.) y la higiene durante el sacrificio. Habitualmente, la infección humana está relacionada con el cocinado incompleto y la contaminación cruzada. *Salmonella* posee factores de virulencia regulados por genes cromosómicos y plasmídicos, uno de los primeros es el gen *invA*, de gran utilidad para su identificación y detección en muestras clínicas y en alimentos (McClure, 2000).

El origen de *E. coli* verotoxigénico o *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) es el ganado vacuno aunque también se ha aislado de pequeños rumiantes y otros animales domésticos y silvestres. Dentro de este grupo, el serotipo O157:H7 es el más importante

aunque también destacan otros como O26:H11, O103:H2, O11:H- y O113:H21. Producen tres síndromes: colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombótica trombocitopénica (PTT). Los dos primeros brotes (1982) se asociaron con el consumo de hamburguesas de vacuno preparadas a partir de carne congelada. La presentación clínica más común es la CH pero el 10% de estos pacientes acaba desarrollando SUH o PTT. Cuando afecta a niños y ancianos, la infección puede ser mortal (5-10%). En aquéllos, el síndrome urémico hemolítico es la principal causa de fallo renal agudo.

Los mecanismos de patogenicidad no están totalmente esclarecidos. Produce uno o más compuestos “citotóxicos” para células de la línea Vero por lo que, inicialmente, se denominaron Verotoxinas 1 y 2. Por su relación genética e inmunológica con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 también se citaron como “Shiga Like Toxins”. En la actualidad se denominan como el resto de las toxinas de la familia Shiga (Stxs). La Stx1 puede ser idéntica a la Stx o diferir únicamente en un aminoácido pero la Stx2 no se trata de una única toxina sino de una “familia” de toxinas y, por tanto, hay subgrupos o subtipos de Stx2. Así, además de la Stx2, se han descrito Stx2c y Stx2e. Las tres primeras (Stx1, Stx2 y Stx2c) participan en los síntomas característicos de los síndromes ocasionados por EHEC y están codificadas en el genoma de profagos mientras que la Stx2e, que no interviene en procesos humanos aunque sí en la enfermedad edematosa del cerdo, lo es por un gen del cromosoma. La gravedad de los síndromes ocasionados por EHEC y su, aparentemente, baja dosis infectiva (<100 células), sitúan a esta bacteria entre los agentes de infecciones alimentarias más preocupantes. Como en el caso anterior, la detección e identificación de estas bacterias puede hacerse utilizando técnicas de separación inmunomagnética o de Reacción en Cadena de la Polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”, PCR).

Y. enterocolitica es un ejemplo típico de bacteria patógena entérica invasiva. Su reservorio es el cerdo y por su carácter psicrotrofo puede multiplicarse durante el almacenamiento a refrigeración. Los mecanismos de virulencia son complejos, participando múltiples factores codificados por genes cromosómicos y plasmídicos. Entre estos factores de virulencia se encuentra la enterotoxina Yst relacionada con las toxinas termoestables (STs) de *Escherichia coli* enterotoxigénico y con la ST de *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139. Su producción está regulada por el gen cromosómico *yst* cuya detección mediante técnicas de PCR es una alternativa rápida y fiable para la detección e identificación de las cepas patógenas de esta especie.

L. monocytogenes es una bacteria psicrotrofa y ubicua que, sin ser esporulada, presenta la particularidad de ser resistente a múltiples condiciones disgenésicas, poseyendo, además, capacidad para colonizar el equipo de la industria alimentaria. Es un microorganismo capaz de sobrevivir y multiplicarse en las células del sistema monocito-macrófago. Una vez dentro de los macrófagos, mediante la listeriolisina O (LLO), puede romper el fagosoma en el citosol. Las bacterias liberadas en el citosol del macrófago se multiplican y se rodean de una cubierta de filamentos de actina que facilitan su desplazamiento en el interior del macrófago y su posterior diseminación a macrófagos próximos. Las listerias intracelulares lisan al macrófago con el concurso de la LLO. Todas las cepas patógenas producen, pues, un factor de virulencia reconocido, listeriolisina O. Otros factores asociados con la virulencia son la producción del factor p60 (una proteína de 60 kDa) y de internalina (ambas proteínas relacionadas con la invasión). La detección de *L. monocytogenes* puede hacerse por procedimientos convencionales (Downes y col. (eds.), 2001) o mediante el empleo de técnicas alternativas como las de separación inmunomagnética y métodos PCR. En el último caso, la detección de los genes que regulan la producción del factor p60 (*iap*) y de la LLO (*hly*) resultan muy útiles.

Tras *Salmonella*, *Campylobacter* y rotavirus, *A. hydrophila* y otras aeromonas móviles son la cuarta causa de infecciones alimentarias en España (Anónimo, 2005a). Su hábitat es el agua y se asocian con procesos extra y gastrointestinales. Los diferentes procesos asociados con *Aeromonas* spp. sugieren que las cepas poseen diversos mecanismos de patogenicidad. Entre los potenciales factores de virulencia de las cepas de este género tenemos la producción de hemolisinas. La detección de los genes que regulan la producción de dos de ellas (*aerA* y *hlyA*) resulta muy útil para la identificación de las cepas capaces de producir procesos diarreicos.

En brotes y casos de intoxicación estafilocócica, los manipuladores que contaminan ciertos alimentos listos para el consumo son el origen más frecuente de las cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas aunque los animales vivos, que a menudo son portadores asintomáticos o sufren estafilococosis, pueden ser también una fuente importante. *S. aureus* accede a la carne, además, a partir de superficies, equipos y utensilios contaminados que no se han lavado y desinfectado correctamente ya que se trata de una bacteria con gran capacidad para colonizar el ambiente de la industria alimentaria mediante la formación de películas biológicas o “biofilms”. Por tanto, la presencia de *S. aureus* en carne es frecuente y no siempre relacionada con la contaminación de origen humano (Jablonski y col., 2001).

En conejos, *S. aureus* no sólo es responsable de varios procesos (mastitis, dermatitis exudativa, abscesos y pododermatitis) sino que también se aísla frecuentemente (hasta del 100%) de individuos aparentemente sanos en explotaciones sin problemas crónicos de estafilococosis (Ajuwape y col., 2001; Hermans y col., 1999). En las granjas se han descrito dos formas de estafilococosis; una, que afecta a un número limitado de animales y es producida por cepas poco virulentas, y otra, causada por cepas muy virulentas que infectan a un gran número de animales y ocasionan problemas de

estafilococosis crónicas. Las cepas muy virulentas suelen pertenecer a una combinación de biotipo-fagotipo denominada “mixed CV:C-3A/3C/55/71” (Devriese, 1990; Hermans y col., 1999; Hermans y col., 2003). La biotipificación y la fagotipia son útiles para determinar el origen de las cepas de *S. aureus* aisladas de conejos y para diferenciar entre cepas muy virulentas y poco virulentas. Sin embargo, hay que recordar que los sistemas de tipificación basados exclusivamente en pruebas fenotípicas presentan limitaciones tales como bajo poder discriminante y modesta reproducibilidad (Struelens, 1998; Swaminathan y col., 1993; Tenover y col., 1997). Por ello, se han desarrollado progresivamente y utilizado técnicas genotípicas como PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado), RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) y ribotipado.

III. CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Para la conservación de los alimentos, uno de los principales objetivos a alcanzar es la destrucción de los microorganismos y/o la prevención de su crecimiento. Con este fin, el calor ha sido empleado por el hombre desde los albores de la civilización y durante mucho tiempo el tratamiento térmico ha sido el único utilizado por la industria alimentaria para la inactivación tanto de los microorganismos responsables de la alteración de los alimentos como de aquéllos que representan un peligro para la salud pública. Es indudable que la conservación mediante el calor permite obtener alimentos estables durante un tiempo determinado y reducir o eliminar los riesgos microbiológicos asociados a su consumo. Sin embargo, algunos efectos indeseables del calor sobre las características organolépticas y los nutrientes han propiciado el desarrollo de nuevos sistemas de inactivación microbiana. Entre los diferentes métodos que se han investigado, y que actualmente son de gran interés, se pueden destacar los procesos basados en tratamientos con ultrasonidos, pulsos eléctricos

de alto voltaje (“Pulsed Electric Field”, PEF), radiaciones ionizantes y altas presiones hidrostáticas.

Los ultrasonidos se definen como ondas acústicas de frecuencia superior a 16 kHz (límite humano de audición). La inactivación microbiana con ultrasonidos ha sido objeto de estudio desde la década de 1930 aunque su empleo fue inicialmente descartado por su escaso efecto letal. Desde entonces, la intensa labor realizada por algunos grupos de investigación ha permitido mejorar su eficacia, sobre todo cuando se combinan con presiones hidrostáticas de hasta 600 kPa (manosonicación –MS-; Raso y col., 2003) y calor (manotermosonicación –MTS-; Raso y col., 1998).

La mayor parte de la acción de los ultrasonidos se atribuye al efecto mecánico producido por el fenómeno de cavitación (Suslick, 1990). Cuando las ondas ultrasónicas atraviesan un medio líquido se producen ciclos alternativos de compresión y expansión y, como consecuencia, la aparición de burbujas de gas en la masa del líquido. En sucesivos ciclos, las burbujas crecen, alcanzan un tamaño crítico y, al superarlo, implosionan. Esto produce altas presiones y temperaturas que se transmiten por el medio rompiendo las estructuras celulares próximas y disgregando la materia en suspensión. También se forman radicales libres aunque su importancia es menor (Mañas y col., 2005). Como ya se dijo, su utilidad, como tratamiento único, es baja dada la poca eficacia del proceso pero combinada con presión (MS) y con presión y calor (MTS) resulta prometedora.

La aplicación comercial de la MS y la MTS todavía está en desarrollo. Parece indudable que puede tener gran interés en alimentos líquidos como método alternativo a la pasteurización y esterilización aunque parece más remota su posible utilización en otros grupos de alimentos (Gould, 1996).

El tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) consiste en aplicar a un alimento un campo eléctrico de alta intensidad (>10 kV/cm) de forma intermitente durante periodos de tiempo del orden de microsegundos. De este modo, se produce la destrucción de las formas vegetativas de bacterias, mohos y levaduras aunque no de los esporos bacterianos, al igual que ocurre con los tratamientos por presiones ultraelevadas y radiación ionizante. Este efecto en los microorganismos fue observado por primera vez por Doevenspeck (1961). Con posterioridad, muchos estudios han ampliado los conocimientos sobre esta tecnología y, en los últimos años, se está considerando su utilización como sistema de pasteurización de alimentos.

De todas las teorías expuestas para explicar el mecanismo de acción de los PEF, la de Zimmermann y col. (1974) es la más aceptada. Según estos investigadores, el campo eléctrico que se aplica mediante este tratamiento induce la aparición de poros irreversibles en la membrana celular de los microorganismos por la diferencia de potencial eléctrico generado entre el interior y el exterior, provocando su muerte.

La idea de tratar los alimentos con radiaciones ionizantes surgió hace ya más de un siglo (Minsch, 1896) a partir del descubrimiento de la radiactividad por Becquerel en 1895. Sin embargo, su utilización comercial no comenzó hasta después de la Segunda Guerra Mundial. Este retraso en el desarrollo de la irradiación de los alimentos provocó la asociación de esta tecnología con las bombas atómicas y los accidentes nucleares, que todavía hoy están presentes en la percepción que gran parte de la sociedad tiene debido a la falta de un conocimiento completo y riguroso de este proceso.

Mediante la irradiación de los alimentos, éstos son expuestos a radiaciones ionizantes a partir de rayos gamma, procedentes de radionucleidos tales como ^{137}Cs o ^{60}Co , de haces de electrones de alta energía o de rayos X. Desde el punto de vista de la

contaminación microbiana de los alimentos, el efecto producido es tanto directo como indirecto y, principalmente, implica a las moléculas de DNA o RNA (Moseley, 1989).

El tratamiento de los alimentos con radiaciones ionizantes es considerado un método eficaz para el control de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, además de reducir sensiblemente la microbiota alterante que comúnmente está presente en los alimentos y, por tanto, permite aumentar su vida útil (Farkas, 1998). La gran ventaja que presenta el tratamiento de los alimentos con radiación ionizante frente a otras tecnologías, como las que utilizan el calor, es su alto y uniforme poder de penetración, sobre todo mediante la radiación gamma, sin incrementar significativamente la temperatura del alimento (Satin, 2002). Ésta es una de las razones para pensar que, en pocos años, la utilización comercial de la irradiación de los alimentos pueda popularizarse industrialmente, siempre que la opinión pública general cambie la percepción negativa actual sobre este proceso, principalmente en el ámbito europeo.

La aplicación de cualquier tecnología nueva para la conservación de los alimentos requiere un modelo matemático que describa fehacientemente la inactivación microbiana producida. El modelo que se ha utilizado tradicionalmente para el estudio de los tratamientos térmicos se describe por una cinética de primer orden. Así, representando el logaritmo de la fracción de microorganismos supervivientes frente al tiempo se obtienen curvas de supervivencia rectas. El valor inverso negativo de la pendiente de la línea de supervivencia determina el valor D_t , que se define como el tiempo, a una temperatura determinada, necesario para reducir la población microbiana en un ciclo logarítmico. De forma similar, si se representa el logaritmo del valor D_t correspondiente a cada temperatura se obtiene una línea de termodestrucción cuyo valor inverso negativo representa el valor z , que indica el número de grados que es necesario aumentar la temperatura para reducir el valor D_t a su décima parte.

La cinética de inactivación de primer orden también se utiliza normalmente para describir el tratamiento con ultrasonidos bajo presión y con radiaciones ionizantes. Existen algunos modelos que se han desarrollado para describir curvas de supervivencia no lineales. Entre éstos, la distribución de Weibull ha sido propuesta como un modelo matemático eficaz para describir la inactivación microbiana con PEF (Álvarez y col., 2003).

Por todo lo expuesto, parece interesante investigar el efecto de algunas de estas nuevas tecnologías sobre bacterias que, como *S. aureus*, son contaminantes habituales de alimentos diversos.

En relación con las radiaciones ionizantes, ya se han indicado sus mecanismos de acción; directos sobre el material genético e indirectos por acción de los radicales libres. La sensibilidad de los organismos a la irradiación aumenta con su complejidad; así, los virus son más resistentes que las bacterias y, éstas, a su vez, más que otros organismos más complejos como son los helmintos e insectos. Los esporos y quistes son bastante resistentes por su escaso contenido en DNA. Entre las bacterias, las Gram negativas son más sensibles que las Gram positivas. Sin embargo, existen excepciones a estos principios generales, sirviendo como ejemplo *Deinococcus radiodurans*, bacteria Gram positiva extremadamente resistente a la irradiación y algunos miembros de la familia *Moraxellaceae* como *Psychrobacter* spp.

El género *Psychrobacter*, actualmente incluido en la familia *Moraxellaceae* (Rossau y col., 1991), fue descrito por Juni y Heym (1986) para ubicar a un grupo de bacilos y cocobacilos Gram negativos, no fermentadores, inmóviles, oxidasa-positivos, no pigmentados y tolerantes al frío y al NaCl que previamente habían sido incluidos en los géneros “*Achromobacter*” y *Acinetobacter* o recibido denominaciones diversas como

“*Moraxella-like*”. Estas bacterias, que se aíslan de muestras procedentes de ambientes muy fríos (hielo y suelo), de pescado, de alimentos proteicos alterados y de alimentos irradiados, precisan para su identificación definitiva ser sometidos a un ensayo de transformación utilizando una cepa de *P. immobilis* deficiente en tiamina e hipoxantina. Quizás porque en los años 70, cepas adscritas al grupo “*Moraxella-like*” se recuperaron durante el almacenamiento de alimentos irradiados y sin irradiar, se ha considerado que *Psychrobacter* es una bacteria alterante resistente a la irradiación aunque el número de trabajos dedicados a confirmarlo es muy escaso y nunca con cepas identificadas de forma definitiva.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la microbiota de mayor importancia en relación con la conservación y la inocuidad de la carne de conejo, y evaluar la eficacia de tecnologías que permitan aumentar su vida útil.

OBJETIVOS CONCRETOS:

A. Determinar la calidad (microbiológica, físico-química y organoléptica) de la carne de conejo a las 24 h *post-mortem* y durante su exposición para la venta al por menor con el fin de evaluar las prácticas higiénicas durante su obtención, manipulación y almacenamiento.

B. Conocer la evolución de la microbiota que se desarrolla en la carne de conejo almacenada en aerobiosis a temperatura de refrigeración.

C. Obtener información sobre la importancia de la carne de conejo como posible vehículo de bacterias patógenas de transmisión alimentaria.

D. Establecer el origen y la diversidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en carne de conejo, empleando métodos fenotípicos (biotipado, fagotipado y susceptibilidad a agentes antimicrobianos) y genotípicos (PFGE, ribotipado y RAPD).

E. Determinar el comportamiento de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de carne de conejo frente a tres tecnologías de conservación de alimentos (calor, ultrasonidos bajo presión y pulsos eléctricos de alto voltaje), y establecer las posibles relaciones entre la resistencia de dichas cepas a los tres tratamientos físicos.

F. Estudiar cómo evoluciona la calidad bacteriológica, físico-química y sensorial de la carne de conejo almacenada a refrigeración en diferentes atmósferas de envasado: vacío, 100% CO₂ y una combinación comercial formada por 35% CO₂: 35% O₂: 30% N₂.

G. Determinar la incidencia de *Psychrobacter* spp. en carne de conejo, su posible papel alterante y su sensibilidad al tratamiento con radiación ionizante.

PUBLICACIONES que ha dado lugar esta Tesis Doctoral:

1. *Rodríguez-Calleja, J. M., J. A. Santos, A. Otero, and M. L. García-López.* 2004. Microbiological quality of rabbit meat. *Journal of Food Protection*, 67:966-971.

2. *Rodríguez-Calleja, J. M., M. F. Patterson, I. García-López, J. A. Santos, A. Otero, and M.-L. García-López.* 2005. Incidence, radioresistance, and behavior of *Psychrobacter* spp. in rabbit meat. *Journal of Food Protection*, 68:538–543.

3.- *Rodríguez-Calleja, J. M., M.-L. García-López, J. A. Santos, and A. Otero.* 2005. Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. *Meat Science*, 70:389–394.

4.- *Rodríguez-Calleja, J. M., G. Cebrián, S. Condón, and P. Mañas.* 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. “*Journal of Applied Microbiology*”, artículo en prensa (JAM-2005-0840), doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02868.x.

5.- *Rodríguez-Calleja, J. M., I. García-López, J. A. Santos, A. Otero, and M.-L. García-López.* 2006. Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat. “*Research in Microbiology*”, artículo en prensa (resmic2413), doi: 10.1016/j.resmic.2005.11.011.

6.- *Rodríguez-Calleja, J. M., I. García-López, M.-L. García-López, J. A. Santos, and A. Otero.* 2006. Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. “*Journal of Food Protection*”, 69(4):000–000. Artículo en prensa.

CAPÍTULO 1.-

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE DE CONEJO



▪ Introducción_____	35
▪ Material y Métodos_____	38
▪ Resultados_____	41
▪ Discusión_____	45
▪ <i>Artículo original:</i> “Microbiological quality of rabbit meat”_____	50a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col. 2004.*
Microbiological quality of rabbit meat. "Journal of Food Protection", 67(5):966-971.

Introducción

La alteración de la carne fresca mantenida a refrigeración se debe principalmente a la multiplicación de diferentes microorganismos psicrotrofos. En el momento de su obtención la microbiota es muy heterogénea y a medida que avanza el almacenamiento se produce la selección de algunos grupos de microorganismos (Dainty y col., 1983). La importancia y distribución de estos grupos ha sido exhaustivamente estudiada en algunas carnes de gran consumo, como son las de vacuno y pollo, pero es muy poco conocida en la de otras especies. Respecto a la carne de conejo, existe una gran cantidad de información disponible, aunque la mayoría de las investigaciones se han dirigido al estudio de la composición de las canales y a determinar los factores biológicos y técnicos que afectan a la calidad y a las propiedades sensoriales de esta carne. Por el contrario, la información acerca de la calidad microbiológica se reduce a pocos artículos (Badr, 2004; Cabanes y col., 1994; Khalafalla, 1993; Perez-Chabela y col., 1999) y algunos documentos australianos de la "Australian Rural Industries Research and Development Corporation" (Bobbitt, 2002; Bobbitt, 2003).

En general, la calidad microbiológica de las canales está condicionada por las propias características de cría del animal, incluido su estado sanitario en el momento del sacrificio, el proceso de obtención de la carne y su posterior procesado. La conjunción de estos factores junto con otros de carácter ambiental, sobre todo la temperatura de almacenamiento, determinarán la microbiota característica de la carne (Dainty y col., 1983; Gill, 1998).

El conocimiento de los grupos microbianos predominantes en la carne de conejo recién obtenida permitirá estimar su vida útil y aportará información interesante para la aplicación de tecnologías que permitan prolongar la conservación de este tipo de carne, además de evaluar la posible transmisión de bacterias patógenas al consumidor mediante la determinación de parámetros microbianos indicadores. Desde este punto de vista, la determinación del recuento total de colonias aerobias y de enterobacterias pueden ser buenos indicadores de la higiene del proceso de obtención de las canales en matadero, y así lo establecía la Comisión Europea en la Decisión 2001/471/CE para las de bovino, porcino, ovino, caprino y equino (Anónimo, 2001) y, en la actualidad, se recoge en el Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2005b).

Uno de los parámetros determinantes en la alteración de la carne es el pH. A las 24 h *post-mortem*, las carnes rojas presentan, generalmente, valores entre 5.5 y 5.8. Sin embargo, en canales de conejo el valor es ligeramente superior a 6.0 (Barrón y col., 2005). El pH es además un parámetro clave para la identificación de particulares problemas en relación con la calidad de la carne; como son las condiciones DFD (oscura, firme, seca) y PSE (pálida, blanda, exudativa).

Otros parámetros físicos y químicos, como el volumen de extracto liberado (ERV) y la determinación del contenido en ácido láctico, se han utilizado durante varias décadas para determinar el grado de frescura/alteración de la carne fresca. Así, Jay (1966) encontró correlación entre el ERV y la calidad microbiológica de la carne de vacuno. La alteración de la carne se manifiesta en cambios proteicos que originan mayor retención de agua. Por otro lado, se ha correlacionado la alteración temprana en aerobiosis de la carne con la concentración de metabolitos de bajo peso molecular, como los isómeros D y L del ácido

láctico, que son utilizados principalmente por las bacterias Gram negativas después del agotamiento de la D-glucosa (Nychas y col., 1998).

El análisis sensorial puede utilizarse para determinar la vida útil de un alimento, momento a partir del cual el producto puede ser rechazado por el consumidor. Si bien los parámetros microbiológicos y físico-químicos pueden relacionarse con el grado de alteración de una muestra, es el consumidor finalmente el que juzga si un alimento es aceptable para el consumo. Entre los métodos sensoriales destaca el sistema QIM/MIC (Quality Index Method/Método del Índice de Calidad) basado en la evaluación objetiva de ciertos atributos del pescado fresco o de los filetes de pescado. En este caso, se fijan las características a evaluar y se les asigna una puntuación entre 0 y 3-4 de forma que cuanto más baja sea la puntuación mejor será la calidad. La suma de los puntos de demérito (“demerit points”) se puede expresar como tal o como un porcentaje del valor total que se puede alcanzar, existiendo una relación lineal entre este valor y la vida útil (Botta, 1995).

Los objetivos de este capítulo han sido: a) obtener información sobre el nivel de contaminación de canales de conejo recién obtenidas en matadero y de cortes expuestos para la venta en supermercados, y b) evaluar la calidad microbiológica de las canales de conejo tras su obtención y hasta la adquisición por parte del consumidor.

Material y Métodos

Se adquirieron 12 canales de conejo de un pequeño matadero (G) y fueron almacenadas a 3 °C durante 24 h. El mismo número de canales de conejo, de diferentes lotes, se obtuvieron de un matadero industrial de conejos y de gran capacidad (M), que se almacenaron en las mismas condiciones. Por otro lado, 27 cortes y canales de carne de conejo, que se presentaban envasadas en bandejas de poliestireno recubiertas con una película plástica permeable al oxígeno, fueron obtenidas en dos grandes cadenas de supermercados. Dieciséis de ellas correspondían a dos muslos traseros de las respectivas canales que habían sido obtenidos en el propio supermercado 1 (CC1) para su venta en vitrinas refrigeradas abiertas (-1 / +1 °C). Las 11 muestras restantes consistían en canales enteras que habían sido envasadas en el supermercado 2 (CC2) y almacenadas a refrigeración en una vitrina vertical abierta para su venta (+1 / +5 °C).

Previamente al análisis físico, químico y microbiológico, en cada día de análisis un muslo de conejo fue evaluado sensorialmente por un grupo de habituales consumidores de la Universidad de León. Las observaciones realizadas fueron anotadas en una tabla diseñada a partir de la descrita por Botta (1995) y Costell (2002) para evaluar la frescura del pescado. Los parámetros de calidad, las características definidas y la escala de valores son mostrados en la publicación anexa a este capítulo (“table” 1). Esta metodología se basa en el empleo de una serie de criterios apropiados y valorados con una puntuación de demérito en una escala discontinua de 0 a 3. Se suman las puntuaciones de demérito otorgadas a cada criterio y se determina así un resultado sensorial final. Este resultado fue transformado a porcentaje respecto de la puntuación máxima de demérito posible. Cuanto más bajo sea el porcentaje alcanzado mejor será la calidad sensorial.

Para el análisis físico y químico se realizaron mediciones de pH en el músculo *Biceps femoris* utilizando un pHmetro (Ouhayoun y Dalle Zotte, 1996) con electrodo de punción Crison pH/mV506 (Crison, Barcelona, España) y, paralelamente, sobre homogeneizados de la carne (10 g de músculo en 10 ml de agua destilada) con un pHmetro micropH 2001 (Crison). El volumen de extracto liberado (ERV) fue medido según el protocolo descrito por Kirk y Sawyer (1991). Brevemente, consistió en el picado de 15 g de carne de conejo y su mezcla con 60 ml de un reactivo de extracción. Posteriormente se homogeneizó en un mezclador Sorvall modelo Omni-Mixer 17106 (Sorvall, Pacisa, Madrid, España) y se filtró con papel de filtro (Whatman no. 1), considerando el volumen recogido en 15 minutos como el ERV. Tanto la configuración como la cantidad de ácido láctico en los muslos fueron determinadas enzimáticamente según Noll (1974), usando un *kit* enzimático (número de catálogo 1112821, GmbH, Mannheim, Alemania). Básicamente el método consiste en la producción de NADPH como consecuencia de la actuación de las enzimas D-lactato y L-lactato deshidrogenasas respectivamente, utilizando como sustrato los isómeros D y L del ácido láctico. La producción de NADPH es estequiométricamente equivalente a la cantidad de ácido láctico presente y se determina mediante lectura del cambio de absorbancia medida a 340 nm.

Para el análisis microbiológico se realizó un lavado de las muestras a partir de los muslos traseros en una bolsa estéril con agua de peptona bacteriológica (Oxoid, Basingstoke, UK) al 0.1%. Se realizaron siembras para determinar los recuentos de: (1) microbiota aerobia mesófila (RAM) y psicrotrofa (RAP) en placas de “plate count agar” (PCA) incubadas a 30 °C/48 h y 4.5 °C/14 días, respectivamente; (2) presuntos clostridios psicrotrofos sulfito reductores en agar Perfringens de Shahidi Ferguson con yema de huevo (Oxoid), después de 14 días de incubación a 20 °C en jarra de anaerobios; (3) Pseudomonas en placas de agar base *Pseudomonas* (Oxoid) suplementadas con CFC

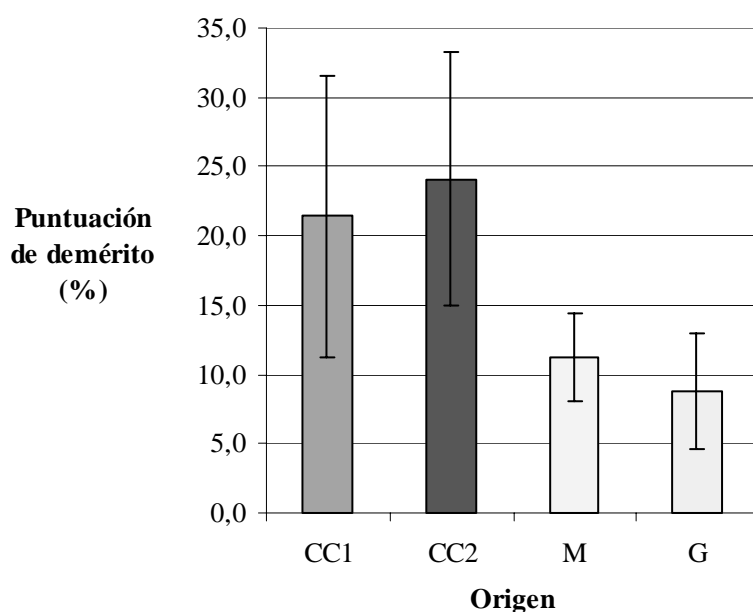
(cetrimida, fucidina, cefaloridina; Oxoid) incubadas a 25 °C durante 48 h; (4) Enterobacteriaceae en placas de “violet-red bile glucose agar” (VRBGA, Oxoid) con sobrecapa, después de 24 h de incubación a 37 °C; (5) Escherichia coli y coliformes en láminas “3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform” (3M Microbiology Products, St. Paul, MN, USA) incubadas a 35 °C durante 24 y 48 h; (6) bacterias ácido-lácticas en placas de agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Oxoid) añadiendo sobrecapa, mantenidas a 30 °C durante 3 días; (7) Brochothrix thermosphacta sobre “streptomycin sulfate cycloheximide thallos acetate agar” (STAA, Oxoid) después de incubar a 22 °C durante 48 h; (8) estafilococos coagulasa positivos en placas de agar de Baird Parker (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) suplementado con plasma de conejo y fibrinógeno bovino (RPF, Biokar Diagnostics) tras una incubación de 48 h a 37 °C; y (9) mohos y levaduras en placas de “oxytetraciline glucose yeast extract agar” (OGYEA, Oxoid) incubadas a 25 °C durante 5 días, procediendo a un primera diferenciación entre mohos y levaduras según Harrigan (1998).

Todos los datos obtenidos, tras su transformación logarítmica para los recuentos microbianos, fueron analizados estadísticamente (medias, desviación estándar, coeficientes de correlación y prueba de la “*t* de Student” para determinar la significatividad de las diferencias entre las medias) usando el software “Statistica for Windows Release 5.5” (Statsoft, Chicago, IL, USA).

Resultados

Evaluación sensorial. Las puntuaciones medias de demérito de las canales de conejo procedentes de los mataderos fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajas que las obtenidas en la venta al por menor de los supermercados. De éstas, los muslos traseros envasados en el supermercado 1 alcanzaron puntuaciones medias más bajas que las obtenidas en las canales envasadas en el supermercado 2 (figura 1.1). Los resultados de las puntuaciones de demérito estuvieron significativamente ($p < 0.05$) relacionados con el pH (coeficiente de correlación, r , de +0.59), el contenido en ácido L-láctico ($r = -0.60$) y con los recuentos totales de psicrotrofos, *B. thermosphacta* y levaduras ($r = +0.47$). Las correlaciones significativas con un coeficiente r más bajo (entre +0.39 y +0.42) fueron obtenidas para los recuentos de la microbiota aerobia mesófila, *Pseudomonas* y bacterias ácido-lácticas.

Figura 1.1.- Puntuaciones totales, media \pm desviación estándar respecto del porcentaje de demérito máximo, obtenidas en el análisis sensorial de carne de conejo en función de su lugar de adquisición: CC1, supermercado 1; CC2, supermercado 2; M, matadero de gran capacidad; G, pequeño matadero.



Análisis físico y químico. Los valores medios de pH, ERV y los contenidos de ácido D- y L- láctico se muestran en la tabla 1.1. Los valores medios de pH de las canales frescas de conejo fueron idénticos (5.98) y significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los encontrados en las muestras adquiridas en los establecimientos comerciales. En estas últimas muestras se encontró un nivel de ácido láctico significativamente ($p < 0.05$) más bajo que el determinado en las muestras de matadero. Este parámetro estaba significativamente ($p < 0.05$) relacionado con el pH ($r = -0.52$) y los recuentos de bacterias aerobias psicrotrofas ($r = -0.49$), además de con los recuentos de *Pseudomonas* ($r = -0.51$), *Enterobacteriaceae* ($r = -0.56$) y levaduras ($r = -0.52$).

En los muslos traseros envasados en el supermercado 1, los valores medios de ERV fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los encontrados en las canales envasadas en el supermercado 2 y en las canales frescas de conejo. No se observaron correlaciones significativas entre el ERV y los restantes parámetros analizados.

Análisis microbiológico. Los resultados del análisis microbiológico se presentan en la figura 1.2. Entre las canales frescas de conejo a las 24 h *post-mortem*, las adquiridas en el matadero de gran capacidad presentaron recuentos significativamente ($p < 0.05$) más altos de bacterias aerobias mesófilas y psicrotrofas, de presuntos clostridios psicrotrofos y de *B. thermosphacta* que los obtenidos en el matadero más pequeño. En los restantes grupos microbianos investigados no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) salvo el número de bacterias ácido-lácticas que fue significativamente ($p < 0.05$) más alto en las canales de conejo adquiridas en el pequeño matadero. Estas canales tuvieron una menor incidencia de *E. coli* (25%) que las procedentes del matadero industrial (58.3%).

Entre las muestras expuestas para la venta, las adquiridas en el supermercado 2 presentaron una contaminación significativamente ($p < 0.05$) más alta de bacterias aerobias psicrotrofas, clostridios psicrotrofos, *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido-lácticas, *B. thermosphacta* y levaduras. La prevalencia de *E. coli* también fue mayor en el supermercado 1 que en el 2 (72% frente al 56%).

Tabla 1.1.- Características físico-químicas y sensoriales de la carne de conejo.

Procedencia de la carne de conejo	Puntuación de demérito ^a	pH	ERV (ml)	Ácido D-láctico (%)	Ácido L-láctico (%)	Peso del muslo (g)	Superficie del muslo (cm ²) ^b
Pequeño matadero ^c	8.8±4.2 A ^d	5.98±0.07 A	22.44±6.60 A	ND ^e	0.50±0.05 A	142.49±20.79 A	164.69±31.47 A
Gran matadero ^c	11.2±3.2 A	5.98±0.09 A	24.01±7.50 A	ND	0.57±0.11 A	139.37±23.67 A	174.80±33.46 A
Supermercado 1 ^f	21.4±10.2 B	6.26±0.18 B	9.81±4.72 B	ND	0.38±0.18 B	137.88±45.51 A	246.80±57.28 B
Supermercado 2 ^g	24.1±9.1 B	6.37±0.18 B	20.05±11.55 A	ND	0.38±0.18 B	134.82±37.85 A	148.08±37.21 A

^a Puntuación total de demérito en porcentaje sobre la puntuación máxima de demérito posible.

^b Estimación aproximada después de presionar el muslo trasero humedecido sobre un papel de filtro.

^c 12 canales refrigeradas a las 24 h *post-mortem*.

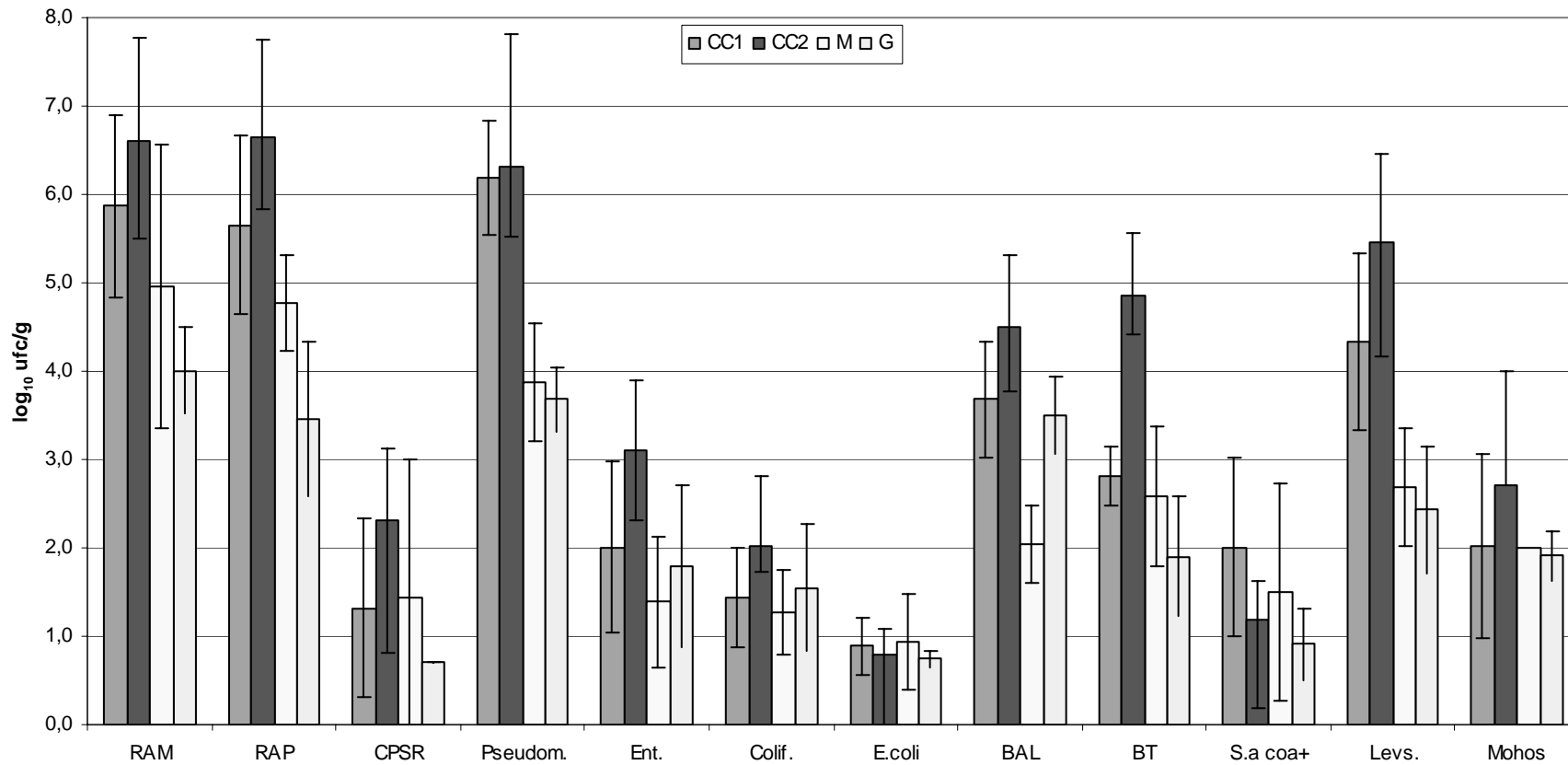
^d Para todos los parámetros se recogen media ± desviación estándar. Las medias en la misma columna que lleven la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

^e ND, valor por debajo del límite de detección de la técnica utilizada ($< 0.006\%$)

^f 16 envases, con dos muslos traseros, mantenidos a refrigeración.

^g 11 canales enteras e individualmente envasadas y mantenidas en condiciones de refrigeración.

Figura 1.2.- Comparación de los recuentos microbiológicos obtenidos sobre carne fresca de conejo (media \pm desviación estándar): RAM, microbiota aerobia mesófila; RAP, microbiota aerobia psicrotrofa; CPSR, clostridios psicrotrofos sulfito reductores; Pseudom., *Pseudomonas*; Enter., *Enterobacteriaceae*, Colif., coliformes; BAL, bacterias ácido-lácticas; BT, *Brochothrix thermosphacta*; S.a. coa+, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos; Levs., levaduras; CC1, supermercado 1; CC2, supermercado 2; M, matadero de gran capacidad; G, pequeño matadero.



Discusión

Se han propuesto una gran cantidad de métodos sensoriales para la evaluación de la calidad de los alimentos y su selección debería depender, entre otros, de los objetivos perseguidos (Costell, 2002). Como ya se ha comentado, la evaluación de la “frescura” y la aceptación por parte del potencial consumidor, definidas a partir de características tales como apariencia, olor, textura, etc, representaron el principal objetivo del estudio. Así pues, la calidad sensorial de la carne de conejo fue determinada en base a una graduación o escala de calidad, método que se aplica principalmente a la valoración de la frescura del pescado aunque puede ser utilizado en muchos alimentos (Costell, 2002). En este estudio, los resultados de demérito consiguieron diferenciar significativamente ($p < 0.05$) las canales frescas (puntuaciones de demérito más bajas) de la carne de conejo expuesta para su venta al por menor (puntuaciones más altas) como se refleja en la figura 1.1. Tanto por este hecho como por la concordancia de estos resultados con los datos microbiológicos obtenidos (figura 1.2), se puede afirmar que el modelo adaptado del utilizado para el pescado resultó eficaz para el análisis organoléptico de la carne de conejo.

Hulot y Ouhayoun (1999) han revisado la información publicada sobre los factores que afectan al pH en la carne de conejo. En esta especie, el pH definitivo es alcanzado a las 20 h tras el sacrificio y sus valores dependen del músculo donde se tome la lectura. En el músculo *Biceps femoris* de las canales de conejo adquiridas en los mataderos se encontraron valores medios de pH (5.98) ligeramente más altos que los citados en otras publicaciones revisadas por los autores mencionados más arriba (aproximadamente 5.8) y bastante altos comparados con otros músculos en especies animales de carne roja. Como se discute más adelante, el pH podría ser un factor que inflencie el tipo de microorganismos que crecen en la carne de conejo.

El ERV proporciona una aproximada estimación de la calidad microbiológica de la carne almacenada aeróbicamente a pesar de que está influido por otros factores como es el tipo de microbiota y los cambios en el pH (Jay, 1986). El L-lactato es un componente de la carne utilizado por *Pseudomonas* y otra microbiota tras el agotamiento de la glucosa en carnes de vacuno, porcino y ave almacenadas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (Nassos y col., 1988; Nychas y col., 1998; Tsigarida y Nychas, 2001). En el presente estudio, el ERV no se correlacionó significativamente con ninguno de los parámetros investigados pero el nivel de ácido L-láctico en la carne de conejo de venta al por menor fue significativamente más bajo que el de las canales frescas de conejo (tabla 1.1).

El análisis microbiológico de la carne fresca es apropiado para valorar las operaciones de procesado, la verificación del sistema APPCC y la estimación de la vida útil. En España, la producción de carne de conejo destinada a la venta para consumo humano ha estado regulada hasta el 31 de diciembre de 2005 por el R.D. 1543/1994 (Anónimo, 1994a), que incorporó la Directiva 91/495/CEE del Consejo Europeo (Anónimo, 1991). Esta normativa, que establecía las condiciones sanitarias a cumplir en la producción, sacrificio, despiezado, transporte, manipulación, almacenamiento y venta final de esta carne, no incluía criterios microbiológicos y ha sido sustituida por los reglamentos comprendidos en el coloquialmente conocido como “paquete de higiene”. Es importante destacar que los únicos límites microbiológicos para la carne de conejo recogidos en la “base de datos de especificaciones microbiológicas para determinados países” (World Health Organization, 2000) son “recomendaciones españolas” sin carácter obligatorio o legal. Sin embargo, la casi ausencia de estudios microbiológicos sobre la carne de conejo sugiere que esos valores sean considerados como una propuesta teórica.

En la UE, los criterios microbiológicos que determinan la aceptabilidad de la carne fresca fueron establecidos para la carne picada y los preparados de carne (Anónimo,

1994b) y para las canales de carnes rojas en el matadero (Anónimo, 2001). En este último caso y empleando métodos destructivos, para todas las canales de carne roja las medias logarítmicas ($n = 5-10$ canales) se han de adscribir a alguna de las tres categorías: aceptable, marginal e inaceptable, siendo los valores de m y M : 3.5 (4.0 para porcino) y 5.0 \log_{10} RAM/cm², 1.5 (2.0 para porcino) y 2.5 (3.0 para porcino) \log_{10} *Enterobacteriaceae*/cm². En este estudio (figura 1.2), el número de unidades logarítmicas promedio de RAM en las canales de conejo adquiridas en el matadero de menor capacidad (4.01/g, aproximadamente 4.07/cm²) fue idéntico al que encontró Khalafalla (1993) en canales frescas de conejo en Egipto y superior al valor m (UE) para carnes de vacuno, porcino y pequeños rumiantes. Coliformes y *E. coli*, que también son investigados como indicadores de posible contaminación fecal (Gill, 2000), alcanzaron números bajos, similares a los hallados por Bobbit en Australia (2003).

Recientemente, la Comisión Europea ha adoptado el Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2005b), que, si bien sustituye a las normas microbiológicas antes indicadas, no introduce cambios significativos en relación con lo discutido previamente.

A pesar de que el almacenamiento durante 24 horas a 3 °C produciría inevitablemente el incremento de algún grupo de microorganismos, los niveles de RAM de la carne de conejo fueron superiores a los esperados en carne procesada higiénicamente. Así pues, dependiendo de la escala, los recuentos medios se situaron en el rango de aceptables o marginales de acuerdo con el “Australian Meat Standard Committee” (Bobbitt, 2003) o en el grado malo o pobre de acuerdo con la escala consultiva de Mackey y Roberts (1993). En carne de vacuno, los relativamente bajos números de microorganismos indicadores asociados a los relativamente altos de RAM se consideran debidos a excesiva manipulación (Gill y col., 1998). El extremo de las patas traseras, que

permanecían sin desollar en la canal de conejo tras la retirada de la piel, podrían haber contribuido al nivel de RAM a partir de la contaminación por pelos y microorganismos en el agua de lavado.

Al igual que Bobbit (2002; 2003), hemos observado que, en general, los principales grupos microbianos en las canales de conejo a las 24 h *post-mortem* fueron *Pseudomonas* spp., bacterias ácido-lácticas, levaduras y *B. thermosphacta*, mientras que los clostridios y *S.aureus* se encontraron en valores bajos. En la carne de conejo expuesta para su venta, *Pseudomonas* seguida por las levaduras, las bacterias ácido-lácticas y *B. thermosphacta* dominaron la microbiota de los muslos traseros de conejo (supermercado 1). Estos microorganismos también fueron los contaminantes principales de las canales envasadas con película plástica del supermercado 2. La mayoría de las anteriores, que presentaron los mayores niveles de *B. thermosphacta*, bacterias ácido-lácticas y *Enterobacteriaceae*, estaban dispuestas en el expositor a +1/+5 °C. Cuando el almacenamiento fue en aire a 4 °C durante 8 días, Bobbit (2002) detectó que *Pseudomonas*, *B. thermosphacta* y bacterias ácido-lácticas eran los microorganismos predominantes en las canales de conejo. Khalafalla (1993) y Pérez-Chabela y col. (1999), que también estudiaron la carne de conejo en venta al por menor en Egipto y Méjico respectivamente, no enumeraron bacterias Gram positivas asociadas con la alteración, y sus resultados coinciden en un incremento general de los niveles de contaminación microbiana.

Pseudomonas spp. normalmente son los microorganismos que predominan en carne almacenada a refrigeración en condiciones de aerobiosis. Sobre los tejidos grasos y musculares que presentan pH elevado (≥ 6.0), *B. thermosphacta* puede también crecer, particularmente a temperaturas de almacenamiento ≥ 4 °C (Blickstad y Molin, 1983; Dainty y Mackey, 1992). Tanto los valores de pH como la temperatura de almacenamiento pueden ser causas importantes de los niveles altos de *B. thermosphacta* en muestras

examinadas por Bobbit (2002) y en los encontrados en el supermercado 2 en este trabajo. La disminución de la capacidad competitiva de *Pseudomonas* se puede producir bajo la acción de pequeñas acumulaciones de CO₂, y también se ha relacionado con la elevada incidencia puntual de *B. thermosphacta* en carne envasada con película plástica y expuesta para su venta (Gardner y col., 1967). Las levaduras psicrotrofas se consideran incapaces de competir con las bacterias por sus ritmos lentos de crecimiento (Dillon, 1998). Sin embargo, en algunos estudios sobre carne fresca de ave, la población inicial de levaduras se corresponde bastante bien con las que nosotros hemos encontrado (Geornaras y col., 1994; Ismail y col., 2000) y se citan incrementos de hasta 5 log₁₀ ufc/g durante el almacenamiento a refrigeración hasta el final de la vida útil (Gallo y col., 1988; Geornaras y col., 1994; Ismail y col., 2000).

Según la “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF, 2005), los clostridios presentan una incidencia baja en las carnes rojas. Nosotros hemos investigado los niveles de clostridios pertenecientes al grupo 1, que son capaces de crecer a bajas temperaturas, según Broda y col. (1998). De forma análoga, sobre la carne fresca se encuentran recuentos bajos de estafilococos coagulasa positivos, muy posiblemente conjunción de los supervivientes del animal y de contaminantes de diferentes fuentes. En conejos, *S. aureus* es frecuente y, además, puede causar diferentes enfermedades, destacando los abscesos y las mastitis (Lebas y col., 1997; Rosell, 2000b).

En resumen, las muestras de carne de conejo estudiadas poseen bajos niveles de microorganismos indicadores pero números relativamente altos de recuentos totales. Por otra parte, nuestros datos y los de Bobbit (2002; 2003) sugieren que, al igual que en otras carnes, la microbiota de la carne de conejo cruda refrigerada está dominada por *Pseudomonas* pero las levaduras y algunas bacterias Gram positivas no esporuladas parecen ser también relevantes.

Microbiological Quality of Rabbit Meat

JOSE M. RODRÍGUEZ-CALLEJA, JESÚS A. SANTOS, ANDRÉS OTERO, AND MARÍA-LUISA GARCÍA-LÓPEZ*

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071 León, Spain

MS 03-356: Received 21 August 2003/Accepted 22 November 2003

ABSTRACT

World rabbit meat production is estimated to be over 1 million tons, and Spain is the third largest producer. Although rabbit meat is marketed and consumed worldwide, information on microbiological quality is very scarce. Here, we report indicator organisms, spoilage flora, sensory quality, and some physicochemical traits of 24 h postmortem chilled rabbit carcasses and prepackaged rabbit meat stored chilled in air for 0 to 3 days at the retail level. The mean total bacterial count ($4.01 \pm 0.48 \log \text{CFU/g}$) for carcasses dressed at a small abattoir by a manual process was significantly lower ($P < 0.05$) than that ($4.96 \pm 0.90 \log \text{CFU/g}$) for carcasses dressed at a large abattoir in automated slaughter lines. Both groups of carcasses had mean pH values of 5.98. The dominant contaminants on carcasses from the small abattoir were *Pseudomonas*, lactic acid bacteria, and yeasts. These microorganisms and *Brochothrix thermosphacta* were dominant on carcasses from the large abattoir. On prepacked hind legs (pH 6.26 ± 0.18) stored at -1 to $+1^\circ\text{C}$ (supermarket 1), mean aerobic mesophilic count was $5.87 \pm 1.03 \log \text{CFU/g}$, and the major microbial groups were *Pseudomonas*, yeasts, lactic acid bacteria, and *B. thermosphacta*. On prepacked whole carcasses (pH 6.37 ± 0.18) displayed at -1 to $+5^\circ\text{C}$ (supermarket 2), mean aerobic mesophilic count was 6.60 ± 1.18 and the same microbial groups were dominant. Relative *Escherichia coli* incidence was supermarket 2 > large abattoir > supermarket 1 > small abattoir. Overall, low numbers of coliforms, *Enterobacteriaceae*, psychrotrophic clostridia, coagulase-positive staphylococci, and molds were found. Sensory scores, pH values, and L-lactic acid content differentiated fresh carcasses from retail samples. Data obtained suggest that the microflora of chilled rabbit meat are different from those found on the meat of other animals.

In 2002, world production of rabbit meat was estimated to be over 1 million tons. The largest producer was China (417,000 tons) followed by Italy (221,000 tons), Spain (121,000 tons), and France (85,200 tons) (16). In Spain, with a per capita consumption of 1.75 kg/year (12), most of the rabbit meat is marketed as unwrapped skinned carcasses with the thoracic viscera, liver, and kidneys (1), but increasing quantities are being sold as whole carcasses and consumer portions in polystyrene trays with an oxygen-permeable overwrap film.

Rabbits, with high fertility rates, fast growth rates, and short production cycles, are a good source of meat and have better nutritional and dietary properties than do red meats (14, 30). On average, protein content is higher and fat and cholesterol contents are lower (14, 30). There are also differences in amino acids, certain vitamins and minerals, and fat composition; rabbit lipids contain lower concentrations of stearic and oleic acids and higher proportions of polyunsaturated fatty acids (14, 22, 30, 35). In spite of these advantages, traditional and cultural factors have probably been partially responsible for keeping rabbit meat consumption from becoming common in many countries.

Many studies concerning rabbit meat have been published, although most research has been dedicated to carcass composition and biological and technological factors influencing meat quality and sensory traits. In contrast, information on microbiological quality is limited to a few

reports from researchers (10, 28, 36) and from the Australian Rural Industries Research and Development Corporation (6, 7).

Because rabbit meat has not been incriminated in outbreaks of foodborne disease, it is considered a safe product (14). However, as with other raw meats, rabbit has the potential to carry food-poisoning organisms derived from different sources (skin, gut contents, feces, abattoir environment, workers, cutting and packaging processes, and handling at the retail level). Rabbit carcasses are obtained, processed, and stored like those of other meat animals, and postmortem biochemical changes that occur in rabbit muscle are similar to those that occur in red meat and poultry (24). Therefore, spoilage will be essentially the same as that in other chilled meats, which is mainly the result of microbial action.

Because the microflora of raw meats is of interest as an index of processing practices, storage conditions, shelf life, and potential risk to public health, this study was undertaken to determine the microbiological contamination (indicator organisms and spoilage flora) of rabbit meat 24 h postmortem and at the retail level. Sensory quality and some physicochemical traits were also examined.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. From January to July, 12 healthy commercial rabbits (10 weeks of age, around 2 kg live weight) from different flocks were obtained from one rabbit farm, slaughtered under hygienic conditions (1) in a small plant, and stored at 3°C for 24 h. The same number of chilled (24 h) rabbit carcasses, each

* Author for correspondence. Tel: +34987291119; Fax: +34987291284; E-mail: dhtmg1@unileon.es.

one belonging to a different lot, was collected from one large rabbit slaughterhouse with structure, layout, maintenance, and operational hygiene in compliance with European Union (EU) legislation (1). At the small plant, slaughtering was a manual process. Rabbits were stunned with a blow to the skull and hung by the hind legs above the hock joint. After bleeding, forefeet and skin were removed, and while still hanging, the carcass was opened to remove the viscera. Head, liver, kidneys, and heart remained with the carcass, which was washed with chlorinated water to eliminate hair and any other soil or debris. At the large plant, rabbits were stunned by electronarcosis, shackled immediately, and quickly bled. Subsequent dressing of carcasses was carried out on automated slaughter lines.

Over the same period, 27 packages of rabbit meat in polystyrene trays overwrapped with oxygen-permeable films were obtained from two large-chain supermarkets. Trays, which were purchased between 0 and 3 days after packaging (shelf life of 1 week), belonged to different lots. Sixteen samples consisted of packages of two bone-in hind legs that originated from one processor and were marketed in supermarket 1 displayed in an open-top cabinet with forced-air circulation at -1 to $+1^{\circ}\text{C}$. The remaining 11 samples were overwrapped whole carcasses from supermarket 2 that originating from a different processing company and were stored in a vertical multideck cabinet at -1 to $+5^{\circ}\text{C}$.

Sensory evaluation. Experts in sensory evaluation (León University) evaluated rabbit meat after slaughtering and during chilled storage. Changes in appearance, odor, and texture were noted, and a freshness quality scheme was developed based upon those of Botta (8) and Costell (11) for fish. Quality parameters, characteristics, and demerit point scales are given in Table 1. Six trained panelists, 25 to 60 years of age, made assessments. The sum of points for each sample was transformed to a percentage of maximum demerit points and was expressed as the demerit score.

Physicochemical analysis. After incision of the aponeurosis, pH values were measured in the biceps femoris muscle by means of a pH/mV506 pH meter (Crison, Barcelona, Spain) and a penetration glass electrode (34). Measures of pH were also done in meat homogenates (10 g muscle per 10 ml distilled water) with a microPH 2001 pH meter (Crison).

Extract release volume (ERV) was measured as described by Kirk and Sawyer (29). Minced hind-leg rabbit meat (15 g) was mixed with 60 ml of extraction reagent (50 ml of 0.2 M KH_2PO_4 and 3.72 ml of 0.2 M NaOH diluted up to 200 ml with distilled water; pH 5.8) and homogenized for 2 min in an Omni Mixer (Sorvall, Pacisa, Spain). The homogenate was filtered through filter paper (Whatman no. 1, 18.5 cm diameter), and the ERV was defined as the volume collected in 15 min.

The configuration and amount of lactic acid in hind legs were determined enzymatically using D-lactate and L-lactate dehydrogenase (no. 1112821, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

Microbiological analysis. Hind legs (one from each whole carcass and package) were placed in sterile Stomacher bags containing enough 0.1% (wt/vol) peptone water to make a 1:5 dilution. Samples were rinsed by shaking vigorously for 30 s, and the resultant wash was used for testing after being serially diluted (4). After rinsing, a rough estimation of hind-leg surface was made by manually pressing the wet hind leg for 30 s on filter paper. Water absorbed by the filter paper formed ellipses from which the area was calculated.

Aerobic mesophilic and psychrotrophic counts were deter-

TABLE 1. Sensory quality system developed for rabbit meat

Parameter	Characteristic	Demerit points
Color	Characteristic rabbit meat color	0
	Opaque	1
	Yellowish	2
Odor (fresh)	Normal	0
	Neutral	1
	Trace of "off" odor	2
Odor (boiled) ^a	Normal	0
	Neutral	1
	Abnormal, urine	2
Flesh texture	Firm	0
	Slightly soft	1
	Soft	2
Wetness	Normal	0
	Slightly dry or slightly wet	1
	Moderately dry or moderately wet	2
	Excessive dry or excessive wet	3
Contamination (hair, feces, blood patches)	None	0
	Slight	1
	Moderate	2
Fat appearance	White	0
	Opaque	1
	Yellowish	2
Rancidity (odor)	Absent	0
	Slight	1
	Moderate	2
Package ^b	Normal	0
	Defective	1
	Broken	2
Maximum demerit points for packed rabbit cuts and carcasses		19
Maximum demerit points for fresh rabbit carcasses		17

^a Ten grams in 30 ml of tap water, 5 min in a microwave oven.

^b Only packaged rabbit meat.

mined on plate count agar (Oxoid, Basingstoke, UK) incubated at 30 and 4.5°C for 2 and 14 days, respectively (23). Presumptive counts of psychrotrophic sulfite-reducing clostridia were obtained on Shahidi Ferguson Perfringens agar with egg yolk (Oxoid) incubated for 14 days at 20°C in an anaerobic jar with Anaerogen gas-generating sachets (Oxoid) (9). *Pseudomonas* numbers were determined after 2 days of incubation at 25°C on *Pseudomonas* agar base (Oxoid) to which cetrimide-fucidin-cephaloridine supplement (Oxoid) was added. *Enterobacteriaceae* were determined, after incubation at 37°C for 24 h, using overlaid plates of violet-red bile glucose agar (Oxoid). *Escherichia coli* and coliforms were grown on Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates (3M Microbiology Products, St. Paul, Minn.). Colonies were counted according to the manufacturer's instructions following 24 and 48 h of incubation at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (AOAC Official Method 991.04). Lactic acid bacteria were counted using overlaid plates of MRS agar (Oxoid) incubated at 30°C for 3 days. *Brochothrix thermosphacta* colonies were enumerated on streptomycin sulfate cycloheximide thallose acetate agar (Oxoid) after incubation for 2 days at 25°C . Coagulase-positive staphylococci were directly determined by using Baird-Parker agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) with

rabbit plasma fibrinogen supplement (Biokar) incubated at 37°C for 48 h. Numbers of fungi were determined on oxytetracycline glucose yeast extract agar (Oxoid) plates incubated at 25°C for 5 days. Initial differentiation between yeasts and molds was made according to Harrigan (23).

Statistical analysis. The number of microorganisms per milliliter of rinse water was transformed and expressed as log CFU per gram. Sensory, physicochemical and microbiological data were analyzed (means, SD, variance, *t* test, and correlation coefficients) using the Statistica for Windows release 5.5 software (Statsoft, Chicago, Ill.).

RESULTS

Sensory evaluation. Mean demerit scores of rabbit carcasses from abattoirs were significantly lower ($P < 0.05$) than those obtained from retail samples. Among the latter, packed hind legs from supermarket 1 had lower mean scores than packed rabbit carcasses from supermarket 2 (Table 2).

Physicochemical analysis. Mean values for pH, ERV, and D- and L-lactic acid content are given in Table 2. Mean pH values of fresh rabbit carcasses were identical (5.98) and significantly lower ($P < 0.05$) than those of rabbit meat at the retail level.

In packed hind legs from supermarket 1, the mean ERV was significantly lower ($P < 0.05$) than those of packed carcasses from supermarket 2 and fresh rabbit carcasses.

Microbiological analysis. Results of microbiological analyses are given in Table 3. Among 24 h postmortem fresh rabbit carcasses, those from the large abattoir had significantly higher counts ($P < 0.05$) of mesophilic and psychrotrophic aerobic bacteria, presumptive psychrotrophic clostridia, and *B. thermosphacta* than did carcasses from the small abattoir. For the remaining bacterial groups, there were no significant differences ($P > 0.05$) except for the lactic acid bacteria, which were significantly more numerous ($P < 0.05$) in rabbit carcasses from the small abattoir. These carcasses had lower *E. coli* incidence (25%) than those obtained at the large abattoir (58.3%).

Among displayed samples, those from supermarket 2 had significantly higher numbers ($P < 0.05$) of total psychrotrophic aerobic bacteria, psychrotrophic clostridia, *Enterobacteriaceae*, lactic acid bacteria, *B. thermosphacta*, and yeasts. *E. coli* prevalence was also higher (72% vs. 56%).

DISCUSSION

Many different types of sensory analyses have been proposed to evaluate the quality of foods, and selection of the best approach must depend, among other things, on the objectives of the study (11). Evaluation of "freshness" and potential consumer acceptance defined in terms of characteristics such as appearance, odor, and texture was the principal aim in this study. Therefore, the sensory quality of rabbit meat was determined on the basis of quality grading, a method mainly applied to freshness quality assessment of fish, although it can be used for a variety of foods (11).

TABLE 2. Sensory and physicochemical characteristics of rabbit meat

Rabbit source	Demerit score (%) ^a	pH	ERV (ml)	D-Lactic acid (%)	L-Lactic acid (%)	Leg weight (g)	Leg surface (cm ²) ^b
Small abattoir ^c	8.8 ± 4.2 A ^d	5.98 ± 0.07 A	22.44 ± 6.60 A	0.000 ± 0.000	0.50 ± 0.05 A	142.49 ± 20.79 A	164.69 ± 31.47 A
Large abattoir ^c	11.2 ± 3.2 A	5.98 ± 0.09 A	24.01 ± 7.50 A	0.001 ± 0.001	0.57 ± 0.11 A	139.37 ± 23.67 A	174.80 ± 33.46 A
Supermarket 1 ^e	21.4 ± 1.02 B	6.26 ± 0.18 B	9.81 ± 4.72 B	0.000 ± 0.001	0.38 ± 0.18 B	137.88 ± 45.51 A	246.80 ± 57.28 B
Supermarket 2/ ^f	24.1 ± 9.1 B	6.37 ± 0.18 B	20.05 ± 11.55 A	0.000 ± 0.000	0.38 ± 0.18 B	134.82 ± 37.85 A	148.08 ± 37.21 A

^a Total demerit points transformed to a mean ± SD percentage of maximum demerit points attainable.

^b Rough estimation after pressing wet hind legs on filter paper.

^c Twelve chilled carcasses at 24 h postmortem.

^d Means in the same column with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

^e Sixteen chilled packages containing two hind legs.

^f Eleven individual chilled whole packed carcasses.

TABLE 3. Microbiological characteristics of rabbit meat

Rabbit source	APC ^a		<i>E. coli</i>																							
	30°C		4.5°C		Psychrotrophic clostridia		<i>Pseudomonas</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>		Coliforms		No. of positive samples/total no. examined		Count		Lactic acid bacteria		<i>B. thermophilacta</i>		Coagulase-positive staphylococci		Yeasts		Molds	
Small abattoir ^b	4.01 ± 0.48	3.46 ± 0.88	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	3.68 ± 0.36	1.79 ± 0.91	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	1.55 ± 0.72	4/12	0.74 ± 0.10	3.50 ± 0.44	1.90 ± 0.68	0.91 ± 0.40	2.43 ± 0.72	1.91 ± 0.28	2.69 ± 1.22	2.01 ± 0.66	2.01 ± 0.66	2.01 ± 0.66	2.01 ± 0.66
Large abattoir ^b	4.96 ± 0.90	4.77 ± 1.60	1.44 ± 0.55	1.44 ± 0.55	3.87 ± 1.57	1.39 ± 0.67	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	1.27 ± 0.74	7/12	0.94 ± 0.48	2.04 ± 0.54	2.58 ± 0.43	1.50 ± 0.79	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	2.69 ± 1.22	
Supermarket 1 ^d	5.87 ± 1.03	5.65 ± 1.01	1.32 ± 1.01	1.32 ± 1.01	6.19 ± 0.65	2.01 ± 0.96	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	1.43 ± 0.56	9/16	0.89 ± 0.32	3.68 ± 0.65	2.81 ± 0.34	2.01 ± 1.02	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00	4.33 ± 1.00
Supermarket 2 ^e	6.60 ± 1.18	6.65 ± 1.11	2.32 ± 0.81	2.32 ± 0.81	6.31 ± 1.51	3.11 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	2.02 ± 0.79	8/11	0.79 ± 0.29	4.49 ± 0.83	4.85 ± 0.71	1.18 ± 0.44	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00	5.45 ± 1.00

^a Aerobic plate counts, mean ± SD log CFU/g.

^b Twelve chilled carcasses at 24 h postmortem.

^c Means in the same column with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

^d Sixteen chilled packages containing two hind legs.

^e Eleven individual chilled whole packed carcasses.

This approach is based on assessment of important characteristics, to which demerit points ranging from 0 to 3 are assigned (Table 1). For each characteristic, demerit points are recorded and the scores for all characteristics are added to give an overall sensory score. The lower the score, the better the quality. In this study, demerit scores significantly differentiated fresh carcasses from retail rabbit meat.

Hulot and Ouhayoun (24) reviewed published information on factors affecting pH in rabbit meat. In rabbits, the final pH is reached 20 h after slaughter, with values depending on the muscle evaluated. The biceps femoris of rabbit carcasses from abattoirs had mean pH values (5.98) slightly higher than those reported by Hulot and Ouhayoun (ca. 5.8) and much higher than those in many muscles in red meat species. This variation in pH could be a factor influencing the types of microorganisms growing on rabbit meat.

ERV provides a rough estimate of the microbial quality in aerobically stored meat, although it is influenced by factors such as the type of microbial flora and changes in pH (27). *Pseudomonas* and other meat microflora in beef, pork, and poultry stored under aerobic and anaerobic conditions utilize L-lactate after glucose has been depleted (32, 33, 38). In the present study, ERV was not significantly correlated with any trait investigated, but L-lactic acid levels were significantly lower in displayed rabbit meat than in fresh rabbit carcasses.

Microbiological testing of raw meats is appropriate for assessment of process performance, verification of the hazard analysis critical control point system, and estimation of shelf life. In Spain, the production of rabbit meat intended for sale for human consumption is covered by regulation 1543/1994 (3), which implements European Council Directive 91/495/EEC (1). This regulation, which prescribes the conditions that must be satisfied for the production, slaughter, butchering, transport, handling, storage, and sale of this meat, did not set microbiological criteria. The only microbiological limits for rabbit meat mentioned in the "Database of Microbiological Specifications for Selected Countries" (39) are the "Spanish recommendations." The virtual absence of microbiological studies on rabbit meat suggests that this proposal is theoretical.

Microbiological criteria for the acceptability of raw meat has long presented a problem. Within the EU, such criteria are only set for minced meat and meat preparations (2) and carcasses of red-meat animals at the slaughterhouse (European Commission Decision 2001/471/EC). Using destructive methods for all red-meat carcasses except pig, daily log mean (of 5 to 10 carcasses) is allocated into one of three categories: acceptable, marginal, and unacceptable: the values for *m* and *M*, respectively, are 3.5 and 5 log aerobic mesophilic count (AMC) per cm² and 1.5 and 2.5 log *Enterobacteriaceae* per cm².

Although dressing of each meat species should be regarded as a unique process, dressing of rabbit carcasses has been compared with that of beef carcasses (30). In this study (Table 3), the log mean AMC on rabbit carcasses from the small abattoir (4.01/g, ca. 4.07/cm²) was identical to that found by Khalafalla (28) on fresh rabbit carcasses

in Egypt and above the EU *m* value for red meat. On large abattoir carcasses, the log mean AMC (4.96/g, ca. 5.05/cm²) was similar to that reported by Bobbitt (7) for rabbit carcasses in Australia (4.79/g) and very close to the EU *M* value for red meat. However, log mean *Enterobacteriaceae* counts were below or slightly higher than the *m* value set by the EU for red meat and lower than that found by Khalafalla (28). Coliforms and *E. coli*, which are also investigated as indicators of possible hazardous contamination (20), were scarce, in agreement with the data of Bobbitt (7).

Although storage for 24 h at 3°C would have resulted in some microbial proliferation, AMCs are high for hygienically processed meat. Thus, depending on scale, mean counts fall into the acceptable or marginal range according to the Australian Meat Standard Committee (7) or into the poor or bad grade according to the advisory scale of Mackey and Roberts (31). In beef, relatively small numbers of indicator organisms and relatively high AMCs suggest extensive handling (21). Hind-foot fur that remained on rabbit carcasses after skinning could have contributed to high AMCs because wash water can spread hair and microorganisms.

Like Bobbitt (6, 7), we observed that the main microbial groups on 24 h postmortem rabbit carcasses were *Pseudomonas*, lactic acid bacteria, and *B. thermosphacta*, with clostridia and *Staphylococcus aureus* present in low numbers. In our study, fungi (especially yeasts) were a significant component of the flora. In retail rabbit meat, *Pseudomonas* followed by yeasts, lactic acid bacteria, and *B. thermosphacta* dominated the microflora of rabbit hind legs stored between -1 and +1°C (supermarket 1). These microorganisms were also the major components of the microflora of overwrapped carcasses from supermarket 2. Most of these carcasses, which had the highest levels of *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria, and *Enterobacteriaceae*, were displayed at 5°C. When rabbit carcasses were stored in air at 4°C for 8 days, Bobbitt (6) identified *Pseudomonas*, *B. thermosphacta*, and lactic acid bacteria as the dominant organisms. Khalafalla (28), who also studied rabbit meat in retail outlets as did Pérez-Chabela et al. (36) in Mexico, did not enumerate gram-positive bacteria associated with spoilage, and results of both studies only confirm an overall increase in microbial contamination.

Pseudomonas species are usually the dominant organisms found on chilled meat stored under aerobic conditions. On fat tissue and muscle tissue with high pH (≥ 6), *B. thermosphacta* may also grow, particularly at storage temperatures $\geq 4^\circ\text{C}$ (5, 13). Both pH values and storage temperature may account for high *B. thermosphacta* counts in samples examined by Bobbitt (6) and in those from supermarket 2 in the present study. A slight buildup of CO₂ that inhibits competing *Pseudomonas* has also been associated with occasional high numbers of *B. thermosphacta* in displayed overwrapped meat (13, 18). Psychrotrophic yeasts are considered unable to compete with bacteria because of their slower growth rates (15). However, in some surveys of raw poultry, mean initial populations of yeasts were similar to those found in the present study (19, 26) and in-

creased up to 5 log CFU/g during refrigerated storage (17, 19, 26).

Clostridia occur in low numbers on red meat (25). We have investigated levels of clostridia belonging to group 1, as defined by Broda et al. (9), that are capable of growth at low temperatures under oxygen-restricted conditions. Similarly, low numbers of coagulase-positive staphylococci that are a mixture of survivors from the live animal and contaminants acquired from different sources are found on raw meat. In rabbits, *S. aureus* can cause a number of different diseases, the most relevant of which are abscesses and mastitis (30, 37).

Rabbit carcasses obtained in compliance with regulations (1, 3) had relatively low levels of indicator organisms but relatively high numbers of total contaminants. However, our data and those of Bobbitt (6, 7) suggest that, like those of other meat animals, the microflora of chilled raw rabbit meat is dominated by *Pseudomonas*, but yeasts and some non-spore-forming gram-positive bacteria also appear to be important. Because of the limited data currently available, further studies are being carried out to determine the specific storage flora of rabbit meat.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the Spanish MCYT (project AGL-2000 1159). Jose M. Rodríguez-Calleja is the beneficiary of a fellowship associated with the same project.

REFERENCES

- Anonymous. 1991. European Council Directive 91/495/EEC of 27 November 1990 concerning public health and animal health problems affecting the production and placing on the market of rabbit meat and farmed game meat. *Off. J. Eur. Community L* 228, 24/09/1991:41-55.
- Anonymous. 1994. European Council Directive 94/65/EC of 14 December 1994 laying down the requirements for the production and placing on the market of minced meat and meat preparations. *Off. J. Eur. Community L* 368, 21/12/1994:10-31.
- Anonymous. 1994. REAL DECRETO 1543/1994, de 8 de julio, por el que se establecen los requisitos sanitarios y de policía sanitaria aplicables a la producción y a la comercialización de carne de conejo doméstico y de caza de granja. [Royal Decree 1543/1994, of 8 of July, laying down the sanitary requirements and the requirements of sanitary police to be applied to the production and to the marketing of rabbit meat and farmed game meat.] *Bol. Of. Estado* 216:28097-29109.
- Barnes, E. M., and C. S. Impey. 1973. The sampling of chickens, turkeys, ducks and game birds, p. 63-76. In R. G. Board and D. W. Lovelock (ed.), *Sampling microbiological monitoring of environments*. Academic Press, London.
- Blickstad, E., and G. Molin. 1983. Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork, with special reference to temperature and sodium chloride. *J. Food Prot.* 46:756-763.
- Bobbitt, J. 2002. Shelf life and microbiological safety of selected new and emerging meats destined for export markets. Rural Industries Research and Development Corporation publ. no. 02-038. Available at: <http://www.rirdc.gov.au/reports/NAP/02-038.pdf>. Accessed 22 July 2003.
- Bobbitt, J. 2003. Buffalo, camel, crocodile, emu, kangaroo, ostrich and rabbit meat. New value added products. Rural Industries Research and Development Corporation publ. no. 03-036. Available at: <http://www.rirdc.gov.au/reports/NAP/03-036.pdf>. Accessed 22 July 2003.
- Botta, J. R. 1995. Evaluation of seafood freshness quality. VCH Publishers, Inc., New York.

9. Broda, D. M., K. M. Lacy, and R. G. Bell. 1998. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Int. J. Food Microbiol.* 39:69–78.
10. Cabanes, R. A., J. Ouhayoun, and S. Gilbert. 1994. Qualité de la viande de lapin. Influence de trois modes de conservation sur l'évolution des propriétés microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles. *Viandes Prod. Carnés* 15:175–178.
11. Costell, E. 2002. A comparison of sensory methods in quality control. *Food Qual. Prefer.* 13:341–353.
12. Cruz, J. 2002. La situación de la producción de carne de conejo en España. *Eurocarne* 112:21–24.
13. Dainty, R. H., and B. M. Mackey. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 21:103S–114S.
14. Dalle Zotte, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest. Prod. Sci.* 75:11–32.
15. Dillon, V. M. 1998. Yeasts and moulds associated with meat and meat products, p. 85–117. In A. Davies and R. Board (ed.), *The microbiology of meat and poultry*, 1st ed. Blackie Academic and Professional, London.
16. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003. FAOSTAT agriculture data. Available at: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>. Accessed 22 July 2003.
17. Gallo, L., R. E. Schmitt, and W. Schmidlorenz. 1988. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers, 1. Bacterial-flora and growth during storage. *Lebensm. Wiss. Technol.* 21:216–223.
18. Gardner, G. A., A. W. Carson, and J. Patton. 1967. Bacteriology of prepacked pork with reference to gas composition within pack. *J. Appl. Bacteriol.* 30:321–333.
19. Geornaras, I., G. A. Dykes, and A. von Holy. 1994. Microbial-populations associated with refrigerated poultry. *S. Afr. J. Sci.* 90:579–582.
20. Gill, C. O. 2000. HACCP in primary processing: red meat, p. 81–122. In M. Brown (ed.), *HACCP in the meat industry*. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, UK.
21. Gill, C. O., J. C. McGinnis, and J. Bryant. 1998. Microbial contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. *Int. J. Food Microbiol.* 42:175–184.
22. Gracey, J. F., D. S. Collins, and R. J. Huey. 1999. *Meat hygiene*, 10th ed. W. B. Saunders Company, Ltd., London.
23. Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*, 3rd ed. Academic Press, London.
24. Hulot, F., and J. Ouhayoun. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Sci.* 7:15–36.
25. International Commission on Microbiological Specifications for Food. 1998. *Microorganisms in foods*, 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic and Professional, London.
26. Ismail, S. A. S., T. Deak, H. A. Abd El-Rahman, M. A. M. Yassien, and L. R. Beuchat. 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 62:113–121.
27. Jay, J. M. 1986. Microbial spoilage indicators and metabolites, p. 219–240. In M. D. Pierson and N. J. Stern (ed.), *Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
28. Khalafalla, F. A. 1993. Microbiological status of rabbit carcasses in Egypt. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 196:233–235.
29. Kirk, R. S., and R. Sawyer. 1991. *Pearson's composition and analysis of food*, 9th ed. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK.
30. Lebas, F., P. Coudert, H. de Rochambeau, and R. G. Thébault. 1997. The rabbit—husbandry, health and production. Animal Production and Health Series no. 21. Food and Agriculture Organization, Rome.
31. Mackey, B. M., and T. A. Roberts. 1993. Verbesserung der Schlachthygiene durch HACCP und Ueberwachung. *Fleischwirtschaft.de* 73:34–38.
32. Nassos, P. S., J. King-AD, and A. E. Stafford. 1988. Lactic acid concentration as an indicator of acceptability in refrigerated or freeze-thawed ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:822–823.
33. Nychas, G.-J. E., E. H. Drosinos, and R. G. Board. 1998. Chemical changes in stored meat, p. 288–326. In A. Davies and R. Board (ed.), *The microbiology of meat and poultry*, 1st ed. Blackie Academic and Professional, London.
34. Ouhayoun, J., and A. Dalle Zotte. 1996. Harmonization of muscle and meat criteria in rabbit meat research. *World Rabbit Sci.* 4:211–218.
35. Parigi Bini, R., G. Xiccato, M. Cinetto, and A. Dalle Zotte. 1992. Effetto dell'età e peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della carne cunicola, 2. Composizione chimica e qualità della carne. *Zoot. Nutr. Anim.* 18:173–190.
36. Pérez-Chabela, M. L., G. M. Rodríguez-Serrano, P. Lara Calderón, and I. Guerrero. 1999. Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat Sci.* 51:279–282.
37. Rosell, J. M. 2000. Enfermedades del conejo. [Diseases of the rabbit.] Mundi-Prensa, Madrid.
38. Tsigarida, E., and G. J. E. Nychas. 2001. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp and a *Pseudomonas* sp on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *J. Appl. Microbiol.* 90:696–705.
39. World Health Organization. 2000. Database of microbiological specifications for selected countries. Available at: <http://www.who.dk/foodsafety/microbiological/20020418.8>. Accessed 22 July 2003.

CAPÍTULO 2.-

DESARROLLO DE LA MICROBIOTA AEROBIA ALTERANTE DE LA CARNE DE CONEJO ALMACENADA A REFRIGERACIÓN



▪ Introducción	53
▪ Material y Métodos	55
▪ Resultados	56
▪ Discusión	62
▪ <i>Artículo original:</i> “Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat”	66a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col. 2005. Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. "Meat Science", 70:389–394.*

Introducción

La alteración de la carne ha sido objeto de gran interés durante décadas y, por ello, ha originado numerosas publicaciones, tanto sobre aspectos microbiológicos como bioquímicos, dedicadas principalmente a tres tipos de carne: vacuno, cerdo y ave. Durante el envasado en presencia de oxígeno a temperaturas de refrigeración, la alteración de la carne es consecuencia principalmente de la actividad de bacterias aerobias, psicrotrofas, Gram negativas, en su mayoría *Pseudomonas*, cuya actividad metabólica les permite utilizar inicialmente la glucosa y, posteriormente, aminoácidos dando lugar a compuestos directamente relacionados con los signos de alteración (Pooni y Mead, 1984). Otros microorganismos, como *Brochothrix thermosphacta*, las bacterias ácido-lácticas (BAL) y ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son también capaces de multiplicarse pero generalmente alcanzan proporciones pequeñas respecto a la microbiota total, siendo su crecimiento favorecido por un pH alto de los tejidos (>6.0) y por el almacenamiento a temperaturas ≥ 5 °C (Dainty y Mackey, 1992; García-López y col., 1998). Además de la temperatura, el pH y la atmósfera de almacenamiento, la microbiota inicial determinará el predominio de uno u otro grupo bacteriano durante la vida útil. Así, una contaminación inicial alta por especies alterantes con bajo ritmo de crecimiento puede permitirles competir más eficazmente frente a otras bacterias que se presenten en la carne en un número reducido aún cuando sus ritmos de crecimiento puedan ser superiores. Además, los niveles altos de aquéllas producirán una alteración rápida a pesar de que su crecimiento sea lento.

La temperatura es el factor más importante que determina la durabilidad de la carne en condiciones de aerobiosis. Tras el almacenamiento refrigerado en estas condiciones, el inaceptable olor y la limosidad superficial son los signos de alteración más evidentes, consecuencia de la utilización bacteriana de los sustratos disponibles (Pooni y Mead, 1984).

Las canales de conejo son obtenidas, procesadas y almacenadas de igual forma que otras carnes y los cambios bioquímicos *post-mortem* que ocurren en el músculo de conejo son similares a los que tienen lugar en las carnes rojas y las de pollo (Hulot y Ouhayoun, 1999), aunque su pH a las 24 h (pH₂₄) suele ser superior al de las canales de vacuno (ver capítulo 1). A pesar de ello, y aunque no existe información al respecto, se considera que su alteración es similar a la de las canales de otros animales de abasto.

En este capítulo los objetivos a conseguir han sido: a) obtener información sobre los principales grupos microbianos que se desarrollan en carne de conejo almacenada a refrigeración en condiciones de aerobiosis, b) determinar la vida útil de la carne de conejo envasada en película de plástico permeable al oxígeno y almacenada en una cámara refrigerada a 3 ± 1 °C, y c) obtener el mismo tipo de información indicada en los dos apartados anteriores en canales de conejos con signos DFD (oscura, firme, seca).

Material y Métodos

La adquisición de canales, el procedimiento de muestreo, la evaluación sensorial, el análisis físico, químico y microbiológico, las canales de conejo DFD estudiadas y el análisis estadístico de los datos generados se detallan en la publicación anexa a este capítulo.

Brevemente, fueron analizados cuatro lotes de canales de conejo (12 canales por cada lote) obtenidos en un matadero. A la llegada al laboratorio (D1) se muestrearon 2 canales y el resto se almacenaron a refrigeración (3 ± 1 °C) para su examen tras 3 (D4), 4 (D5), 5 (D6), 6 (D7) y 7 (D8) días.

De cada canal, según el protocolo descrito en el capítulo 1, un muslo trasero se utilizó para el análisis sensorial y el análisis físico-químico mediante la determinación de pH, ERV y contenido en ácido láctico (isómeros D y L). Con el otro muslo trasero se realizó el análisis microbiológico determinando el recuento de microbiota aerobia mesófila y psicrotrofa, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, bacterias ácido-lácticas, enterobacteriáceas y mohos y levaduras.

Resultados

Vida útil. El promedio de vida útil de las canales de conejo fue estimado en 6.8 días principalmente por la valoración de la apariencia general y el olor, momento en el cual el recuento de la microbiota aerobia mesófila y psicrotrofa, y de *Pseudomonas* spp. fue de aproximadamente $8 \log_{10}$ ufc/g, (figura 2.1). En un muestreo anterior, cuando estas bacterias habían alcanzado aproximadamente $7 \log_{10}$ ufc/g (D5), la mayoría de las canales mostraron cierto ablandamiento y un brillo característico que se relacionó con una ligera humedad superficial. En el D8, todas las canales mostraron una capa limosa claramente visible.

Diferencias “interlotes”. En las canales del día 1 en el lote 1, los recuentos de *Pseudomonas* spp. al igual que los realizados en “agar para recuento en placa” (“plate count agar”, PCA, Oxoid) fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los encontrados en el resto de lotes. Además, los números de levaduras fueron significativamente ($p < 0.05$) más bajos en el lote 2 que en los restantes lotes estudiados. También, los datos de volumen de extracto liberado (ERV) de las canales analizadas en el día 1 en el lote 4 fueron significativamente más bajos ($p < 0.05$) que los obtenidos en los otros lotes. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los recuentos de bacterias ácido-lácticas (BAL) entre cada uno de los lotes en el día 1.

No hubo diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre los lotes para los restantes parámetros analizados.

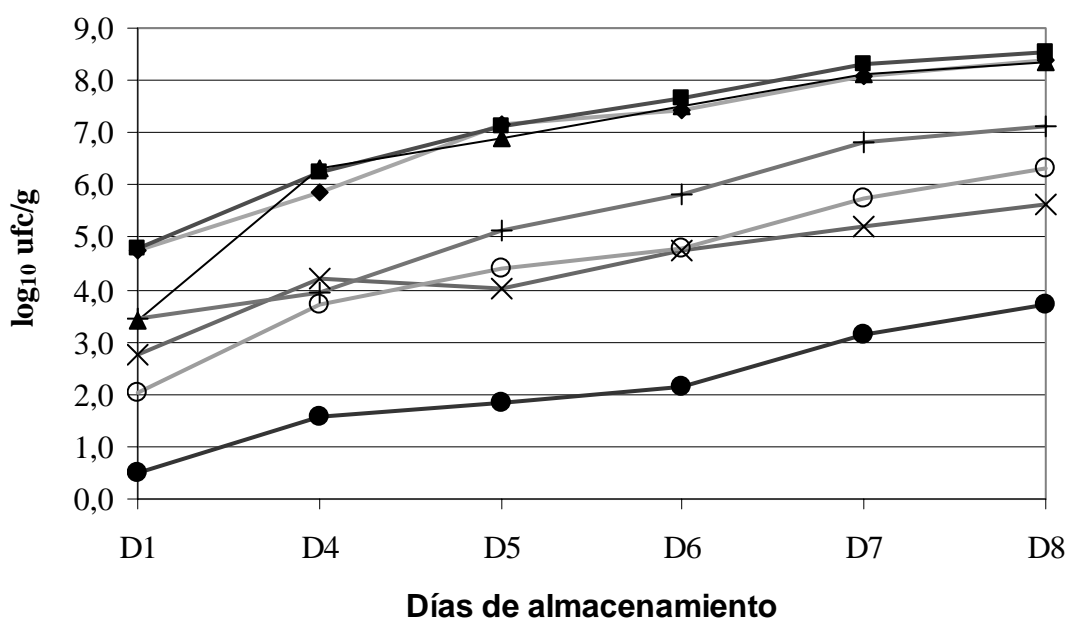
Cambios físicoquímicos. El valor medio de pH_{24} y su desviación estándar en el músculo *Biceps femoris* fue de 6.26 ± 0.20 . Se incrementó hasta 6.49 ± 0.26 (D8) a un ritmo diario de 0.03 ± 0.03 unidades (figura 2.2). Se observaron correlaciones significativas ($r > +0.82$, $p < 0.05$) entre el valor de pH y los recuentos microbianos.

Durante el almacenamiento, el valor de ERV disminuyó desde 13.50 ± 3.50 ml (D1) a 7.76 ± 2.46 ml (D8) a un ritmo diario de -0.68 ± 0.22 ml.

Los resultados medios obtenidos para el nivel de ácido L-láctico en las canales de conejo (la cantidad determinada del isómero D fue inferior al límite de detección de la técnica, $<0.006\%$) estuvieron comprendidos entre $0.70 \pm 0.07\%$ (g/100g muestra) y $0.56 \pm 0.05\%$ en el periodo de tiempo en que la carne fue almacenada.

Cambios microbiológicos. Los cambios de las asociaciones microbianas de la carne de conejo almacenada en aire a 3 ± 1 °C son mostrados en la siguiente figura.

Figura 2.1.- Perfil microbiano de carne de conejo almacenada a 3 ± 1 °C durante 7 días: (■), microbiota aerobia psicrotrofa; (◆), microbiota aerobia mesófila; (▲), *Pseudomonas*; (+), levaduras; (O), *B. thermosphacta*; (x), bacterias ácido-lácticas; (●), *Enterobacteriaceae*. Cada punto representa el valor medio de 8 determinaciones (cuatro lotes, dos muestras por lote).

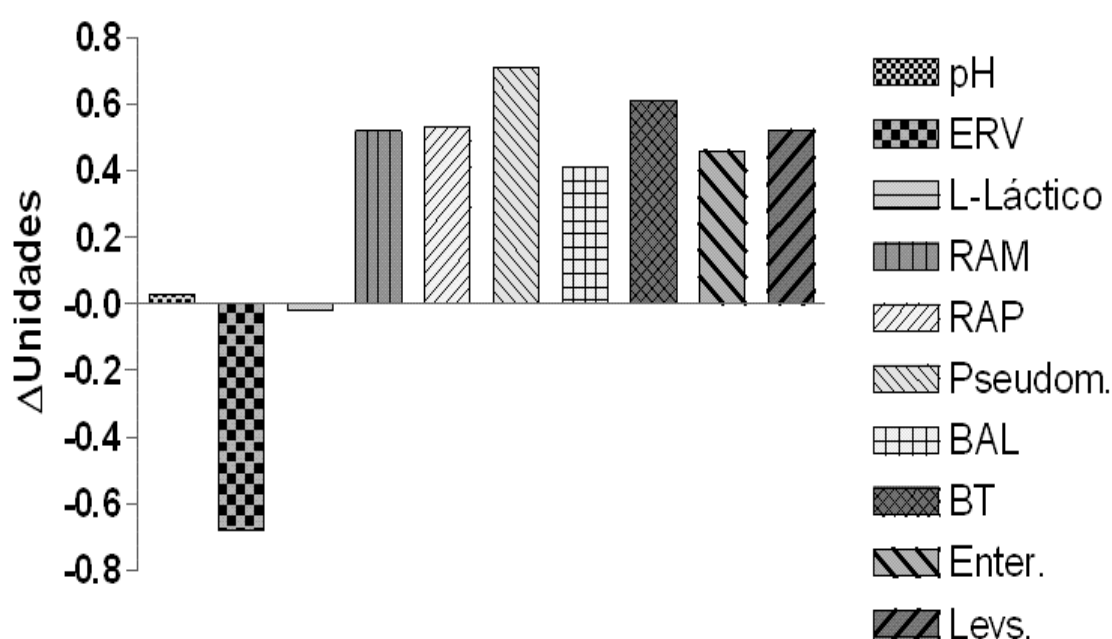


Durante todo el almacenamiento (D1-D8), los niveles de microbiota aerobia mesófila aumentaron en casi 4 unidades logarítmicas por gramo (desde $4.76 \pm 0.31 \log_{10}$ ufc/g a $8.41 \pm 0.32 \log_{10}$ ufc/g) con un incremento medio diario de $0.52 \pm 0.02 \log_{10}$ ufc/g (figura 2.2). Los recuentos de psicrotrofos también se incrementaron en cifras muy similares, coincidiendo incluso en el ritmo medio diario (0.53 ± 0.07). Durante este periodo, los valores encontrados para *Pseudomonas* spp. se incrementaron en $4.95 \log_{10}$ ufc/g, desde $3.39 \pm 1.12 \log_{10}$ ufc/g hasta $8.34 \pm 0.29 \log_{10}$ ufc/g. Entre los aislamientos confirmados de *Pseudomonas* spp., el 75% produjeron pigmentos fluorescentes. *B. thermosphacta* se incrementó en algo más de 4 unidades logarítmicas por gramo, desde $2.01 \pm 0.92 \log_{10}$ ufc/g hasta $6.31 \pm 0.62 \log_{10}$ ufc/g; las levaduras alcanzaron un nivel de $7.13 \pm 0.55 \log_{10}$ ufc/g desde una contaminación en el D1 de $3.46 \pm 0.32 \log_{10}$ ufc/g; las *Enterobacteriaceae* incrementaron su recuento inicial de $0.49 \pm 0.45 \log_{10}$ ufc/g hasta $3.70 \pm 0.66 \log_{10}$ ufc/g y, finalmente, los números de BAL se incrementaron desde $2.76 \pm 0.51 \log_{10}$ ufc/g hasta $5.64 \pm 0.66 \log_{10}$ ufc/g.

Los ritmos diarios de crecimiento de *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, levaduras, *Enterobacteriaceae* y BAL fueron de 0.71 ± 0.12 , 0.61 ± 0.12 , 0.52 ± 0.05 , 0.46 ± 0.08 y $0.41 \pm 0.05 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente (figura 2.2).

Pseudomonas spp. representó el 61.7% de los psicrotrofos totales después de 6 días de almacenamiento (D7). En ese momento, las levaduras y *B. thermosphacta* representaron el 3.1 y 0.3% de los psicrotrofos, respectivamente. En el momento en que las canales presentaban la consideración de extremadamente inaceptables (D8), *Pseudomonas* spp. representaba el 63.1%, las levaduras el 3.9% y *B. thermosphacta* el 0.6% del total de la microbiota psicrotrofa.

Figura 2.2.- Ritmos diarios de variación (incremento de unidades logarítmicas por gramo) de los parámetros físico-químicos y microbiológicos estudiados entre el día inicial (D1) y el último día (D8) de almacenamiento de carne de conejo en aerobiosis y a refrigeración. ERV, volumen de extracto liberado; RAM, microbiota aerobia mesófila; RAP, microbiota aerobia psicrotrofa; Pseudom., *Pseudomonas*; BAL, bacterias ácido-lácticas; BT, *B. thermosphacta*; Enter., *Enterobacteriaceae*; Levs., levaduras.



Canales de conejo DFD. A las 24 h *post-mortem*, el valor medio de pH (6.70) fue significativamente ($p < 0.05$) más alto y el valor medio de ERV (8.75 ml) significativamente ($p < 0.05$) más bajo que los presentados por canales normales (figuras 2.3 y 2.4), con diferencias no significativas ($p > 0.05$) en los recuentos microbianos (tabla 2.1). El lote fue rechazado después de 4 días (D5) de almacenamiento refrigerado debido a su perceptible olor pútrido. En ese momento el pH fue de 6.80 y el ERV de 5.50 ml, ampliamente diferenciados de los obtenidos en las muestras de canales normales en el mismo día de almacenamiento refrigerado (figuras 2.3 y 2.4).

De forma análoga, todos los recuentos microbianos fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores que en las muestras normales (tabla 2.1). Así, los recuentos medios en el D5 de RAM, de RAP y de *Pseudomonas* spp. fueron 8.51, 8.63 y 8.08 \log_{10} ufc/g, respectivamente. Los valores medios de BAL, *B. thermosphacta*, levaduras y *Enterobacteriaceae* en ese momento fueron de 5.93, 6.01 y 2.74 \log_{10} ufc/g, respectivamente. El crecimiento diario de las levaduras fue de 0.56 \log_{10} ufc/g hasta alcanzar 5.50 \log_{10} ufc/g.

Figura 2.3.- Comparación del valor medio de pH de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.

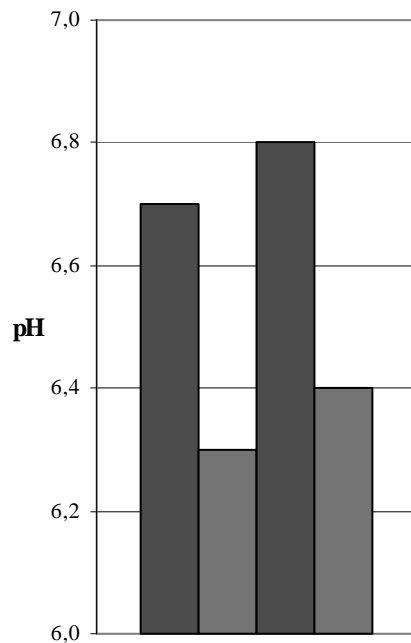


Figura 2.4.- Comparación del ERV de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.

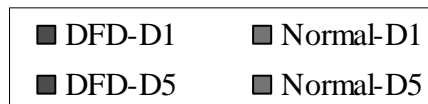
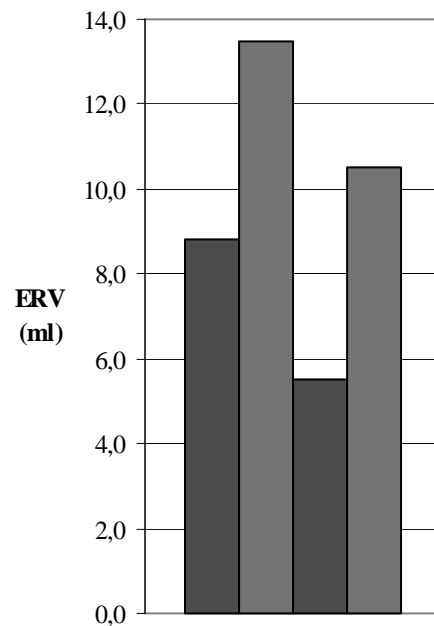


Tabla 2.1.- Recuentos microbiológicos medios (\log_{10} ufc/g) de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.

Tipo de carne de conejo	Día de análisis	RAM	RAP	Pseudom.	BAL	BT	Enter.	Levs.
DFD	D1	4.80	4.71	4.33	2.58	2.70	0.40	2.70
Normal	D1	4.76	4.81	3.39	2.76	2.01	0.49	3.46
DFD	D5	8.51	8.63	8.08	5.93	6.01	2.74	5.50
Normal	D5	7.15	7.11	6.90	4.04	4.39	1.84	5.13

RAM, microbiota aerobia mesófila; RAP, microbiota aerobia psicrotrofa; Pseudom., *Pseudomonas*; BAL, bacterias ácido-lácticas; BT, *B. thermosphacta*; Enter., *Enterobacteriaceae*; Levs., levaduras.

Discusión

El único trabajo publicado sobre la alteración microbiana de canales de conejo es el de Bobbit (2002) en Australia, que estimó una vida útil de sólo 3 días para canales de conejo envasadas y conservadas a 4 °C. Hay que señalar que en ese estudio la microbiota inicial total era aproximadamente una unidad logarítmica superior al nivel encontrado por nosotros (figura 2.1). Es bien conocido que una población inicial alta de microorganismos en la canal reduce significativamente la vida útil de la carne (Gill y col., 1998; ICMSF, 2005) y se demuestra, una vez más, la necesidad de extremar las prácticas higiénicas durante los procesos de carnización y en las manipulaciones previas al envasado y almacenamiento con el fin de conseguir una contaminación inicial lo más baja posible.

A pesar de que el pH final de las canales de conejo depende del tipo de músculo, el valor medio del pH₂₄ fue más alto (6.26±0.20) que el medido por otros investigadores en el músculo *Biceps femoris* de conejo (5.80-5.98; Hulot y Ouhayoun, 1999). Como en otros alimentos proteicos mantenidos a refrigeración y en aerobiosis, el pH de la carne de conejo se incrementó a medida que el almacenamiento progresaba. Esto es principalmente debido a la actividad bacteriana, como parecen reflejar las correlaciones significativas encontradas entre este parámetro y los grupos investigados. Durante la multiplicación, se producen compuestos como amonio, aminas y otras sustancias de reacción básica (Nychas y col., 1998). El valor de ERV, que proporciona una estimación de la calidad microbiológica en carne almacenada en condiciones de aerobiosis (Jay, 1986), descendió en un 32,5 % durante el almacenamiento y se correlacionó significativamente ($p < 0.05$, $r > -0.83$) con el nivel de *Pseudomonas* spp., BAL, *B. thermosphacta* y *Enterobacteriaceae*.

Al contrario, los valores medios obtenidos para el lactato, componente de la carne de bajo peso molecular que pueden utilizar tanto las pseudomonas como otras bacterias después de que la glucosa haya sido completamente metabolizada (Nychas y col., 1998), no se correlacionaron significativamente ($p > 0.05$) con ninguno de los otros parámetros determinados.

La alteración microbiana tanto de la carne roja como la de ave ha sido estudiada exhaustivamente. La microbiota alterante que predomina en la carne almacenada en aerobiosis y a temperaturas de refrigeración es *Pseudomonas* spp., aunque también tiene lugar el crecimiento de otro tipo de bacterias como *B. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* y BAL. En la carne de ave también es *Pseudomonas* spp. el grupo alterante predominante, a pesar de que el alto pH (6.4-6.7) de los muslos facilita el desarrollo de otras bacterias Gram negativas como *Shewanella putrefaciens*, *Serratia liquefaciens*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., etc., que alcanzan niveles que pueden contribuir a la alteración (Dainty y Mackey, 1992; Gill y Penney, 1986; Jackson y col., 2001).

Bobbit (2002) encontró que *Pseudomonas* spp. y *B. thermosphacta* eran los microorganismos alterantes dominantes durante toda la vida útil de canales de conejo envasados y almacenados a temperaturas de refrigeración. Como se expuso en el capítulo 1, tanto estas bacterias como las levaduras fueron los contaminantes predominantes en las canales de conejo 24 h *post-mortem* procedentes de los mataderos. En este estudio, la microbiota presente durante el almacenamiento de las canales de conejo fue también dominada por *Pseudomonas* spp., la mayoría fluorescentes, y en menor medida por levaduras y *B. thermosphacta* (figura 2.1).

El predominio de *Pseudomonas* spp. entre los microorganismos alterantes de alimentos proteicos refrigerados y almacenados en aerobiosis es probablemente debido a

su elevada tasa de crecimiento y a la eficiente utilización de los nutrientes presentes en carne con diferentes valores de pH. Además, se ha demostrado la actividad inhibidora de estas bacterias, especialmente las del grupo fluorescente, frente a la microbiota acompañante y esta propiedad se ha atribuido a que compiten por el hierro y a que producen compuestos antimicrobianos (Dainty y Mackey, 1992; Gram y col., 2002; Nychas y col., 1998). En este sentido, varios autores han observado que *P. fluorescens* puede inhibir el crecimiento de *S. putrefaciens* debido a que es capaz de producir sideróforos (Gram, 1993; Gram y col., 2002; Gram y Melchiorson, 1996). La rápida transformación de la glucosa en otro sustrato mucho menos utilizable, el gluconato, se considera otra ventaja competitiva de *Pseudomonas* spp. Además, las pseudomonas alterantes, que no se ven afectadas por el pH normal de la carne, pueden metabolizar eficazmente diversos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Gill, 1982; Nychas y col., 1988; Nychas y col., 1998).

Se considera que las levaduras psicrotrofas son incapaces de competir con las bacterias debido a que presentan bajos ritmos de crecimiento (Dillon, 1998). Sin embargo, el crecimiento de las levaduras sobre las canales refrigeradas de conejo se produce a un ritmo medio diario superior al de las enterobacterias y BAL. Tanto este hecho como su nivel inicial las convierten en el segundo grupo microbiano alterante. En algunos estudios en carne de ave, la población inicial de levaduras se incrementó significativamente durante el almacenamiento a refrigeración (Gallo y col., 1988; Hinton-A. y col., 2002; Ismail y col., 2000). Los investigadores citados concluyeron que la contribución de las levaduras a la alteración microbiana de la carne de ave cruda no es clara pero sugirieron que la actividad metabólica de algunas especies de levaduras podría potenciar el ritmo de alteración al permitir que algunos nutrientes estuvieran más disponibles para las bacterias.

Se debe tener en cuenta que la biomasa de 10^6 levaduras/cm² es equivalente a la de 10^8 bacterias/cm², el nivel asociado con la alteración en carne a refrigeración (Dillon, 1998).

B. thermosphacta tiene un gran potencial alterante y puede ser importante tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas si el ecosistema de la carne es propicio para su crecimiento. Su capacidad para crecer a bajas temperaturas y a baja actividad de agua favorece su proliferación (Skovgaard, 1985). Como esta bacteria precisa valores de pH superiores a 5.8, parece probable que el pH inicial de las canales de conejo influyera en el comportamiento de *B. thermosphacta* que, al final del almacenamiento, mostró un incremento de 4.30 unidades logarítmicas por gramo, a un ritmo superior al de las levaduras, *Enterobacteriaceae* y BAL. La gran población de *B. thermosphacta* en carne de cordero y porcino se ha atribuido a la capa de grasa cuyo pH es superior al del músculo, creciendo también mejor en carne con un pH alto (Dainty y Mackey, 1992; Nychas y col., 1998).

La denominada “DFD” es una condición por la que la carne de los animales sacrificados es claramente más oscura y seca que la normal y, además, presenta una textura más firme. La carne DFD, que se asocia al estrés previo al sacrificio, es frecuente en ganado vacuno y ovino y aparece en algunas ocasiones en cerdos y pavos, pero raramente sucede en conejos. Los datos aportados por Tantiñá y col. (2000) muestran la ausencia de esta condición entre más de 439000 canales obtenidas en Italia y España. En nuestro estudio, tanto las canales de conejo normales como las DFD tuvieron valores de pH a las 24 h *post-mortem* superiores a 6.0 y parece que no existen diferencias entre los recuentos microbianos iniciales. Sin embargo, las canales de conejo DFD se alteraron y desarrollaron olores pútridos en una fase temprana del almacenamiento. Este hecho coincide con lo observado en carne de vacuno DFD y se ha asociado con la utilización, en fases iniciales, de los aminoácidos de los músculos que presentan bajo contenido en glucosa. Como

consecuencia de esta utilización, los fenómenos asociados a la alteración se manifiestan con niveles bajos de microorganismos (Gill, 1982).

Se puede concluir que durante el almacenamiento a refrigeración en presencia de oxígeno los principales microorganismos que se desarrollan en canales de conejo normales, que habitualmente tienen valores de pH (músculo *Biceps femoris*) superiores a los que presentan las canales de otras especies de abasto, son *Pseudomonas* spp. y en menor medida levaduras y *B. thermosphacta*. Como ocurre con otras carnes DFD, las canales de conejo DFD presentaron un pH más alto, menor ERV y se alteraron más rápidamente que las canales normales.



Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat

José M. Rodríguez-Calleja, María-Luisa García-López*, Jesús A. Santos, Andrés Otero

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071-León, Spain

Received 8 August 2004; received in revised form 4 January 2005; accepted 20 January 2005

Abstract

Even though worldwide production of rabbit meat is over 1,000,000 ton, little information is available on rabbit meat microbiology. This paper reports on the microflora developing on chill-stored rabbit carcasses. Four different lots of 24 h *post-mortem* rabbit carcasses dressed and kept at 0 °C in a medium-size abattoir were collected and evaluated for sensory, physicochemical and microbiological changes during aerobic storage at 3 ± 1 °C. Mean initial pH value (pH_{24}), extract-release volume (ERV) and lactate content of *Biceps femoris* muscle, were 6.26 ± 0.20 , 13.50 ± 3.50 ml and $0.70 \pm 0.07\%$, respectively. As with other muscle foods kept chilled in air, pH increased and ERV and lactate decreased as storage progressed. Initial levels (log cfu/g) of aerobes (APC), psychrotrophic flora, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and yeasts were 4.76 ± 0.31 , 4.81 ± 0.81 , 3.39 ± 1.12 , 2.01 ± 0.92 , 2.76 ± 0.51 , 0.49 ± 0.45 and 3.46 ± 0.32 , respectively. Pseudomonads, most of them fluorescent, and to a lesser extent *B. thermosphacta* and yeasts grew faster than the remaining microorganisms and became predominant at the end of the shelf life. Carcasses spoiled when mean APC, psychrotrophic and pseudomonads numbers were ca. 8 log cfu/g, their mean shelf life being estimated at 6.8 days. A lot of DFD-like rabbit carcasses, with higher pH and lower ERV values but similar microbial loads to normal meat, developed a strong putrid odour after 4 days.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Normal and DFD rabbit meat; Microbial spoilage; Physicochemical characteristics

1. Introduction

As in other Mediterranean countries, rabbit meat is a common item in the Spanish diet. Global rabbit meat production is currently estimated at more than 1,000,000 ton per year. According to FAOSTAT data (2004), China (425,000 ton) is the world's leading producer followed by Italy (220,000 ton), Spain (115,000 ton) and France (85,200 ton). Although, much information is available on rabbit carcasses composition and factors influencing nutritional and sensory traits, data on the microbiology of rabbit meat are very scarce and limited to a few papers (Badr, 2004; Bobbitt, 2002,

2003; Cabanes, Ouhayoun, & Gilbert, 1994; Khalafalla, 1993; Perez-Chabela, Rodriguez-Serrano, Lara, & Guerrero, 1999; Rodríguez-Calleja, Santos, Otero, & García-López, 2004).

Studies on meat spoilage have been concerned largely with the processes occurring in red meat and poultry. At low temperatures in air, meat spoilage is mainly the result of the activity of motile and non-motile Gram-negative, psychrotrophic, aerobic rods dominated by *Pseudomonas* spp. Other organisms, including *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB) and cold tolerant *Enterobacteriaceae* are also capable of multiplication but they usually account for a small proportion of the total flora (Dainty & Mackey, 1992; García-López, Prieto, & Otero, 1998).

Previous work (Rodríguez-Calleja et al., 2004) showed that, at 24 h *post-mortem*, the mean pH of rabbit

* Corresponding author. Tel.: +34 987 291119; fax: +34 987 291284.
E-mail address: dhtmg1@unileon.es (M.-L. García-López).

carcasses was ca. 6, which is higher than that in many red meat species. It was also observed that Gram-positive bacteria and yeasts were significant components of displayed rabbit meat flora. The aim of this study was to obtain information on the flora developing on chilled rabbit meat carcasses stored in air.

2. Materials and methods

2.1. Collection of carcasses

Over a period of four months (December to March), four lots (lots 1–4) of rabbit carcasses were obtained from a medium-size abattoir with structure, layout, maintenance, and operational hygiene in compliance with European Union (EU) legislation (Anon, 1991). Each lot consisted of 12 carcasses from a single consignment of New Zealand white rabbits from the same flock and owner and processed at the same time. After arrival to the processing plant, rabbits were removed one by one from the transport crates, stunned by electronarcosis (140 mA, 100 V), immediately hung by the hind legs at the processing line and quickly bled by cutting the jugular veins and carotid arteries. After bleeding, forefeet and skin were removed, and while still hanging, the carcasses were opened to remove viscera. Head, liver, kidneys and thoracic organs remained with the carcasses, which were washed with chlorinated water to eliminate hair and any other soil or debris. Carcasses were then air chilled, overwrapped with oxygen-permeable film and stored in plastic boxes at 0 °C. After 24 h storage, carcasses were chilled transported to the laboratory.

2.2. Sampling procedure

Upon arrival to the laboratory (<2 h) on day 1 (D1), two carcasses were sampled, the remaining being stored at 3 ± 1 °C and examined after 3 (D4), 4 (D5), 5 (D6), 6 (D7) and 7 (D8) days. For microbiological analysis, on each sampling occasion, one hind leg from each one of two whole carcasses was aseptically removed and placed in sterile Stomacher bags containing enough 0.1 % (w/v) peptone solution to make a 1:5 dilution. Samples were rinsed by shaking solution vigorously for 30 s and the resultant was used for testing after serial dilution (Barnes & Impey, 1973). The other hind legs were used for physicochemical and sensory analysis.

2.3. Sensory evaluation

Each sampling day, carcasses were evaluated for both appearance and odour acceptability by a trained panel of five people. Appearance was assessed using a struc-

tured hedonic scale with numerical scores from 7 (excellent) to 1 (extremely undesirable). A mean value of 3.5 was considered the borderline of acceptability. Odour acceptability was evaluated using a 3-point scale (1, off-odour; 2, neutral; 3, normal). A mean value of 1.5 was considered the borderline of acceptability. Shelf life was arbitrarily defined as the time in days to reach mean values of 3.5 and 1.5 on the appearance and odour scales, respectively (Greer & Murray, 1988; Land & Shepherd, 1988).

2.4. Physicochemical analysis

pH values were measured in the *Biceps femoris* muscle, by means of a Crison pH/mV506 pH meter (Crison, Barcelona, Spain) with a penetration glass electrode (Ouhayoun & Dalle Zotte, 1996). Determination of pH was also done in meat homogenates (10 g muscle/10 ml distilled water) with a micropH 2001 pH meter fitted with a combined glass electrode (Crison). Extract-release volume (ERV) was measured as described by Kirk and Sawyer (1991). The configuration and amount of lactic acid in hind legs were determined enzymatically by using D-lactate and L-lactate dehydrogenase kits (Catalogue No. 1112821, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

2.5. Microbiological analysis

Tenfold dilutions were spread plated (two plates per dilution and incubation temperature) onto plate count agar (PCA; Oxoid; Basingstoke, UK), and incubated at 30 °C (aerobic plate counts, APC) or 4.5 °C (psychrotrophic counts) for 2 or 14 days, respectively (Harrigan, 1998). Pseudomonads numbers were determined, after 2 days incubation at 25 °C, on *Pseudomonas* agar base (Oxoid) to which CFC (cetrimide, fucidin, cephaloridine; Oxoid) supplement was added. From each set of countable plates, five colonies were randomly selected, streaked to purity on tryptone soy agar (TSA, Oxoid) and examined for Gram-reaction, cell morphology, motility, oxidase and catalase reactions, anaerobic growth and production of fluorescent pigments (García-López, Otero, García-López, & Santos, 2004). *B. thermosphacta* was enumerated on streptomycin sulphate cycloheximide thallos acetate agar (STAA, Oxoid), checking for oxidase negative colonies. LAB were counted using overlaid plates of MRS agar (Oxoid) incubated at 35 °C for 5 days. Confirmatory presumptive tests for LAB were performed as described by González, Encinas, García-López, and Otero (2000). *Enterobacteriaceae* counts were determined on overlaid plates of violet-red bile glucose agar (VRBGA; Oxoid) after incubation at 37 °C for 24 h. Fungi were enumerated on oxytetracycline glucose yeast extract agar (OGYEA, Oxoid) plates

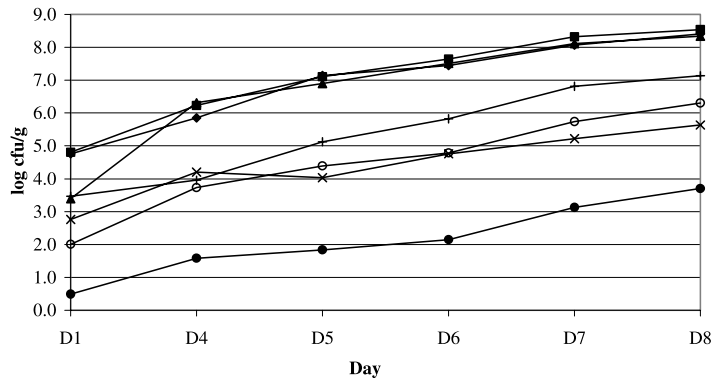


Fig. 1. Microbial profile of rabbit meat held at 3 ± 1 °C for 7 days: (■), psychrotrophic counts; (◆), aerobic plate counts; (▲), pseudomonads counts; (+), yeasts; (○), *Brochothrix thermosphacta* counts; (×), lactic acid bacteria; (●), *Enterobacteriaceae* counts. Each point is a mean value of 8 determinations (four lots, two samples per lot).

incubated at 25 °C for 5 days. Differentiation between yeasts and moulds was made according to Harrigan (1998).

2.6. DFD-like rabbit carcasses

A lot of dark, firm and dry (DFD) rabbit carcasses obtained and processed in similar conditions was also included in this study.

2.7. Statistical analysis

The number of microorganisms/ml rinse water were transformed and expressed as log cfu/g. Physicochemical and microbiological data were statistically analysed (means, standard deviation, variance, correlation coefficients and *t*-student's test of mean values) using the Statistica for Windows Release 5.5 software (Statsoft, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Freshly dressed rabbit carcasses. "Inter" lots differences

D1 carcasses in lot 1, had APC, psychrotrophic and pseudomonads counts significantly lower ($p < 0.05$) than those found in the remaining lots. Yeasts numbers were significantly lower ($p < 0.05$) in lot 2 than in the other three studied ones. Also the ERV data of D1 carcasses in lot 4 were significantly lower ($p < 0.05$) than those obtained in the other lots. On the other hand, significant differences ($p < 0.05$) were found in LAB counts between each one of the lots on D1.

There were no statistical differences ($p > 0.05$) between the lots for the remaining analysed parameters.

3.2. Shelf life

For both, appearance and odour, the average shelf life of rabbit carcasses was estimated to be 6.8 days when mean APC, psychrotrophic and pseudomonads numbers were ca. 8 log cfu/g (Fig. 1). Earlier, when these bacteria had risen to ca. 7 log cfu/g (D5), most carcasses showed some softening and a characteristic bright surface related to slight wetness. On D8, all carcasses exhibited a visible slime layer.

The only available study on rabbit carcasses shelf life is that of Bobbitt (2002), who estimated a shelf life of 3 days at 4 °C for boxed rabbit carcasses with a mean initial APC ca. 1 log unit higher than that found by us (Fig. 1). A high initial population of microorganisms on meat significantly reduces product shelf life (Gill, McGinnis, & Bryant, 1998; ICMSF, 1998).

3.3. Physicochemical changes

The mean pH₂₄ value \pm standard deviation of *B. femoris* muscle was 6.26 ± 0.20 . Then it increased up to 6.49 ± 0.26 (D8) at a daily rate of 0.03 ± 0.03 units. Significant correlations ($r > +0.82$, $p < 0.05$) were observed between pH values and rabbit legs microbial counts. Although, the ultimate pH of rabbit carcasses depends on muscle type, pH₂₄ was higher than that previously reported for rabbit *B. femoris* (5.80–5.98) (Hulot & Ouhayoun, 1999). As with other muscle foods kept chilled in air, rabbit meat pH increased as storage progressed. This is mainly due to the bacterial activity that results in the production of ammonia, amines and other basic substances (Nychas, Drosinos, & Board, 1998).

During storage, average ERV decreased from 13.50 ± 3.50 ml (D1) to 7.75 ± 2.46 ml (D8) at a mean daily rate of -0.68 ± 0.22 ml. ERV, which can provide a rough estimate of the microbiological quality in

aerobically stored meat (Jay, 1986), was significantly correlated ($r > -0.83$, $p < 0.05$) with numbers of pseudomonads, LAB, *B. thermosphacta* and *Enterobacteriaceae*.

Lactate, predominantly the L-isomer, is a low-molecular weight meat component utilized by *Pseudomonas* spp. and other bacteria after glucose depletion (Nychas et al., 1998). In this study, mean L-lactic acid level dropped from $0.70 \pm 0.07\%$ to $0.56 \pm 0.05\%$ during storage of rabbit carcasses, but it was not significantly correlated with any trait investigated.

3.4. Microbiological changes

Changes of the microbial associations with rabbit meat stored in air at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ are shown in Fig. 1. Among *Pseudomonas* spp. confirmed isolates, 75% produced fluorescent pigments. The daily growth rates for pseudomonads, *B. thermosphacta*, yeasts, *Enterobacteriaceae* and LAB were 0.71 ± 0.12 , 0.61 ± 0.12 , 0.52 ± 0.05 , 0.46 ± 0.08 and 0.41 ± 0.05 log cfu/g, respectively. *Pseudomonas* spp. accounted for 61.7% of the total psychrotrophic numbers at the end of the storage life (D7). At this time, yeasts and *B. thermosphacta*, accounted for 3.1% and 0.3% of psychrotrophic numbers, respectively. When carcasses were extremely unacceptable (D8), *Pseudomonas* spp. accounted for 63.1%, yeasts for 3.9% and *B. thermosphacta* for 0.6% of the total psychrotrophic flora.

Pseudomonas spp. and *B. thermosphacta* were the dominant microorganisms found by Bobbitt (2002) throughout the shelf life of refrigerated boxed rabbit carcasses. These bacteria and yeasts were the predominant contaminants on 24 h *post-mortem* rabbit carcasses obtained at two different abattoirs (Rodríguez-Calleja et al., 2004). In displayed hind legs and whole carcasses, pseudomonads followed by yeasts, *B. thermosphacta* or LAB dominated the microflora (Rodríguez-Calleja et al., 2004). In this study, the storage flora of rabbit carcasses was also dominated by pseudomonads, most of them fluorescent strains, and to a lesser extent by yeasts and *B. thermosphacta*.

As with other meat animals, it is possible that pseudomonads on freshly dressed rabbit carcasses originated in the live-animal environment and were brought into the abattoir on the hair, skin and feet. Transfer occurs during dressing and further contamination from processing activities and environment is not unlikely since their psychrotrophic nature and simple nutritional requirements enable them to multiply on any wet surface in the plant (García-López et al., 1998). There are several reasons for the high prevalence of *Pseudomonas* spp. among the storage flora of raw meat and other muscle foods held in air at chill temperatures. Although it has been suggested that the role of glucose in meat spoilage may have been overemphasized (Molin, 1985), dominance of *Pseudomonas* over other microorganisms on raw proteinaceous

foods has been associated with their faster growth rates and/or their greater affinity for oxygen, which result in enhanced catabolism of glucose and lactate. Rapid conversion of glucose to the less commonly used substrate, gluconate, is considered a competitive advantage for these bacteria. In addition, spoiling pseudomonads, which are unaffected by the pH over the range found in meat, are able to utilize low-molecular weight nitrogen compounds (Gill, 1982; Nychas, Dillon, & Board, 1988, 1998). Although the predominance of pseudomonads has been associated with their ability to utilize meat constituents rather than to direct interaction with other food microorganisms, it has been shown that *Pseudomonas* spp., especially those of the fluorescent group, produce a range of antimicrobial compounds and, at the same time, they compete very efficiently for iron. It has been reported that *P. fluorescens* can inhibit the growth of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens* due to the ability of the former to produce siderophores (Gram, 1993; Gram & Melchiorson, 1996; Gram et al., 2002).

The established route of yeast contamination from the field and farm via the animal to the resultant carcass has been demonstrated. Psychrotrophic yeasts are considered unable to compete with bacteria because of their slower growth rates (Dillon, 1988). However, yeast growth occurred on refrigerated rabbit carcasses at a daily mean rate higher than those of *Enterobacteriaceae* and LAB. This and their initial numbers enabled them to become the second most important microbial group. In a number of studies on poultry meat, initial yeast populations increased significantly during chilled storage (Gallo, Schmitt, & Schmidtlörenz, 1988; Hinton, Cason, & Ingram, 2002; Ismail, Deak, Abd El-Rahman, Yassien, & Beuchat, 2000). The latter authors concluded that the contribution of yeasts to microbial spoilage of raw poultry is not clearly defined, but suggested that the metabolic activity of some yeast species may enhance the rate of spoilage by making nutrients more readily available to bacteria. It should be also noted that 6 log yeasts/cm² is equivalent to the biomass of 8 log bacteria/cm², the level associated with spoilage in chilled meat (Dillon, 1988).

Available information indicates that *B. thermosphacta*, which is common to the meat habitat, originates in soil and faeces and is introduced into slaughterhouses from these sources. Its ability to grow at low temperatures and at low water activity favours the subsequent proliferation (Skovgaard, 1985). In rabbit hind legs, mean initial levels (2.01 ± 0.92 log cfu/g) increased by 4.30 log units per gram at a faster rate than those of yeasts, *Enterobacteriaceae* and LAB. *B. thermosphacta* has greater spoilage potential than other Gram-positive bacteria. This bacterium can be important in the spoilage of modified atmosphere packaged muscle foods and also occur in vacuum-packed meat and meat stored in normal atmosphere. In aerobic conditions, it may have

some importance on pork and lamb, particularly on fat tissue apparently because fat has a higher pH than normal muscle (Dainty & Mackey, 1992; Nychas et al., 1998).

3.5. DFD-like rabbit carcasses

At 24 h *post-mortem*, the mean pH (6.70) was significantly ($p < 0.05$) higher and the mean ERV (8.75 ml) significantly ($p < 0.05$) lower than those of normal carcasses, with non significant differences ($p > 0.05$) in microbial counts. The lot was rejected after 4 days of chilled storage because of marked putrid odour. At spoilage time, pH was 6.80, ERV was 5.50 ml, and mean APC, psychrotrophic and pseudomonads counts were 6.34, 7.60 and 6.59 logcfu/g, respectively. Mean numbers of LAB, *B. thermosphacta*, yeasts and *Enterobacteriaceae* were 4.14, 4.52, 3.39 and 1.17 log cfu/g, respectively.

DFD is a quality condition in which the musculature of freshly killed animals is appreciably darker and drier than normal and has a much firmer texture. DFD meat, which is associated to pre-slaughter stress, is most common in cattle or sheep and sometimes pigs and turkeys, but apparently rarely occurs in rabbit. Data collected by Tantiñá, Rosell, and Facchin (2000) show the absence of this condition among 439,094 carcasses obtained in Italy and Spain. In this study, both normal and DFD-like rabbit carcasses had 24 h *post-mortem* pH values higher than 6 and there appear to be no important differences in the microbial counts. However, DFD-like rabbit carcasses spoiled and developed putrid odours at an earlier stage. This observation is similar to that reported for DFD beef and has been attributed to early bacterial use of aminoacids in glucose deficient muscles. As spoilage odours and flavours are the result of amino acid degradation, they become detectable at lower cell densities (Gill, 1982).

In conclusion, the main microorganisms involved in the spoilage of normal rabbit carcasses, which had pH values higher than those of many red meat animals, are pseudomonads and to a lesser extent yeasts and *B. thermosphacta*. As with other DFD-meats, DFD-like rabbit carcasses had higher pH, lower ERV and spoiled more rapidly than normal meat.

Acknowledgement

Mr. Rodríguez-Calleja is beneficiary of a grant from the Spanish MCYT (Project No. AGL-2000 1159).

References

Anon. (1991). Council Directive 91/495/EEC of 27 November 1990 concerning public health and animal health problems affecting the

- production and placing on the market of rabbit meat and farmed game meat. *Official Journal of The European Communities*, L228, 24/09/1991, 41–55.
- Badr, H. M. (2004). Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Science*, 67(4), 541–548.
- Barnes, E. M., & Impey, C. S. (1973). The sampling of chickens, turkeys, ducks and game birds. In R. G. Board & D. W. Lovelock (Eds.), *Sampling microbiological monitoring of environments* (pp. 63–76). London: Academic Press.
- Bobbitt, J. (2002). Self life and microbiological safety of selected new and emerging meats destined for export markets. Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. 02–038.
- Bobbitt, J. (2003). Buffalo, Camel, Crocodile, Emu, Kangaroo, Ostrich and Rabbit Meat. New value added products. Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. 03–036.
- Cabanes, R. A., Ouhayoun, J., & Gilbert, S. (1994). Qualité de la viande de lapin. Influence de trois modes de conservation sur l'évolution des propriétés microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles. *Viandes et Produits Carnes*, 15, 175–178.
- Dainty, R. H., & Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology, Symposium Suppl.* 21, 103S–114S.
- Dillon, V. M. (1988). Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In A. Davies & R. G. Board (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 85–117). London: Blackie Academic and Professional.
- Gallo, L., Schmitt, R. E., & Schmidlorenz, W. (1988). Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. 1. Bacterial-flora and growth during storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 21(4), 216–223.
- García-López, L., Otero, A., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2004). Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 878–886.
- García-López, M. L., Prieto, M., & Otero, A. (1998). The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In A. Davies & R. G. Board (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 1–34). London: Blackie Academic and Professional.
- Gill, C. O. (1982). Microbial interaction with meats. In M. H. Brown (Ed.), *Meat microbiology* (pp. 225–264). London: Applied Science Publishers Ltd.
- Gill, C. O., McGinnis, J. C., & Bryant, J. (1998). Microbial contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. *International Journal of Food Microbiology*, 42(3), 175–184.
- González, C. J., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17(4), 383–391.
- Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2197–2203.
- Gram, L., & Melchiorsen, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(6), 589–595.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), 79–97.
- Greer, G. G., & Murray, A. C. (1988). Effects of pork muscle quality on bacterial growth and retail case life. *Meat Science*, 24(1), 61–71.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* (3rd ed.). London: Academic Press.
- Hinton, A., Jr., Cason, J. A., & Ingram, K. D. (2002). Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry process-

- ing and spoilage of refrigerated broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 65(6), 993–998.
- Hulot, F., & Ouhayoun, J. (1999). Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 7, 15–36.
- ICMSF (1998). *International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. London: Blackie Academic and Professional.
- Ismail, S. A. S., Deak, T., Abd El-Rahman, H. A., Yassien, M. A. M., & Beuchat, L. R. (2000). Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 113–121.
- Jay, J. M. (1986). Microbial spoilage indicators and metabolites. In M. D. Pierson & N. J. Stern (Eds.), *Foodborne microorganisms and their toxins: Developing methodology* (pp. 219–240). New York: Marcel Dekker Inc.
- Khalafalla, F. A. (1993). Microbiological status of rabbit carcasses in Egypt. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A – Food Research and Technology*, 196, 233–235.
- Land, D. G., & Shepherd, R. (1988). Scaling and ranking methods. In J. R. Piggot (Ed.), *Sensory analysis of foods* (2nd ed., pp. 155–185). London: Elsevier Applied Science.
- Molin, G. (1985). Mixed carbon source utilization of meat-spoiling *Pseudomonas fragi* 72 in relation to oxygen limitation and carbon dioxide inhibition. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1442–1447.
- Nychas, G. J., Dillon, V. M., & Board, R. G. (1988). Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10(3), 203–231.
- Nychas, G.-J. E., Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. In A. Davies & R. Board (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 288–326). London: Blackie Academic and Professional.
- Ouhayoun, J., & Dalle Zotte, A. (1996). Harmonization of muscle and meat criteria in rabbit meat research. *World Rabbit Science*, 4, 211–218.
- Perez-Chabela, M. L., Rodríguez-Serrano, G. M., Lara, C. P., & Guerrero, I. (1999). Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat Science*, 51, 279–282.
- Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2004). Microbiological quality of rabbit meat. *Journal of Food Protection*, 67(5), 966–971.
- Skovgaard, N. (1985). *Brochothrix thermosphacta* – comments on its taxonomy, ecology and isolation. *International Journal of Food Microbiology*, 2(1–2), 71–79.
- Tantiñá, M., Rosell, J. M., & Facchin, E. (2000). Salud pública. In J. M. Rosell (Ed.), *Enfermedades del conejo* (pp. 465–514). Madrid: Mundi-Prensa.

CAPÍTULO 3.-

INCIDENCIA E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS EN CARNE DE CONEJO ALMACENADA A REFRIGERACIÓN



- Introducción_____ 69
- Material y Métodos_____ 80
- Resultados_____ 85
- Discusión_____ 89
- *Artículo original:* “Rabbit Meat as a Source of Bacterial Foodborne Pathogens”_____ 94a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col.* 2006. Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. "Journal of Food Protection", 69(4):000–000. Artículo en prensa.

Introducción

La bibliografía disponible acerca de la incidencia en carne de conejo de bacterias patógenas de transmisión alimentaria es escasa, probablemente porque se considera un alimento seguro al no haberse declarado hasta ahora ningún brote de intoxicación o infección alimentaria relacionado con este producto (Dalle Zotte, 2002). Sin embargo, las canales de conejo se obtienen, procesan y almacenan de forma similar a las de otras especies de abasto y de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (UE) (Anónimo, 2004a; Anónimo, 2004b). Tanto las canales como sus cortes deben de ser obtenidos en establecimientos que cumplan condiciones idénticas a las exigidas para la carne de pollo. Es evidente que, al igual que en otros tipos de carnes, la carne de conejo puede estar contaminada con organismos patógenos procedentes de diferentes orígenes (piel, contenido intestinal, heces, ambiente del matadero, manipuladores, utensilios, superficies y ambiente donde se realicen los procesos de corte y envasado, y de manipulación en el nivel de venta al consumidor).

Entre los riesgos microbiológicos más importantes asociados al consumo de carne se encuentran los asociados a ciertas bacterias patógenas que proceden de los propios animales (por ejemplo, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* O157:H7), bacterias patógenas procedentes del entorno que se introducen en la cadena alimentaria a partir de cualquier contaminación ambiental (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* y algunas especies de aeromonas móviles) y bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* que llegan a la carne principalmente vía manipuladores, aunque

esta bacteria puede colonizar determinadas zonas de los equipos de procesado y también se asocia con algunas enfermedades de los conejos, como abscesos subcutáneos, mastitis y pododermatitis (Borch y col., 1996b; Rosell, 2000b).

Los miembros del género *Salmonella* (familia *Enterobacteriaceae*) se encuentran entre los principales agentes de infecciones alimentarias en los países desarrollados, siendo *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis las dos serovariedades implicadas con mayor frecuencia en brotes y casos de infección alimentaria. Basándose en sus antígenos O, H y K, actualmente se han identificado aproximadamente 2300 serovares diferentes de *Salmonella*.

Salmonella spp. puede colonizar el intestino humano y producir un cuadro de gastroenteritis típico que en ocasiones deriva en procesos extraintestinales. Su principal reservorio es el contenido intestinal del hombre, sobre todo *Salmonella* Typhi y *Samonella* Paratyphi, y de los animales, siendo el agua contaminada, los alimentos de origen animal y los manipuladores las principales fuentes de contaminación (Andrews y col., 2001). En los animales de abasto, destacan las aves como principal reservorio, y en los últimos años se ha constatado una colonización importante de *Salmonella* Enteritidis. Otras especies (porcino, rumiantes) también son portadores de *Salmonella*, adquiridas a partir de fuentes de contaminación como heces, agua, animales enfermos y asintomáticos, y piensos contaminados. Otros productos, como los de la acuicultura y las frutas y verduras, se están identificando actualmente como importantes vehículos de *Salmonella*.

Entre los mecanismos de virulencia es típica la respuesta inflamatoria, aunque también otros factores contribuyen a la patogenicidad como la producción de sideróforos, la movilidad, la producción de toxinas (enterotoxina, endotoxina y citotoxina) y la presencia de un plásmido. Existen varios genes implicados en la invasión de las células epiteliales, tanto plasmídicos como cromosómicos.

Salmonella spp. suele ser el principal agente de infecciones e intoxicaciones alimentarias en los países desarrollados. En España se declaran anualmente cerca de 10000 casos de patología gastrointestinal causados por esta bacteria (102 casos notificados de fiebre tifoidea y paratifoidea) (Anónimo, 2005a).

Yersinia enterocolitica es un bacilo psicrotrofo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que produce gastroenteritis además de estar involucrado en procesos supurativos y autoinmunes. Es una especie que suele subdividirse tanto por sus características bioquímicas como por sus antígenos O. Se describen las biovariedades 1A, 1B, 2, 3, 4 y 5. Al biovar 1A pertenecen la mayoría de las cepas medioambientales. Desde el punto de vista serológico, las cepas de esta especie se agrupan en función de sus antígenos somáticos, si bien en la práctica se consideran sólo 18 serovariedades de *Y. enterocolitica*. También se han identificado 18 antígenos H. Los serogrupos potencialmente patógenos son: O:3 (la mayoría pertenecen a la biovariedad 4), O:8, O:9, O:5,27, y O:4,32. Estos serogrupos parecen tener una distribución de acuerdo con nichos geográficos. En Europa predominan las serovariedades O:3 y O:9.

Se puede aislar a partir de diferentes orígenes: de varias especies animales, del medio ambiente y de los alimentos aunque en la mayoría de los casos los serovares y biovares no son los que afectan al hombre o las cepas carecen de muchos de los factores de virulencia. El principal reservorio de las cepas patógenas de esta bacteria es el cerdo, portador de *Y. enterocolitica* biovar 4, serovar O:3 y también de los serovares O:9 y O:5,27. Se aísla en cualquier parte del mundo pero con mayor frecuencia los procesos infecciosos ocurren en los climas fríos. De hecho, la incidencia de brotes y casos es más elevada en el norte de Europa y Japón, incrementándose en otoño e invierno. Por esta amplia distribución y sus características, la incidencia de las infecciones por *Y. enterocolitica* parece baja, si bien en España ocupó la quinta posición en número de casos

de procesos gastroentéricos declarados al Sistema de Información Microbiológica en el año 2004 (Anónimo, 2005a). Los alimentos principalmente involucrados en brotes han sido: leche cruda, leche chocolateada pasteurizada, brotes de judías, tofu (derivado de la soja), leche pasteurizada y platos con vísceras de cerdo. El agua sin higienizar también ha ocasionado casos y brotes bien directamente o al utilizarla para el lavado y la preparación de alimentos (World Health Organization, 1976).

Sus determinantes de virulencia la convierten en una bacteria patógena entérica invasiva. Sus mecanismos de virulencia son complejos, múltiples y codificados por genes cromosómicos (entre otros, *inv*, *ail*, *yst*) y plasmídicos (plásmido de 70-75 kb, denominado pYV) (Robins-Browne, 2001).

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que, por la gravedad de los síndromes ocasionados y su baja dosis infectiva, se considera entre los agentes de infecciones alimentarias más preocupantes. En general, *E. coli* es uno de los microorganismos mejor conocidos aunque constituye una especie muy compleja, con una gran variabilidad entre las distintas cepas. El método basado en el esquema antigénico de Kauffmann (2005) se suele emplear para diferenciar las cepas. Distingue unos 170 antígenos somáticos, 56 flagelares y 80 capsulares. Cada serogrupo, definido por el antígeno O, se subdivide en serotipos o serovares según los antígenos K y H.

Las cepas de *E. coli* que producen diarrea se dividen en los grupos siguientes: enteropatógeno (EPEC), enteroinvasivo (EIEC), enterotoxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC) o verotoxigénico (VTEC o STEC), difuso-adherente (DAEC) y enteroagregativo (EaggEC o EAEC) (Meng y col., 2001b).

Las cepas de *E. coli* verotoxigénico incluyen a todas las productoras de verotoxinas (toxinas que son activas frente a células de la línea Vero), y sólo algunas de ellas son enterohemorrágicas. El serotipo más conocido es *E. coli* O157:H7 aunque también son importantes las serovariedades O26:H11, O111:H-, O103:H2, O11:H- y O113:H21. *E. coli* O157:H7 se caracteriza por no fermentar el sorbitol y por ser “negativo” en la prueba del MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido), en contraposición al 95% de las cepas de *E. coli* que producen fluorescencia en presencia de este compuesto (Meng y col., 2001a).

Este microorganismo produce tres síndromes:

- Colitis hemorrágica. Es la presentación más frecuente.
- Síndrome urémico hemolítico (SUH). Cursa con insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia. Afecta principalmente a niños.
- Púrpura trombótica trombocitopénica. Está relacionado con el síndrome anterior e incluye fiebre y síntomas nerviosos.

Los dos primeros brotes de colitis por VTEC (1982) se asociaron con el consumo de “sandwiches” de hamburguesas de vacuno preparadas a partir de carne congelada. Cuando afecta a niños y ancianos, la infección puede ser mortal (5-10%).

Los mecanismos de patogenicidad no son claros. Produce uno o más compuestos “citotóxicos” para células de la línea Vero por lo que, inicialmente, se denominaron Verotoxinas 1 y 2 (VT1 y VT2). Sin embargo, estas citotoxinas presentan una relación genética e inmunológica con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 por lo que se ha propuesto que se denominen como el resto de las toxinas de la familia Shiga (Stxs). Otros mecanismos de patogenicidad se asocian con la adherencia (posiblemente asociada a un plásmido) y con la capacidad invasiva (recientemente descrita) y probablemente codificada por un gen del cromosoma .

El ganado vacuno es la principal fuente o reservorio de VTEC, aunque también se aísla de otros animales de abasto (cerdo, ovino) y de aves. Los alimentos implicados en casos y brotes son principalmente: carne picada de vacuno con un tratamiento térmico insuficiente y leche cruda. También se han descrito brotes asociados con agua, semillas germinadas, alimentos ácidos como embutidos fermentados o zumo de manzana. En España, se han declarado 13 casos por *E. coli* O157 durante 2004 (Anónimo, 2005a).

L. monocytogenes es un microorganismo Gram positivo ubicuo, que provoca gran preocupación en la industria alimentaria como bacteria patógena transmitida por los alimentos. Los casos de listeriosis pueden asociarse con el consumo de carne (vacuno, pollo), productos cárnicos (patés, salchichas, jamón cocido, lengua, etc.) y de la pesca (ahumados), y comidas preparadas. Alimentos crudos como las ensaladas, la leche pasteurizada y los quesos blandos también han sido causa de brotes. La mortalidad por esta infección, que afecta a embarazadas e individuos inmunodeprimidos, puede llegar a ser hasta del 50% (Ryser, 1999). La posibilidad de que este microorganismo acceda a las industrias alimentarias es muy alta. Se detecta frecuentemente en el agua de condensación, restos de alimentos, efluentes, equipo, etc. Además, puede formar “biofilms” al colonizar las superficies (acero inoxidable, vidrio y gomas). En el matadero se detectan tanto en las zonas limpias como en las sucias, siendo vehiculados por los propios animales de abasto. Su presencia en las canales es, por tanto, frecuente.

Esta bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse en las células que conforman el sistema inmune del organismo humano. Así, se introduce en los macrófagos y rompiendo el fagosoma accede al citosol mediante la listeriolisina O (LLO). A continuación, las bacterias se multiplican y se rodean de una cubierta de filamentos de actina cuya misión es facilitar su desplazamiento en el interior del macrófago y su posterior diseminación a macrófagos próximos y otras células.

De todas las especies adscritas al género *Listeria*, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se consideran patógenas (basándose en las DL50 para ratones y su capacidad para multiplicarse en el hígado y bazo de estos animales). *L. welshimeri* y *L. seeligeri* pueden ser sólo ocasionalmente patógenas para el hombre. Todas las cepas patógenas de *Listeria* producen un factor de virulencia reconocido, listeriolisina O. Además de éste, existen otros factores asociados con la virulencia: la producción del factor p60 y de internalina, ambas proteínas relacionadas con la invasión. Existen 13 serovariedades de *L. monocytogenes* que pueden ser patógenas aunque el 95 % de las cepas aisladas de muestras de infecciones humanas pertenecen a los serovares 1/2a, 1/2b y 4b, siendo este último el más frecuente.

El género *Aeromonas*, hasta 1992 perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, actualmente se incluye dentro de la familia *Aeromonadaceae* (Garrity y col., 2004). Originalmente se identificaron tres especies móviles, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y una inmóvil, *A. salmonicida*, pero algunos estudios demostraron la existencia de diferentes grupos bioquímicos (fenopecies) y distintos grupos de hibridación del DNA (genoespecies o grupos de hibridación, HGs) (Kirov, 2001). Las aeromonas móviles son bacterias acuáticas frecuentemente aisladas de carne fresca y picada, pollo y despojos comestibles (Fricker y Tompsett, 1989; Neyts y col., 2000; Okrend y col., 1987). En 1984, la “Food and Drug Administration” (FDA) incluyó las aeromonas entre los nuevos patógenos de transmisión alimentaria aunque su papel en enfermedades de este tipo no está plenamente confirmado y la mayoría de los casos han sido esporádicos. El único documento que identifica *Aeromonas* como agente causal de gastroenteritis está relacionado con el consumo de un cóctel de camarones (Janda y Abbott, 1999). Sin embargo, los datos epidemiológicos ponen de manifiesto que estas bacterias son capaces de producir gastroenteritis, septicemia y endocarditis entre otras complicaciones. Las estimaciones realizadas en Estados Unidos elevan hasta el 13% los casos de gastroenteritis

que serían causados por *Aeromonas* (Bin Kingombe y col., 1999). Los datos epidemiológicos de 2004 en España revelan que son el tercer agente bacteriano de patología gastrointestinal (628 casos declarados) y el cuarto en total (tras *Salmonella*, *Campylobacter* y rotavirus) con una clara tendencia a aumentar que se viene observando en los últimos años (Anónimo, 2005a). En España, *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. sobria* son las especies más frecuentemente aisladas de patologías gastrointestinales. El origen de las cepas involucradas en estos procesos es diverso: agua, carne de cerdo, pescado congelado, caracoles, ostras, crustáceos y gambas precocinados, platos y especialidades asiáticas y del norte de Europa conteniendo pescado, y ensaladas. Por tanto, es una bacteria ubicua y puesto que el porcentaje de animales portadores es bajo su presencia en los alimentos de origen animal se asocia con el agua utilizada en la industria pero sobre todo con la formación de “biofilms” (Borch y col., 1996b).

En cuanto a su identificación, el empleo de pruebas bioquímicas no permite, en todos los casos, adscribir las cepas a las nuevas especies. Tampoco los sistemas miniaturizados ni automatizados incluyen en sus bases de datos muchas de las especies descritas hasta ahora. En la actualidad, para demostrar la patogenicidad de una cepa de *Aeromonas* se investiga la presencia de genes que codifican para factores de virulencia, aunque la posesión de dichos genes no significa que las cepas sean capaces de expresarlos (Santos y col., 1999). Los factores de virulencia mejor conocidos son una amplia gama de enzimas exocelulares: proteasas, lipasas, nucleasas, elastasa, lecitinasa, amilasa, gelatinasa y quitinasas. También son factores de virulencia reconocidos la producción de sideróforos, el lipopolisacárido (LPS) y otros. Los factores que se consideran más importantes en relación con la patogénesis de los procesos gastrointestinales son las exotoxinas. La enterotoxina codificada por el gen *aerA* ha recibido varios nombres. La aerolisina es hemolítica, citotóxica, enterotóxica, letal para ratones y produce degeneración de las

criptas y vellosidades del intestino delgado. *Aeromonas* spp. también pueden producir otras hemolisinas α y β . Además de producir β -hemólisis por la aerolisina, también existe otra enterotoxina citotóxica denominada HlyA, (69 kDa y similar a la hemolisina de *Vibrio cholerae*) que produce hemólisis, citotoxicidad y enterotoxicidad (González-Serrano y col., 2002; Wong y col., 1998), y la acción conjunta de ambas enterotoxinas parece responsable, en gran medida, de la virulencia de las cepas de *Aeromonas*. Por último, se han detectado cepas que producen una citotoxina similar a la Sxt1 de *Escherichia coli* verotoxigénico (Haque y col., 1996).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva ampliamente distribuida en el medio ambiente de la industria alimentaria y en los animales de abasto y aves colonizando sus membranas mucosas y su piel. Además, se estima que más de la mitad de las personas pueden ser portadores de esta bacteria. El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene gran relevancia para la salud pública ya que algunas cepas tienen la capacidad de producir enterotoxinas en los alimentos que, al ser consumidos, ocasionarían intoxicaciones. Asimismo, son agentes destacados de procesos infecciosos en el hombre y en los animales. Entre estos últimos los conejos, en cuyas granjas ocasionan graves problemas por su alta prevalencia. Las estafilococosis más frecuentes en los conejos son mastitis, dermatitis exudativa, abscesos y pododermatitis (Rosell, 2000b).

Algunos de los alimentos que se ven implicados en la intoxicación estafilocócica son leche, derivados lácteos y helados (riesgo bajo si se respetan las buenas prácticas de manipulación y elaboración), nata, productos cárnicos curados y cocidos (a partir de los manipuladores), productos cárnicos enlatados (a partir del agua de enfriado), platos preparados conteniendo carne, ensaladas, huevos cocidos (a partir del agua que se emplea para enfriarlos), alimentos deshidratados, etc.

La importancia sanitaria de la contaminación de la carne con esta bacteria ha sido destacada por organismos internacionales como la “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF, 2005). La contaminación de los alimentos de origen animal es muy frecuente por colonización, lesiones y otras causas (Devriese, 1990; Mead y Dodd, 1990), y llega a ser elevada en situaciones de gran manipulación durante el procesado, como consecuencia de prácticas higiénicas inadecuadas. Es de destacar la capacidad de esta bacteria para colonizar las superficies en los equipos de procesado y, a partir de ahí, contaminar las canales y cortes de carnes (Lancette y Bennett, 2001).

Para la detección y/o la tipificación de numerosos agentes patógenos de transmisión alimentaria, como los mencionados en este capítulo, en los últimos años se ha generalizado el empleo de la técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”, PCR), y de otras derivadas de ésta como el análisis de perfiles del DNA por amplificación aleatoria (“Random Amplified Polymorphic DNA”, RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (“Restriction Fragment Length Polimorphism”, PCR-RFLP), PCR a tiempo real (“Real Time PCR”, RTi-PCR), etc., debido a sus múltiples ventajas en comparación con la utilización de las técnicas tradicionales. Así, permite detectar la presencia de microorganismos patógenos de forma rápida y precisa dada su gran especificidad y sensibilidad, mediante la detección de genes relacionados con la producción de factores de virulencia. Para ello, durante el desarrollo de la técnica se amplifica, de forma exponencial, un segmento específico de DNA de secuencia nucleotídica conocida.

Brevemente, la técnica consiste en utilizar dos oligonucleótidos o cebadores (“primers”) sintéticos de 15-20 bases que son complementarios a los extremos de la región de DNA cuya secuencia es específica de los genes de interés. Estos cebadores actúan como

iniciadores de la síntesis *in vitro* de DNA, siendo ésta habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq* polimerasa. La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales consta de tres fases: desnaturalización del DNA molde, hibridación o “annealing”, por la que se produce la unión de los cebadores a las hebras del DNA, y extensión, en la que la *Taq* polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de DNA desnaturalizada. De estas fases, la de hibridación se lleva a cabo a una combinación temperatura/tiempo óptima según los cebadores específicos utilizados.

Estas tres fases determinan un ciclo que se repite hasta “n” veces para dar lugar a 2^n copias de la región de DNA que se pretende amplificar. Una vez amplificado el fragmento, la visualización se realiza, por lo general, mediante electroforesis en gel de agarosa y exposición a la luz ultravioleta tras teñir el DNA con bromuro de etidio.

El objetivo de este capítulo ha sido determinar la prevalencia de (a) formas activas de *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Aeromonas* móviles y *S. aureus* en carne de conejo, y (b) los principales genes de virulencia asociados a las citadas bacterias patógenas, en este último caso mediante su detección por técnicas de PCR.

Material y Métodos

La adquisición y preparación de las muestras, el aislamiento y la identificación de las bacterias patógenas, así como el protocolo de desarrollo de la PCR se describen en la publicación anexa a este capítulo.

Brevemente, se analizaron 51 muestras de carne de conejo: 24 canales obtenidas en dos mataderos (un matadero industrial y de gran capacidad, M, y otro de menor tamaño, G), y 27 envases de carne de conejo cubiertos con película flexible permeable al oxígeno adquiridas en dos supermercados. Los recuentos de *Aeromonas* y *S. aureus* se realizaron por siembras en placa a partir de lavados de los muslos. Para la detección de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se partió de un homogeneizado de la muestra en un medio de enriquecimiento adecuado, separación inmuno-magnética (SIM) y posterior siembra en placas de medios selectivos. Para la detección y aislamiento de *Y. enterocolitica*, se incluyó un enriquecimiento en frío seguido de un tratamiento alcalino y posterior siembra en placas de agar selectivo (Weagant y Feng, 2001).

Salmonella spp.

El enriquecimiento no selectivo consistió en la homogeneización de 25 g de muestra en 225 ml de agua de peptona tamponada (Oxoid) y posterior incubación a 37 °C durante 18 horas. Seguidamente se realizó la SIM y la siembra en placas de agar Entérico Hektoen (Oxoid) y agar XLD (xilosa, lisina y desoxicolato, Oxoid) que se incubaron 48 h a 37 °C.

Las colonias sospechosas de *Salmonella* se sometieron a pruebas fenotípicas en agar con tres azúcares e hierro (agar TSI) y en agar con hierro, lisina y arginina (Palumbo y col., 1985) (González y col., 1999). Finalmente, se utilizaron tanto el sistema

miniaturizado de identificación API 20E (bioMérieux, España) como el sistema automatizado VITEK con tarjetas GNI para la identificación de bacterias Gram negativas (bioMérieux).

Y. enterocolitica

Para la detección de esta bacteria, el enriquecimiento se realizó en frío en caldo PSBB (caldo de peptona, sorbitol y sales biliares) y posterior tratamiento alcalino (KOH y NaCl 0.5%) durante unos segundos. Seguidamente, se realizó una siembra en placas de agar CIN (Cefsulodin Irgasan Novobiocin) y de agar de MacConkey (Oxoid) que se incubaron durante 24h a 30 y 22 °C, respectivamente.

Las presuntas colonias de *Y. enterocolitica* fueron cultivadas en agar LIA, agar urea de Christensen y en agar con esculina y bilis. También se comprobaron: la movilidad de los aislados a 22 °C y 37 °C, las reacciones en agar TSI, la producción de β -D- glicosidasa, la descarboxilación de la ornitina, la producción de gas a partir de la glucosa y de ácido a partir de manitol, sorbitol, celobiosa, amigdalina, sacarosa, ramnosa, rafinosa y melódiosa. Finalmente se utilizó el sistema de identificación API 20E.

E. coli O157:H7

Para esta bacteria, el enriquecimiento no selectivo y posterior SIM se realizaron de igual forma que para *Salmonella*. En este caso, se obtuvieron las colonias a partir de siembras en placas de agar de MacConkey con Sorbitol, Telurito y Cefixima (TC-SMAC, Oxoid) mantenidas a 37 °C durante 24h.

Las presuntas cepas de *E. coli* O157:H7 se pasaron al medio O157:H7 ID (bioMérieux) y aquellas sorbitol negativas que no expresaban la enzima β -glucuronidasa se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas (Meng y col., 2001a): producción de indol,

reacciones en agar TSI, fermentación de celobiosa, prueba del rojo de metilo y Voges-Proskauer, utilización del citrato, descarboxilación de la lisina y ornitina, y movilidad.

L. monocytogenes

Después de un enriquecimiento selectivo (25 g homogeneizados en 225 ml de caldo Fraser a mitad de concentración, Oxoid, durante 24h a 30 °C), se procedió a la SIM y posterior siembra en placas de agar PALCAM (Oxoid) y ALOA (AES Laboratoires, Combourg, France) que fueron incubadas durante 48h a 37 °C.

La identificación y confirmación de los miembros de *Listeria* spp. recuperados se realizó utilizando las pruebas siguientes: producción de β -hemolisina, reducción de nitratos, prueba del CAMP (test de Christie-Atkins-Munch-Peterson, frente a *S. aureus* y *Rhodococcus equi*), pruebas del rojo metilo y de Voges-Proskauer, producción de indol, reacciones en agar TSI y producción de ácido a partir de la D-glucosa, D-xilosa, D-manitol, L-ramnosa y α -metil-D-manósido.

Aeromonas móviles

En este caso se realizó siembra directa en placas de agar almidón ampicilina, SAA, (Palumbo y col., 1985) incubadas 24h a 28 °C a partir de diluciones decimales del lavado de los muslos de conejo. Las colonias que producían amilasa en el agar ampicilina almidón se sometieron a diferentes pruebas: movilidad, fermentación y producción de gas de la glucosa, producción de ácido a partir de m-inositol, L-arabinosa, lactosa, D-manitol, salicina, D-sacarosa, D-ramnosa y D-sorbitol, resistencia al agente vibriostático O/129, producción de indol, pruebas del rojo metilo y de Voges-Proskauer, hidrólisis de L-arginina, descarboxilación de lisina y ornitina, hidrólisis de esculina, susceptibilidad a cefalotina, actividades elastasa, gelatinasa y β -hemolítica, según describen González-Rodríguez y col. (2002).

S. aureus

De forma similar a los recuentos de *Aeromonas*, a partir de los lavados de los muslos se realizaron los recuentos de estafilococos coagulasa positivos sobre placas de agar Baird-Parker suplementado con plasma de conejo y fibrinógeno bovino (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) después de 24h de incubación a 37 °C.

Los estafilococos coagulasa positivos fueron confirmados mediante las pruebas de sensibilidad a la lisostafina, fermentación de la glucosa, producción de termonucleasa y coagulasa, y actividad hemolítica de acuerdo con García y col. (1980).

Para la detección de la actividad enterotoxigénica, se empleó el *kit* “Transia Tube *Staphylococcal Enterotoxins*” (Diffchamb AB, Västra Frölunda, Suecia). Consiste en un ensayo inmunoenzimático (Borch y Agerhem, 1992) tipo “sandwich”, que utiliza un tubo como soporte sólido al que se adhieren los anticuerpos específicos para las enterotoxinas estafilocócicas. Los resultados se obtienen por lectura de la densidad óptica a 450 nm y comparación con controles positivos y negativos. Para la prueba se emplearon los sobrenadantes de los cultivos de las cepas en caldo BHI (Oxoid) incubado a 37 °C durante 24 h, siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Brevemente, se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación del caldo de cultivo (3000g/10 minutos) y se esterilizaron por filtración. Se utilizó suero de conejo con el complemento desactivado (Diffchamb) para eliminar la interferencia de la proteína A que produciría falsos positivos. A continuación, se llevaron a cabo varios pasos de incubación, ajuste de pH y diluciones para realizar, finalmente, la prueba con 500 µl de muestra. Este volumen se añadió a los tubos con los anticuerpos anti-enterotoxina estafilocócica y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 600 rpm. Los pasos siguientes fueron: lavado con solución tampón, adición del conjugado (anticuerpos anti-enterotoxina+peroxidasa), incubación con agitación, lavados, adición del sustrato (urea-H₂O₂) y la sustancia cromógena (TMB),

incubación con agitación y adición de la solución para detener la reacción, seguido de la lectura fotométrica.

En la publicación anexa a este capítulo se detalla el procedimiento seguido para la detección de genes asociados a virulencia mediante la técnica de la PCR. En breve, esta detección se llevo a cabo a partir de lavados de las muestras y de las cepas aisladas. Básicamente consistió en obtener el DNA por un procedimiento de ebullición (Wang y col., 1997) y, realizar una PCR convencional y otra PCR a tiempo real para amplificar fragmentos concretos de genes asociados a virulencia en las bacterias patógenas estudiadas.

Resultados

La prevalencia de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Listeria* spp., *Aeromonas* spp. y *S. aureus* en carne de conejo se muestra en la tabla 3.1, así como sus genotipos (*invA*, *stx₁*, *stx₂*, *yst*, *hly*, *iap*, *aerA*, *hlyA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*) y la presencia de los genes de virulencia asociados en los cultivos de enriquecimiento no selectivo.

Cuatro cepas fueron identificadas como *Salmonella* mediante el empleo de las galerías API 20E aunque no pudieron ser asignadas a este género tras la realización de pruebas bioquímicas convencionales (tinción de Gram, producción de oxidasa y catalasa, fermentación de la glucosa y la lactosa, descarboxilación de la lisina, producción de H₂S) ni tampoco fueron identificadas como tal por el sistema Vitek. Además, estas cepas no presentaron el gen *invA*, que tampoco pudo ser detectado en ninguno de los enriquecimientos no selectivos.

En cuatro muestras se detectaron cepas de *E. coli stx₁⁻/stx₂⁻*, sorbitol y β-glucuronidasa negativas. Sus genes *stx₁* y *stx₂* tampoco se detectaron en los enriquecimientos no selectivos de los lavados de las muestras.

Dos muestras estaban contaminadas con *Y. enterocolitica yst⁻*. El gen *yst* fue detectado en el enriquecimiento no selectivo de otras dos muestras del mismo origen pero en las que no se pudo recuperar ninguna forma viable de esta bacteria.

Tabla 3.1.- Prevalencia y genotipos de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Listeria* spp., *Aeromonas* spp. y *S. aureus* en carne de conejo.

Género y Especie	Aislamiento			Enriquecimientos no selectivos de las muestras		
	Recuperación	Genotipo	Prevalencia (%)	Genes	Positivos	Prevalencia (%)
<i>Salmonella</i> spp.	0		<2.0	<i>invA</i>	0	<2.0
<i>E. coli</i> O157:H7	0		<2.0	<i>stx1/stx2</i>	0	<2.0
<i>Y. enterocolitica</i>	2	<i>yst⁻</i>	3.9	<i>yst^a</i>	2	3.9
<i>Listeria</i> spp.	7		13.7			
<i>L. monocytogenes</i>	3	<i>hly⁺/iap⁺</i>	5.9	<i>hly/iap</i>	3	5.9
<i>L. seeligeri</i>	2	<i>hly⁻/iap⁻</i>	3.9			
<i>L. ivanovii</i>	1	<i>hly⁻/iap⁻</i>	2.0			
<i>L. innocua</i>	1	<i>hly⁻/iap⁻</i>	2.0			
<i>Aeromonas</i> spp.	18		35.3			
<i>A. hydrophila</i>	10	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	19.6	<i>aerA/hlyA</i>	39	76.5
<i>A. caviae</i>	1	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	2.0	<i>aerA</i>	3	5.9
<i>A. caviae</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁺</i>	2.0	<i>hlyA</i>	4	7.8
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	1	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	2.0			
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁺</i>	2.0			
<i>A. popoffii</i>	2	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	2.0			
<i>A. schubertii</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	2.0			
No identificados	1	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	2.0			
<i>Staphylococcus</i> spp.	27		52.9	NI ^b		
<i>S. aureus</i>	2	<i>seb⁺</i>	3.9			
<i>S. aureus</i>	2	<i>sec⁺</i>	3.9			
<i>S. aureus</i>	23	<i>sea⁻/seb⁻/sec⁻/sed⁻/see⁻</i>	45.1			

^aNegativo en siembra; ^bNI, no investigado

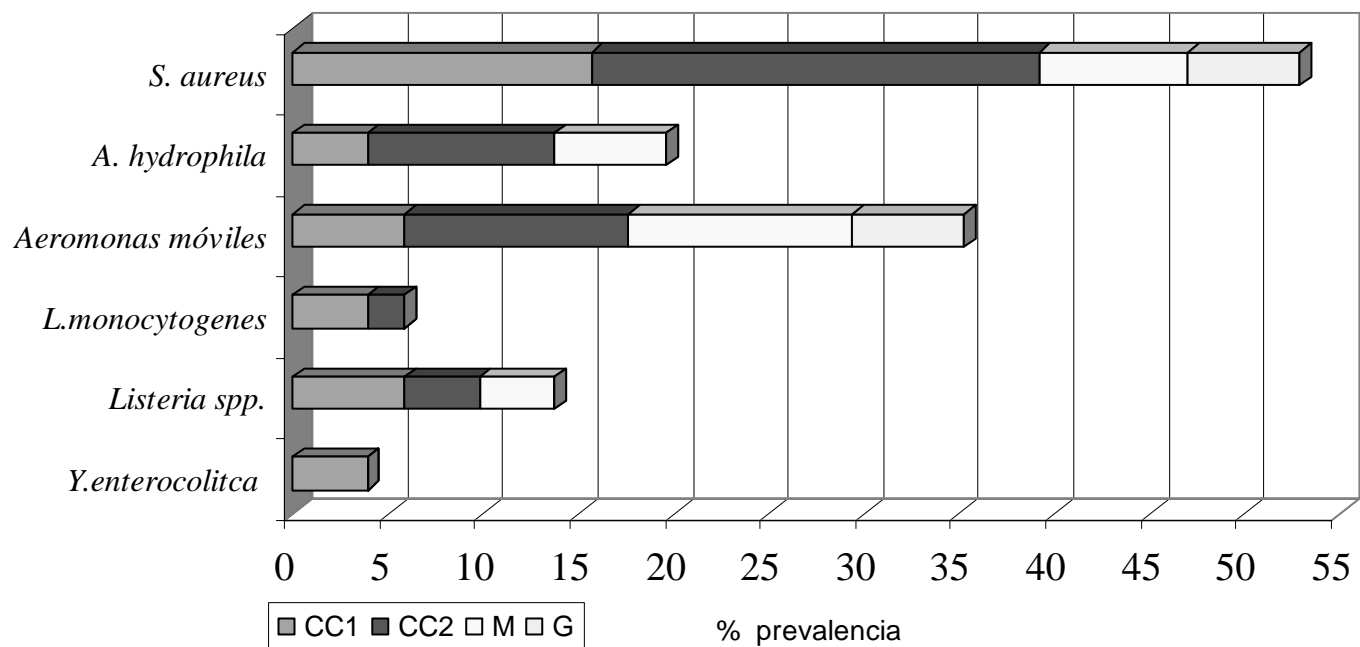
Siete cepas, aisladas en muestras de todos los orígenes salvo del matadero de menor capacidad (figura 3.1), pertenecían al género *Listeria*. Tres de ellas fueron *L. monocytogenes hly⁺/iap⁺*; otras tres, que fueron hemolíticas, CAMP + frente a *S. aureus* y *hly⁻/iap⁻*, se adaptaban al perfil de *L. seeligeri* (2 cepas) y *L. ivanovii* (1 cepa), y las restantes se identificaron como *L. innocua*. Cinco de las cepas aisladas de *Listeria* fueron recuperadas de las muestras adquiridas en la venta al por menor.

En cuanto a las *Aeromonas* móviles (recuento medio de $1.77 \pm 0.62 \log_{10}$ ufc/g), el porcentaje de contaminación fue del 35.3% a pesar de que los genes *aerA* y/o *hlyA* fueron detectados en aproximadamente el 90% de los enriquecimientos no selectivos. La mayoría de estas cepas de aeromonas fueron *A. hydrophila aerA⁺/hlyA⁺*, el 70% aisladas de muestras adquiridas en los supermercados (figura 3.1). También se aislaron cepas pertenecientes a las especies *A. caviae*, *A. veronii*, *A. popoffii* y *A. schubertii* (tabla 3.1).

La prevalencia de *S. aureus* (recuento medio de $1.37 \pm 0.79 \log_{10}$ ufc/g) fue del 52.9%. De las 27 cepas de *S. aureus* aisladas, dos presentaban el gen para la enterotoxina estafilocócica B (*seb*) y otras dos para la enterotoxina estafilocócica C (*sec*) y, además, los sobrenadantes de los cultivos de estas cuatro cepas fueron positivos para la producción de enterotoxina. En los sobrenadantes de otras 11 cepas también se detectó la producción de alguna de las enterotoxinas A a E.

Las especies de aeromonas móviles se recuperaron de muestras de todos los orígenes mientras que la mayoría de las muestras contaminadas con *S. aureus* (20/27) procedían de supermercados (figura 3.1).

Figura 3.1.- Prevalencia (%) de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en 51 muestras de carne de conejo* diferenciadas por origen: CC1, supermercado 1; CC2, supermercado 2; M, matadero de gran capacidad; G, pequeño matadero.



* La prevalencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 fue menor del 2.0%.

Discusión

La información relativa a la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en carne fresca indica que su incidencia depende de la especie y de las prácticas higiénicas durante la carnización y el procesado. Así, la contaminación de las canales y de los cortes se asocia tanto con la presencia y número de estas bacterias en la piel (suciedad) y el tracto gastrointestinal (enfermos y portadores), como con la contaminación cruzada y medioambiental durante el sacrificio y posterior procesado (Bell y Kyriakides, 2002a).

Salmonella, que es una de las bacterias patógenas de transmisión alimentaria más importante, puede causar infecciones en los conejos, especialmente en los gazapos y en las hembras preñadas. En España, durante el periodo de 1989 a 1998 la mayor parte de los serotipos de *Salmonella* identificados en conejos se asociaron con los serovares Typhimurium y Enteritidis (Rosell, 2000b). Algunos trabajos ponen de manifiesto que menos del 1 % de los conejos sanos, que llegan al matadero, son portadores de *Salmonella* en sus heces (Bonardi y col., 1999; Catellani y col., 1999). En nuestro estudio, ni en las canales ni en los cortes de conejo se detectó *Salmonella*, lo que coincide con los datos obtenidos en Australia (Bobbitt, 2002) y Túnez (Ben Jaafar y col., 2002). En Egipto, Khalafalla (1993) encontró una prevalencia del 5 % (serovar Typhimurium) en muestras adquiridas en la venta al por menor, mientras que en Italia se recuperó *Salmonella* (serovar Blockley y no tipificable) en sólo 3 de 369 canales (Cerrone y col., 2004).

Otra bacteria patógena importante en humanos es *E. coli* O157:H7. Aunque se considera que el ganado vacuno es el principal reservorio de este serovar y de otras cepas de *E. coli* productoras de la toxina Shiga (STEC), cepas STEC se aíslan también de otros animales domésticos y silvestres (Meng y col., 2001a). La incidencia de STEC en carne de conejo no se conoce aunque, en un estudio con animales vivos, García y Fox (2003) hallaron que el 25% de conejos de la raza Dutch Belted y el 9% de los conejos de la raza Nueva Zelanda eran portadores de *E. coli* O153:H⁻ *stx*₁⁺ u O153:H7 en sus heces. El contacto con heces de conejos silvestres se identificó como el origen de una cepa de *E. coli* O157:H7 productora de Stx que fue aislada en un brote de colitis hemorrágica y SUH en el Reino Unido. Aparentemente, las heces de los conejos contaminaron una zona de recreo, próxima a una granja de vacuno donde los conejos habían adquirido la cepa al alimentarse con hierba contaminada con heces de vacuno (Pritchard y col., 2001). Estos últimos autores sugirieron que los conejos podrían ser un nuevo reservorio o vector de STEC, y que podrían suponer un riesgo. Sin embargo, en ninguna de nuestras muestras se detectaron cepas de *E. coli* O157:H7, ni tampoco los genes *stx*₁ y *stx*₂.

A partir de la amplificación del gen *yst*, dos de las canales analizadas fueron positivas aunque de ninguna se recuperaron células viables. El hecho de no conseguir el aislamiento de cepas de *Y. enterocolitica* a partir de muestras positivas por la técnica de PCR podría ser debido a un número inicial bajo o a la presencia de células dañadas letal o subletalmente. Por otro lado, las cepas aisladas de *Y. enterocolitica* no eran patógenas ya que carecían del gen *yst*, que también estaba ausente en los enriquecimientos no selectivos de las muestras de donde procedían. En otros estudios en los que se investigó la incidencia de *Y. enterocolitica* en carne de conejo, tampoco se detectó esta bacteria (Bobbitt, 2002; Fredriksson-Ahomaa y Korkeala, 2003; Khalafalla, 1993). *Y. enterocolitica* es un

microorganismo ubicuo que se aísla frecuentemente del medio ambiente, de los animales domésticos y salvajes y de una gran variedad de alimentos. La asociación de enfermedades humanas con el consumo de alimentos y aguas no tratadas contaminadas con *Y. enterocolitica* se conoce bien aunque la mayoría de las cepas aisladas de origen no clínico no son patógenas. Su mecanismo de virulencia es bastante complejo y relacionado tanto con genes plasmídicos como con cromosómicos. Entre estos últimos se encuentra el gen *yst*, que codifica para la enterotoxina termoestable Yst. El gen *yst* se considera un eficaz marcador de la virulencia (Fredriksson-Ahomaa y Korkeala, 2003) ya que la producción de la toxina Yst está limitada a los clásicos biovares patógenos de *Y. enterocolitica*.

Existen numerosos trabajos sobre la prevalencia de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en carne fresca. Farber y Peterkin (1999) y Bell y Kyriakides (2002b) han analizado los datos publicados sobre carne de vacuno, ovino, porcino, equino y caprino. En la carne de estas especies, la prevalencia de *Listeria* oscilaba entre el 0 y el 100 %, y para *L. monocytogenes* entre el 0 y el 65 %. En general, la mayor incidencia corresponde a las carnes picadas. Los porcentajes de *Listeria* y *L. monocytogenes* en nuestro estudio fueron de 13.7 y 5.9 %, respectivamente, y si se distribuyen en función de su origen se observa que la prevalencia fue más elevada en las muestras obtenidas en establecimientos de venta que en las canales procedentes de los mataderos a las 24 h *post-mortem* (18.5 % vs. 8.3 %). Estos datos son comparables a los encontrados por Khalafalla (1993) que no detectó *Listeria* spp. en canales frescas de conejo pero sí en muestras dispuestas para su venta, en donde la incidencia de *L. monocytogenes* fue del 10 %. Parece que la contaminación de las canales frescas de conejo por *Listeria* spp. está asociada con el despique y el envasado más que con la contaminación inicial. En este sentido, Genigeorgis y col. (1989) demostraron que las operaciones de envasado, el almacenamiento a temperaturas de refrigeración, las manos de los operarios y sus guantes pueden aumentar significativamente la detección de

Listeria en carne de pollo. También es preocupante el hecho de que *L. monocytogenes* puede colonizar los propios establecimientos y equipos y permanecer viable durante largos periodos de tiempo (Farber y Peterkin, 1999).

Por lo que respecta a *Aeromonas*, entre las muestras de carne de conejo estudiadas, 46 (90.2 %) fueron positivas por PCR para uno o ambos genes hemolíticos (*aerA* y/o *hlyA*), y 18 (35.3%) tenían niveles de aeromonas viables superiores al mínimo de detección de la técnica empleada, presentando el 83.3 % de las cepas aisladas los genes *aerA*⁺ y/o *hlyA*⁺. Esta incidencia de aeromonas portadoras de los genes asociados a la virulencia es similar al 82 % encontrado por Bin Kingombe y col. (1999) en una población de 45 cepas procedentes de carne de vacuno y porcino y carne picada de vacuno. A pesar de que la identificación fenotípica de las cepas de *Aeromonas* a nivel de especie se considera difícil por la insuficiente definición de los esquemas bioquímicos y la pobre descripción de las nuevas especies, todos nuestros aislamientos, excepto uno, pudieron ser adscritos a especie empleando caracteres fenotípicos. La mayor parte de las cepas eran *A. hydrophila aerA*⁺/*hlyA*⁺. Heuzenroeder y col. (1999) demostraron que el genotipo *aerA*⁺/*hlyA*⁺, al menos en *A. hydrophila*, es un buen indicador de la capacidad de producir diarrea. Esta especie junto con *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria*, que también fueron aisladas, representan más del 85 % de los aislamientos asociados con gastroenteritis (Kirov, 2001). La elevada incidencia de aeromonas móviles en las canales se suele atribuir al agua utilizada para su lavado ya que los animales vivos son raramente portadores. Sin embargo, cada vez es más evidente que la capacidad de formar “biofilms” por parte de las aeromonas les permite colonizar el matadero, en especial ciertas áreas de procesado (Jablonski y Bohach, 2001). Nuestros resultados sugieren que la carne de conejo podría ser un vehículo de diseminación de aeromonas patógenas especialmente como origen de contaminación cruzada.

Entre las bacterias patógenas investigadas por nosotros, *S. aureus* presentó la mayor prevalencia (52.9 % de las muestras). La fuente principal de contaminación de los alimentos con cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas es la manipulación de los mismos sobre todo durante la preparación de alimentos listos para el consumo, aunque también los animales de abasto pueden ser un reservorio de esta bacteria. Además, *S. aureus* es capaz de colonizar las superficies de trabajo y equipos y utensilios empleados en el procesado de los alimentos. Es frecuente, por lo tanto, detectar en carne fresca niveles bajos de esta bacteria, pudiendo las cepas ser o no de origen humano (Jablonski y Bohach, 2001). *S. aureus* es el agente de diversos procesos infecciosos en madres reproductoras y gazapos, habiéndose aislado hasta en el 100 % de las explotaciones con problemas crónicos de estafilococosis. Las áreas del conejo colonizadas más frecuentemente con *S. aureus* son las orejas y el perineo (Ajuwape y Aregbesola, 2001; Hermans y col., 1999). Como era de esperar, los recuentos de *S. aureus* hallados en las muestras analizadas por nosotros eran bajos. Esto se explica por ser una bacteria mesófila con escasa capacidad para competir con la microbiota alterante. Por otro lado, sólo el 14.8 % de las cepas poseían genes que regulan la producción de las enterotoxinas mejor conocidas (SEA a SEE). En cualquier caso, su presencia en las muestras de matadero y supermercado sugiere que la carne de conejo puede ser una fuente potencial de esta bacteria y que sería importante establecer el origen o fuente primaria de las cepas aisladas (véase capítulo 4).

Un hallazgo difícil de interpretar es la discrepancia entre el número de cepas (4 cepas) portadoras de genes que regulan la producción de las enterotoxinas clásicas (SEA a SEE) y el de cepas que dieron resultados positivos utilizando el *kit* inmunoenzimático (15 cepas). Una posible explicación sería la producción de enterotoxinas estructuralmente relacionadas con las clásicas pero codificadas por genes distintos de los investigados. Otra posibilidad sería que la técnica, a pesar de los controles, diera resultados positivos falsos.

Esto último, aunque no imposible, se intentó evitar siguiendo cuidadosamente el protocolo proporcionado por el fabricante que elimina los compuestos que pueden interferir originando falsas reacciones positivas (por ejemplo, la proteína A o el peróxido de hidrógeno).

Aunque es evidente que son necesarios más estudios dedicados a investigar la prevalencia y evaluar los riesgos por bacterias patógenas en carne de conejos, nuestros resultados y también los de otros investigadores sugieren que ni las canales ni los cortes parecen ser un vehículo importante de agentes zoonóticos como *Salmonella*, *E. coli* verotoxigénico o *Y. enterocolitica*. Sin embargo, la prevalencia de bacterias patógenas de diversos orígenes como *S. aureus*, *Aeromonas* móviles y *Listeria monocytogenes*, capaces de colonizar el ambiente de los establecimientos alimentarios, es similar e incluso superior a la observada en otras carnes. El tratamiento térmico culinario inactivará a estas últimas pero hay que tener en cuenta que pueden acceder al hombre por manipulación, cocinado incompleto o contaminación cruzada.

Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 4, 2006, Pages 000-000
Copyright ©, International Association for Food Protection

Rabbit Meat as a Source of Bacterial Foodborne Pathogens

JOSE M. RODRÍGUEZ-CALLEJA, ISABEL GARCÍA-LÓPEZ, MARÍA-LUISA GARCÍA-LÓPEZ,* JESÚS A. SANTOS,
AND ANDRÉS OTERO

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071-León, Spain

MS 05-383: Received 31 July 2005/Accepted 23 November 2005

ABSTRACT

71 Even though worldwide production of rabbit meat is >1,000,000 tons, little information is available for rabbit meat microbiology. This study provides data on the prevalence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp., motile *Aeromonas* spp., and *Staphylococcus aureus* on rabbit meat. A total of 24 rabbit carcasses from two abattoirs and 27 rabbit meat packages from supermarket displays were examined. In addition to culturing methods, associated virulence genes were investigated by PCR in suspect isolates and samples. Neither *Salmonella* nor *E. coli* O157:H7 was detected. All samples were negative for virulence-associated *invA*, *stx*₁, and *stx*₂ genes. At one abattoir, two carcasses (3.9%) carried *Y. enterocolitica* *yst*⁻, and two were positive for the *yst* gene, although viable *Y. enterocolitica* cells were not recovered from these samples. Seven samples (13.7%) were contaminated with *Listeria*. Of them, three were positive for *hly* and *iap* genes (*Listeria monocytogenes* *hly*⁺/*iap*⁺); two carried *Listeria seeligeri*; one carried *Listeria ivanovii*; and one carried *Listeria innocua*. For detectable motile *Aeromonas* spp. (average count, 1.77 ± 0.62 log CFU/g), the contamination rate was 35.3%, although ca. 90% of the samples were positive for the *aerA* and/or *hlyA* gene. The majority of aeromonad isolates were *Aeromonas hydrophila aerA*⁺/*hlyA*⁺. *Aeromonas caviae*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas schubertii*, and the two biovars of *Aeromonas veronii* were also isolated. The prevalence of *S. aureus* contamination (average count, 1.37 ± 0.79 log CFU/g) was 52.9%. Among 27 *S. aureus* isolates, two harbored genes for staphylococcal enterotoxin B (*seb*), and two harbored genes for staphylococcal enterotoxin C (*sec*). The remaining isolates were negative for *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*.

Large amounts of red meat and poultry are consumed throughout the world. In Europe and certain Asian countries, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are also an important source of meat. According to data published by the Food and Agriculture Organization of The United Nations (16), world rabbit meat production is estimated to be >1,000,000 tons. The major producer is China (440,000 tons), followed by Italy (222,000 tons), Spain (115,000 tons), and France (85,200 tons).

For a variety of reasons, rabbits are unique among food animals. Their reproduction cycle is short, their prolificacy rate is high, and their growth rate is fast. They are adapted for industrial production and are easy to transport and market for food. Rabbits produce white meat that is fine-grained, high in protein, low in fat and cholesterol, and rich in certain minerals and vitamins (14).

Although microbial contamination of raw meat has always been an important issue for food safety, available information for rabbit meat microbiology is very scarce (14). However, rabbit carcasses are obtained, processed, and stored in the same manner as meat from other animals, and according to European Union legislation (4, 5), it will become the law on 1 January 2006 that rabbit carcasses and cuts meet the same conditions that apply to poultry and that they be similarly stored and checked for health and hygienic status.

Among the microbiological hazards that are of impor-

tance in meat are pathogens from living animals (e.g., *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7), pathogens from the environment that can enter the meat chain wherever environmental contamination may occur (e.g., *Listeria monocytogenes*, some species of motile aeromonads), and pathogens that are carried by product handlers, as occurs with *Staphylococcus aureus*, although this bacterium is capable of colonizing certain items of processing equipment and is also associated with some diseases of commercial rabbits, such as subcutaneous abscesses, mastitis, and pododermatitis (39).

The control of foodborne pathogens requires an understanding of a number of factors, including the knowledge of possible hazards and their likely occurrence in various products. The goal of this study was to provide a microbiological profile of rabbit meat with respect to certain bacteria that are associated with varying degrees of public health concern.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Twelve healthy commercial rabbits (New Zealand, 10 weeks old, ca. 2 kg live weight) from different flocks were obtained from one rabbit farm, slaughtered under hygienic conditions in a small plant, and stored at 3°C for 24 h. The same number of 24-h postmortem carcasses, each from a different flock, was collected from one large rabbit abattoir plant with structures, layouts, maintenance operations, and operational hygienic conditions in compliance with current European Union legislation (2).

Twenty-seven packages of rabbit meat in polystyrene trays overwrapped with oxygen-permeable films were obtained from

* Author for correspondence. Tel: +34987291119; Fax: +34987291284; E-mail: dhtmg1@unileon.es.

two large-chain supermarkets. These were purchased between 0 and 3 days after packaging (shelf life, 1 week), and all of them belonged to different lots. Sixteen of these samples consisted of packages of two bone-in hind legs that originated from one processor and were marketed in one supermarket, where they were displayed at temperatures from -1 to $+1^{\circ}\text{C}$. The remaining samples consisted of 11 whole carcasses from a different processing company and were displayed at temperatures from -1 to $+5^{\circ}\text{C}$ in a second supermarket.

Sample preparation. For *Aeromonas* spp. and *S. aureus* counts, one hind leg (144 ± 33 g) from each whole carcass or package was placed in a sterile stomacher bag containing enough 0.1% (wt/vol) peptone water to make a 1:5 dilution and vigorously hand shaken for 30 s. Recovered rinse liquid was poured into a sterile container and further diluted 10-fold. The second hind leg was prepared for the analysis of *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, and *L. monocytogenes* as described below.

Isolation and identification of pathogenic bacteria. Presumptive *Salmonella* isolation was performed by immunomagnetic separation (IMS) with Dynabeads containing anti-*Salmonella* (DynaL A.S., Oslo, Norway) according to the instructions provided by the manufacturer. Briefly, the protocol consisted of a standard preenrichment of 25-g meat samples in 225 ml of buffered peptone water (Oxoid, Basingstoke, UK) for 18 h at 37°C and then processing by IMS and plating onto selective agars (xylose-lysine-deoxycholate and Hektoen Enteric agars, Oxoid). Suspect *Salmonella* isolates were tested as described elsewhere (24) as well as by two commercially available identification systems: (i) the API 20E (bioMérieux España, Madrid, Spain) and (ii) the Vitek AutoMicrobic System (bioMérieux España) with a Gram-Negative Identification card.

The method for isolating *Y. enterocolitica* consisted of (i) an enrichment of 25-g meat samples in 225 ml of peptone sorbitol bile broth incubated at room temperature for 48 h and (ii) an alkali treatment with 0.5% KOH in 0.5% saline; then, two loopfuls were plate streaked on Cefsulodin Irgasan Novobiocin agar (Oxoid) and MacConkey agar (Oxoid) and incubated for 24 h at 30 and 22°C , respectively (18). Small colonies with a deep red center (Cefsulodin Irgasan Novobiocin agar) and flat, colorless, or pale pink colonies (MacConkey agar) were picked and stabbed into lysine arginine iron agar, Christensen's urea agar, and bile esculin agar slants. The colonies that gave typical *Yersinia* reactions were tested as follows: motility at 22 and 37°C ; triple sugar iron reactions; β -D-glycosidase activity; ornithine decarboxylase; gas from glucose; and acid from mannitol, sorbitol, cellobiose, amygdaline, sucrose, rhamnose, raffinose, and melibiose (44). Suspect strains were also inoculated into API 20E strips.

Presumptive *E. coli* O157:H7 strains were recovered with Dynabeads containing anti-*E. coli* (DynaL A.S.) according to the protocol of the manufacturer. In brief, IMS was conducted after an 18-h preenrichment (at 37°C) of blended 25-g samples in 225 ml of buffered peptone water (Oxoid). Each recovered IMS bead complex was spread onto tellurite cefixime sorbitol MacConkey agar (Oxoid). Suspect colonies were directly streaked onto plates of a selective chromogenic agar (O157:H7 ID medium, bioMérieux). Sorbitol-negative strains that did not express β -glucuronidase activity were tested for phenotypic traits (31) and were also inoculated into API 20E strips.

L. monocytogenes was isolated from an enrichment (25 g of meat stomached in 225 ml of half Fraser broth [Oxoid] for 24 h at 30°C) and then underwent IMS with Dynabeads containing anti-*Listeria* (DynaL A.S.) and subsequent plating onto PALCAM agar (Oxoid) and ALOA medium (AES Laboratoires, Combourg,

France). *Listeria* spp. identification was based on cell morphology, Gram staining, catalase and oxidase activities, motility at 25 and 37°C , growth at 35°C , acid from glucose, H_2S production, and anaerobic production of gas. Isolates confirmed as *Listeria* were further examined as follows: beta-hemolysis production on sheep erythrocytes; nitrate reduction; acid production from D-glucose, D-xylose, D-mannitol, L-rhamnose, and α -methyl-D-mannoside; methyl red reaction; indole production; and triple sugar iron agar reactions. These isolates were also subjected to the CAMP test with *S. aureus* and *Rhodococcus equi* and the Voges-Proskauer test.

Motile *Aeromonas* isolation was performed from serial 10-fold dilutions of the rinse that had been surface spread directly on starch ampicillin agar plates (34) and incubated at 28°C for 24 h. Amilase-producing colonies were Gram stained and examined as follows: motility; oxidase and catalase activities; fermentation of glucose; resistance to vibriostatic agent O/129; indole production; gas from glucose; Voges-Proskauer test; L-arginine hydrolysis; lysine and ornithine decarboxylase activities; esculin hydrolysis; susceptibility to cephalotin; methyl red test; acid from m-inositol, L-arabinose, lactose, D-mannitol, salicin, D-sucrose, D-rhamnose, and D-sorbitol; gelatinase and elastase activities; and beta-hemolysis on sheep blood agar plates as described elsewhere (25). Species assignment was based on schemes for the differentiation of *Aeromonas* spp. (1, 30) as well as on key properties of the following *Aeromonas* spp.: *A. bestiarum*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, and *A. eucrenophila*.

Coagulase-positive staphylococci were enumerated on Baird-Parker agar base with Rabbit Plasma Fibrinogen (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Representative colonies were picked and subjected to the following confirmatory tests: Gram staining, catalase and oxidase activities, lysostaphin sensitivity, and anaerobic glucose fermentation. Staphylococcal strains were further tested for coagulase and thermonuclease activities and hemolytic activity as described by García et al. (21).

PCR assays. The target genes investigated in this study and the primers used for PCR assays are listed in Table 1.

PCR detection of virulence-associated genes (Table 1) was performed with rinses or isolates. Rinse aliquots were enriched in Trypticase soy broth (Becton-Dickinson S.A., Madrid, Spain) plus 0.6% yeast extract (TSBYE) according to Wang et al. (43). Briefly, 10-ml rinses were inoculated in 90 ml of TSBYE and incubated at 30°C overnight (16 to 18 h) with constant shaking (150 rpm). An aliquot of 1 ml was taken from the upper phase and centrifuged at $9,000 \times g$ for 10 min. The pellet was washed three times with phosphate-buffered saline (Oxoid) and resuspended in 500 μl of a mixture of water and 1% Triton X-100 (Sigma, Barcelona, Spain), and DNA was extracted by a boiling procedure (36).

Genomic DNA was extracted from exponential cultures of the organisms in TSB (Oxoid) as previously described. Furthermore, a DNA control was obtained from reference strains, and there was correspondence between the controls and the tested microorganism. Reference strains were *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis CECT (Spanish Type Culture Collection) 545; *E. coli* CECT 4267; *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* CECT 4315; *L. monocytogenes* CECT 4032; *Aeromonas hydrophila* AH 154 (41); *S. aureus* CECT 976; *S. aureus* CECT 4459; *S. aureus* CECT 4465; *S. aureus* CECT 4466; and *S. aureus* CECT 5192.

The PCR mixture contained 5 μl of $10\times$ PCR buffer, 0.1 mM deoxynucleotide-triphosphate mix, 25 pmol of each primer solution, 0.8 U of DNA polymerase, 5 μl of the DNA template, and deionized water up to a final volume of 50 μl . PCR was performed in a Mastercycler Personal apparatus (Eppendorf-Neth-

TABLE 1. PCR primers, annealing temperatures, and expected PCR products for virulence-associated genes

Bacteria	Target gene	Primer sequences (5'-3')	Annealing temp (°C)	Produced amplicon length (bp)	Reference
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTCCGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	60	284	37
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yst</i>	CTGTCTTCATTTGGAGCATTC GCAACATACATCGCAGCAATC	55	159	28
STEC ^a	<i>stx</i> ₁	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC CGTGGTATAGCTACTGTCCACC	55	302	8
STEC	<i>stx</i> ₂	CTTCGGTATCCTATTCCEGG CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	55	516	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	CGGAGGTTCCGCAAAAGATG CCTCCAGAGTGATCGATGTT	58	234	19
<i>L. monocytogenes</i>	<i>iap</i>	CAAACCTGCTAACACAGCTACT TTATACGCGACCGAAGCCAAC	58	660	11
Motile <i>Aeromonas</i>	<i>aerA</i>	GC (A/T) GA (A/G) CCC (A/G) TCTATCC (A/T) G TTTCTCCGGTAAACAGGATG	55	252	41
Motile <i>Aeromonas</i>	<i>hlyA</i>	GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG GGCGGCGCCGGACGAGACGGG	62	597	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>sea</i>	ACGATCAATTTTTACAGC TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	57	544	38
<i>S. aureus</i>	<i>seb</i>	GAATGATATTAATTCGCATC TCTTTGTGCGTAAGATAAACTTC	57	416	38
<i>S. aureus</i>	<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCCA	57	257	38
<i>S. aureus</i>	<i>sed</i>	TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT CCACCATAACAATTAATGC	57	334	38
<i>S. aureus</i>	<i>see</i>	ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA TAACTTACCGTGGACCC	57	170	38

^a STEC, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

eler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany). The reaction mixtures were subjected to PCR under the following conditions. First, there was an initial denaturation step at 94°C for 3 min, which was followed by 30 cycles of denaturation at 92°C for 30 s, primer annealing for 30 s (annealing temperatures are indicated in Table 1), and then extension at 72°C for 1 min. After the last amplification cycle, samples were subjected to a final extension at 72°C for 1.5 min. Aliquots from amplification reactions were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and viewed, after ethidium bromide staining, under UV light.

Moreover, *Listeria* isolates were analyzed by a real-time PCR 5'-nuclease assay (42) that amplified a 113-bp amplicon target from the *hly* gene, as described by Nogva et al. (33). Consumables were purchased from Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Each reaction (total volume, 50 µl) included 5 µl of DNA and 25 µl of TaqMan Universal PCR master mix containing 10.5 pmol of each of the specific primers (forward primer, 5'-TGC AAG TCC TAA GAC GCC A-3'; reverse primer, 5'-CAC TGC ATC TCC GTG GTA TAC TAA-3') and 0.2 µM of the fluorogenic TaqMan probe (5'-CGA TTT CAT CCG CGT GTT TCT TTT CG-3'). Thermal cycling conditions included an initial activation at 50°C for 2 min and then at 95°C for 10 min. This was followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and then annealing and extension at 60°C for 1 min. Reactions were performed in the ABI-PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

RESULTS

Table 2 shows the prevalence of *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Listeria* spp., *Aeromonas* spp.,

and *S. aureus* in rabbit meat, as well as their genotypes and the prevalence of virulence-associated genes (*invA*, *stx*₁, *stx*₂, *yst*, *hly*, *iap*, *aerA*, and *hlyA*) in nonselective enriched rinse cultures.

Although four strains were identified as *Salmonella* by the API 20E system, they could not be assigned to this genus on the basis of phenotypic traits and the Vitek system. These isolates did not harbor the *invA* gene, which was also not detected in any of the nonselective enriched rinses. Four samples yielded sorbitol and β-glucuronidase-negative *E. coli stx*₁⁻/*stx*₂⁻ strains. Both genes were also absent in the nonselective enriched rinses. Two carcasses from the large abattoir carried *Y. enterocolitica yst*⁻. The *yst* gene was detected in nonselective enriched rinses from two other carcasses of the same origin, but viable *Y. enterocolitica* cells could not be recovered. Seven strains, from the same number of samples, belonged to the genus *Listeria*. Of them, three were *L. monocytogenes hly*⁺/*iap*⁺. Three other strains, which were *hly*⁻/*iap*⁻, matched the description of either *Listeria seeligeri* (two strains) or *Listeria ivanovii* (one strain); the remaining strain was identified as *Listeria innocua*. Five of the *Listeria* isolates were recovered from samples at the retail level.

The contamination rate for motile *Aeromonas* (average count, 1.77 ± 0.62 log CFU/g) was 35.3%, even though the genes *aerA* and *hlyA* were detected in ca. 90% of the nonselective enrichments. Most of the *Aeromonas* strains

TABLE 2. Prevalence of bacterial foodborne pathogens and some virulence-associated genes on rabbit meat samples

Genera and species	Isolates			Nonselective enriched samples		
	Re-covered	Genotype	Prevalence (%)	Genes	Positive	Prevalence (%)
<i>Salmonella</i>	0		<2.0	<i>invA</i>	0	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0		<2.0	<i>stx₁/stx₂</i>	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	<i>yst⁻</i>	3.9	<i>yst^a</i>	2	3.9
<i>Listeria</i> species	7		13.7			
<i>L. monocytogenes</i>	3	<i>hly⁺/iap⁺</i>	5.9	<i>hly/iap</i>	3	5.9
<i>L. seeligeri</i>	2	<i>hly⁻/iap⁻</i>	3.9			
<i>L. ivanovii</i>	1	<i>hly⁻/iap⁻</i>	2.0			
<i>L. innocua</i>	1	<i>hly⁻/iap⁻</i>	2.0			
<i>Aeromonas</i> species	18		35.3			
<i>A. hydrophila</i>	10	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	19.6	<i>aerA/hlyA</i>	39	76.5
<i>A. caviae</i>	1	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	2.0	<i>aerA</i>	3	5.9
<i>A. caviae</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁺</i>	2.0	<i>hlyA</i>	4	7.8
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	1	<i>aerA⁺/hlyA⁺</i>	2.0			
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁺</i>	2.0			
<i>A. popoffii</i>	2	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	3.9			
<i>A. schubertii</i>	1	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	2.0			
Unidentified	1	<i>aerA⁻/hlyA⁻</i>	2.0			
<i>Staphylococcus aureus</i>	27		52.9	ND ^b		
<i>S. aureus</i>	2	<i>seb⁺</i>	3.9			
<i>S. aureus</i>	2	<i>sec⁺</i>	3.9			
<i>S. aureus</i>	23	<i>sea⁻/seb⁻/sec⁻/sed⁻/see⁻</i>	45.1			

^a Negative by culturing.

^b ND, not determined.

were *A. hydrophila aerA⁺/hlyA⁺*. Strains belonging to *Aeromonas caviae*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas schubertii*, and the two biovars of *Aeromonas veronii* were also isolated. The prevalence of *S. aureus* contamination (average count, 1.37 ± 0.79 log CFU/g) was 52.9%. Among the 27 *S. aureus* isolates, two harbored the gene for staphylococcal enterotoxin B (*seb*), and two harbored the gene for staphylococcal enterotoxin C (*sec*). Motile aeromonads species were equally recovered from samples of all origins, whereas the majority of *S. aureus*-contaminated samples (20 of 27) were from supermarkets.

DISCUSSION

The reported prevalence of pathogens such as *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 in raw meat varies considerably, depending on the meat species as well as on its processing and origin. Contamination of carcasses and cuts by these types of bacteria depends on their prevalence and numbers on the hide, fleece, pelt, or feathers and in the gastrointestinal tract. Contamination is also significantly affected by the degree of cross-contamination occurring from these and environmental sources during slaughter and subsequent processing.

Salmonella remains a major cause of foodborne disease in humans worldwide. It can also cause infections in commercial rabbits, with young rabbits and pregnant does being the most susceptible. The majority of rabbit salmonellosis outbreaks in Spain are associated with *Salmonella* Typhimurium or Enteritidis (39). A limited number of surveys suggest that less than 1% of healthy rabbits at the abattoir

are positive for *Salmonella* on the basis of fecal samples (10, 12). This study did not detect *Salmonella* on rabbit carcasses and cuts (prevalence, <2%), which is in agreement with data found in Australia (9) and Tunis (6). In Egypt, Khalafalla (29) reported a prevalence of 5% (*Salmonella* Typhimurium) at the retail level, and in Italy, Cerone et al. (13) recovered *Salmonella* (serovar Blockley and a nontypeable strain) from 3 of 369 carcasses (<1%).

E. coli O157:H7 is another important human pathogen that is associated with hemorrhagic colitis and the more severe complication of hemolytic uremic syndrome, the leading cause of acute renal failure in children. Although cattle are thought to be the main reservoir of this bacterium and other Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), STEC strains have also been isolated from other domestic animals and wildlife (31). The rates of STEC contamination in rabbit meat are not known, but García and Fox (20) found that 25% of Dutch Belted and 9% of New Zealand White rabbits harbored *stx₁⁺* *E. coli* O153:H⁻ or O153:H7 in their feces. Contact with wild rabbit feces was identified as the source of a Stx-producing *E. coli* O157:H7 strain that was isolated in an outbreak of hemorrhagic diarrhea and hemolytic uremic syndrome. Apparently, rabbits carried the strain from a cattle farm to recreational areas by their consumption of contaminated herbage (35). Although the above authors concluded that rabbits could be a new reservoir or vector of STEC and posed a zoonotic risk for humans, neither the STEC strains nor the *stx* genes were detected in the samples.

On the basis of the amplification of the *yst* gene, two

of the rabbit carcasses were positive for *Y. enterocolitica*, although they were negative by the culture method. Our inability to isolate viable *Y. enterocolitica* cells from the PCR-positive samples may indicate low initial numbers or dead or sublethally injured cells. The isolated *Y. enterocolitica* strains were apparently nonpathogenic, because they did not carry the *yst* gene, which was also absent in the enriched broths from which they were obtained. The surveys that exist regarding the occurrence of *Y. enterocolitica* on rabbit meat have not detected this bacterium (9, 13, 29). *Y. enterocolitica* is a ubiquitous microorganism that can be isolated frequently from the environment, wild and domestic animals, and a variety of foods. The association of human illness with the consumption of *Y. enterocolitica*-contaminated foods and untreated water is well documented, but most isolates from nonclinical specimens are nonpathogenic. The virulence of this bacterium is complex and is related to plasmid-borne and chromosomal genes. The *yst* gene, which encodes the heat-stable enterotoxin Yst, is often responsible for virulence of chromosomal origin. Because Yst production is largely restricted to invasive strains (the classical pathogenic biovars of *Y. enterocolitica*), the *yst* gene is considered a useful virulence marker (17).

Numerous studies have been conducted to determine the prevalence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in raw meat. Farber and Peterkin (15) summarized many reports on beef, lamb, pork, horse, and goat meats in which the prevalence of *Listeria* ranged from 0 to 100%, with *L. monocytogenes* ranging from 0 to 65%. Overall, minced raw meats showed the highest prevalence. The rates of *Listeria* and *L. monocytogenes* in this study were 13.7 and 5.9%, respectively, but when they were analyzed with respect to the distribution of their origin, the prevalence of *Listeria* was much higher in retail cuts and carcasses than in 24-h postmortem carcasses (18.5 versus 8.3%). These data compare well with those from Khalafalla (29), who did not find *Listeria* spp. on freshly slaughtered rabbit carcasses but did find them at the retail level, with the prevalence of *L. monocytogenes* being 10%. It appears that *Listeria* spp. enter rabbit meat during cutting and packaging rather than being initially present. Genigeorgis et al. (22) demonstrated that handling during packaging with subsequent storage at refrigeration temperatures, regardless of whether handlers wore gloves or not, significantly increased *Listeria* detection in poultry meat. It is also of concern that *L. monocytogenes* can establish itself within food-processing environments as an in-house bacterium (15).

Aeromonas occupied the fourth place among causes of total gastrointestinal diseases reported in Spain in 2002 (3). *Aeromonas* spp. are primarily aquatic organisms that are frequently found in raw and minced meats, poultry, and offal (32). Of all the rabbit meat samples tested, 46 (90.2%) yielded PCR-positive results for one or both hemolytic genes, and 18 (35.3%) yielded detectable numbers of motile aeromonads, with 83.3% of the isolates being *aerA*⁺ and/or *hlyA*⁺. This prevalence of aeromonads harboring virulence associated genes is similar to the 82% reported by Bin Kingombe et al. (7) for 45 meat isolates (beef, pork, and minced meat).

Although the phenotypic identification of *Aeromonas* strains to the species level is considered difficult because of the lack of clear biochemical schemes and the poor characterization of newly described species, all but one of the isolates in our study could be satisfactorily identified to the species level by phenotypic traits. The majority of strains were *A. hydrophila aerA*⁺/*hlyA*⁺. Heuzenroeder et al. (27) found that the genotype *aerA*⁺/*hlyA*⁺ was a reasonable predictor of human diarrhea when present in *A. hydrophila*. This species, along with *A. caviae* and the *A. veronii* biovar *sobria*, which were also found, accounts for more than 85% of the gastroenteritis-associated isolates (30). Overall, the intestinal carriage of this organism in food animals cannot explain the high prevalence of *Aeromonas* on meat, and the water used in washing has been considered the most likely source. However, because aeromonads can form biofilms, they can become endemic in slaughterhouses and other processing environments (23). The high prevalence of aeromonad virulence-associated genes in carcasses and cuts and the isolation of potentially pathogenic *Aeromonas* strains may indicate that rabbit meat can act as a possible vehicle for the dissemination of *Aeromonas* gastroenteritis.

S. aureus was the most prevalent of the foodborne pathogenic bacteria we investigated (52.9%). Humans who contaminate foods during preparation are the main reservoir of strains involved in staphylococcal food poisoning, but live food animals, often colonized with staphylococci, can be an important source of *S. aureus*. This bacterium may also be introduced by contact surfaces and equipment and utensils used in food processing. Therefore, contamination of raw meat with low numbers of *S. aureus* is common and not always related to human contamination. In rabbits, *S. aureus* is not only responsible for a number of diseases in does and young rabbits but can also be isolated in up to 100% of animals in rabbitries that show no chronic problems of staphylococcosis infection. The ears and perineum appear to be the predominant sites of colonization (26). Although the cell populations of *S. aureus*, which is a poor competitor on raw meat, were usually low and only 14.8% of the isolates harbored genes encoding for the classical enterotoxins studied, its widespread presence suggests that rabbit meat is a potential source of this bacterium.

In conclusion, although further microbiological studies are needed to determine the prevalence and risk of foodborne pathogens in rabbits and rabbit meat, our data and most of the limited information to date suggest that some zoonotic agents occurring in livestock are not frequently found in rabbit meat. However, as in other raw meats, *S. aureus* from different origins and pathogenic bacteria from the environment can enter carcasses and cuts. Human illnesses may result from the handling of contaminated raw meat, the insufficient cooking of meat, and the cross-contamination of ready-to-eat foods.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish CICYT (projects AGL2000-0485-P4-02 and AGL2004-04672-ALI). J. M. Rodríguez-Calleja was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (project AGL2000-1159).

REFERENCES

1. Abbott, S. L., W. K. W. Cheung, and J. M. Janda. 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41:2348–2357.
2. Anonymous. 1991. Council Directive 91/495/EEC of 27 November 1990 concerning public health and animal health problems affecting the production and placing on the market of rabbit meat and farmed game meat. *Off. J. Eur. Community L* 228, 24/09/1991:41–55.
3. Anonymous. 2003. Epidemiological comment about obligatory statement diseases and system of microbiological information. Spain. Year 2002. *Bol. Epidemiol. Sem.* 11:157–158.
4. Anonymous. 2004. Corrigendum to Regulation (EC) 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin (OJ L 139, 30.4.2004). *Off. J. Eur. Union L* 226, 25/06/2004:0022–0082.
5. Anonymous. 2004. Corrigendum to Regulation (EC) 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption (OJ L 139, 30.4.2004). *Off. J. Eur. Union L* 226, 25/06/2004:0083–0127.
6. Ben Jaafar, K., M. Jiridi, M. Fodha, and I. Salem. 2002. Study of *Salmonella* contamination of restaurant meat products collected over a period of one year. *Tunis. Med.* 80:207–213.
7. Bin Kingombe, C. I., G. Huys, M. Tonolla, M. J. Albert, J. Swings, R. Peduzzi, and T. Jemmi. 1999. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5293–5302.
8. Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M. P. Alonso, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardes, and J. Blanco. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ε*). *J. Clin. Microbiol.* 42:645–651.
9. Bobbitt, J. 2002. Shelf life and microbiological safety of selected new and emerging meats destined for export markets. Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Pub. 02/038. Available at: <http://www.rirdc.gov.au/reports/NAP/02-038.pdf>. Accessed 15 July 2005.
10. Bonardi, S., G. Pizzin, R. Ridolfini, and G. Antignano. 1999. Isolation of *Salmonella enterica* serotype Brancaster from slaughtered rabbits. Available at: <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bonardi/bonardi.htm>. Accessed 15 July 2005.
11. Bubert, A., S. Koehler, and W. Goebel. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus and species specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2625–2632.
12. Catellani, P., C. Malocco, and M. Rasetti. 1999. Possible role of breed rabbits as asymptomatic carriers of *Salmonella* spp. at slaughterhouse. *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.* LIII:321–322.
13. Cerrone, A., F. Mariani, M. Ciabrelli, G. Galiero, E. De Carlo, A. Fioretti, A. Baiano, and M. Bartoli. 2004. A survey of zoonotic agents in Italian rabbit slaughterhouses. Proceedings of 8th World Rabbit Congress, Puebla City, Mexico. Available at: <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>. Accessed 12 July 2005.
14. Dalle Zotte, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest. Prod. Sci.* 75:11–32.
15. Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1999. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products, p. 505–564. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, listeriosis, and food safety, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
16. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2005. FAOSTAT agriculture data. Available at: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>. Accessed 11 November 2005.
17. Fredriksson-Ahomaa, M., and H. Korkeala. 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 220–229.
18. Fukushima, H. 1985. Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:710–712.
19. Furrer, B., U. Candrian, C. Hoefelein, and J. Luethy. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of hemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.* 70:372–379.
20. García, A., and J. G. Fox. 2003. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1592–1597.
21. García, M. L., B. Moreno, and M. S. Bergdoll. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:548–553.
22. Genigeorgis, C. A., D. Dutulescu, and J. F. Garayzabal. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Prot.* 52:618–624.
23. Gill, C. O., and T. Jones. 1995. The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at 2 pig slaughtering plants. *Food Microbiol.* 12:135–141.
24. González, C. J., T. M. López-Daz, M. L. García-López, M. Prieto, and A. Otero. 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Exox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62:1270–1277.
25. González-Rodríguez, M. N., J. A. Santos, A. Otero, and M. L. García-López. 2002. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold-smoked freshwater fish. *J. Appl. Microbiol.* 93:675–680.
26. Hermans, K., P. De Herdt, L. A. Devriese, W. Hendrickx, C. Godard, and F. Haesebrouck. 1999. Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet. Microbiol.* 67:37–46.
27. Heuzenroeder, M. W., C. Y. F. Wong, and R. L. P. Flower. 1999. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:131–136.
28. Ibrahim, A., W. Liesack, and E. Stackebrandt. 1992. Polymerase chain reaction—gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 30:1942–1947.
29. Khalafalla, F. A. 1993. Microbiological status of rabbit carcasses in Egypt. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch.* 196:233–235.
30. Kirov, S. M. 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, p. 301–327. In M. P. Doyle, L. R. Beachat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
31. Meng, J., P. Feng, and M. P. Doyle. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*, p. 331–341. In F. P. Downes and K. Ito (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
32. Neyts, K., G. Huys, M. Uyttendaele, J. Swings, and J. Debevere. 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:359–363.
33. Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, and D. Lillehaug. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4266–4271.
34. Palumbo, S. A., F. Maxino, A. C. Williams, R. L. Buchanan, and D. W. Thayer. 1985. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1027–1030.
35. Pritchard, G. C., S. Williamson, T. Carson, J. R. Bailey, L. Warner, G. Willshaw, and T. Cheasty. 2001. Wild rabbits—a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.* 149:567.
36. Rådström, P., P. Wolffs, R. Knutsson, V. Kmet, B. Malorny, and P. T. Tassios. 2005. Guideline for the purification of bacterial DNA for use in the polymerase chain reaction (FOOD-PCR, Workpackage 1, Task 1.1); 2.3.1.—Thermal cell disruption from pure broth cultures (“boiling method”). Available at: http://www.pcr.dk/guideline_for_the_purification_o.htm. Accessed 11 November 2005.
37. Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss III, and C. L. Gyles. 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.

J. Food Prot., Vol. 69, No. 4

FOODBORNE PATHOGENS IN RABBIT MEAT

38. Rosec, J. P., and O. Gigaud. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77:61–70.
39. Rosell, J. M. 2000. Enfermedades del conejo. Mundi-Prensa, Madrid.
40. Ryser, E. T., and C. W. Donnelly. 2001. *Listeria*, p. 343–356. In F. P. Downes and K. Ito (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
41. Santos, J. A., C. J. Gonzalez, A. Otero, and M. L. García-López. 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5612–5614.
42. Vishnubhatla, A., D. Y. Fung, R. D. Oberst, M. P. Hays, T. G. Nagaraja, and S. J. Flood. 2000. Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4131–4135.
43. Wang, R.-F., W.-W. Cao, and C. E. Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83:727–736.
44. Weagant, S. D., and P. Feng. 2001. *Yersinia*, p. 421–428. In F. P. Downes and K. Ito (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
45. Wong, C. Y. F., M. W. Heuzenroeder, and R. L. P. Flower. 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology (UK)* 144:291–298. **8g**

CAPÍTULO 4.-

TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE CARNE DE CONEJO ALMACENADA A REFRIGERACIÓN



▪	Introducción_____	97
▪	Material y Métodos_____	100
▪	Resultados_____	103
▪	Discusión_____	110
▪	<i>Artículo original: “Molecular and phenotypic typing of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from rabbit meat”</i> _____	116a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col. 2006. Molecular and phenotypic typing of Staphylococcus aureus isolates from rabbit meat. "Research in Microbiology", artículo en prensa (resmic2413), doi: 10.1016/j.resmic.2005.11.011.*

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria que, por su gran capacidad de colonización, frecuentemente puede encontrarse en diferentes partes del cuerpo humano y de los animales homeotermos, e incluso en el equipo de la industria alimentaria. Los miembros de esta especie son importantes agentes de patologías asociadas a la producción de un considerable número de compuestos extracelulares como hemolisinas, enterotoxinas, coagulasas, nucleasas y lipasas. La producción de las enzimas coagulasa y nucleasa termoestable se utiliza como indicador de patogenicidad, y también es útil para su identificación. La intoxicación estafilocócica está originada por enterotoxinas, algunas de ellas bien conocidas y caracterizadas (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE), otras recientemente descritas (SEG, SEH, SEI, SEJ) y un tercer grupo cuya posible existencia se ha puesto de manifiesto tras la publicación del genoma completo de *S. aureus* (Kuroda y col., 2001).

En las explotaciones de conejos, *S. aureus* se ha asociado con dos tipos de patologías, uno originado por cepas poco virulentas, que afectan a un pequeño número de animales, y otro debido a cepas muy virulentas. Se ha observado que, en Europa, la mayoría de las últimas cepas pertenecen a un fenotipo concreto "biotipo NHS CV:C-fagotipo 3A/3C/55/71" (Devriese, 1990; Hermans y col., 1999; Hermans y col., 2003).

Para los estudios epidemiológicos de cepas de *S. aureus* aisladas de los alimentos y de muestras clínicas son útiles las técnicas de fenotipado y de genotipado, principalmente: (1) el biotipado, que se ha utilizado desde la década de los 70 y emplea pruebas basadas en la actividad metabólica de *S. aureus*; (2) el fagotipado, fundamentado en la susceptibilidad de las bacterias a determinados virus (bacteriófagos) que determinan patrones de infección característicos; (3) la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos, que origina un perfil o antibiograma característico de la cepa estudiada; (4) la tipificación por electroforesis en gel de campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis”, PFGE), considerada actualmente como la técnica estándar para la tipificación bacteriana, mediante la cual los fragmentos de DNA obtenidos por la restricción mediada por endonucleasas son separados por su tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa sometido a un campo eléctrico de polaridad cambiante; (5) la técnica de análisis de perfiles del DNA por amplificación aleatoria (“Random Amplified Polymorphic DNA”, RAPD), en la que mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”, PCR), y utilizando pequeños cebadores de unos 10 nucleótidos que se unen al azar, se determinan patrones de bandas de DNA característicos para cada cepa; (6) la tipificación mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de los genes que codifican para el RNA ribosomal (ribotipado), en la que las cepas se caracterizan tras digerir el DNA bacteriano mediante una endonucleasa, separando los fragmentos de restricción obtenidos en una electroforesis en gel de agarosa para, finalmente, transferirlos a una membrana de nitrocelulosa (“blotting”) e hibridarlos con una sonda (RNA ribosomal) para su detección.

Además de estos seis procedimientos, para la tipificación bacteriana pueden emplearse otros, como el análisis de plásmidos, otras técnicas basadas en PCR, la determinación de los perfiles de proteínas y ácidos grasos, y la secuenciación.

El objetivo de este capítulo ha sido determinar el posible origen y la diversidad de cepas de *S. aureus* aisladas de canales y cortes de conejo de distinto origen, utilizando para su caracterización:

- a) tres sistemas fenotípicos (sensibilidad a antibióticos, fagotipificación y biotipificación) y,
- b) tres sistemas moleculares (PFGE, RAPD y ribotipado).

Material y Métodos

Un total de 26 cepas de *S. aureus* se aislaron de muestras de carne de conejo, producidas en mataderos geográficamente distanciados (provincias de Segovia, Valladolid, León y Orense), según se describe en el artículo anexo a este capítulo. El aislamiento y la caracterización fenotípica y mediante la técnica de PCR de estas cepas se detalla en el capítulo 3.

En el artículo anexo se describen los procedimientos que se utilizaron para la tipificación de las cepas de *S. aureus* y cuyas etapas básicas se resumen a continuación:

- La PFGE se realizó a partir del DNA de cada cepa, obtenido intacto según Bannerman y col. (1995), digerido con la enzima de restricción *Sma*I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), resolución mediante electroforesis pulsada en gel de agarosa (1%) con un aparato CHEF-DR III (Biorad, Madrid, España) y exposición a la luz ultravioleta una vez teñido el DNA con bromuro de etidio.
- La obtención del DNA molde para el método RAPD se realizó según el protocolo descrito por Johnson y Tyler (1993) que emplea lisostafina (100 µg/ml) y SDS (1%). La purificación del DNA se realizó con el *kit* comercial “Genomic Blood DNA purification” (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania). El *kit* de RAPD utilizado fue “Ready-To-Go RAPD Analysis Beads kit” (Amersham Biosciences Europe), utilizando el cebador RAPD 4M: 5'-AAG ACG CCG T-3' (Hermans y col., 2000). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador “Mastercycler Personal” (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburgo, Alemania) y la posterior electroforesis en gel de agarosa (2%).

- Para el análisis por ribotipado se utilizó un sistema automatizado (RiboPrinter Microbial Characterization System, DuPont Qualicon, Wilmington, DC, USA) y la enzima de restricción *EcoRI*.

En estos tres sistemas de tipificación, las imágenes de los patrones de bandas obtenidos fueron tomadas y analizadas mediante el programa EDAS 290 (Kodak Co., Rochester, NY, USA). Los correspondientes dendrogramas se prepararon mediante el procedimiento de conglomeración intergrupos y empleando los coeficientes de similitud de Dice (ribotipado y PFGE) o Jaccard (RAPD) utilizando el software SPSS v.12.0.1. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Tanto para el método RAPD como para el ribotipado, se formaron grupos con un índice de similitud ≥ 90 %. En el caso de los patrones de bandas por la técnica de PFGE, se consideraron grupos o tipos aquéllos en los que no existían más de tres fragmentos de variación (representados con letra mayúscula en las secciones de Resultados y Discusión de este capítulo) mientras que los subgrupos o subtipos presentaban diferencias de uno a tres fragmentos (designados con letra mayúscula y un número) todo ello según Tenover y col. (Tenover y col., 1995).

- El biotipado se basó en el esquema de Devriese (1984), y conllevó la determinación de estafiloquinasa (K), β -hemólisis (β), coagulación de plasma bovino y tipo de crecimiento típico en agar cristal violeta (CV). Este sistema permite diferenciar entre ecovares de hospedador específico (humano, humano β +, pollo, bovino y ovino) y cinco diferentes biotipos sin hospedador específico (NHS).

- La tipificación mediante bacteriófagos se realizó en el Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Madrid), con el conjunto internacional de 23 bacteriófagos para cepas de *S. aureus* de origen humano. Las cepas no tipificadas de esta manera se sometieron a fagotipificación inversa (de Saxe y Notley, 1978).
- En las pruebas de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos se empleó el método de difusión en disco, según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (García Rodríguez y col., 2000), utilizando los siguientes compuestos: azitromicina (AZM), levofloxacin (LEV), penicilina (P), ciprofloxacina (CIP), lomefloxacina (LOM), rifampicina (RD), claritromicina (CLR), nitrofurantoína (F), teicoplanina (TEC), clindamicina (DA), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), ofloxacina (OFX), trimetoprim (W), eritromicina (E), oxacilina (OX), gentamicina (GN), y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

La capacidad discriminante de cada método fue establecida mediante el índice de poder discriminante (Id) descrito por Hunter (1990). Según éste, la probabilidad de que dos cepas escogidas aleatoriamente entre una población de cepas, sin aparente relación, sean incluidas en diferentes grupos de tipificación se obtiene matemáticamente de la expresión siguiente:

$$Id = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s [x_j(x_j - 1)]$$

donde s es el número de tipos, x_j es el número de cepas que serán agrupados en cada uno de los j tipos y N es el tamaño de la población.

Resultados

Mediante el empleo de las técnicas de genotipificación se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.1, en la que se presenta también la capacidad discriminante de cada método empleado (valor Id).

- **PFGE.** La tipificación de las cepas de *S. aureus* estudiadas mediante este sistema presentó un valor Id (0.966) superior al obtenido con los restantes procedimientos utilizados. Se encontraron 19 patrones que mostraron al menos una banda de diferencia. Estos 19 patrones o pulsotipos se reducían a sólo diez grupos si se empleaba el criterio de Tenover y col. (1995), considerando diferentes los patrones que presentaban más de 3 bandas no comunes. Estos 10 grupos fueron identificados con las letras A a la J (tabla 4.1). El grupo mayor (A) estaba formado por seis subgrupos que, en conjunto, representaban más del 34% del total de cepas, y procedían de cuatro establecimientos. Otros dos agrupamientos (designados con las letras H e I) se conformaron incluyendo tres cepas cada uno, las cuales procedían de envases de carne de conejo obtenidos en dos de los establecimientos. También se establecieron dos grupos (B y D) con dos cepas cada uno, procedentes de diferentes centros de despiezado y procesado, y otro (designado como G) constituido por dos cepas, aisladas de carne obtenida en el matadero de pequeña capacidad, que resultaron ser idénticas. Las cuatro cepas restantes, procedentes de cuatro establecimientos diferentes, presentaron pulsotipos únicos (identificados como C, E, F y J).

- **RAPD.** El valor Id calculado fue de 0.877. El análisis del dendrograma obtenido, tomando como punto de corte la similitud al 90%, mostró nueve patrones diferentes (I-IX, tabla 4.1), reuniendo el mayor número de cepas los grupos VI (27%) y I (20%). La mayoría de los grupos contenían cepas idénticas o muy relacionadas (hasta tres bandas diferentes) a las agrupadas por pulsotipos.
- **Ribotipificación.** El coeficiente de discriminación Id fue menor que el obtenido con las otras dos técnicas de genotipificación (0.786). De forma análoga al procedimiento seguido para RAPD, se tuvo en cuenta un nivel de similitud $\geq 90\%$ que permitió diferenciar siete ribotipos diferentes (designados con los números 1 a 7, respectivamente, tabla 4.1), utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Los grupos más grandes y homogéneos fueron el 1 y el 6, cada uno de ellos compuesto por cepas idénticas. Al ribotipo 6 corresponden ocho de las cepas del pulsotipo A y la cepa SA121, única componente del pulsotipo C.

Tabla 4.1.- Resultados de la tipificación genética de 26 cepas de *S. aureus* aisladas en carne de conejo obtenida en cinco establecimientos diferentes.

ORIGEN ^a	CEPA	PFGE ^b	RAPD ^c	RT ^d
M3	SA41	A1	I	6
M3	SA29	A1	I	6
M3	SA31	A1	I	6
M3	SA40	A1	I	6
M2	SA84	A2	I	6
M5	SA123	A3	II	6
M5	SA124	A3	II	6
M5	SA122	A4	III	6
M1	SA59	A5	VIII	2
M2	SA115	A6	VII	2
M2	SA116	B1	VII	2
M1	SA58	B2	VIII	2
M5	SA121	C	III	6
M2	SA114	D1	IX	5
M3	SA50	D2	VI	4
M3	SA30	E	X	3
M2	SA49	F	VIII	1
M4	SA181	G1	V	1
M4	SA182	G1	V	1
M2	SA86	H1	VI	1
M3	SA11	H1	VI	1
M3	SA13	H2	VI	1
M2	SA87	I1	VI	1
M2	SA88	I1	VI	1
M3	SA12	I2	VI	1
M4	SA164	J	IV	7
Id^e		0.966	0.877	0.786

Cada color de letra representa un pulsotipo diferente

a, Origen: M1, canales enteras envasadas individualmente procedentes de matadero y planta de envasado (Orense); M2, canales enteras envasadas individualmente procedentes de matadero y planta de envasado (León); M3, bandejas de muslos procedentes de matadero y planta de procesado (Segovia); M4, canales enteras procedentes de matadero de pequeña capacidad (Ponferrada); M5, canales enteras procedentes de matadero industrial de gran capacidad (Valladolid);

b, PFGE: los grupos (letras mayúsculas) se diferencian en más de 3 fragmentos. Dentro de ellos, diferencias de 1 a 3 fragmentos se consideraron subtipos (números tras cada letra mayúscula);

c, RAPD: grupos (I a IX) con un índice de similitud $\geq 90\%$;

d, RT, Ribotipo: ribogrupos (1 a 7) con un índice de similitud $\geq 90\%$;

e, Id, Índice de discriminación.

La caracterización de las cepas estudiadas mediante las técnicas de **fenotipificación** dio lugar a los resultados que se presentan en la tabla 4.2, que muestra también el poder de discriminación de cada método utilizado (valor Id).

- **Biotipado.** La capacidad discriminante fue la menor de entre todas las técnicas utilizadas, con un coeficiente de discriminación de 0.644. Ninguna de las cepas fue encuadrada en los ecovares bovino, ovino o aviar. Once cepas presentaron características propias del ecovar humano y el resto pertenecían a biotipos NHS. De estas últimas cepas, 14 fueron NHS1 (K- β + CV:C) y una NHS5 (K- β - CV:C).
- **Tipificación por bacteriófagos.** El valor Id fue de 0.761. Empleando el fagotipado estándar, 17 cepas (66.7%) fueron lisadas por fagos de los Grupos II (8 cepas), III (5 cepas), I/III (2 cepa) y V (2 cepas). El patrón 3A/3C/55/71 fue común para todas las cepas del Grupo II. Utilizando el fagotipado inverso, otras 8 cepas fueron tipificadas (29.6%), siendo la mayoría sensibles a los fagos 47 (Grupo III), 1030 y W57, y perteneciendo siete de ellas al ecovar humano.
- **Susceptibilidad a antimicrobianos.** El poder discriminante calculado fue casi idéntico al obtenido en la tipificación por bacteriófagos (Id 0.763). Seis cepas fueron sensibles a todos los agentes antimicrobianos ensayados. Las cepas resistentes se agruparon en 6 patrones de resistencia, siendo los dos más frecuentes los de resistencia a la tetraciclina (11 cepas) y a la penicilina (4 cepas), respectivamente (figura 4.1). En total, el 11.5% de las cepas fueron resistentes a la tetraciclina y la penicilina, y el 76.9% lo fueron a la tetraciclina o la penicilina. No se encontró asociación entre el biotipo, el fagotipo y la resistencia a agentes antimicrobianos.

Tabla 4.2.- Resultados de la tipificación fenotípica de 26 cepas de *S. aureus* aisladas en carne de conejo obtenida en cinco establecimientos diferentes.

ORIGEN ^a	CEPA	Biotipado ^b	FG ^c	FT ^d	Resistencia a antimicrobianos ^e
M3	SA41	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	-
M3	SA29	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3C/55/55/71	TE
M3	SA31	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	TE/AZM/DA
M3	SA40	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	-
M2	SA84	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	-
M5	SA123	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	TE
M5	SA124	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	TE
M5	SA122	biotipo NHS K-β+CV:C	III	6/42E/47/53	TE/AZM
M1	SA59	ecovar humano β+	NT ^f	47/1030 ^f	TE
M2	SA115	ecovar humano β+	NT	47/W57 ^f	TE/P/E/CLR/AZM/DA
M2	SA116	ecovar humano	NT	47/1030/W57 ^g	TE/P/E/CLR/AZM/DA
M1	SA58	ecovar humano β+	NT	47/1030/W57 ^g	TE
M5	SA121	biotipo NHS K-β+CV:C	II	3A/3C/55/71	TE
M2	SA114	ecovar humano	NT	42E/47/1030/W57 ^g	TE/P
M3	SA50	ecovar humano	NT	NT ^g	-
M3	SA30	biotipo NHS K-β+CV:C	NT	47/1030/W57 ^g	P
M2	SA49	biotipo NHS K-β-CV:C	I/III	29/52/79/80/85	-
M4	SA181	biotipo NHS K-β+CV:C	V	94/96	P
M4	SA182	biotipo NHS K-β+CV:C	V	94/96	P
M2	SA86	ecovar humano β+	NT	47/1030 ^g	-
M3	SA11	ecovar humano β+	III	47/54/75	TE
M3	SA13	ecovar humano β+	III	54/81	TE
M2	SA87	biotipo NHS K-β+CV:C	III	47/53/75/77/83A/84/85	TE
M2	SA88	biotipo NHS K-β+CV:C	III	53/54/75/77/83A/84/85	TE
M3	SA12	ecovar humano β+	I/III	29/52/80/53/54/ 75/77/84/85	TE
M4	SA164	ecovar humano	NT	42E/1030/W57 ^f	P
Id^h		0.644	0.76		0.763

Cada color de letra representa un pulsotipo diferente

a, Origen: M1, canales enteras envasadas individualmente procedentes de matadero y planta de envasado (Orense); M2, canales enteras envasadas individualmente procedentes de matadero y planta de envasado (León); M3, bandejas de muslos procedentes de matadero y planta de procesado (Segovia); M4, canales enteras procedentes de matadero de pequeña capacidad (Ponferrada); M5, canales enteras procedentes de matadero industrial de gran capacidad (Valladolid);

b, Biotipado: Biotipo NHS K-β+CV:C: sin hospedador específico, estafiloquinasa-, β-hemólisis+, coagulación del plasma bovino en 6 h-, crecimiento en cristal violeta tipo C. Biotipo NHS K-β-CV:C: sin hospedador específico, estafiloquinasa-, β-hemólisis-, coagulación del plasma bovino en 6 h-, crecimiento en cristal violeta tipo C. Ecovar humano: estafiloquinasa+, β-hemólisis-, coagulación del plasma bovino en 6 h-, crecimiento en cristal violeta tipo C. Ecovar humano β+: estafiloquinasa+, β-hemólisis+, coagulación del plasma bovino en 6 h-, crecimiento en cristal violeta tipo C;

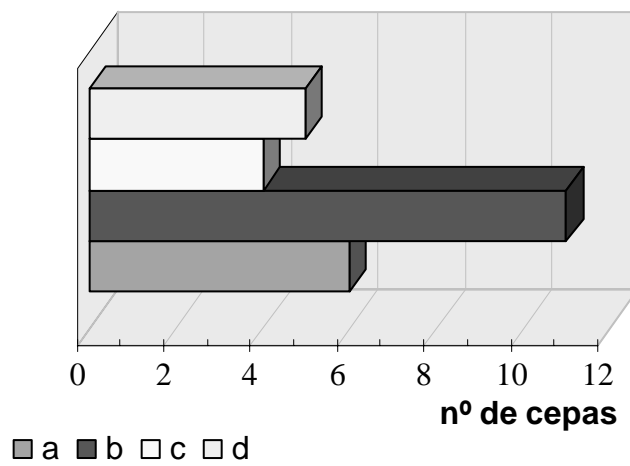
c, FG, Fagotipo; **d,** FT, Fagotipo;

e, Antibiotipo: -, sensible a todos los antibióticos ensayados; el resto, resistente/s al/los antibiótico/s indicado/s: azitromicina (AZM), levofloxacina (LEV), penicilina (P), ciprofloxacina (CIP), lomefloxacina (LOM), rifampicina (RD), claritromicina (CLR), nitrofurantoína (F), teicoplanina (TEC), clindamicina (DA), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), ofloxacina (OFX), trimetoprim (W), eritromicina (E), oxacilina (OX), gentamicina (GN), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT);

f, NT, no tipificable por fagotipificación directa; **g,** Reacción por tipificación inversa;

h, Id, Índice de discriminación.

Figura 4.1.- Distribución de 26 cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo según patrones de resistencia a diferentes antimicrobianos.



a, sensibilidad a todos los antimicrobianos probados

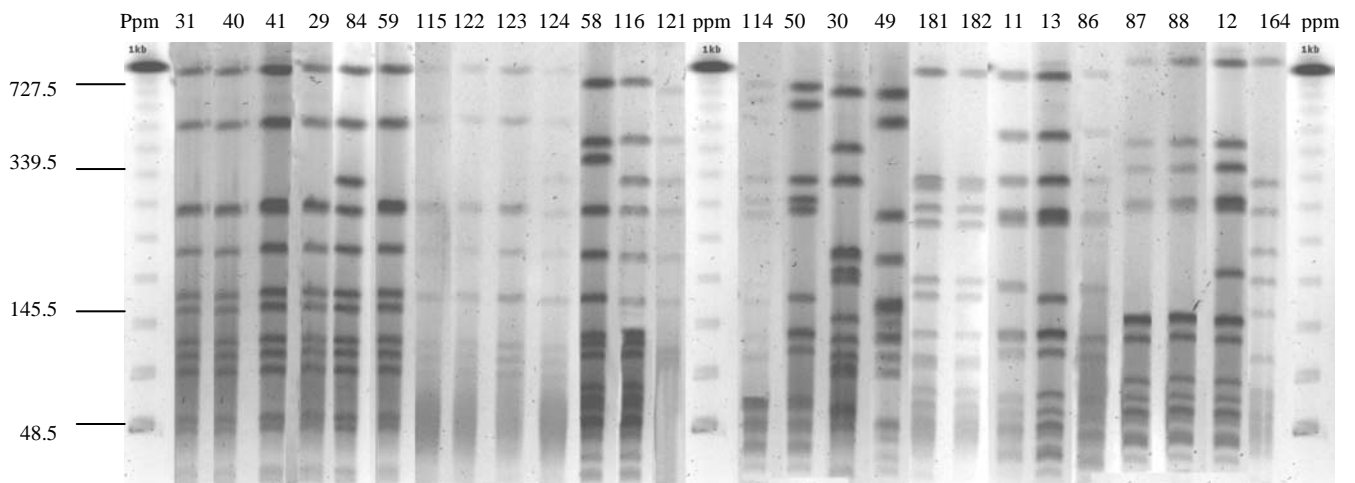
b, resistencia a TE (tetraciclina)

c, resistencia a P (penicilina)

d, resistencia a TE y otros antimicrobianos

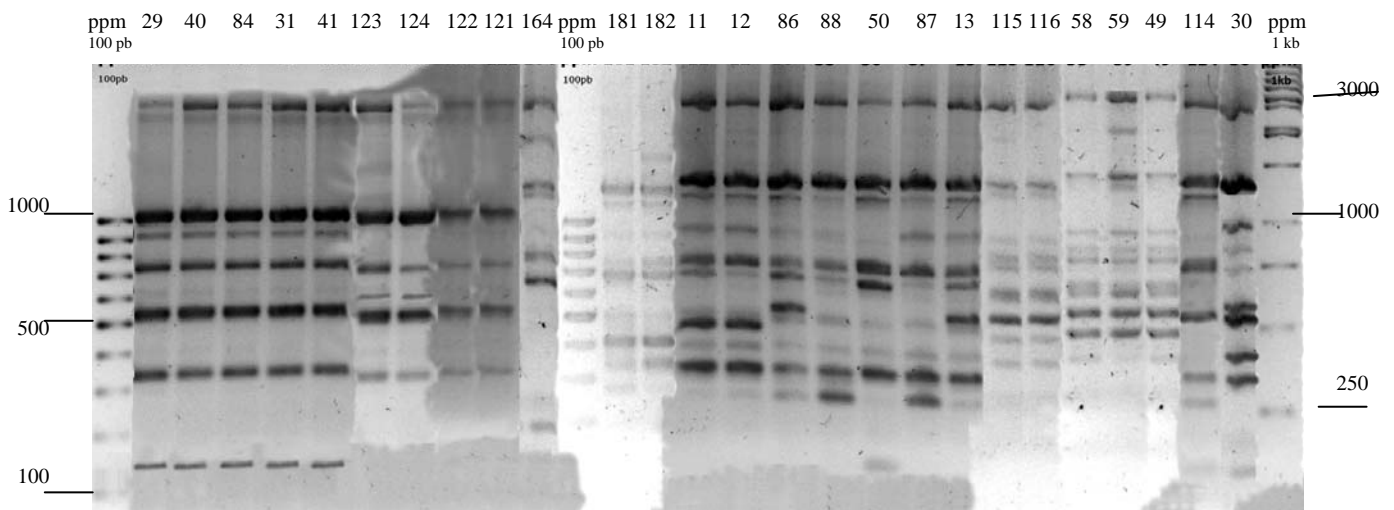
En las figuras 4.2, 4.3 y 4.4 se presentan los geles resultantes de los diferentes métodos de tipificación molecular empleados en este trabajo (PFGE, RAPD y Ribotipado), mostrándose, en cada caso, las cepas ordenadas según los tipos que se indican en la tabla 4.1.

Figura 4.2.- Patrones de bandas de 26 cepas de *S. aureus* obtenidos por PFGE.



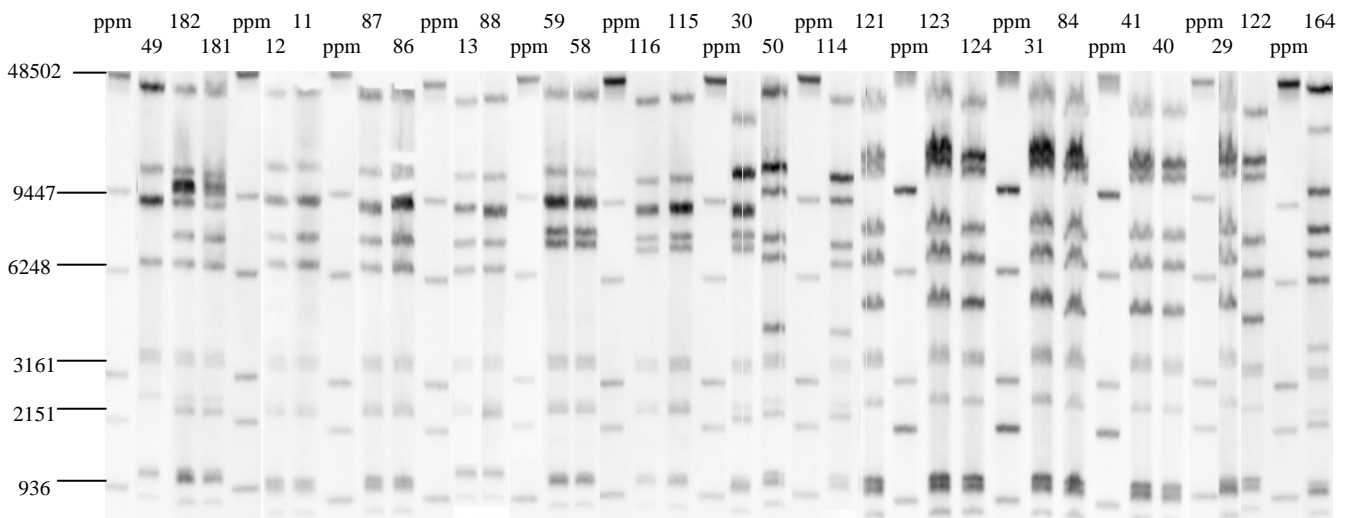
ppm, patrón de peso molecular formado por concatémeros del fago lambda de 48.5 kb (Biorad)

Figura 4.3.- Patrones de bandas de 26 cepas de *S. aureus* obtenidos por RAPD.



ppm 100 pb, patrón de peso molecular 1000-80 pares de bases (biotools)
ppm 1 kb, patrón de peso molecular 10000-500 pares de bases (biotools)

Figura 4.4.- Patrones de bandas de *S. aureus* obtenidos por Ribotipado (*EcoRI*).



Discusión

Durante muchos años, los estudios epidemiológicos realizados con cepas de *S. aureus* de diversos orígenes empleaban como herramienta básica los métodos fenotípicos, entre los que se encuentran los tres utilizados en este trabajo: fagotipificación, susceptibilidad a antimicrobianos y biotipificación. Estos sistemas, que utilizan exclusivamente pruebas fenotípicas para la caracterización de cepas, tienen limitaciones como son el bajo índice de discriminación y la baja reproducibilidad (Struelens, 1998; Swaminathan y Matar, 1993; Tenover y col., 1997). El bajo poder de discriminación se pone de manifiesto en este estudio a partir de los valores de Id obtenidos. Las limitaciones de los métodos fenotípicos impulsaron el desarrollo de métodos basados en el material genético de los microorganismos. Así se desarrollaron los métodos de PFGE, RAPD y ribotipificación. La técnica de PFGE, que ha sido propuesta como referencia para la tipificación de cepas clínicas de *S. aureus* (Bannerman y col., 1995), se considera una de las de mayor reproducibilidad y capacidad discriminante, hecho este último que también se pone de manifiesto a partir de los resultados obtenidos en este trabajo. Muchos estudios han comparado este sistema con otras técnicas para tipificar cepas de *S. aureus*, y se ha comprobado que es más eficaz que el RAPD y la ribotipificación (Grundmann y col., 2001; Grundmann y col., 2002; Martín y col., 2004; Sabour y col., 2004; Tenover y col., 1997). Otra ventaja es que existen guías de interpretación de los patrones obtenidos por PFGE (Tenover y col., 1995), lo que no sucede cuando se trata de analizar los patrones originados por RAPD y ribotipificación.

El examen de los patrones de bandas obtenidos por PFGE pone de manifiesto que cepas de *S. aureus* aisladas de muestras procedentes de diferentes establecimientos eran idénticas o genéticamente muy próximas (diferencias máximas de tres fragmentos), aunque también se encontraron diferentes tipos de *S. aureus* en muestras obtenidas en el mismo

establecimiento. Así, las cepas aisladas del pulsotipo A se encontraron en muestras de todos los establecimientos excepto uno. Otros pulsotipos (B, D, H e I) también fueron obtenidos a partir de muestras de más de un establecimiento. La presencia de cepas de *S. aureus* tan relacionadas entre sí en muestras obtenidas en áreas geográficas distantes sugiere la diseminación de clones entre las granjas de conejos y/o los centros de procesado. En explotaciones de vacuno está bien demostrada la tendencia a la diseminación de clones idénticos de *S. aureus* (Lange y col., 1999; Sabour y col., 2004). En conejos de varios países europeos, Devriese y col. (1981; 1987) identificaron a los reproductores introducidos en las explotaciones como el origen de un brote epidémico de estafilococosis por cepas de *S. aureus* que pertenecían al fenotipo específico y altamente virulento (biotipo NHS CV:C – fagotipo 3A/3C/55/71). El esperma, incluso en el caso de inseminación artificial, también contribuyó a la diseminación de estas cepas (Rossi y col., 1995), que hasta ahora únicamente se han aislado en granjas europeas de conejos afectados de estafilococosis crónicas (Hermans y col., 1999; Hermans y col., 2003). Es destacable el hecho de que ocho de nuestros aislados, siete del pulsotipo A (subtipos A1, A2 y A3), obtenidos de carne de conejo procesada en tres establecimientos, y la cepa posiblemente relacionada del pulsotipo C, mostraran el fenotipo virulento. Estas cepas se agruparon en el mismo ribogrupo y en tres patrones de RAPD diferentes. Las relaciones genéticas entre las cepas del fenotipo virulento observadas a partir de la tipificación por PFGE son destacables y confirman las hipótesis previas de Hermans y col. (1999; 2000) basadas en el biotipo, el fagotipo y los patrones de RAPD. Hay que hacer notar, sin embargo, que tres cepas del pulsotipo A (subtipos A4, A5 y A6) no presentaron el fenotipo virulento. En otros estudios (Schlichting y col., 1993), también se han detectado variaciones fenotípicas entre cepas pertenecientes a un mismo pulsotipo.

Es también interesante que algunos tipos de PFGE, como el A1, A3 e I1, estuvieran presentes en carne de conejo obtenida en diferentes días de muestreo. La persistencia en un establecimiento de cepas idénticas sugiere que la contaminación deriva de determinados clones de *S. aureus* presentes en el equipo. En algunos casos, las cepas aisladas pueden proceder de los propios animales pero un programa inadecuado de limpieza y desinfección exagera el problema al permitir a las bacterias colonizar el medio ambiente y el equipo de la industria. En mataderos de pollo, está bien demostrado que *S. aureus* puede colonizar determinadas partes de los equipos de procesado hasta llegar a convertirse en un problema endémico (Mead y Dodd, 1990).

El sistema de biotipado descrito por Devriese (1984) ha demostrado ser útil para establecer el origen de cepas de *S. aureus* aisladas tanto del hombre como de los animales, y también de alimentos (Aarestrup y col., 1995; Devriese, 1984; Devriese y col., 1985; Rodgers y col., 1999). Hennekine y col. (2003) determinaron que el 86% de las cepas de un mismo biotipo se agrupaban por PFGE. En nuestro estudio, las cepas idénticas por PFGE pertenecían al mismo biotipo pero el índice de discriminación de la biotipificación fue bajo ya que las cepas pertenecían sólo a los dos ecovares humanos o a dos biotipos NHS que, por otra parte, son los más frecuentemente encontrados en *S. aureus* aislados de conejos (Devriese, 1984; Vancraeynest y col., 2004).

Durante muchos años, la tipificación por bacteriófagos fue el método de elección en los estudios epidemiológicos con *S. aureus*. Uno de sus inconvenientes principales, y que ha favorecido la implantación de otros sistemas, es que, utilizando el set internacional de bacteriófagos, la tasa de cepas no tipificables es alta (Bannerman y col., 1995; Tenover y col., 1994). Hay que señalar, no obstante, que la escasa información disponible sugiere que la mayoría de las cepas de *S. aureus* de conejo pertenecientes a biotipos NHS CV:C son lisadas por fagos del set internacional humano (Vancraeynest y col., 2004). Entre nuestras

cepas, el 33.3% no fueron tipificables por fagotipificación directa pero la incidencia de no-reacción fue mucho mayor entre las pertenecientes a los ecovares humanos (72.2%), que entre las adscritas a los biotipos NHS CV:C (6.6%). La fagotipificación, junto con la biotipificación, se ha utilizado también en estudios ecológicos. En general, el empleo conjunto de ambos sistemas es insuficiente para determinar el origen de las cepas, aunque existen excepciones como es la susceptibilidad característica del ecovar ovino al fago 78 del set bovino (Gutiérrez y col., 1982; Hajek y Horak, 1978). Nuestras cepas NHS CV:C-3A/3C/55/71, genéticamente relacionadas y casi ubicuas, podrían proceder de conejos ya que su fenotipo sólo se encuentra en animales de granjas afectadas de estafilococosis crónica (Hermans y col., 1999).

De los tres métodos fenotípicos utilizados, la susceptibilidad a compuestos antimicrobianos presentó el valor más alto de Id. Sin embargo, los patrones de resistencia no se correlacionaron bien con los resultados de los otros métodos de tipificación. De este modo, hubo cepas genéticamente idénticas que producían patrones de resistencia diferentes y al contrario, cepas sin aparente relación que presentaban la misma resistencia a los antimicrobianos. Observaciones parecidas a las señaladas se han atribuido a la adquisición o pérdida de elementos genéticos extracromosómicos en cepas idénticas y a la presión selectiva que tiende a homogeneizar los patrones de resistencia de cepas sin relación alguna (Tenover y col., 1994; Weller, 2000).

Los compuestos antimicrobianos se utilizan en ganadería como agentes terapéuticos y también como promotores del crecimiento. En este estudio, la incidencia de cepas resistentes a antimicrobianos fue alta (76.9%), presentándose como más frecuentes las resistencias a la tetraciclina (61.5%) y a la penicilina G (26.9%). Ambos porcentajes son semejantes a los hallados por Goñi y col. (2004) en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis de conejos en España. En otros países europeos y para cepas procedentes de granjas de

conejos con estafilococosis crónica, Vancraynest y col. (2004) observaron resistencias a sustancias antimicrobianas en el 46% de las cepas, correspondiendo los mayores porcentajes a la tetraciclina, penicilina, eritromicina y lincomicina.

Es evidente que el uso abusivo de sustancias antimicrobianas en medicina humana y sanidad animal conduce a la selección de cepas resistentes (Smith y Coast, 2002; Teuber, 1999). Por ello, en salud pública preocupa la potencial transmisión de organismos resistentes, y de sus genes de resistencia, desde el ganado al hombre vía el consumo directo y/o la manipulación de los alimentos de origen animal (Teale, 2002; World Health Organization, 2002). Con el fin de minimizar el riesgo, el Reglamento 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo prohíbe la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento en los piensos (Anónimo, 2003b). Es preciso recordar, sin embargo, que entre los 23 compuestos antimicrobianos aprobados por la UE para uso terapéutico en todos los animales, se encuentran seis penicilinas, tres tetraciclinas y otros compuestos empleados en medicina humana (Anónimo, 1990). Existe controversia sobre el impacto que puede tener esta prohibición y se ha llegado a sugerir que uno de sus efectos negativos es el incremento del uso terapéutico de antibióticos permitidos que podría contribuir al aumento de las resistencias a los compuestos habitualmente empleados en medicina humana (Casewell y col., 2003; Phillips y col., 2004).

En resumen, nuestras cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo, en base a su biotipo, son probablemente de origen humano o sin hospedador específico. Los resultados obtenidos con la técnica de PFGE, que fue el método con mayor poder de discriminación, ponen de manifiesto que existían diferentes pulsotipos dentro de cada establecimiento y que algunos de ellos persistían a lo largo del tiempo. Asimismo, en los diferentes establecimientos se observó también una diseminación de cepas genéticamente relacionadas pertenecientes, la mayoría, al pulsotipo A y al fenotipo “biotipo NHS CV:C-

fagotipo 3A/3C/55/71". Este último ha sido detectado, hasta ahora, en conejos afectados de estafilococosis crónica en granjas europeas. La ubicuidad de este fenotipo virulento y la alta incidencia de cepas resistentes a antibióticos usados en medicina humana es preocupante tanto en salud pública como en sanidad animal.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Research in Microbiology ●●● (●●●●) ●●●●●●●●

www.elsevier.com/locate/resmic

Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat

Jose M. Rodríguez-Calleja, Isabel García-López, Jesús A. Santos, Andrés Otero, María-Luisa García-Lopez*

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071 León, Spain

Received 14 September 2005; accepted 16 November 2005

Abstract

Twenty-six *Staphylococcus aureus* isolates were recovered from rabbit carcasses and cuts during a period of seven months. Samples from 51 different animals, flocks and farms were obtained from five establishments in four Spanish provinces. To determine their diversity and possible origin, isolates were typed by three molecular and three phenotypic methods. PFGE, with the highest discrimination index ($D = 0.966$), identified 19 patterns (more than one band difference) and 10 types (more than three band differences). Based on $\geq 90\%$ similarity, RAPD ($D = 0.877$) produced nine patterns while ribotyping ($D = 0.786$) produced seven types. On the basis of biotyping ($D = 0.644$), 11 isolates belonged to human ecovars and 15 to the non-host-specific crystal violet type C (NHS CV:C) biotypes. By direct phage typing ($D = 0.761$), 17 isolates were lysed by human phages into groups II (8 isolates), III (5 isolates), I/III (2 isolates) and V (2 isolates). The overall resistance to antimicrobials ($D = 0.783$) was 76.9%, with most isolates being resistant to tetracycline (61.5%) and penicillin G (26.9%). PFGE showed that samples from each processing plant carried different *S. aureus* types, some of them persisting over time. There also was evidence of interestablishment dissemination of genetically related clones, most of them belonging to the PFGE type A and phenotype "NHS CV:C biotypes-3A/3C/55/71 phage type", which is highly virulent for European commercial rabbitries. The ubiquity of the virulent phenotype, as well as the high incidence of resistance to antibiotics with application in human medicine, is a matter of concern in public and animal health.

© 2006 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Rabbit meat; Molecular and phenotypic typing; Spain

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a versatile bacterium which is very successful in establishing itself as a commensal in various niches in humans and animals. As a pathogen, *S. aureus* is involved in a wide variety of infections in humans and animals and some strains are also responsible for human food poisoning by producing enterotoxins in foods [25].

According to FAOSTAT data [11], in 2004, production of farmed rabbit meat in Italy, Spain and France accounted for approximately 40% of the total world production, which was estimated to be over 1 120 000 tons.

Contamination of meat by pathogens is considered an important issue in terms of food safety. Since food animals arriving at abattoirs are frequently carriers of *S. aureus*, the organism is commonly found on carcasses and cuts, and staphylococcal contamination may or may not result from lesions [26]. Human strains are also likely to be present, especially if a high level of handling is involved during processing and if hygiene is poor. In addition, certain strains may colonize the food-processing environment and enter carcasses and cuts from the processing equipment [23].

For live rabbits, not only has a high prevalence of *S. aureus* colonization been reported, but also, staphylococcosis (mastitis, exudative dermatitis, abscesses and pododermatitis) is a major problem [29]. Two types of *S. aureus* infection have been described: one that is caused by "low-virulence" strains, affecting a small number of animals, and the other that is caused by "high-virulence" strains. Strains causing severe problems in

* Corresponding author.

E-mail address: dhtmg1@unileon.es (M.-L. García-Lopez).

1 rabbitries of different European countries have been identified
2 as belonging to a specific phenotype called the biotype–phage
3 combination “NHS CV:C biotypes-3A/3C/55/71 phage type”
4 [18,19].

5 A number of typing techniques are available to help in trac-
6 ing the source and transmission routes of *S. aureus* from foods
7 and clinical specimens. The objective of the present study was
8 to determine the diversity and possible origin of *S. aureus* iso-
9 lates from rabbit meat obtained from five establishments lo-
10 cated in four Spanish provinces, using the genotypic methods
11 of pulsed field gel electrophoresis (PFGE), ribotyping and ran-
12 domly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), and the
13 phenotypic methods of phage typing, biotyping and antimicro-
14 bial susceptibility testing.

16 2. Materials and methods

18 2.1. Strains

20 Twenty-six *S. aureus* strains isolated from January to July
21 2001 were studied. They were recovered from 51 rabbit meat
22 samples collected in four Spanish provinces (León, Orense,
23 Segovia and Valladolid). Nine strains were from overwrapped
24 trays of two bone-in hind legs from an abattoir and cutting plant
25 in Segovia (ACP); eight were from overwrapped whole car-
26 casses from an abattoir with a packing plant in León (APP1);
27 two were from overwrapped whole carcasses obtained and
28 packed at a similar establishment in Orense (APP2); four were
29 from 24-h postmortem rabbit carcasses obtained from a large
30 abattoir (LA) in Valladolid; and three were from 24-h post-
31 mortem rabbit carcasses from a small abattoir (SA) in Ponfer-
32 rada (León province). Distances between localities ranged from
33 115 to 467 km. Each sample was from a different animal, farm
34 and flock.

35 For isolation, one hind leg from each whole carcass or tray
36 was placed in a sterile Stomacher bag containing enough 0.1%
37 (w/v) peptone (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) water to
38 make a 1:5 dilution. Samples were vigorously shaken for 30 s
39 and the rinse fluid serially diluted and spread plated onto a
40 Baird–Parker agar base with rabbit plasma fibrinogen (Biokar
41 Diagnostics, Beauvais, France), which was incubated at 37 °C
42 for 48 h. All isolates were identified by standard phenotypic
43 methods [13]. Stocks cultures were maintained at –40 °C in
44 brain heart infusion broth (Oxoid) containing 20% (v/v) gly-
45 cerol.

47 2.2. PFGE

49 Chromosomal DNA was prepared as described by Ban-
50 nerman et al. [4]. Intact DNA in agarose plugs was digested
51 with 30 U of *Sma*I restriction enzyme (Roche Diagnostics
52 GmbH, Mannheim, Germany) for 2 h at 25 °C. DNA fragments
53 were separated by electrophoresis in 1% certified megabase
54 agarose (BioRad, Hercules, CA) in 0.5× TBE buffer with
55 a CHEF-DR III apparatus (BioRad). The conditions were
56 6 V/cm for 20 h at 14 °C with pulse times ranging from 5
57 to 40 s. Concatameric bacteriophage lambda DNA molecules

(BioRad) were used as size standards. Strains were typed at
58 at least two separate occasions. The gels were stained with
59 ethidium bromide and documented and analyzed with the Ko-
60 dak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290
61 (EDAS 290, Kodak Co., Rochester, NY). Similarity indices
62 were determined using the Dice coefficient [10] and the dis-
63 tance between clusters calculated using the unweighted pair-
64 group method with arithmetic averages (UPGMA). Data analy-
65 sis was performed using SPSS version 12.0.1. (SPSS Inc.,
66 Chicago, IL). Interpretation of PFGE patterns was done ac-
67 cording to Tenover et al. [36]: variations in more than three
68 fragments were assumed to represent major patterns or types
69 (assigned capital letters), while one- to three-fragment differ-
70 ences were considered subtypes (assigned capital letters with
71 numerical codes).

74 2.3. RAPD

76 Template DNA from 18 h cultures in brain heart infusion
77 broth (Oxoid) was extracted with lysostaphin (100 µg/ml,
78 Sigma, Barcelona, Spain) and 1% sodium dodecyl sulfate as
79 described by Johnson and Tyler [22]. DNA was purified us-
80 ing the GFX Genomic Blood DNA purification kit (Amersham
81 Biosciences Europe, Freiburg, Germany) according to the man-
82 ufacturer’s protocol. The DNA concentration in the resulting
83 eluates was determined by comparison with known amounts
84 of lambda DNA (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). For
85 RAPD analysis, 15 ng template DNA were employed. DNA
86 amplification was performed with the Ready–To–Go RAPD
87 Analysis Beads kit (Amersham Biosciences Europe) with
88 primer RAPD 4 M (5′-AAGACGCCGT-3′) [20]. RAPD am-
89 plification reactions were performed in a Mastercycler Personal
90 apparatus (Eppendorf–Netheler–Hinz GmbH, Hamburg, Ger-
91 many) under the following conditions: 1 cycle at 95 °C for
92 5 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min, 36 °C for 1
93 min, and 72 °C for 2 min. Amplification products (5 µl) were
94 subjected to electrophoresis in 2% (w/v) agarose gels at 100 V
95 for 1 h, visualized by staining with ethidium bromide and doc-
96 umented with the EDAS 290 system (Kodak Co.). Reaction
97 mixtures without bacterial DNA acted as negative controls,
98 and 100- and 1000-bp ladders (Biotools, Madrid, Spain) were
99 included as DNA molecular size standards. Each strain was am-
100 plified three independent times. Image estimation of fragment
101 size was done using the EDAS 290 system (Kodak Co.). On
102 the basis of band patterns, a dendrogram was created using the
103 software package SPSS version 12.0.1. (SPSS Inc.). Cluster-
104 ing analysis was carried out with the Jaccard’s coefficient and
105 UPGMA. Isolates with a similarity index of ≥90.0% were con-
106 sidered to have the same RAPD pattern.

108 2.4. Ribotyping

110 Ribotyping was performed with an automated system (Ribo-
111 Printer Microbial Characterization System, DuPont Qualicon,
112 Wilmington, DE) and *Eco*RI, as described by the manufac-
113 turer. A single 24 h colony on Baird–Parker agar base with RPF
114

(rabbit plasma fibrinogen) (Oxoid) was tested. In brief, automated processing included cell lysis, deproteinization, restriction digestion with *EcoRI*, and separation of DNA fragments on agarose gel, DNA transfer to a nylon membrane, hybridization with a chemoluminescent labeled rRNA probe, photography, scanning of the DNA patterns, and analysis by their software program. Computer-assisted analysis of the ribotypes was performed with the software package SPSS version 12.0.1. (SPSS Inc.). Matching and dendrogram UPGMA analysis of the patterns were performed using the Dice coefficient as described above. Isolates had to have a similarity index of $\geq 90.0\%$ to be considered as belonging to the same ribotype.

2.5. Biotyping

Biotyping was performed as described by Devriese [7]. Staphylokinase production was determined by using bovine fibrinogen (Sigma) with and without dog plasma as plasminogen source. β -Hamolysis was tested for on sheep blood agar plates. Bovine plasma coagulation within 6 h was investigated in cow's diluted plasma and crystal violet growth types on tryptose agar (Oxoid) with 6 and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ crystal violet (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Devriese's system differentiates between host-specific ecovars (human, human β^+ , poultry, bovine and ovine) and five non-host-specific biotypes (NHS).

2.6. Bacteriophage typing

Bacteriophage susceptibility testing was kindly performed by the National Center for Microbiology, National Institute of Health Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, with the international basic set of 23 phages for human *S. aureus* strains. Non-typable strains were tested by reverse phage typing using the same set and four additional phages 1030, 2009, 18042 and W57 [6].

2.7. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method according to the general recommendations of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology [12] for azithromycin (AZM), ciprofloxacin (CIP), clarithromycin (CLR), clindamycin (DA), chloramphenicol (C), erythromycin (E), gentamicin (GN), levofloxacin (LEV), lomefloxacin (LOM), nitrofurantoin (F), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFX), oxacillin (Ox), penicillin G (P), rifampicin (RD), teicoplanin (TEC), tetracycline (TE), trimethoprim (W), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) and vancomycin (VA). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as reference strains.

2.8. Calculation of the discrimination index

The discriminatory power of typing methods was determined using the numerical index of discriminatory power (*D*) [21].

3. Results

The results of molecular and phenotypic typing of the 26 *S. aureus* isolates from rabbit meat are given in Table 1.

3.1. Genotyping

3.1.1. PFGE

SmaI macrorestriction analysis identified 19 PFGE patterns dependent on a single band difference. Based on more than three-band differences, ten types, designated by the letters A through J, were produced. Type A was the largest group consisting of six different subtypes, which together accounted for 34.4% of all isolates. These strains were recovered from rabbit meat obtained in four establishments. Two other multi-strain PFGE clusters (H and I) were identified. Both included six strains from packed rabbit meat from two of the establishments. There were two groups (B and D) with two isolates from different processing and cutting plants and one (G) with two indistinguishable isolates from the small abattoir. Four strains from the same number of establishments had unique PFGE patterns (C, E, F and J). The *D* value was 0.966.

3.1.2. RAPD

Based on $\geq 90\%$ similarity, RAPD analysis of the 26 *S. aureus* isolates produced nine different patterns (I-IX), the most common (VI and I) accounting for 42.3% of all isolates. Most RAPD groups contained indistinguishable or closely related (up to three band differences) PFGE isolates. The *D* value was 0.877.

3.1.3. Ribotyping

At a similarity level $\geq 90\%$, ribotyping with the *EcoRI* restriction enzyme produced seven different types (1-7). The most common patterns were types 1 and 6. To type 6, which characterized nine isolates as identical, belonged eight of the PFGE type A isolates and strain SA121 (unique PFGE type C), which was possibly related (six-band difference) to A1 strains. The *D* value was 0.786.

3.2. Phenotyping

3.2.1. Biotyping

All isolates were typable by this method. No poultry, bovine or ovine ecovars were found. Eleven strains belonged to the human ecovars and 15 to NHS biotypes. Among the NHS strains, 14 were staphylokinase⁻, β -hemolytic⁺, bovine plasma coagulation within 6 h, and crystal violet type C (K⁻ β^+ CV:C) and one was K⁻ β^- CV:C. The *D* value was 0.644.

3.2.2. Bacteriophage typing

By direct phage typing, 17 strains (66.7%) were lysed by phages from Groups II (8 strains), III (5 strains), I/III (2 strains) and V (2 strains). All Group II strains showed the phage type 3A/3C/55/71. With reverse typing, eight additional strains (29.6%) were typable, with most strains being sensitive to phages 47 (Group III), 1030 and W57. All but one of the latter strains belonged to human ecovars. The *D* value was 0.761.

Table 1

Results of molecular and phenotypic typing of 26 *S. aureus* isolates from rabbit meat from five establishments located in four Spanish provinces

Origin ^a	Strain	PFGE ^b	RAPD ^c	RT ^d	Biotyping ^e	PG ^f	PT ^g	Antibiotic resistance ^h
ACP	SA41	A1	I	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	-
ACP	SA29	A1	I	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3C/55/55/71	TE
ACP	SA31	A1	I	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	TE/AZM/DA
ACP	SA40	A1	I	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	-
APP1	SA84	A2	I	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	-
LA	SA123	A3	II	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	TE
LA	SA124	A3	II	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	TE
LA	SA122	A4	III	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	III	6/42E/47/53	TE/AZM
APP2	SA59	A5	VIII	2	Human β ⁺ ecovar	NT ⁱ	47/1030 ^j	TE
APP1	SA115	A6	VII	2	Human β ⁺ ecovar	NT	47/W57 ^j	TE/P/E/CLR/ AZM/DA
APP1	SA116	B1	VII	2	Human ecovar	NT	47/1030/W57 ^j	TE/P/E/CLR/ AZM/DA
APP2	SA58	B2	VIII	2	Human β ⁺ ecovar	NT	47/1030/W57 ^j	TE
LA	SA121	C	III	6	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	II	3A/3C/55/71	TE
APP1	SA114	D1	IX	5	Human ecovar	NT	42E/47/1030/ W57 ^j	TE/P
ACP	SA50	D2	VI	4	Human ecovar	NT	NT	-
ACP	SA30	E	X	3	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	NT	47/1030/W57 ^j	P
APP1	SA49	F	VIII	1	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	I/III	29/52/79/80/85	-
SA	SA181	G1	V	1	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	V	94/96	P
SA	SA182	G1	V	1	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	V	94/96	P
APP1	SA86	H1	VI	1	Human β ⁺ ecovar	NT	47/1030 ^j	-
ACP	SA11	H1	VI	1	Human β ⁺ ecovar	III	47/54/75	TE
ACP	SA13	H2	VI	1	Human β ⁺ ecovar	III	54/81	TE
APP1	SA87	I1	VI	1	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	III	47/53/75/77 83A/84/85	TE
APP1	SA88	I1	VI	1	NHS K ⁻ β ⁺ CV:C bio.	III	53/54/75/77 83A/84/85	TE
ACP	SA12	I2	VI	1	Human β ⁺ ecovar	I/III	29/52/80/53/ 54/75/77/84/85	TE
SA	SA164	J	IV	7	Human ecovar	NT	42E/1030/W57 ^j	P

^a ACP, abattoir and cutting plant in Segovia; APP1, abattoir and packing plant in León; APP2, abattoir and packing plant in Orense; LA, large abattoir in Valladolid; SA, small abattoir in Ponferrada (León).

^b PFGE types and subtypes according to Tenover et al. [36].

^c RAPD patterns (similarity index ≥90%).

^d Ribotyping patterns (similarity index ≥90%).

^e NHS K⁻β⁺CV:C biotype, non-host-specific staphylokinase⁻, β-hemolysin⁺, bovine plasma coagulation within 6 h, and crystal violet growth type C. NHS K⁻β⁻CV:C biotype, non-host-specific staphylokinase⁻, β-hemolysin⁻, bovine plasma coagulation within 6 h⁻, and crystal violet growth type C. Human ecovar, staphylokinase⁺, β⁻-hemolysin⁻, bovine plasma coagulation within 6 h⁻, and crystal violet growth type C. Human β⁺ ecovar, staphylokinase⁺, β-hemolysin⁺, bovine plasma coagulation within 6 h⁻, and crystal violet growth type C.

^f PG, phage group.

^g PT, phage type.

^h Antibiotype, expressed as sensitive to all tested antimicrobials (-) or resistant to some of the following antibiotics: AZM, azithromycin; CLR, clarithromycin; DA, clindamycin; E, erythromycin; P, penicillin; TE, tetracycline.

ⁱ NT, non-typable by direct phage typing.

^j Reactive by reverse typing.

3.2.3. Antimicrobial susceptibility patterns

Six strains were sensitive to all antimicrobials. Resistant strains showed six resistance patterns. The two most frequent patterns consisted of resistance to only one drug: tetracycline (11 strains) or penicillin. Five strains showed multidrug resistance: two were resistant to six antibiotics (tetracycline, penicillin, erythromycin, clarithromycin, azithromycin and clindamycin), two were resistant to two antibiotics (tetracycline and penicillin, and tetracycline and azithromycin), and one was resistant to three antibiotics (tetracycline, azithromycin and clindamycin). The *D* value was 0.763.

4. Discussion

To determine the diversity and to trace the origin of *S. aureus* strains from rabbit meat obtained in establishments located in four Spanish provinces, we chose three phenotypic and three

molecular typing methods. Among the latter, PFGE showed the highest discriminatory power and ribotyping the lowest. Antibiotic resistance testing and phage typing yielded similar *D*-values of 0.761 and 0.763, respectively, while biotyping was the least discriminatory of the six methods.

For many years, *S. aureus* isolates have been distinguished by phenotypic methods such as biotyping, bacteriophage typing and antibiotic resistance. Typing systems based solely on phenotypic tests have limitations such as relatively low discriminatory power and modest reproducibility because phenotypic traits are inconsistently expressed [34]. The shortcomings of phenotypically-based typing methods have led to the progressive development of genotypic strategies, including PFGE, RAPD and ribotyping. PFGE, which has been proposed as the method of choice for typing *S. aureus* isolates [4], is considered one of the most reproducible and discriminatory typing techniques. For *S. aureus*, it has been compared to other techniques

1 in numerous studies and found to be superior to RAPD and ribotyping [15,27,31,35]. Furthermore, interpretation of patterns produced by PFGE is aided by published guidelines [36], while no general rules are available for interpretation of RAPD and ribotyping patterns.

2 In this study, analysis of PFGE patterns revealed that although different *S. aureus* types were present in rabbit meat processed within each establishment, indistinguishable or closely related isolates (up to three fragment differences) were recovered from samples collected from different facilities. Thus, PFGE type A isolates were almost ubiquitous since they were found among samples from the four provinces and from all but one of the five establishments. Also, PFGE types B, D, H and I were detected in carcasses and cuts from more than one establishment. The presence of closely related isolates in samples from different geographical areas suggests dissemination of a number of clones among rabbit farms and/or processing establishments. In dairy herds, several studies have shown a tendency towards widespread dissemination of *S. aureus* clones [24,31]. In European commercial rabbitries, Devriese et al. [8,9] identified carrier breeding stocks introduced into the flocks as probably the most important source of epidemic infection outbreaks caused by *S. aureus* strains belonging to the highly virulent specific phenotype ("NHS CV:C biotypes-3A/3C/55/71 phage type"). Sperm, even after artificial insemination, also contributes to dissemination of these strains [30], which until this study, had only been isolated from animals in European rabbitries with chronic staphylococcosis [18,19]. Notably, eight of our isolates, seven of which were PFGE type A (subtypes A1, A2 and A3) recovered from rabbit meat from three establishments, and the possibly related PFGE type C, fit the description of the associated virulence phenotype. They had an identical ribotype pattern and three different RAPD patterns. Genetic relatedness among isolates belonging to the specific virulent phenotype was previously suggested by Hermans et al. [18,20] on the basis of biotype, phage type and RAPD patterns and is confirmed in this study by the use of PFGE. It should be noted, however, that three PFGE type A isolates (subtypes A4, A5 and A6) did not belong to the virulent phenotype. In other studies, phenotypic variants have been observed among *S. aureus* isolates belonging to a single type as defined by PFGE [32].

3 It is also interesting that specific PFGE patterns like A1, A3 and I persisted in rabbit meat collected over time. Persistence of indistinguishable isolates within an establishment suggests that contamination is derived from the presence of certain *S. aureus* clones on processing equipment. At least in some cases, these isolates are likely to have originated from incoming animals, but inadequate cleaning and disinfection programs can exacerbate the problem. In poultry abattoirs, there is much evidence that *S. aureus* is capable of colonizing certain items of abattoir processing equipments and of becoming endemic in the processing environment [26].

4 Although not widely used, the biotyping system of Devriese [7] has proven to be useful in tracing the origin of *S. aureus* strains from humans, healthy and diseased animals and foods [1,7,27]. For *S. aureus* belonging to eight ecovars and biotypes,

58 Hennekine et al. [17] have reported that 86% of the strains with the same biotype were grouped by PFGE. In that study, indistinguishable isolates had the same ecovar or biotype, but the discriminatory power of biotyping was low because all isolates belonged only to the human ecovars or NHS CV:C biotypes, which, on the other hand, are the most frequently detected in *S. aureus* from rabbits [7,38].

59 For many years, bacteriophage typing was the method of choice for typing *S. aureus*. One shortcoming of bacteriophage typing is the high proportion of non-typable isolates by the international human set [4,35]. The scarce information available suggests, however, that most rabbit *S. aureus* belonging to NHS CV:C biotypes are lysed by phages of the human set [38]. By direct phage typing, we found 33.3% of the isolates to be non-typable. The incidence of non-reactivity was much higher in isolates allocated to human ecovars (72.2%), which were more reactive by reverse typing, than in those belonging to NHS CV:C biotypes (6.6%). Phage typing has also been used to supplement biotyping in ecological studies. In general, it has been found that determination of the biotype and phage type is insufficient to trace the origin of strains, although there are some exceptions such as the characteristic susceptibility of the ovine ecovar to phage 78 of the bovine set [16]. Our NHS CV:C-3A/3C/55/71 isolates, which were genetically related and almost ubiquitous, could be of rabbit origin, since their phenotype appears only to occur in rabbitries chronically dealing with signs of staphylococcosis [18].

60 Of the three phenotypic methods used, antibiotyping gave the highest *D* value. However, the resistance patterns did not correlate well with results of the other typing methods. Thus, there were otherwise indistinguishable isolates that produced different resistance patterns and, conversely, unrelated isolates showing the same antimicrobial resistance. Similar observations have been attributed to acquisition or loss of extrachromosomal genetic elements by indistinguishable *S. aureus* isolates and to selective pressure that tends to homogenize the resistance patterns of unrelated isolates [35].

61 Antimicrobials are used in animal husbandry both for therapeutic reasons and as growth promoters. In this study, the percentage of antimicrobial-resistant strains was high (76.9%), with resistance to tetracycline (61.5%) and penicillin G (26.9%) being the most frequently observed. These rates compare with those found by Goñi et al. [14], who, among *S. aureus* from rabbit mastitis in Spain, observed 83.3% of overall resistance and 58.3% of resistance to tetracycline. In other European countries, for strains isolated from rabbitries with chronic staphylococcosis, Vancraynest et al. [38] reported antimicrobial resistance in 46% of isolates, the highest rates corresponding to tetracycline, penicillin, erythromycin and lincomycin.

62 There is clear evidence that the intensive use and misuse of antimicrobial drugs in human and veterinary medicine leads to the selection of resistant organisms [33]. From the public health perspective, there is an additional concern over the potential transmission of resistant organisms and resistance genes from livestock to man through consumption and handling of foods derived from animals [37,39]. Because of the possible risks to humans, European Union (EU) regulation has banned antibi-

otics from being added to animal feed [3]. However, among the 23 antimicrobials approved by the EU for therapeutic use in all food-producing species, there are six penicillins, three tetracyclines and several other compounds with application in human medicine [2]. Controversy exists over the impact of the growth-promoter banning in the EU and it has been suggested that one potentially undesirable effect is a concomitant increase in the use of therapeutic antibiotics that might contribute to increasing resistance to drugs used in human medicine [5,28].

In summary, our *S. aureus* isolates from rabbit meat were probably of human origin or without host specificity. On the basis of PFGE, which was the most discriminatory typing method, carcasses and cuts from each rabbit processing plant were contaminated with different *S. aureus* PFGE types, some of them persisting over time. There was evidence of dissemination of genetically related clones among samples from different establishments, the most common belonging to a phenotype (NHS CV:C biotypes-3A/3C/55/71 phage type) detected thus far only in European rabbitries with chronic staphylococcosis. The ubiquity of this virulent phenotype and the overall high rate of isolates resistant to antibiotics with application in human medicine is a matter of concern for public and animal health..

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the phage typing support of Ana Vindel, Pilar Trincado and Raquel Cabrera from National Center for Microbiology, National Institute of Health Carlos III. Mr. J.M. Rodríguez-Calleja was supported by the Spanish MCYT (Project No. AGL-2000 1159).

References

- [1] F.M. Aarestrup, H.C. Wegener, V.T. Rosdahl, Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark, *Vet. Microbiol.* 45 (1995) 139–150.
- [2] Anonymous, Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [Last amended by Commission Regulation (EC) No. 1448/2005, of 15 July 2005 (OJEU L 185, 16/7/2005, pp. 20–21)], *Off. J. Eur. Comm. L* 224, 18/08/1990, 1–8.
- [3] Anonymous, Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, *Off. J. Eur. Union L* 268, 18/10/2003, 29–43.
- [4] T.L. Bannerman, G.A. Hancock, F.C. Tenover, J.M. Miller, Pulsed-field gel-electrophoresis as a replacement for bacteriophage-typing of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 551–555.
- [5] M. Casewell, C. Friis, E. Marco, P. McMullin, I. Phillips, The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 159–161.
- [6] M.J. de Saxe, C.M. Notley, Experiences with the typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci, *Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig.* A 241 (1978) 46–59.
- [7] L.A. Devriese, A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species, *J. Appl. Bacteriol.* 56 (1984) 215–220.
- [8] L.A. Devriese, Infecties met een special konijnpathogeen *Staphylococcus aureus* biotype op een konijnen proefbedrijf: resultaten van behandelingen en eradicatiepogingen, *Landbouwtijdschrift* 5 (1987) 1243–1245.
- [9] L.A. Devriese, C. Godard, L. Okerman, L. Renault, Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits, *Ann. Rech. Vet.* 12 (1981) 327–332.
- [10] L.R. Dice, Measures of the amount of ecological associations between species, *J. Ecol.* 26 (1945) 297–302.
- [11] Food and Agriculture Organization of The United Nations, FAOSTAT Agriculture Data (online), <http://faostat.fao.org>, last accessed October 2005.
- [12] J.A. García Rodríguez, R. Cantón, J.E. García Sánchez, M.L. Gómez-Lus, L. Martínez Martínez, C. Rodríguez-Avial, J. Vila, in: J.J. Pícazo (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2000 (online), <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/indice11.htm>, accessed 27 July 2005.
- [13] M.L. García, B. Moreno, M.S. Bergdoll, Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain, *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 548–553.
- [14] P. Goñi, Y. Vergara, J. Ruiz, I. Albizu, J. Vila, R. Gómez-Lus, Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis, *Int. J. Antimicrob. Agents* 23 (2004) 268–272.
- [15] H. Grundmann, S. Hori, M.C. Enright, C. Webster, A. Tami, E.J. Feil, T. Pitt, Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: A comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 4544–4546.
- [16] L.M. Gutiérrez, I. Menes, M.L. García, B. Moreno, M.S. Bergdoll, Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain, *J. Food Protect.* 45 (1982) 1282–1286.
- [17] J.A. Henekinne, A. Kerouanton, A. Brisabois, M.L. De Buyser, Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments, *J. Appl. Microbiol.* 94 (2003) 321–329.
- [18] K. Hermans, P. De Herdt, L.A. Devriese, W. Hendrickx, C. Godard, F. Haesebrouck, Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis, *Vet. Microbiol.* 67 (1999) 37–46.
- [19] K. Hermans, L.A. Devriese, F. Haesebrouck, Rabbit staphylococcosis: Difficult solutions for serious problems, *Vet. Microbiol.* 91 (2003) 57–64.
- [20] K. Hermans, F. Haesebrouck, M. Vanechoutte, L.A. Devriese, C. Godard, P. De Herdt, Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, *Vet. Microbiol.* 72 (2000) 311–319.
- [21] P.R. Hunter, Reproducibility and indexes of discriminatory power of microbial typing methods, *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 1903–1905.
- [22] W.M. Johnson, S.D. Tyler, in: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, T.J. White (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993, pp. 294–299.
- [23] G.A. Lancelette, R.W. Bennett, in: F.P. Downes, K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, fourth ed., American Public Health Association, Washington, DC, 2001, pp. 87–403.
- [24] C. Lange, M. Cardoso, D. Senczek, S. Schwarz, Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil, *Vet. Microbiol.* 67 (1999) 127–141.
- [25] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus* infections, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532.
- [26] G.C. Mead, C.E. Dodd, Incidence, origin and significance of staphylococci on processed poultry, *J. Appl. Bacteriol.* 19 (1990) 81S–91S.
- [27] V. Myllys, J. Ridell, J. Bjorkroth, I. Biese, S. Pyoral, Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping, *Vet. Microbiol.* 57 (1997) 245–251.
- [28] I. Phillips, M. Casewell, T. Cox, B. de Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, J. Waddell, Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2004) 28–52.
- [29] J.M. Rosell, *Enfermedades del conejo*, Mundi-Prensa, Madrid, 2000.
- [30] G. Rossi, C. Stanzel, W. Witte, *Staphylococcus aureus* infections in rabbits

- 1 and the transmission of the pathogens with the sperma, in: Arbeitstagung
2 über Haltung und Krankheiten der Kaninchen: Pelztier und Heimtiere,
3 1995, pp. 251–257.
- 4 [31] P.M. Sabour, J.J. Gill, D. Lepp, J.C. Pacan, R. Ahmed, R. Dingwell,
5 K. Leslie, Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus*
6 isolates in Eastern Canadian dairy herds, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004)
7 3449–3455.
- 8 [32] C. Schlichting, C. Branger, J.M. Fournier, W. Witte, A. Boutonnier,
9 C. Wolz, P. Goulet, G. Doring, Typing of *Staphylococcus aureus* by
10 pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage
11 typing: Resolution of clonal relationships, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993)
12 227–232.
- 13 [33] R.D. Smith, J. Coast, Antimicrobial resistance: A global response, *Bull.*
14 *World Health Organ.* 80 (2002) 126–133.
- 15 [34] B. Swaminathan, G. Matar, in: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover,
16 T. Wait (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Ap-*
17 *plications*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993,
18 pp. 26–49.
- 19 [35] F.C. Tenover, R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering,
20 G. Hancock, G.A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, W.R. Jarvis, B. Kreiswirth,
21 W. Eisner, J. Maslow, L.K. McDougal, J.M. Miller, M. Mulligan, M.A.
22 Pfaller, Comparison of traditional and molecular methods of typing iso-
23 lates of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 407–415.
- 24 [36] F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray,
25 D.H. Persing, B. Swaminathan, Interpreting chromosomal DNA restric-
26 tion patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for
27 bacterial strain typing, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 2233–2239.
- 28 [37] L. Tollefson, B.E. Karp, Human health impact from antimicrobial use in
29 food animals, *Med. Mal Infect.* 34 (2004) 514–521.
- 30 [38] D. Vancraeynest, K. Hermans, A. Martel, M. Vanechoutte, L.A. Devriese,
31 F. Haesebrouck, Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphy-*
32 *lococcus aureus* strains from rabbits, *Vet. Microbiol.* 101 (2004) 245–251.
- 33 [39] World Health Organization, Use of antimicrobials outside human
34 medicine and resultant antimicrobial resistance in humans (online),
35 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/index.html>, accessed
36 27 July 2005.
- 37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
- 58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114

CAPÍTULO 5.-

RESISTENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN CARNE DE CONEJO AL CALOR, LOS ULTRASONIDOS BAJO PRESIÓN Y LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE



- Introducción_____ 119
- Material y Métodos_____ 122
- Resultados_____ 128
- Discusión_____ 136
- *Artículo original:* “Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure”_____ 142a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col.* 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. "Journal of Applied Microbiology", artículo en prensa (JAM-2005-0840), doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02868.x.

Introducción

En la actualidad existe un gran interés por el uso de procedimientos alternativos a los clásicos tratamientos térmicos, especialmente la pasteurización de alimentos líquidos, para la inactivación o reducción de la población microbiana indeseable. Dos de estos tratamientos alternativos se basan en el empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje ("Pulsed Electric Field", PEF) y de ultrasonidos bajo presión o manosonicación (MS) (Raso y Barbosa-Canovas, 2003). Ambas tecnologías se han desarrollado para permitir la comercialización de alimentos seguros, desde un punto de vista microbiológico, sin cambios significativos en las propiedades sensoriales y nutritivas.

Los ultrasonidos se definen como ondas sónicas de frecuencia superior a la audición humana (>16 kHz). En un principio, la aplicación de ultrasonidos para la conservación de los alimentos fue poco efectiva puesto que producía una inactivación microbiana escasa pero su combinación con presiones hidrostáticas superiores a 600 kPa (manosonicación) permitió mejorar significativamente el efecto antimicrobiano. Este tipo de ondas forman pequeñas burbujas en el seno de un líquido y terminan por implosionar de forma brusca provocando temperaturas y presiones muy elevadas, fenómeno conocido como cavitación. La combinación del calor y la MS (manotermosonicación, MTS) también puede incrementar la acción letal sobre los microorganismos ya que se ha observado que esta acción es equivalente a la suma individual del efecto inactivador de sus dos componentes, la MS y el calor (Raso y col., 1998).

Los tratamientos basados en la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje consisten en la aplicación de una corriente de gran campo eléctrico (10-50 kV/cm) en un mínimo espacio de tiempo (del orden de microsegundos) sobre un alimento situado entre dos electrodos. La inactivación bacteriana se debe a los efectos eléctricos, que originan poros en las membranas celulares (electroporación), y no al incremento térmico que se produce por el tratamiento eléctrico puesto que éste es prácticamente insignificante.

Estas tecnologías han sido ampliamente investigadas durante la década de los noventa, dedicándose los trabajos a diversos aspectos de la inactivación microbiana tales como la influencia de los parámetros del proceso (voltaje, tiempo, distancia de electrodos, etc.), la resistencia relativa de microorganismos patógenos y alterantes y, en menor medida, a los factores ambientales que afectan a la resistencia y a los mecanismos del daño celular (Mañas y Pagán, 2005). Un aspecto insuficientemente estudiado es la variación entre miembros de un mismo género o especie. Esto es muy importante ya que se tienen que elegir cuidadosamente las cepas diana más adecuadas a la hora de comprobar la eficacia de nuevos procesos; es decir, en algunos casos las cepas más resistentes y, cuando es posible, cepas resistentes a múltiple estrés (Benito y col., 1999; Sherry y col., 2004).

Varios estudios indican que la resistencia de una especie determinada a un tratamiento de conservación puede variar mucho según la cepa. Las variaciones intraespecie de la resistencia han sido estudiadas utilizando diferentes tecnologías de conservación de alimentos (Alpas y col., 1999; Álvarez y col., 2003; Benito y col., 1999; Lado y Yousef, 2003; Mañas y col., 2000; Patterson y col., 1995; Sherry y col., 2004). Los datos publicados por Alpas y col. (1999) pusieron de manifiesto que, frente a las altas presiones hidrostáticas, la variación intraespecie de *Staphylococcus aureus* era mucho más amplia que en otros microorganismos. Para los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje y ultrasonidos, son pocos los trabajos de investigación disponibles acerca de la

variación intraespecie de la resistencia microbiana. Los resultados de Mañas y col. (2000) y Álvarez y col. (2003), con tres serotipos diferentes de *Salmonella enterica*, demostraron que la variabilidad en la resistencia a los tratamientos con calor era mayor que la observada cuando se aplicaban ultrasonidos con presión y pulsos eléctricos de alto voltaje.

Otros autores han descrito también la existencia de cepas resistentes a diferentes tipos de estrés. Generalmente se acepta que las cepas más resistentes a un determinado agente de estrés, por ejemplo el calor, son también más tolerantes a otros factores estresantes (Benito y col., 1999; Humphrey y col., 1995). Sin embargo, existen estudios que no confirman este hecho. Así, Hauben y col. (1997) estudiaron cepas de *Escherichia coli* altamente barotolerantes que mostraban una tolerancia media al calor. También Sherry y col. (2004) investigaron y compararon la resistencia de 40 cepas de *Salmonella enterica* a los tratamientos con calor, altas presiones e irradiación, no pudiendo establecer relación entre la resistencia a estos tres agentes de estrés.

El objetivo de este capítulo fue: a) determinar y comparar la variación en la resistencia de 15 cepas de la misma especie, *Staphylococcus aureus*, a diferentes tecnologías de conservación de alimentos (pulsos eléctricos de alto voltaje, ultrasonidos con presión y calor) y, b) establecer las posibles relaciones entre las resistencias de dichas cepas a los tres tratamientos físicos.

Material y Métodos

En este trabajo se utilizaron las cepas de *S. aureus* SA11, SA12, SA29, SA30, SA40, SA41, SA49, SA84, SA85, SA87, SA88, SA121, SA122 y SA124, aisladas de carne de conejo según se describió en el capítulo 3. La preparación de los cultivos en fase estacionaria, las condiciones para la realización de los tratamientos con calor, MS y PEF, las características de incubación para los recuentos de supervivientes y los parámetros de resistencia a los tratamientos se presentan detalladamente descritos en la publicación anexa y de forma resumida a continuación.

Para obtener cultivos en fase estacionaria, se inocularon tubos con 10 ml de caldo triptona de soja suplementado con 0.6% de extracto de levadura (TSB-YE; Biolife, Milán, Italia) con una colonia de cada cepa de *S. aureus* procedente de placas de agar triptona de soja suplementado con 0.6% de extracto de levadura (TSA-YE; Biolife). Tras incubar a 37 °C durante 6 horas con agitación, se tomó una alícuota de 50 µl que se mezcló con 50 ml de TSB-YE fresco y se incubó 18 h en las mismas condiciones, rindiendo finalmente alrededor de 10^9 células/ml (cultivo en fase estacionaria).

Los tratamientos de conservación se aplicaron en tampón McIlvaine citrato-fosfato (pH 7, conductividad eléctrica de 2 mS/cm). Para los tratamientos con calor y MS se utilizó un resistómetro, descrito previamente por Raso y col. (1998), y formado por los componentes que se muestran en la figura 5.1. En la cámara de tratamiento conteniendo el tampón (23 ml) se inyectaron alícuotas (0.2 ml) de los cultivos diluidos hasta una concentración de unas 10^7 células/ml, y se aplicaron los correspondientes tratamientos. Después de la inoculación y durante el tratamiento, se tomaron muestras de 0.2 ml que se sembraron en profundidad utilizando TSA-YE. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Los tratamientos con PEF se realizaron en un equipo de pulsos de onda cuadrada (figura 5.2), previamente descrito por Raso y col. (2000), con las siguientes características:

- Distancia entre electrodos: 0.25 cm
- Área de tratamiento: 2.01 cm²
- Amplitud de pulso (τ): 2 μ s
- Intensidad de campo eléctrico: de 15 a 28 kV/cm
- Frecuencia: 1 Hz
- Temperatura: <35 °C

Figura 5.1.- Componentes del resistómetro (Raso y col., 1998).

1. CÁMARA DE TRATAMIENTO (23 ml)

2. CONO SONICADOR

3. HÉLICES DE AGITACIÓN

4. JERINGA DE INYECCIÓN

5. MANÓMETRO

6. ELEMENTO CALEFACTOR

7. Sonda de temperatura

8. VÁLVULA SOLENOIDE DE MUESTREO

9. VASO PRINCIPAL (650 ml)

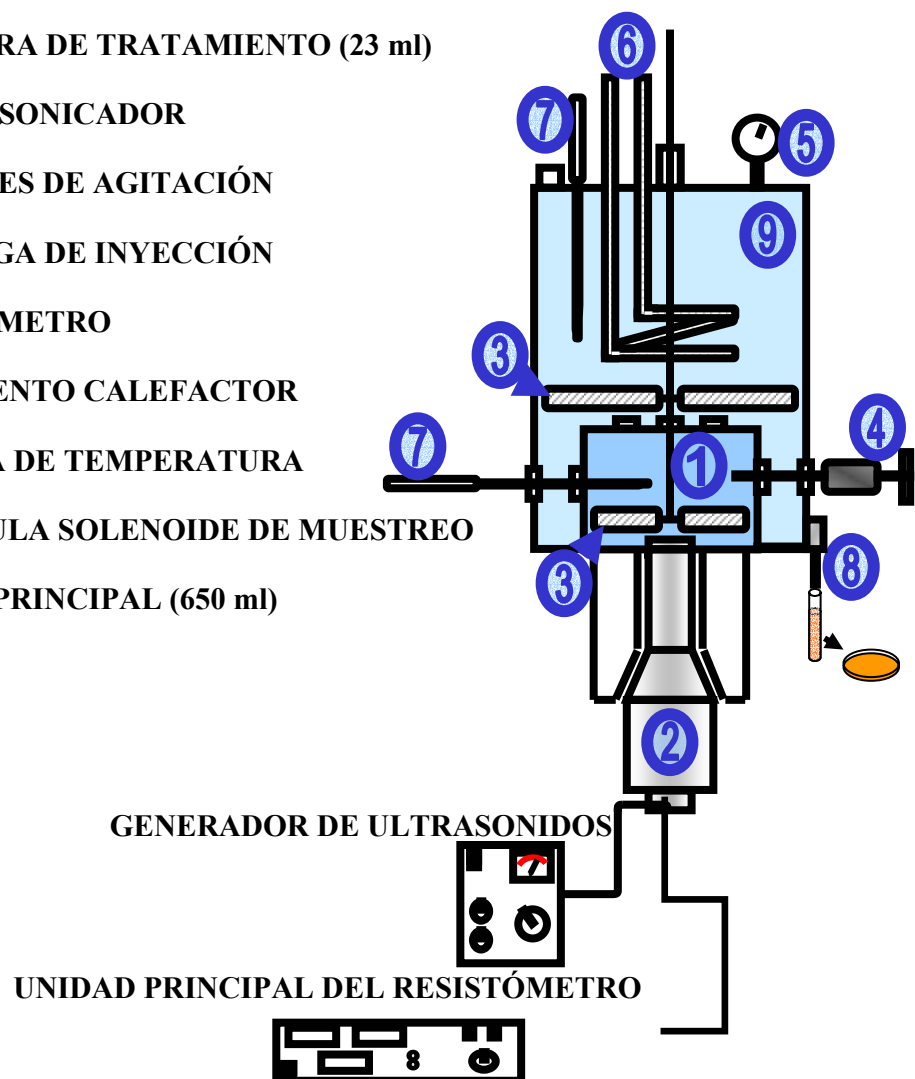
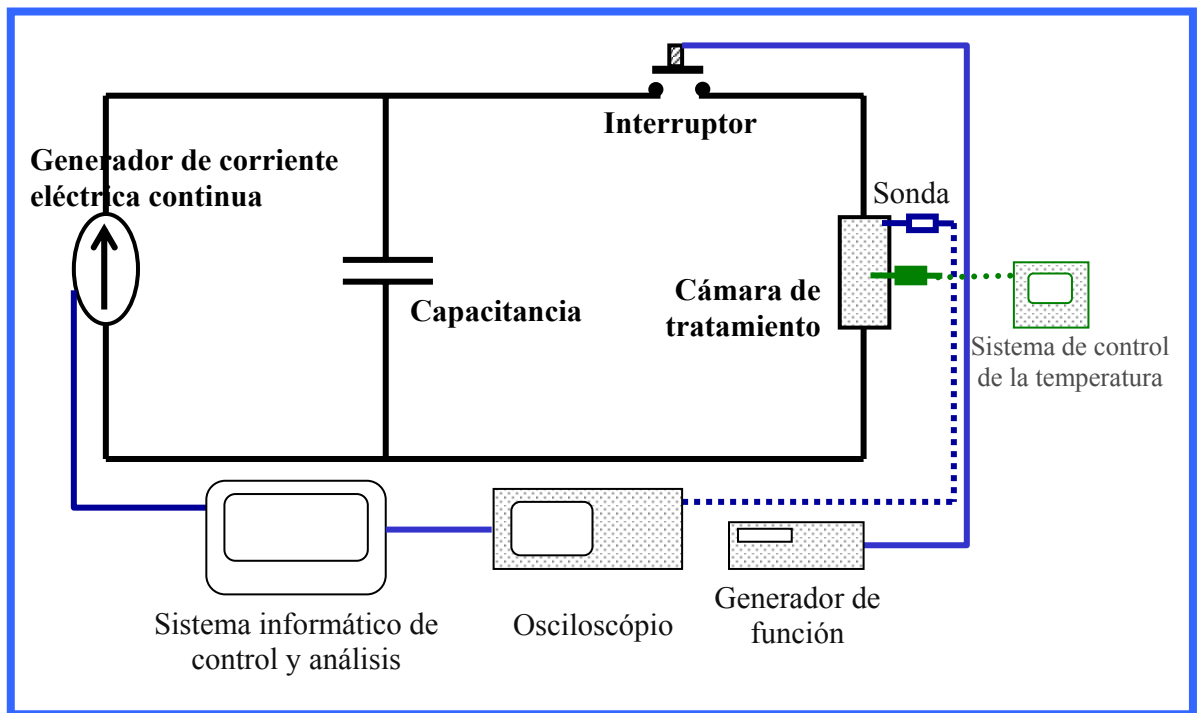


Figura 5.2.- Equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje.

El esquema de funcionamiento de este equipo se ilustra en la figura 5.3. De forma resumida consiste en la carga de un condensador por medio de un generador eléctrico de alto voltaje y la descarga intermitente de la energía eléctrica almacenada, a intervalos de tiempo de microsegundos, en una cámara de tratamiento. Los componentes principales son un generador de corriente de alto voltaje, un condensador y un interruptor, junto con la cámara de tratamiento, formada por dos electrodos separados por un material aislante, y un sistema de control y toma de datos del proceso.

Figura 5.3.- Esquema de funcionamiento del equipo de generación de PEF.

Una vez tratadas las muestras durante un tiempo determinado ($\tau \times n^\circ$ de pulsos), se realizaron diluciones decimales en caldo TSB-YE que se sembraron en profundidad en agar TSA-YE y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Todos los experimentos se realizaron, al menos, cuatro veces de forma independiente utilizando cultivos obtenidos en días diferentes. Para contar las colonias se empleó un contador automático mejorado mediante análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK), convenientemente calibrado y puesto a punto para el tipo de microorganismo a ensayar (Condón y col., 1996).

Para los tres tratamientos estudiados se obtuvieron las curvas de supervivencia, representando el logaritmo de supervivientes frente al tiempo de tratamiento. El tiempo de reducción decimal, definido como los minutos de tratamiento que originan una reducción de un ciclo logarítmico en la población microbiana existente (D_t para los tratamientos con

calor; D_{MS} para los tratamientos con MS), fue utilizado para medir la letalidad de los tratamientos con calor y MS. Este valor D se calculó como el inverso negativo de la pendiente de la recta de regresión de las curvas de supervivencia (figuras 5.4 y 5.6). También se utilizaron las curvas del tiempo de reducción decimal, representación del logaritmo del valor D en ordenadas y la temperatura de tratamiento en abscisas, a partir de las cuales se calculó el valor z , definido como el incremento de temperatura (en °C) necesario para reducir el valor D_t en un ciclo logarítmico. Debido a la particular forma cóncava de las curvas de supervivientes en los tratamientos de PEF, para estimar el efecto letal se empleó un modelo matemático basado en la distribución de Weibull, cuya utilidad había sido previamente demostrada (Álvarez y col., 2003), modelo que se ajusta a la ecuación siguiente:

$$\log_{10}S(t) = -(t/b)^n$$

$S(t)$: fracción de supervivientes

t : tiempo de tratamiento (μ s)

b : parámetro de escala de la curva

n : parámetro de forma de la curva

El valor b representa el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico de la población microbiana (μ s) y el valor n se relaciona con la concavidad de la curva de supervivientes. De forma semejante al valor z calculado para los tratamientos con calor, el efecto de la intensidad de campo eléctrico podría ser descrito por un valor z_{PEF} como previamente se propuso para *Salmonella* (Álvarez y col., 2003), que representa el aumento en la intensidad de campo eléctrico que da lugar a una reducción decimal del valor b .

El tratamiento estadístico de todos los datos se realizó con el programa informático GraphPad PRISM® (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

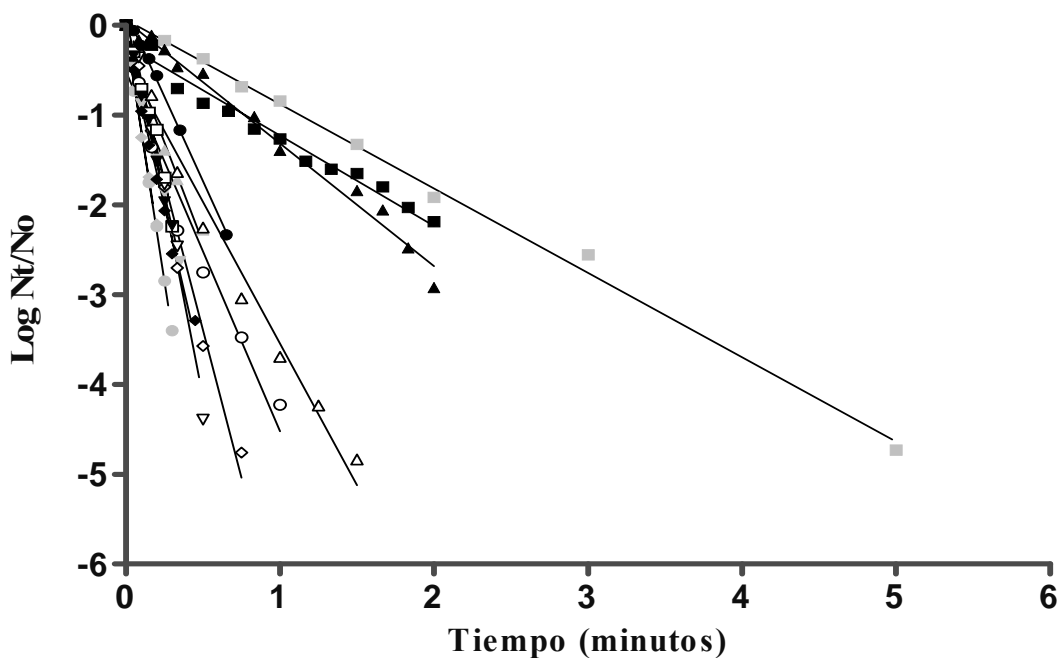
Para estudiar las posibles relaciones entre el contenido en pigmentos carotenoides y el efecto de los tratamientos aplicados a las cepas de *S. aureus*, se cuantificó ese contenido adaptando el protocolo de Morikawa y col. (2001). A partir de precultivos conservados a congelación se realizaron siembras en placas de TSA-YE (Oxoid) que fueron incubadas durante 48 h a 37 °C. A partir de colonias aisladas se prepararon suspensiones en tampón McIlvaine citrato-fosfato pH 7 hasta una densidad óptica de 1.000 a 600 nm. Se tomaron muestras de 15 ml que se centrifugaron a 6000g durante 5 minutos. Los sedimentos celulares resultantes se resuspendieron en tubos con 500 µl de metanol y se incubaron durante 6 minutos a 55 °C en un baño termoestabilizado. Posteriormente, estos tubos se centrifugaron durante 3 minutos a 10000 r.p.m., se recogió el extracto en el sobrenadante y se completó el volumen hasta 1 ml. Para comparar el contenido en carotenoides presente en cada una de las cepas se midió la absorbancia en estos sobrenadantes a 465 nm. Se calcularon los valores promedios de al menos cuatro repeticiones de las determinaciones utilizando suspensiones obtenidas en distintos días.

Para establecer los patrones de comportamiento frente a los tratamientos probados en este estudio, se realizó un análisis de conglomerados con el programa informático SPSS v.12.0.1. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) utilizando los valores del tiempo de reducción decimal (D_t y D_{MS}), los valores b , el tiempo para reducir tres ciclos decimales y la absorbancia a 465 nm. Además se establecieron estadísticamente las relaciones lineales entre absorbancia, resistencia al calor, PEF y MS mediante el software SPSS.

Resultados

Resistencia al calor. La figura 5.4 muestra la curva de supervivencia de las cepas de *S. aureus* tratadas a 58 °C. En esta figura se puede observar que la cinética de inactivación es de primer orden en el rango estudiado.

Figura 5.4.- Curvas de supervivencia a los tratamientos con calor a 58 °C de *S. aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (◆), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▽), 122 (◆) y 124 (●).



Los valores del tiempo de reducción decimal, calculados a partir de los datos mostrados en la figura 5.4, se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1.- D_t , D_{MS} , b , valores n y contenido de carotenoides (A_{465}) de cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo.

CEPA	D_{58}^a		D_{MS}^b		valor b^c		valor n^d		A_{465}^e	
	\bar{x}^f	d.e. ^g	\bar{x}	d.e.	\bar{x}	d.e.	\bar{x}	d.e.	\bar{x}	d.e.
SA11	0.99	0.05	5.30	0.10	12.00	7.60	0.42	0.11	0.034	0.004
SA12	0.73	0.03	4.40	0.20	0.39	0.50	0.19	0.05	0.029	0.009
SA29	0.13	0.00	3.20	0.30	3.60	2.70	0.34	0.08	0.008	0.001
SA30	0.14	0.01	1.80	0.12	0.84	0.51	0.22	0.03	0.010	0.003
SA31	0.27	0.01	5.00	0.23	4.00	3.50	0.28	0.08	0.015	0.003
SA40	0.14	0.01	4.20	0.24	2.80	2.60	0.28	0.07	0.014	0.001
SA41	0.32	0.02	2.40	0.10	55.00	10.00	0.54	0.09	0.007	0.003
SA49	0.11	0.01	3.20	0.23	0.10	0.05	0.17	0.01	0.010	0.005
SA84	0.15	0.01	4.10	0.30	14.00	4.40	0.45	0.06	0.018	0.004
SA85	0.25	0.02	1.30	0.05	6.50	4.00	0.37	0.08	0.011	0.004
SA87	1.10	0.02	2.70	0.29	3.90	2.70	0.30	0.06	0.022	0.001
SA88	0.22	0.03	3.90	0.36	7.20	4.30	0.40	0.09	0.020	0.004
SA121	0.14	0.01	2.50	0.27	3.20	1.00	0.32	0.03	0.009	0.003
SA122	0.09	0.01	2.30	0.10	12.00	6.20	0.42	0.09	0.011	0.002
SA124	0.09	0.00	3.50	0.17	0.97	0.65	0.23	0.03	0.008	0.001

^a, tiempo de reducción decimal para tratamientos a 58 °C (minutos).

^b, tiempo de reducción decimal para tratamientos de manosonicación con presión (minutos).

^c, parámetro de escala de la curva de supervivencia en tratamientos con PEF (μ s).

^d, parámetro de forma de la curva de supervivencia en tratamientos con PEF.

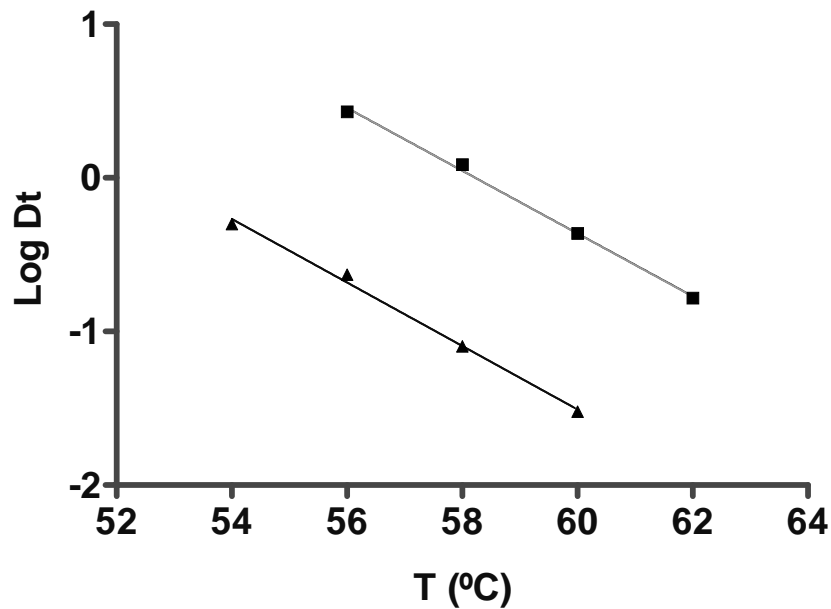
^e, absorbancia medida a 465 nm.

^f, valor promedio.

^g, desviación estándar.

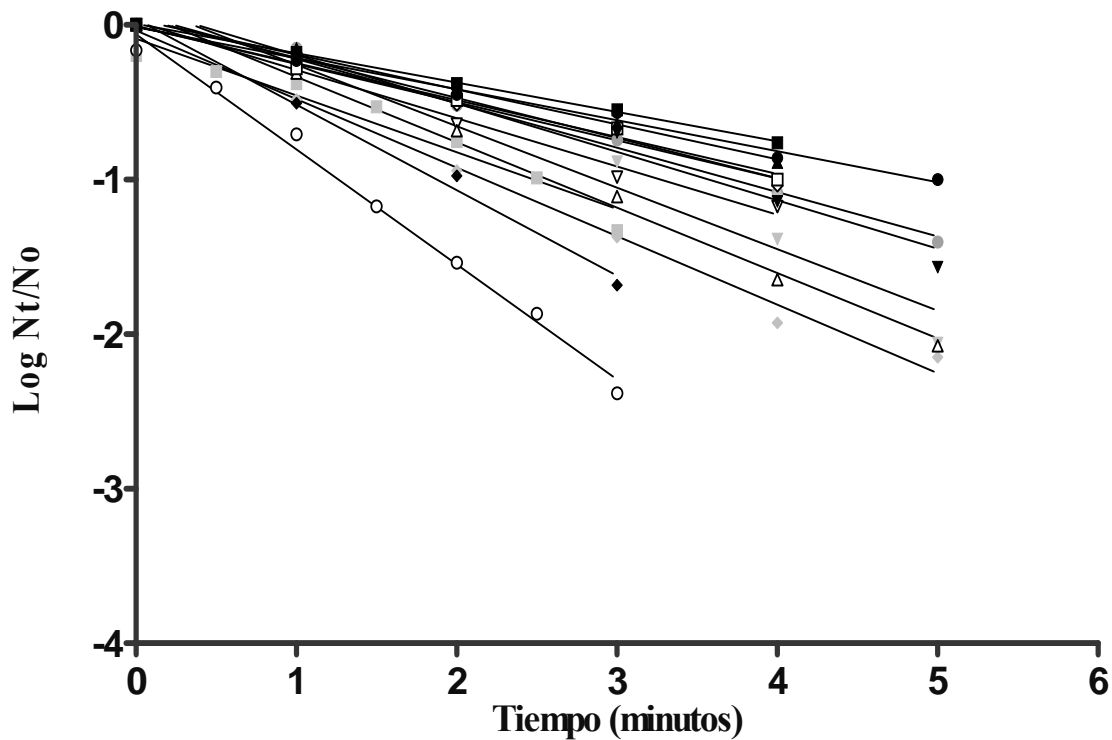
La figura 5.5 representa el efecto de la temperatura en el tiempo de reducción decimal de una de las cepas más termorresistentes (cepa SA11) y de una de las más termosensibles (cepa SA124). Como puede observarse, en ambas cepas la dependencia térmica para la inactivación es similar, con un valor z de 5 °C.

Figura 5.5.- Efecto de la temperatura en la inactivación térmica de las cepas de *S. aureus* SA11 (■) y SA124 (▲) en tampón McIlvaine citrato-fosfato.



Resistencia a la MS. La figura 5.6 muestra las curvas de supervivencia a un tratamiento de manosonicación a 37 °C, 117 μ m de amplitud y 200 kPa. De forma similar a lo que ocurría en la inactivación con calor, las curvas de supervivencia fueron rectas y permitieron el cálculo de los valores D_{MS} que se muestran en la tabla 5.1.

Figura 5.6.- Curvas de supervivencia a la MS (117 μ m, 200 kPa, 37 °C) de *S. aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (◆), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▽), 122 (◆) y 124 (●).



Resistencia a los PEF. En la figura 5.7 se muestran las curvas de supervivencia para todas las cepas de *S. aureus* estudiadas bajo una intensidad de campo eléctrico de 22 kV/cm. Las curvas de supervivencia obtenidas fueron cóncavas en la parte inicial, adaptándose adecuadamente ($r^2 > 0.99$) a la ecuación de Weibull, que ha sido descrita en el apartado de material y métodos.

Los valores b y n calculados a partir de las curvas se presentan también en la tabla 5.1. Sin embargo, las comparaciones directas entre los valores b obtenidos para las cepas no serían fiables debido a que el valor n , parámetro relacionado con la forma de la curva, no fue igual en todas las cepas (tabla 5.1). Por tanto, para realizar la comparación de la

resistencia de las 15 cepas se calculó el tiempo preciso para conseguir 3 ciclos logarítmicos de inactivación utilizando las correspondientes ecuaciones de Weibull. Los resultados se representan en la figura 5.8 en la que se puede observar que la cepa SA41 es significativamente ($p < 0.05$) más resistente a los PEF que el resto de cepas. Así, fueron necesarios 425 μs para inactivar 3 ciclos logarítmicos de la población de la cepa SA41 mientras que para el resto de las cepas sólo se necesitó un promedio de 133 μs .

Figura 5.7.- Curvas de supervivencia a los tratamientos con PEF a 22 kV/cm de *S. aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (◆), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▼), 122 (◆) y 124 (●).

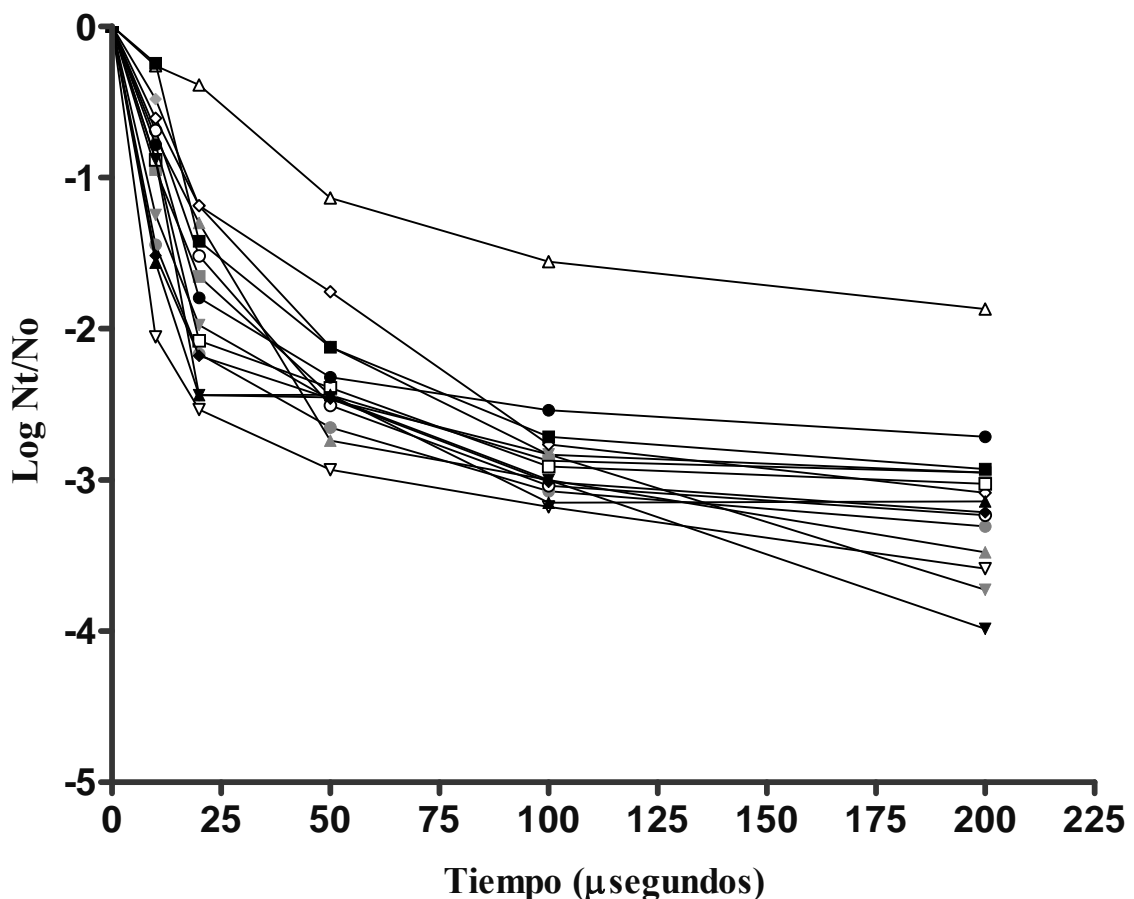
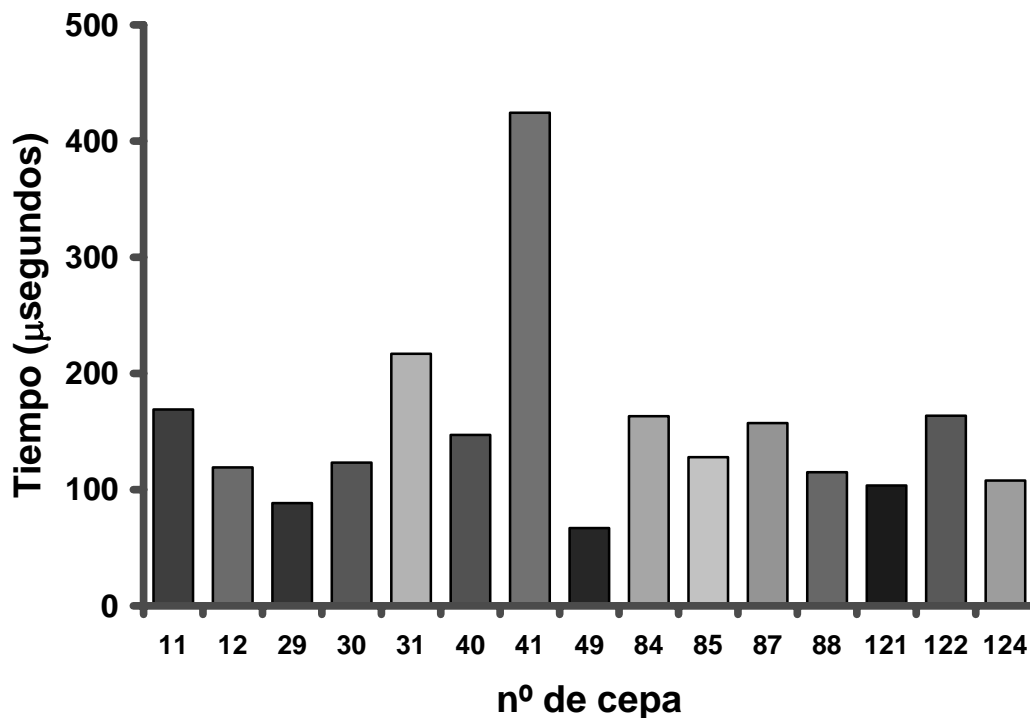


Figura 5.8.- Tiempo para inactivar 3 ciclos logarítmicos a 22 kV/cm en cepas de *S. aureus*.



Las figuras 5.9 y 5.10 muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico sobre la inactivación con PEF. La figura 5.9 representa las curvas de supervivencia de la cepa más resistente a los PEF (SA41) para intensidades de campo eléctrico comprendidas entre 15 y 28 kV/cm. En esa figura se puede observar como tratamientos a intensidad de campo eléctrico menor de 22 kV/cm durante hasta 400 μ s no provocan un sustancial descenso del número de supervivientes. Al contrario, cuando la intensidad de campo eléctrico estaba comprendida entre 22 y 28 kV/cm el cociente de inactivación se incrementó y el valor b decreció exponencialmente. La influencia de la intensidad de campo eléctrico tanto para esta cepa resistente a los PEF (SA41) como para una de las cepas sensibles (SA122) fue muy similar (figura 5.10); es decir, la diferencia en la resistencia entre las dos cepas se mantuvo en todas las intensidades de campo eléctrico probados.

Figura 5.9.- Curvas de supervivencia de *S. aureus* 41 a tratamientos con PEF a 15 kV/cm (■), 19 kV/cm (▲), 22 kV/cm (▼), 25 kV/cm (◆) y 28 kV/cm (●).

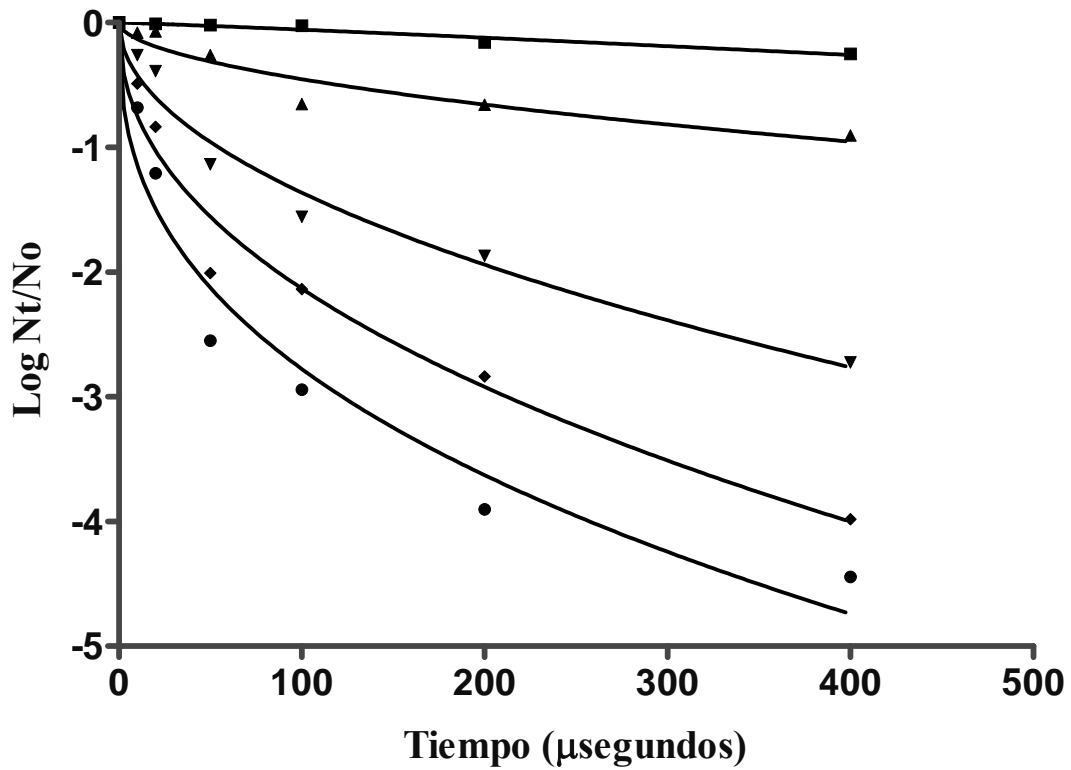
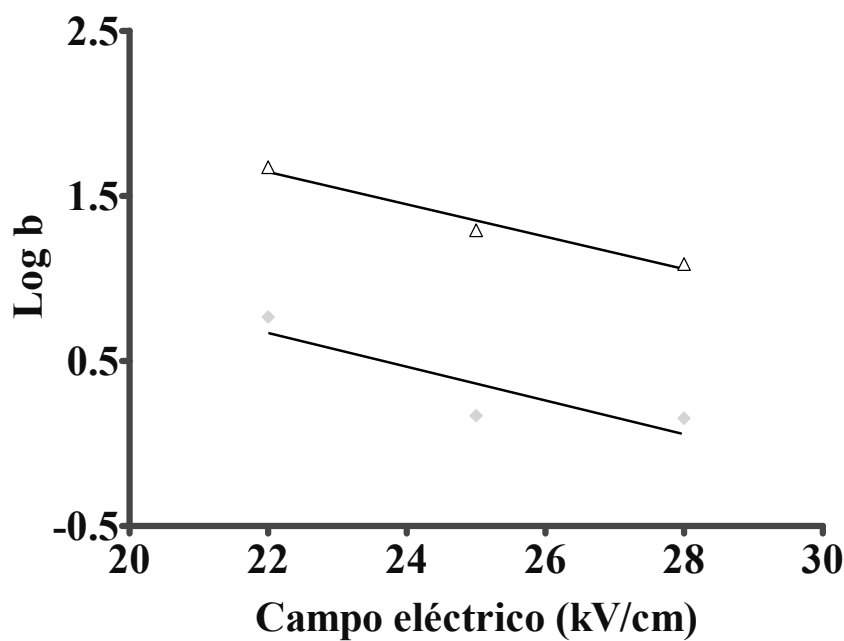


Figura 5.10.- Influencia del campo eléctrico en el valor *b* de *S. aureus* 41 (△) y *S. aureus* 122 (◆).



Relación entre la resistencia y el contenido en pigmentos. El contenido en carotenoides de las cepas estudiadas, medido a una absorbancia de 465 nm, se incluye en la tabla 5.1. La presencia de pigmentación amarilla se relacionó significativamente ($p < 0.001$) con la tolerancia al calor ($r^2 = 0.64$). El análisis de conglomerados para estos dos parámetros distinguió dos grupos principales: uno de resistencia al calor, compuesto por tres cepas de contenido alto en carotenoides (cepas SA11, SA12 y SA87) que presentaban un valor D_{58} promedio de 0.93 minutos, y uno sensible al calor con un valor D_{58} promedio de 0.17 minutos. La correlación observada entre la absorbancia a 465 nm y la resistencia a la MS no fue, en este caso, significativa ($p > 0.05$). Para los tratamientos con PEF, tampoco las relaciones lineales fueron significativas ($p > 0.05$) ya fuera utilizando los valores b o el tiempo de tratamiento necesario para la inactivación de tres ciclos logarítmicos.

Discusión

En este trabajo se utilizaron 15 cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo en un intento de caracterizar la resistencia de esta especie a varias tecnologías de conservación de los alimentos. Son pocos los estudios que han investigado la resistencia de *S. aureus* a los tratamientos con PEF (Evrendilek y col., 2004; García y col., 2005) y ninguno a la MS, aunque sí se dispone de información contrastada relativa al comportamiento de *S. aureus* frente al calor y a otros agentes causantes de estrés como las altas presiones hidrostáticas (Alpas y col., 1999). Estos últimos investigadores estudiaron la supervivencia de siete cepas de *S. aureus* a tratamientos de alta presión hidrostática, y de sus resultados se desprende que la variación en la resistencia puede ser más importante en este microorganismo que en otras especies microbianas. Resultó muy relevante que una de las siete cepas fuera particularmente resistente a la alta presión y que, además, hubiera relación entre la resistencia a la alta presión y al calor, es decir, las cepas más barotolerantes eran también más termotolerantes (Alpas y col., 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la variación en la resistencia entre las cepas de *S. aureus* depende del agente estresante aplicado. Así, mientras hemos observado grandes diferencias en la resistencia al calor entre las 15 cepas estudiadas, las mostradas bajo los tratamientos de PEF y de MS fueron pequeñas. Son destacables las grandes diferencias en la resistencia al calor, con valores de D_{58} comprendidos entre 1.10 minutos (cepa SA87) y 0.09 minutos (cepa SA124). Todos estos valores están comprendidos entre los que se citan para otras especies de bacterias no esporuladas en tampones de uso frecuente en laboratorio. Las cepas más resistentes mostraron valores del tiempo de reducción decimal muy próximos a los que se encuentran en la bibliografía para células vegetativas tolerantes al calor, como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella senftenberg* 775W, mientras que la más sensible presentó un valor D_{58} próximo al de

bacterias menos tolerantes al calor como *Salmonella* Thyphimurium o *Aeromonas hydrophila* (Mañas y col., 2001; Pagán y col., 1999). Sin embargo, incluso las cepas más termorresistentes de entre las estudiadas son bastante más sensibles que *Enterococcus faecium* (Pagán y col., 1999), coco Gram positivo que también posee una gruesa capa de peptidoglucano en su pared celular. El análisis de conglomerados permitió distinguir dos grupos principales de acuerdo con la resistencia al calor; uno que incluía tres cepas resistentes (cepas SA11, SA12 y SA87) y otro que incluía las restantes 12 cepas. Algunos autores han considerado que las cepas naturales son bastante resistentes a los diferentes agentes ambientales causantes de estrés (Humphrey y col., 1995; Shah y col., 1991). Sin embargo, nosotros hemos observado que la mayoría de las cepas estudiadas fueron muy sensibles al calor, con valores D_{58} entre 0.09 y 0.2 minutos. Esta sensibilidad puede ser atribuida en parte, aunque no exclusivamente, al tampón fosfato citrato utilizado como medio de calentamiento en este estudio en lugar de una matriz compleja como la leche o los caldos de cultivo. Es destacable que la influencia de la temperatura de tratamiento, de la misma manera que la intensidad de campo eléctrico en los tratamientos con PEF, fue idéntica para las cepas resistentes y para las sensibles. Esto indicaría que, a pesar de la inherente resistencia individual, para ambos tipos de cepas y para cada agente el mecanismo de inactivación celular fue probablemente el mismo.

Las diferencias en la resistencia a los tratamientos de manosonicación fueron menores que las observadas para los tratamientos con calor. Mientras que las diferencias presentadas entre el tiempo de reducción decimal para los tratamientos a 58 °C de la cepa más sensible y la más resistente fueron mayores de diez veces, solamente fueron de cuatro en los tratamientos con MS. Los tiempos de reducción decimal en los tratamientos de MS estuvieron comprendidos entre 5.3 y 1.3 minutos, y estos valores son superiores a los presentados por la mayoría de las células vegetativas investigadas hasta ahora

(*Streptococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Aeromonas hydrophila*) en condiciones de trabajo similares (Mañas y col., 2000; Pagán y col., 1999; Raso y col., 1998).

La resistencia a los PEF de la mayoría de las cepas de *S. aureus* estudiadas fue similar a la encontrada por otros autores en células vegetativas sensibles, como los serovares Enteritidis o Typhimurium de *Salmonella* (Álvarez y col., 2003), excepto para la cepa SA41. Esta cepa, aún siendo la más resistente a los pulsos eléctricos, fue más sensible que otros microorganismos Gram positivos investigados hasta el momento, como por ejemplo *Listeria monocytogenes* (Álvarez y col., 2003). El valor promedio de z_{PEF} obtenido fue de 11 kV/cm, dato similar al descrito por Álvarez y col. (2003) para tres serotipos de *S. enterica*.

Se ha observado que había correlación entre la alta resistencia al calor y la presencia de pigmentación amarilla. Las cepas no pigmentadas mostraron una resistencia baja al calor mientras que las cepas más resistentes, cepas SA87, SA11 y SA12, presentaban un alto contenido en pigmentos carotenoides (tabla 5.1). La presencia de pigmentos carotenoides en *S. aureus* se ha relacionado con un carácter dependiente de la fase de crecimiento que se expresa al comienzo de la fase estacionaria, controlado por el factor sigma alternativo *sigB* de fase estacionaria (Bischoff y Berger-Bächi, 2001). Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos parece que la tolerancia al calor podría ser un carácter fisiológico que depende del factor sigma alternativo de fase estacionaria (σ^B).

La relación entre la resistencia a MS y PFE de las cepas de *S. aureus* y el contenido en carotenoides no fue significativa ($p > 0.05$). Si, de acuerdo con Bischoff y Berger-Bächi (2001), consideramos el contenido en pigmentos como un indicador de la expresión del factor sigma alternativo *sigB* de fase estacionaria, nuestros resultados sugieren que los cambios celulares que se producen en el momento de alcanzarse la fase estacionaria

debidos al factor *sigB* tienen un papel fundamental en la tolerancia al calor, aunque son menos importantes para la resistencia a la MS e insignificantes para la tolerancia a los tratamientos con PEF. En el caso de bacterias Gram negativas, se han descrito algunos cambios celulares que podrían estar relacionados con el incremento generalizado de la resistencia en el momento de alcanzarse la fase estacionaria (Huisman y col., 1996). Estos cambios consisten en: condensación de DNA, modificaciones en la composición y conformación de la membrana citoplasmática, y engrosamiento de la pared celular, entre otros. Para bacterias Gram positivas, son escasos los trabajos que se han centrado en estudiar los cambios responsables del incremento de la resistencia.

El análisis de correlación de Pearson no mostró relaciones lineales significativas entre la resistencia a las tres condiciones de estrés aplicadas, es decir, ninguna de las cepas estudiadas presentaba una resistencia múltiple a los tratamientos probados. En general, se considera que las cepas más resistentes a un determinado agente son también más resistentes a otros tipos de agentes causantes de estrés. Sin embargo, existen estudios, incluido el nuestro, que no confirman este hecho.

La falta de relación significativa entre la resistencia al calor, a los PEF y a la MS indicaría que los mecanismos de inactivación son intrínsecamente diferentes. Se puede esperar que un microorganismo muy tolerante al calor pueda también ser tolerante al estrés oxidativo. Sin embargo, en lo relativo al calor, a los PEF y a la MS, y de acuerdo con nuestros resultados, podemos asumir que las características fisiológicas y morfológicas que tienen un papel importante en la supervivencia frente a un agente no son relevantes para la supervivencia frente a otros agentes causante de estrés. Desafortunadamente, el mecanismo último de inactivación por la aplicación de estas tres tecnologías no es bien conocido. Mientras que se han propuesto hipótesis claras para explicar cómo las células bacterianas son inactivadas por los ultrasonidos bajo presión y por los tratamientos con PEF, todavía se

sabe poco acerca de la acción del calor. Se conoce que el calor actúa sobre algunas estructuras en el interior de la célula bacteriana, como la membrana, la pared celular, los ribosomas, el RNA, etc., pero el punto clave y decisivo para la muerte celular todavía no ha sido identificado. Por otra parte, existe información sobre cómo los ultrasonidos con presión destruyen la célula por ruptura mecánica de las envolturas celulares (Raso y col., 1998) y, según la teoría de la electroporación de Zimmermann (1974), cómo los pulsos eléctricos provocan la muerte celular al inducir la formación de poros en la membrana citoplasmática. Un aspecto interesante de esta investigación es que la resistencia relativa a los tres agentes causantes de estrés, comparada con la presentada por otras células vegetativas procariotas, fue diferente para cada uno de los agentes. Mientras *S. aureus* es más resistente a la MS que la mayoría de las células vegetativas estudiadas hasta hoy, es un microorganismo de los más sensibles a los tratamientos con PEF, y su relativa resistencia al calor depende en gran medida de la cepa. La resistencia a la MS se explica posiblemente por la gruesa capa de peptidoglucano, el pequeño tamaño y la típica forma esférica de los estafilococos. Es muy probable que estas características protejan la célula contra el estrés mecánico inducido por los ultrasonidos. Se ha demostrado que las células mayores y de forma bacilar son más sensibles al efecto de los ultrasonidos (Pagán y col., 1999). Por tanto, en comparación con otras células procariotas, la relativa resistencia de *S. aureus* a la MS estuvo en correspondencia con la información disponible. Por el contrario, las características mencionadas anteriormente no otorgan un efecto protector a la célula frente al calor y a los pulsos eléctricos. En relación a los tratamientos con PEF, se ha propuesto que el tamaño y la forma de la célula son características críticas que influyen en la inactivación bacteriana mediante estos tratamientos (Heinz y col., 2001). Se acepta que la inactivación microbiana con PEF es consecuencia de la formación de poros en la membrana bacteriana por un incremento del potencial transmembrana una vez que la

intensidad del campo eléctrico exterior es incrementado por encima del valor crítico (Zimmermann y col., 1974). Las células esféricas deberían ser más sensibles a los tratamientos por PEF porque, de acuerdo con los cálculos teóricos, la intensidad de campo eléctrico crítica para la formación de poros es más baja (Heinz y col., 2001) pero, por otra parte, las células pequeñas deberían ser más resistentes por su reducida superficie. El grado de inactivación de las cepas de *S. aureus* ensayadas tras un tratamiento de 22 kV/cm durante 400 μ s fue mayor que el observado en *L. monocytogenes*, y parecido al encontrado en células bacilares Gram negativas como es el caso de *Salmonella* o *Yersinia* bajo condiciones similares (Álvarez y col., 2003; Wouters y col., 2001). Puesto que la mayoría de las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron muy sensibles a los tratamiento con PEF, se puede concluir que esta tecnología puede convertirse en una alternativa muy ventajosa a los tratamientos con calor para conseguir la inactivación de *S. aureus* en los alimentos. Solamente la cepa SA41 resistió significativamente mejor que las otras al tratamiento de 22 kV/cm (figura 5.7). Esta cepa SA41 no pigmentada se incluyó en el grupo de cepas sensibles al calor según el análisis de conglomerados. Las características fisiológicas o bioquímicas particulares de esta cepa que le proporcionan tal resistencia a los tratamientos con PEF son desconocidas. Por tanto, son necesarios más estudios centrados en este particular que permitan conocer el mecanismo concreto de inactivación.

De forma análoga a como la temperatura influye en la resistencia al calor, la influencia de la intensidad de campo eléctrico era independiente de la cepa estudiada (figura 5.10). Intensidades de campo eléctrico inferiores a 19 kV/cm inactivaron *S. aureus* a un ritmo bajo (figura 5.9). En el intervalo 22-28 kV/cm, la relación entre el valor b y la intensidad de campo eléctrico fue de tipo exponencial. Por tanto, fue posible calcular un valor Z_{PEF} según la descripción de Álvarez y col. (2003). El valor de Z_{PEF} fue de 11 kV/cm para las cepas SA41 y SA122 (figura 5.10). Este valor es muy parecido al que ya se había

determinado previamente para varios serotipos del género *Salmonella*. Desde un punto de vista práctico, los resultados obtenidos en este estudio confirman que el uso del modelo de Weibull para describir las curvas de supervivencia a los tratamientos con PEF, junto con la determinación del parámetro Z_{PEF} , son inestimables herramientas para establecer los parámetros de proceso que permitan conseguir un determinado grado de inactivación microbiana.

En resumen, en las condiciones en las que se realizó este estudio, *S. aureus* es una de las bacterias más resistentes a los tratamientos de ultrasonidos con presión pero sensible a los tratamientos con PEF. La supervivencia de *S. aureus* a los tratamientos térmicos depende de la cepa por la gran variación intraespecie en la resistencia. Sin embargo, las variaciones intraespecie en la resistencia a MS y PEF es mucho menor. La resistencia al calor de *S. aureus* se correlacionó con el contenido en pigmento carotenoide, hecho que se relaciona con la expresión del factor sigma alternativo de fase estacionaria (σ^B). No hubo relación significativa entre los patrones de resistencia de *S. aureus* a las tres tecnologías de conservación de alimentos. Finalmente, para el diseño de tratamientos que utilicen alguna de estas tecnologías, nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de escoger individualmente la cepa más resistente a cada uno de ellos, especialmente para los tratamientos térmicos, por la anteriormente citada escasa relación entre la resistencia a los tres agentes de estrés.

ORIGINAL ARTICLE

Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure

J.M. Rodríguez-Calleja, G. Cebrián, S. Condón and P. Manas

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

Keywords

Staphylococcus aureus, heat resistance, pulsed electric field, strain variation, ultrasound under pressure.

Correspondence

M^ª Pilar Manas, Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, C/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain. E-mail: manas@unizar.es

Present address

J.M. Rodríguez-Calleja, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de León, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071, León, Spain.

2005/0840: received 26 July 2005, revised 21 October 2005 and accepted 21 October 2005

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02868.x

ABSTRACT

Aims: To study and compare the resistance of 15 *Staphylococcus aureus* isolates to heat, pulsed electric field (PEF) and ultrasound (UW) under pressure (manosonication, MS).

Methods and Results: Survival curves to heat (58°C), to PEF (22 kV cm⁻¹, 2 µs square wave pulses) and to UW under pressure (117 µm, 20 kHz, 200 kPa) were obtained and inactivation parameters (decimal reduction times for heat and UW under pressure, and *b*-values for PEF) were calculated. A wide resistance variation to heat treatment, but not to PEF and MS, was observed amongst the 15 strains.

Conclusions: There was no relationship between the resistances to the three physical agents studied. *Staphylococcus aureus* was relatively resistant to MS but sensitive to PEF. Heat resistance varied with strain and was positively correlated to carotenoid pigment content.

Significance and Impact of the Study: Results would help in defining safe food preservation processes. Care should be taken to choose the most adequate strain of *S. aureus* to model food preservation processing.

Introduction


In recent years, there has been growing interest in the use of nonthermal alternative methods for microbial inactivation, such as, amongst others, pulsed electric field (PEF) and ultrasound (UW) under pressure (Raso and Barbosa-Cánovas 2003). The attraction of these technologies lies in the production of microbiologically safe foods with minimal changes in their sensory and nutritional attributes. Pulsed electric field technology consists of the application of short duration (1–100 µs) high electric field pulses (10–50 kV cm⁻¹) to a food placed between two electrodes. Ultrasound is defined as sound waves with frequencies above the threshold for human hearing (>16 kHz). Although UW was initially discarded for food preservation because of its weak lethal action, the simultaneous application of an external hydrostatic pressure of up to 600 kPa

(manosonication, MS) increases substantially the lethality of the treatment. Also, a combination of MS with temperature (manothermosonication, MTS) has been proposed (Raso *et al.* 1998). In the last decade, a big research effort has been directed towards the investigation of microbial inactivation by these novel technologies, including aspects such as the influence of process parameters, relative resistance of different spoilage and pathogenic microbial species and, to a lesser extent, environmental factors affecting the resistance and mechanisms leading to cell death (Manas and Pagán 2005). An aspect not sufficiently studied is the variation amongst strains of the same genus and species. This latter is especially important as care has to be taken to choose the appropriate target strains for testing the efficacy of novel processes, i.e. the most resistant strains, and when possible, multiple stress resistant strains (Benito *et al.* 1999; Sherry *et al.* 2004).

© 2006 The Authors

Journal compilation © 2006 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

1

	J	A	M	2	8	6	8	B	Dispatch: 30.1.06	Journal: JAM	CE: Sheeja
	Journal Name	Manuscript No.			Author Received:	No. of pages: 9	PE: Raymond				

A number of studies have reported that the resistance of a given species to a preservation technology may greatly vary amongst strains. Intraspecies resistance variation has been reported for several food preservation technologies (Patterson *et al.* 1995; Alpas *et al.* 1999; Benito *et al.* 1999; Manas *et al.* 2000; Lado and Yousef 2003; Álvarez *et al.* 2003; Sherry *et al.* 2004). Results published by Alpas *et al.* (1999) showed that intraspecies variation in resistance to high hydrostatic pressure was remarkably wider for *Staphylococcus aureus* than for other micro-organisms. With regard to PEF and UW, little information is available about the intraspecies variation in resistance. Data previously obtained in our laboratory with three different serotypes of *Salmonella enterica* have shown that resistance to heat treatments varies in a higher magnitude than resistance to UW under pressure (Manas *et al.* 2000) and to PEF (Álvarez *et al.* 2003).

Other authors have also investigated the occurrence of multiple stress resistant strains. It is generally acknowledged that the most resistant strains to a given stressing agent, e.g. heat, are also more tolerant to a variety of different stresses (Humphrey *et al.* 1995; Benito *et al.* 1999). However, some investigations seem to disagree with this general observation. Hauben *et al.* (1997) reported the isolation of highly barotolerant strains of *Escherichia coli*, which showed an average heat tolerance. Also Sherry *et al.* (2004) studied and compared the survival of 40 strains of *S. enterica* to heat, high pressure and irradiation treatments, and they found no relationship amongst the resistance to the three stresses.

The aim of this work was to study and compare the resistance of 15 natural isolates of a foodborne pathogen, *S. aureus*, to heat, PEF and MS treatments to identify multiple resistant strains and to study the relationships amongst the resistances to the three physical treatments.

Material and Methods

Bacterial culture and media

The *S. aureus* strains used in this investigation (SA11, SA12, SA29, SA30, SA40, SA41, SA49, SA84, SA85, SA87, SA88, SA121, SA122 and SA124) were food isolates provided by the Food Hygiene and Food Technology Department of the Faculty of Veterinary of León (Spain). Cultures were maintained in cryovials at -20°C . Stationary-phase cultures were prepared by inoculating 10 ml of tryptone soya broth (Biolife, Milan, Italy) supplemented with 0.6% yeast extract (Biolife) (TSB-YE) with a loopful of growth from tryptone soya agar supplemented with 0.6% yeast extract

(TSA-YE) (Biolife) and incubating the resulting culture overnight at 37°C , in a shaking incubator. 100–500 μl of this culture were inoculated into 50 ml of fresh TSB-YE and incubated for 24–30 h in the same conditions, which resulted in a stationary phase culture containing approx. 10^9 cells ml^{-1} .

Heat, PEF and MS resistance determinations

Mcllvaine citrate phosphate buffer of pH 7.0, whose concentration was adjusted to an electrical conductivity of 2 ms cm^{-1} , was used as treatment medium.

Heat and MS treatments were carried out in a specially designed resistometer as already described (Raso *et al.* 1998). Once temperature, and pressure and UW amplitude for MS determinations, had attained stability, 0.2 ml of an adequately diluted cell suspension (to 10^7 cell ml^{-1} , approx.) was injected into the 23-ml treatment chamber containing the treatment medium. After inoculation, 0.2-ml samples were collected at different treatment times and immediately pour plated using TSA-YE as recovery medium.

Pulsed electric field treatments were carried out in a square waveform pulse equipment previously described by Raso *et al.* (2000), provided with a parallel-electrode treatment chamber with a distance of 0.25 cm between electrodes and an area of 2.01 cm^2 . Pulse width of $2 \mu\text{s}$ and electric field strength from 15 to 28 kV cm^{-1} were used. The frequency was set to 1 Hz to keep the sample temperature below 35°C . Treatment time was calculated by multiplying the pulse width (τ) by the number of pulses applied. Bacterial cultures were centrifuged at 6000 g for 5 min, washed once and diluted 1/10 in buffer, to a concentration of 10^8 micro-organisms per millilitre. The diluted microbial suspension was placed into the treatment chamber with a sterile syringe. The hole of the treatment chamber was sealed with tape. After treatment, appropriate serial dilutions were prepared in sterile TSB-YE and plated into TSA-YE.

All resistance determinations were performed at least twice in independent experiments from cultures obtained in different days.

Incubation of treated samples and survival counting

Plates were incubated for 24 h at 37°C . Previous experiments showed that longer incubation times did not influence survivor counts. After incubation, colony forming units (CFU) were counted with an improved Image Analyzer Automatic Counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as described elsewhere (Condón *et al.* 1996).

Resistance parameters

Survival curves for heat, MS and PEF treatments were obtained by plotting the log number of survivors vs treatment time. The lethality of heat and MS treatments was measured by their decimal reduction time (D -value), which is defined as minutes of treatment for the number of survivors to drop one log cycle (D_t for heat and D_{MS} for MS treatments). The decimal reduction times curves (DRTC) were represented by plotting the log of the D_t -values vs treatment temperature, and z -values ($^{\circ}\text{C}$ increase necessary to reduce D_t -value a log cycle) were calculated. The 95% confidence limits (CL) and the statistical significance of differences ($P < 0.01$) between D_t and z -values were calculated with the appropriate statistical package (GraphPad PRISM[®]; Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

For PEF treatments, non-straight but concave upwards survival curves were observed. Therefore, a mathematical model based on the Weibull distribution was used to fit the survival curves as previously recommended by Álvarez et al. (2003). This model is described by the following equation:

$$\log_{10}S(t) = -(t/b)^n,$$

where $S(t)$ is the survival fraction; t , the treatment time (μs); and b and n are the scale and the shape parameter, respectively. The b -value represents the time needed to reduce the first \log_{10} cycle of the population (μs). To fit the model to the experimental data and to calculate the b and n parameters, the GraphPad PRISM[®] (Graphpad Software, Inc.) was used.

Quantification of carotenoid pigment content

Cell suspensions were collected in stationary phase of growth, optical density adjusted to a value of 1 and carotenoids extracted with methanol as described by Morikawa et al. (2001). The carotenoid content of the extracts was determined by their absorbance (A) at 465 nm. Determinations were performed at least twice and results in graphs correspond to the average values.

Cluster analysis and statistical significance of correlations

Cluster analysis was carried out with the spss software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) using the decimal reduction time values, the b -values and the A at 465 nm as discrimination parameters. Relationship between the A and the resistance to heat, PEF and MS was statistically measured by the Pearson's correlation coefficient calculated through the spss software.

Results

Heat resistance

Figure 1 shows survival curves of the 15 *S. aureus* strains heated at 58°C . As it can be seen in the figure, the inactivation course followed first order kinetics, at least for the range studied in this investigation ($r^2 \geq 0.97$). Therefore, decimal reduction time values were calculated, and are shown in Table 1. There were wide differences amongst the resistances to heat, with $D_{58^{\circ}\text{C}}$ -values ranging from 1.1 min for strain SA87 to 0.09 min for strain SA124 (Table 1). Observed values are amongst those described for other species of nonspore forming bacteria in laboratory buffers. The most resistant strains showed a decimal reduction time value close to that reported for heat tolerant vegetative cells such as *Listeria monocytogenes* and *S. enterica* serovar Senftenberg 775 W, whereas the most heat sensitive strain showed D_{58} -values close to those corresponding to heat labile cells such as *S. enterica* serovar Thyphimurium or *Aeromonas hydrophila* (Pagán et al. 1999; Manas et al. 2001). However, it is noteworthy that even the most heat-resistant strains used in this investigation were considerably more sensitive than *Enterococcus faecium* (Pagán et al. 1999), which is also a gram-positive coccus with a thick peptidoglycan layer in the cell wall.

Figure 2 represents the DRTC lines of a heat-resistant strain (strain SA11) and a heat-sensitive one (strain SA124). As it can be seen in the figure, the thermal dependence of the inactivation was the same for both micro-organisms, and the average z -value was 5°C .

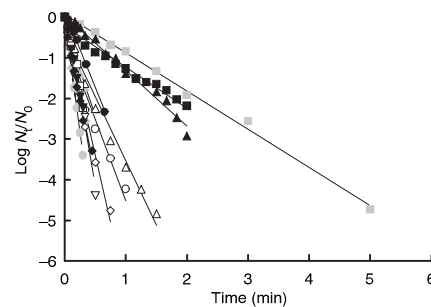
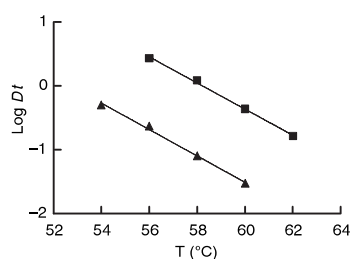


Figure 1 Survival curves to heat treatments at 58°C in pH 7 citrate-phosphate buffer of *Staphylococcus aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (◆), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▼), 122 (◆) and 124 (●).

Table 1 Resistance parameters to heat (D_{58}), manosonication (D_{MS}) and pulsed electric field (b , n) treatments in citrate-phosphate buffer and carotenoid content (A_{465}) of the 15 strains of *Staphylococcus aureus* tested

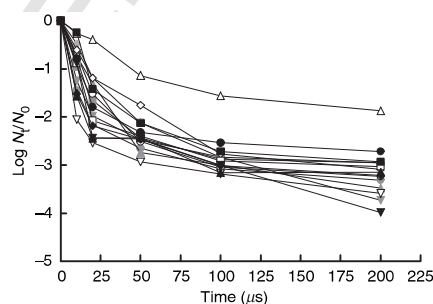
Strain	D_{58}	SD	D_{MS}	SD	b -value	SD	n -value	SD	A_{465}	SD
11	0.99	0.054	5.3	0.10	12	7.6	0.42	0.11	0.034	0.0038
12	0.73	0.026	4.4	0.20	0.39	0.50	0.19	0.046	0.029	0.0091
29	0.13	0.0038	3.2	0.30	3.6	2.7	0.34	0.078	0.008	0.00058
30	0.14	0.0064	1.8	0.12	0.84	0.51	0.22	0.029	0.010	0.0032
31	0.27	0.0055	5.0	0.23	4.0	3.5	0.28	0.076	0.015	0.0032
40	0.14	0.0087	4.2	0.24	2.8	2.6	0.28	0.074	0.014	0.001
41	0.32	0.020	2.4	0.10	55	10	0.54	0.095	0.007	0.0029
49	0.11	0.0074	3.2	0.23	0.10	0.053	0.17	0.013	0.010	0.0049
84	0.15	0.0093	4.1	0.30	14	4.4	0.45	0.064	0.018	0.0040
85	0.25	0.024	1.3	0.054	6.5	4.0	0.37	0.081	0.011	0.0038
87	1.1	0.025	2.7	0.29	3.9	2.7	0.30	0.064	0.022	0.0015
88	0.22	0.026	3.9	0.36	7.2	4.3	0.40	0.086	0.020	0.0040
121	0.14	0.0027	2.5	0.27	3.2	1.0	0.32	0.030	0.009	0.0032
122	0.09	0.0049	2.3	0.098	12	6.2	0.42	0.094	0.011	0.002
124	0.09	0.0022	3.5	0.17	0.97	0.65	0.23	0.035	0.008	0.001

D_{58} , decimal reduction time value at 58°C (min); D_{MS} , decimal reduction time value at 117 μm , 200 kPa and 40°C; b -value, time for the population to drop one log cycle according to a model based on the Weibull distribution; n -value, shape parameter of the model based on the Weibull distribution; A_{465} , A at 465 nm of a methanol soluble extract of the bacterial cells; SD, standard deviation.

**Figure 2** Decimal reduction time curves in pH 7 citrate-phosphate buffer of *S. aureus* 11 (■) and *S. aureus* 124 (▲).

PEF resistance

Figure 3 includes survival curves in pH 7 buffer of all the *S. aureus* strains at an electric field strength of 22 kV cm^{-1} . Survival curves obtained were concave upwards, and they could be described using the Weibull equation (r^2 -values > 0.99). b - and n -values calculated from all the survival curves are included in Table 1. However, in this case, comparisons amongst b -values obtained for all the strains were not appropriate as n -value, which is a parameter related to the shape of the curve, was not equal for all the strains (Table 1). Therefore, to compare the resistance of the fifteen strains, time needed for 3 log cycles inactivation was calculated according to the corresponding Weibull equations and results represented in Fig. 4. As shown in the figure, strain SA41 was notably

**Figure 3** Survival curves to pulsed electric field (PEF) treatments at 22 kV cm^{-1} in pH 7 citrate-phosphate buffer of *S. aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (●), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▼), 122 (●) and 124 (●).

more resistant to PEF, and this was statistically confirmed by the cluster analysis that, in this case, separated strain SA41 from the rest. Treatment time needed to inactivate 3 log cycles the population of strain SA41 was 425 μs whereas the average for the rest of strains was 133 μs . The resistance of the majority of *S. aureus* strains, apart from strain SA41, was close to that reported for sensitive vegetative prokaryotic cells, such as *S. enterica* serovar Enteritidis or Typhimurium (Álvarez et al. 2003). Even the most PEF resistant strain, strain SA41, was still more sensitive than other gram-positive micro-organisms, such as *L. monocytogenes* (Álvarez et al. 2002).

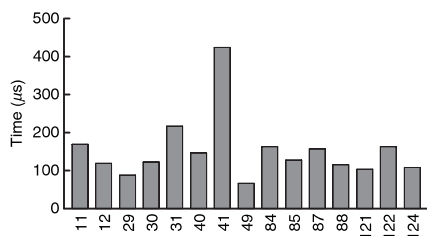


Figure 4 Time to inactivate 3 log cycles after a PEF treatment at 22 kV cm^{-1} in pH 7 citrate-phosphate buffer for the 15 strains of *S. aureus*.

Figure 5 illustrates the influence of the electric field strength on the inactivation by PEF. Figure 5a shows the survival curves of the most PEF resistant strain, at different electric field strengths ranging from 15 to 28 kV cm^{-1} . As it can be seen in the figure, treatments at electric field strengths lower than 22 kV cm^{-1} for up to $400 \mu\text{s}$ caused little decreases in the number of survivors of *S. aureus* 41. However, as the electric field strength was increased from 22 to 28 kV cm^{-1} , the inactivation rate increased and the b -value decreased exponentially. This effect of the electric field strength was the same for strain

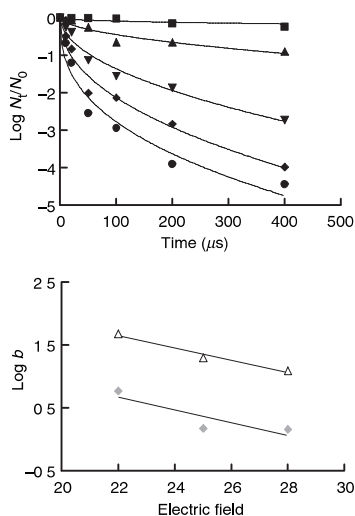


Figure 5 (a) Survival curves in pH 7 citrate-phosphate buffer of *S. aureus* 41 to PEF treatments at 15 kV cm^{-1} (■), 19 kV cm^{-1} (▲), 22 kV cm^{-1} (▼), 25 kV cm^{-1} (●) and 28 kV cm^{-1} (◆). (b) Influence of the electric field strength on the b -value of *S. aureus* 41 (△) and *S. aureus* 122 (◆).

SA41 and also for a PEF-sensitive strain (strain SA122). In other words, the differences in resistance between the two strains were maintained throughout the whole range of electric field strengths tested. Similarly to the z -value from the DRTC lines for heat treatments, the effect of the electric field strength could be described by a z_{PEF} -value as already proposed for *Salmonella* (Álvarez et al. 2003). For *S. aureus*, average z_{PEF} -value was 11 kV cm^{-1} , indicating that an increase of 10 kV cm^{-1} in the electric field strength decreases b -value by one-tenth. This value is similar to that described for three serotypes of *Salmonella enterica* (Álvarez et al. 2003).

MS resistance

Figure 6 shows the survival curves to a manosonication treatment at 37°C , $117 \mu\text{m}$ of amplitude and 200 kPa . For this agent, and similarly to heat inactivation, survival curves were straight ($r^2 \geq 0.96$) and D_{MS} -values could be calculated (Table 1). Differences in resistance to manosonication treatments were smaller than those observed for heat treatments. Whereas the difference between the decimal reduction time of heat treatments at 58°C of the most sensitive and the most resistant strain was of more than 10-fold, it was only fourfold for MS treatments. Decimal reduction times to MS treatments ranged from 5.3 to 1.3 min, and these values are greater than those reported for most vegetative species investigated under similar experimental conditions (Raso et al. 1998; Pagán et al. 1999; Manas et al. 2000).

Relationship between resistance and pigment content

The carotenoid content of the 15 strains, expressed as A at 465 nm , has been included in Table 1. As it can be

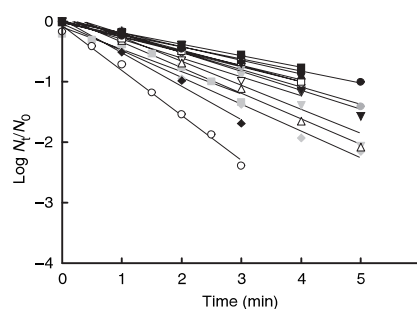


Figure 6 Survival curves to manosonication treatments ($117 \mu\text{m}$, 200 kPa , 37°C) in pH 7 citrate-phosphate buffer of *S. aureus* 11 (■), 12 (▲), 29 (▼), 30 (●), 31 (●), 40 (□), 41 (△), 49 (▽), 84 (◇), 85 (○), 87 (■), 88 (▲), 121 (▽), 122 (◆) and 124 (●).

seen in the table, the appearance of yellow pigmentation was related to heat tolerance. Pearson's correlation coefficient (0.801***) indicated a highly significant relationship between the two parameters (0.001). Cluster analysis according to these two parameters distinguished two main groups: a heat resistant one, comprising three strains of high carotenoid content (strains 11, 12 and 87) whose average D_{58} -value was 0.93 min, and a heat sensitive with an average D_{58} -value of 0.17 min. There was also a correlation between the A and the resistance to MS, but in this case the significance was lower (**). On the contrary, no relationship was found between the resistance to PEF, either expressed by b -values or treatment time needed for 3 log cycles inactivation.

Discussion

In an attempt to characterize the resistance of *S. aureus* to several food preservation technologies, 15 natural isolates from rabbit meat have been used in this study. So far, although some authors have studied the resistance of this pathogenic species to heat and to other stresses like high hydrostatic pressure (Alpas *et al.* 1999), limited studies have been carried out to investigate its resistance to PEF (Evrendilek *et al.* 2004; García *et al.* 2005) and none to MS. Moreover, little is known about the influence of the *S. aureus* strain on the resistance to environmental stresses. Alpas *et al.* (1999) studied the survival to high hydrostatic pressure treatments of seven strains of *S. aureus*, and their results suggested that variation in resistance might be more important for this micro-organism than for other microbial species. From their data, it was remarkable that one out of seven strains was particularly resistant to high pressure, and that there was a link between resistance to high pressure and to heat, i.e. barotolerant strains were also thermotolerant.

Results obtained in this work indicate that variation in resistance amongst strains of *S. aureus* depends on the stressing agent applied. Whereas we have observed wide differences in resistance to heat amongst the 15 strains used, differences were small for PEF and MS resistance. Decimal reduction times for heat treatments at 58°C varied more than 10-fold between the most sensitive and the most resistant strain. Cluster analysis distinguished two main groups according to their heat resistance, a group including three heat-resistant strains (strain SA11, SA12 and SA87) and a second group including the remaining 12 strains. Some researchers have reported that natural isolates tend to be fairly resistant to environmental stresses (Shah *et al.* 1991; Humphrey *et al.* 1995). However, in this investigation, we have observed that the majority of the strains tested were very heat sensitive, showing D_{58} -values between 0.09 and 0.2 min, which are even lower

than those reported for many gram-negative bacteria (Shah *et al.* 1991; Pagán *et al.* 1999). This sensitivity may be partly but not solely attributed to the heating medium used that was, in this investigation, citrate-phosphate buffer instead of complex media such as milk or broths. It is remarkable that the influence of the treatment temperature, as well as the electric field strength for PEF treatments, was the same for resistant and sensitive strains. This would indicate that, despite their individual inherent resistance, the mechanism involved in cell inactivation by each agent was probably the same for both strains, i.e. the key target affected and involved in cell death would be the same.

We have also observed that there was a correlation between the elevated heat resistance and the appearance of yellow pigmentation (Table 1). Nonpigmented strains showed reduced heat resistance whereas the most heat resistant strains, strains SA87, SA11 and SA12, showed a high content in carotenoid pigments. The presence of carotenoid pigments in *S. aureus* has been shown to be a growth phase depending character, which is expressed upon entry into stationary phase, under the control of the alternative sigma factor *sigB* (Bischoff and Berger-Bächi 2001). Therefore, it seems from our results that heat tolerance could be a physiological character dependent on the stationary phase alternative sigma factor.

Also survival to MS was related to the appearance of carotenoids in *S. aureus*, but in this case the significance of the correlation was lower. For PEF treatments, no correlation was observed between resistance and carotenoids content. If we consider pigment content as an indication of the expression of the alternative stationary phase sigma factor *sigB*, as demonstrated by other authors (Bischoff and Berger-Bächi 2001), these results would indicate that cellular changes induced upon entry into stationary phase by *sigB* have an essential role in heat tolerance, but are less important for MS tolerance and negligible for PEF resistance. For gram-negative cells, several cellular changes have been reported that could be involved in the generalized increase in resistance upon entry into stationary phase (Huisman *et al.* 1996). These include DNA condensation, modifications in the cytoplasmic membrane composition and conformation, thickening of the cell wall, amongst others. However, very little is known about changes in gram-positive cells that could account for an increase in resistance.

Pearson's correlation analysis revealed no relationship amongst the resistances to the three stresses tested, in other words, no multiple stress resistant strains could be identified. It is generally acknowledged that strains more resistant to a given agent tend to be more resistant to various other types of stresses (Humphrey *et al.* 1995; Benito *et al.* 1999). However, there are many reported

exceptions to this general rule. For instance, Hauben *et al.* (1997) isolated pressure-resistant mutant strains of *E. coli*, but not all barotolerant strains were also more thermotolerant. Similarly, Metrick *et al.* (1989) observed that the heat-resistant strain of *Salmonella*, *S. enterica* serovar Senftenberg 775 W, was more pressure-sensitive than other serotypes.

The lack of relationship amongst the resistances to heat, PEF and MS indicates that the mechanisms of inactivation are intrinsically different. One may expect that a micro-organism which is more tolerant to heat may also be more tolerant to oxidative stress, for instance, as during heating some oxidative reactive species are generated, and therefore common physiological responses may be activated resulting in cell protection and survival (Benov and Fridovich 1995). However, regarding heat, PEF and MS, and according to our results, we can assume that those morphological and physiological characteristics that play a role on survival to one agent are not relevant for survival for the other agents. Unfortunately, the degree of knowledge about the mechanisms involved in the inactivation by these three technologies is heterogeneous and no general conclusions can be drawn. Whereas clear hypotheses have been put forward to explain how bacterial cells are inactivated by UW under pressure and PEF, still much is unknown about heat. Ultrasound under pressure is known to kill cells through mechanical disintegration of the envelopes (Raso *et al.* 1998), and PEF leads to cell death by the formation of pores in the cytoplasmic membrane according to Zimmerman's electroporation theory (Zimmermann *et al.* 1974). Heat, however, is known to affect many different structures within the bacterial cell, such as the membrane, the cell wall, ribosomes, RNA, etc., but the key target leading to cell death has yet to be identified. An intriguing aspect of this investigation is that the relative resistance to the three agents, in comparison with other vegetative prokaryotic cells, was different for each agent. Whereas *S. aureus* was more resilient to MS than most vegetative cells investigated to date, it was one of the most sensitive to PEF, and its relative heat tolerance depended largely on the strain.

The resistance to MS was possibly explained by the presence of a thick peptidoglycan layer, the small size and spherical shape typical of *S. aureus*. These characteristics possibly protected the cells against the mechanical stress imposed by UW. It has been established that larger and bacillary cells are more easily hit and broken by ultrasonic waves (Pagán *et al.* 1999). Therefore, the relative elevated resistance of *S. aureus* to MS when compared with other prokaryotic cells was somehow expected. On the contrary, the characteristics mentioned above did not exert a protective effect to heat and PEF resistance. With regard to PEF, it has been proposed that cell size and shape are

critical parameters influencing the bacterial inactivation by PEF (Heinz *et al.* 2001). Microbial inactivation by PEF is believed to be a consequence of the formation of pores in the bacterial membrane because of the increase of the transmembrane potential when the external electric field is increased above a critical value or threshold (Zimmermann *et al.* 1974). Spherical cells should be more sensitive to PEF treatments because, according to theoretical calculations, the threshold electric field strength for pore formation is lower (Heinz *et al.* 2001), but on the other hand, smaller cells should be more resistant. The degree of inactivation attained after treatments at 22 kV cm^{-1} for $400 \mu\text{s}$ was higher than that observed for *L. monocytogenes*, and similar to that described for gram-negative bacillary cells such as *Salmonella* or *Yersinia* treated in similar experimental conditions (Wouters *et al.* 2001; Álvarez *et al.* 2003). However, recent results obtained in our laboratory have shown that the relative resistance of various prokaryote cells to PEF treatments depends not only on morphological characteristics such as shape and size of the cell, but also the pH of the treatment medium plays an essential role. Further research is needed to fully clarify these aspects to design PEF treatments with a greater bacterial lethality. In any case, because of the sensitivity to PEF of the majority of the *S. aureus* strains studied, it can be concluded that this technology could be an advantageous alternative to heat treatments for the inactivation of *S. aureus* in foods.

Only strain SA41 survived significantly better than the others to a treatment at 22 kV cm^{-1} (Fig. 3). Strain SA41 is a nonpigmented strain that was not resistant to heat, and according to the cluster analysis, it was included in the heat-sensitive group of strains. The particular physiological or biochemical characteristics of this strain that may be responsible for this resistance to PEF are unknown. Further work on this matter is required, as it would help understand the precise mechanisms involved in bacterial inactivation by PEF.

Similarly to the influence of temperature on heat resistance, the influence of the electric field strength was the same independently of the strain investigated, as it can be observed in Fig. 4. Electric field strengths below 19 kV cm^{-1} inactivated *S. aureus* at a much lower rate. In the range from 22 to 28 kV cm^{-1} , there was an exponential relationship between the b -value and the electric field strength. Therefore a z_{PEF} -value could be calculated as described by Álvarez *et al.* (2003). z_{PEF} was 11 kV cm^{-1} for both strains represented in the figure. This value is similar to that observed previously for several serotypes of the genus *Salmonella*. From a practical point of view, the results obtained in this investigation confirm that the use of the Weibull model to describe PEF survival curves, together with the use of the z_{PEF} parameter, constitutes a

useful tool to calculate the most adequate process parameters to obtain the desired level of bacterial inactivation.

Concluding remarks

Under the experimental conditions used in this investigation, *S. aureus* was one of the most resistant micro-organisms to UW under pressure treatments, but was sensitive to PEF, when compared with other vegetative prokaryotic species. Survival to heat treatments depended on the strain as a large intraspecies variation in resistance to this agent was observed. Intraspecies variation to MS and PEF was much lower. Heat resistance was correlated to carotenoid pigment content, suggesting a relationship with the stationary phase alternative sigma factor expression. There was no relationship between the resistances to the three food preservation technologies tested. These results emphasize the need to choose the most resistant strain, especially for heat treatments, as no multiple stress resistant strains, to the three stresses tested, have been detected.

Acknowledgements

J. M. Rodríguez-Calleja and G. Cebrián gratefully acknowledge the financial support for their doctoral studies from the Spanish Ministry of Education and Culture.

References

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. and Ray, B. (1999) Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4248–4251.
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S. and Raso, J. (2002) Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Lett Appl Microbiol* **35**, 489–493.
- Álvarez, I., Manas, P., Condón, S. and Raso, J. (2003) Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *J Food Sci* **68**, 2316–2320.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T. and Mackey, B. (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1564–1569.
- Benov, L. and Fridovich, I. (1995) Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 3344–3346.
- Bischoff, M. and Berger-Bächi, B. (2001) Teicoplanin stress-selected mutations increasing σ^B activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **45**, 1714–1720.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J. and Sala, F.J. (1996) Influence of the incubation temperature alter heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* **22**, 149–152.
- Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H. and Richter, E.R. (2004) Application of pulsed electric fields to skim milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosyst Eng* **87**, 137–144.
- García, D., Gómez, N., Manas, P., Condón, S., Raso, J. and Pagán, R. (2005) Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J Appl Microbiol* **99**, 94–104.
- Hauben, K.J.A., Bartlett, D.H., Soontjens, C.C.F., Cornelis, K., Wuytack, E.Y. and Michiels, C.W. (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* **63**, 945–950.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A. and Knorr, D. (2001) Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends Food Sci Technol* **12**, 103–111.
- Huisman, G.W., Siegele, D.A., Zambrano, M.M. and Kolter, R. (1996) Morphological and physiological changes during stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology* ed. Neidhardt, F.C. pp. 1672–1682. Washington: ASM Press.
- Humphrey, T.J., Slater, E., McAlpine, K., Rowbury, R.J. and Gilbert, R. (1995) *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3161–3164.
- Lado, B.H. and Yousef, A.E. (2003) Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2223–2229.
- Manas, P. and Pagán, R. (2005) A review: microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J Appl Microbiol* **98**, 1387–1399.
- Manas, P., Pagán, R., Raso, J., Sala, F.J. and Condón, S. (2000) Inactivation of *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. senftenberg* by ultrasonic waves under pressure. *J Food Prot* **63**, 451–456.
- Manas, P., Pagán, R., Leguérinel, I., Condón, S., Mafart, P. and Sala, F.J. (2001) Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **63**, 209–216.
- Metrick, C., Hoover, D.G. and Farkas, D.F. (1989) Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *J Food Sci* **54**, 1547–1549.
- Morikawa, K., Maruyama, A., Inose, Y., Higashide, M., Hayasi, H. and Ohta, T. (2001) Overexpression of sigma factor, σ^B , urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist β -lactams. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 385–389.
- Pagán, R., Manas, P., Raso, J. and Condón, S. (1999) Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at non lethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Appl Environ Microbiol* **65**, 297–300.

- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. and Gilmour, A. (1995) Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J Food Prot* **58**, 524–529.
- Raso, J. and Barbosa-Cánovas, G. (2003) Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**, 265–285.
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S. and Sala, F.J. (1998) Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Appl Environ Microbiol* **64**, 465–471.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S. and Sala, F.J. (2000) Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric field. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **1**, 21–29.
- Shah, D.B., Bradshaw, J.G. and Peeler, J.T. (1991) Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *J Food Sci* **56**, 391–393.
- Sherry, A.E., Patterson, M.F. and Madden, R.H. (2004) Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *J Appl Microbiol* **96**, 887–893.
- Wouters, P.C., Álvarez, I. and Raso, J. (2001) Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Sci Technol* **12**, 112–121.
- Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F. (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* **14**, 881–899.

CAPÍTULO 6.-

TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN APLICADAS A LA CARNE DE CONEJO: ENVASADO A VACÍO Y ENVASADO EN ATMÓSFERAS DE 100% CO₂ Y MEZCLA DE 35% CO₂ : 35% O₂ : 30% N₂



▪ Introducción	145
▪ Material y Métodos	147
▪ Resultados	153
▪ Discusión	170

Introducción

La carne de conejo posee características particulares desde el punto de vista nutritivo si se compara con las denominadas “carnes rojas” (vacuno, porcino, ovino, caprino). El consumo de carne de conejo es, en España, inferior al de otro tipo de carnes, si bien experimentó un aumento progresivo en el periodo de 1980 a 1999 (Cruz, 2002). Su forma habitual de comercialización es en canales enteras o en cortes que, cada vez más frecuentemente, se exponen envasadas en bandejas o bolsas recubiertas de una película de material plástico permeable, en mayor o menor medida al oxígeno.

La comercialización de la carne fresca está limitada por su corta vida útil. Uno de los procedimientos para prolongar el período de comercialización, popularizado a partir de la década de los 80, consiste en la aplicación de métodos de envasado que modifican la composición gaseosa de la atmósfera que rodea la carne: envasado en atmósferas modificadas (EAM).

El almacenamiento a temperaturas de refrigeración de las canales o de los cortes envasados en atmósferas modificadas permite incrementar considerablemente su vida útil, sin que se vean afectadas significativamente las características organolépticas y nutricionales (Stiles, 1991).

Para modificar la composición gaseosa de la atmósfera que rodea íntimamente a la carne pueden emplearse diferentes gases: oxígeno (O₂), anhídrido carbónico (CO₂) y nitrógeno (N₂). El empleo de O₂ pretende, primordialmente, mantener la mioglobina en su forma oxigenada, conservándose así el color rojo brillante característico de la carne fresca, sin embargo, al mismo tiempo puede favorecerse el crecimiento de los principales microorganismos alterantes de la carne refrigerada: las bacterias aerobias psicrotrofas.

El CO₂ inhibe el crecimiento y el metabolismo de diferentes grupos microbianos, especialmente de las bacterias Gram negativas. El N₂ se utiliza como elemento inerte ya que es inodoro, insípido y poco soluble en agua, evitando el colapso del envase (Farber, 1991). Otros gases cuyo empleo contempla la normativa española y europea (Anónimo, 2002), en concreto argón, helio, óxido nitroso e hidrógeno, no son habitualmente empleados para el envasado en atmósfera modificada de las canales o de los cortes.

La proporción de los diferentes gases en el momento de envasado, junto con el material de envasado (cuyas características de permeabilidad condicionan la evolución de la atmósfera interna del envase) son específicos para cada tipo de producto.

Aunque son numerosos los estudios relativos a la aplicación del EAM y del envasado al vacío en la carne de vacuno (Clark y Lentz, 1969; Gill y Badoni, 2002; Grau F.H. y col., 1985; Insausti y col., 2002; Silliker y col., 1977; Skandamis y Nychas, 2002), en la de porcino (Asensio y col., 1988; Krause y col., 2003; Mano y col., 2002; Silliker y col., 1977; Spahl y col., 1981) y en la de pollo (Gardner y col., 1977; Gill y col., 1990; Kakouri y Nychas, 1994; Marshall y col., 1992; Saucier y col., 2000; Sawaya y col., 1995), son muy limitados los datos publicados relativos a la aplicación del EAM en la carne de conejo (Cantoni, 1976; Garipey y col., 1986).

El objetivo de este trabajo ha sido conocer cómo evoluciona la calidad microbiológica, incluidos algunos parámetros relacionados con la alteración de la carne, así como la calidad sensorial de la carne de conejo almacenada a refrigeración en diferentes atmósferas de envasado: vacío, 100% CO₂ y una combinación comercial constituida por 35% CO₂: 35% O₂: 30% N₂.

Material y Métodos

Pruebas de envasado y almacenamiento. Un total de 144 canales de conejo fueron adquiridas en un matadero de la provincia de León 24 horas (3 ± 1 °C) después del sacrificio de los animales. Las canales se obtuvieron en forma de 12 lotes constituidos cada uno de ellos por 10 ó 14 canales de, aproximadamente, 1.1 kg de peso. Desde la adquisición hasta su envasado, las canales se mantuvieron refrigeradas, transcurriendo alrededor de 2 horas.

De cada canal se separaron higiénicamente los muslos traseros que, inmediatamente, se colocaron en una bandeja de polietileno de baja densidad que se introducía en una bolsa Cryovac® BB4L (Cryovac, Barcelona, España), cuyas características de permeabilidad, según el fabricante, eran:

- permeabilidad al O₂ (23 °C; 0% HR) 30 cm³/m²/24h/bar,
- permeabilidad al CO₂ (23 °C; 0% HR) 150 cm³/m²/24h/bar,
- permeabilidad al vapor de agua (38 °C; 90%HR) 20 g/24h/m².

Se ensayaron las siguientes condiciones de envasado:

- a) envasado a vacío,
- b) envasado en una atmósfera compuesta al 100% por CO₂, y
- c) envasado en una atmósfera habitualmente empleada para la conservación de las carnes blancas (pollo, pavo, conejo, etc), y constituida aproximadamente por una mezcla de 35% CO₂: 35% O₂: 30%N₂ (en adelante “mezcla 1”).

En todos los casos, el envasado se llevó a cabo con una envasadora Multivac B.V. mod. A-300 (EMO S.A., Barcelona, España). Tanto el CO₂ como la combinación gaseosa ensayada (35% CO₂: 35% O₂: 30%N₂) fueron proporcionadas por Carburos Metálicos S.A. (Barcelona, España). Los muslos una vez envasados se conservaban a 3 ± 1 °C.

Toma de muestras y repeticiones de los experimentos. Cada semana se retiraban de la cámara frigorífica dos envases a fin de determinar los parámetros microbiológicos (en uno de los muslos contenidos en el envase) y los físicos, químicos y físico-químicos (en el segundo de los muslos procedentes de cada envase) que a continuación se señalan así como para llevar a cabo el análisis sensorial del modo que se indica más adelante. La toma de muestras se prolongó hasta la tercera semana para las carnes envasadas en la mezcla 1 y hasta la sexta semana para las envasadas a vacío y en la atmósfera de 100% de CO₂. Para las carnes envasadas con la mezcla 1 se tomó una muestra adicional el día 18 a partir de su envasado.

Cada condición de envasado se estudió en cuatro lotes de conejos. Así pues, se obtuvieron ocho valores (4 lotes x 2 muestras por lote) para cada uno de los parámetros determinados en cada uno de los momentos de muestreo.

Parámetros analizados

● *Composición gaseosa de la atmósfera del envase.* Inmediatamente antes de la apertura del envase, su contenido gaseoso (porcentaje de CO₂ y O₂) fue determinado mediante un procedimiento electroquímico con un analizador de gases (Oxy-Check 8003 Ltd., Temac Instruments).

● *Análisis sensorial.* Un conjunto de cinco expertos de la Universidad de León realizó el análisis sensorial de la carne de conejo una vez abiertos los envases. A tal fin, se utilizó, en cada ocasión, el muslo que posteriormente se empleaba en las determinaciones físicas, químicas y físico-químicas. Se evaluaron el olor (a la apertura del envase y tras un minuto de exposición al aire), la textura y la apariencia general (color de la carne, color de la grasa, limosidad, humedad, presencia de exudado) calificándose cada una de las características sensoriales analizadas como aceptable (3), regular (2) o inaceptable (1). Una

muestra se consideró alterada cuando en alguna de las características analizadas se le otorgaba por la mayoría de los analistas la calificación de inaceptable (1). El final de la vida útil de cada muestra se estableció en el primer momento en que se calificó como alterada.

● *Análisis físico, químico y físico-químico.* Uno de los muslos de conejo de cada bandeja fue empleado para determinar los valores de pH, el volumen de extracto liberado (ERV) y el contenido en ácido láctico (isómeros D y L).

Los valores de **pH**, medidos en el músculo *Biceps femoris* tras la incisión de la aponeurosis, fueron determinados con un pHmetro Crison pH/mV506 (Crison, Barcelona, España) dotado de un electrodo de punción de vidrio (Crison cat. nº 52-32) (Ouhayoun y Dalle Zotte, 1996). El pH también fue determinado en homogeneizados de carne (10 g de músculo en 10 ml de agua destilada) usando un pHmetro micropH 2001 (Crison) equipado con un electrodo combinado convencional (Crison cat. nº 52-02). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dos determinaciones de pH llevadas a cabo por lo que las tablas reflejan el valor obtenido con el electrodo de punción.

El **ERV** fue medido según la metodología descrita por Kirk y Sawyer (1991). Para ello, se tomaban 15 g de carne del muslo que se troceaban minuciosamente con un cuchillo, mezclándose, a continuación, con 60 ml del reactivo de extracción (compuesto por 15 ml de una solución 0.2M de KH_2PO_4 , 1.12 ml de una solución 0.2 M NaOH, y 43.88 ml de agua destilada, ajustándose su pH a 5.8). La mezcla se homogeneizaba durante 2 minutos en un homogeneizador Sorvall Omni Mixer (Sorvall, Pacisa, Madrid, España). El ERV corresponde al volumen liberado que atravesaba un filtro de 18.5 cm (Whatman nº 1) dispuesto en un embudo sobre el que se situaba la anterior mezcla homogeneizada durante 15 minutos.

Las cantidades de ácido D-láctico y ácido L-láctico fueron determinadas mediante procedimientos enzimáticos (número de catálogo 1112821, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) que emplean D-lactato y L-lactato deshidrogenasa, respectivamente. Para estas determinaciones químicas, se partía de 5 g de muslo de conejo y se procedía según las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim).

● *Análisis microbiológico.* Para la **preparación de las muestras**, y tras la apertura del envase, uno de los muslos se colocaba en una bolsa de homogeneización estéril a la que se le añadía el volumen de agua de peptona bacteriológica al 0.1% (Oxoid, Basingstoke, UK) necesario para obtener una dilución 1:5 (peso/volumen). El muslo se masajeaba manualmente durante 30 segundos y a partir del líquido de lavado resultante se realizaron las oportunas diluciones decimales también con agua de peptona al 0.1% (Barnes e Impey, 1973).

Los recuentos de la **microbiota aerobia mesófila** y de la aerobia **psicrotrofa** fueron determinados por siembra en la profundidad de “agar para recuento en placa” (“plate count agar”, PCA; Oxoid) e incubación a 30 °C-2 días y 4.5 °C-14 días, respectivamente (Harrigan, 1998).

Los recuentos de presuntos **clostridios** psicrotrofos sulfito reductores se obtuvieron mediante siembra en la superficie de agar perfringens de Shahidi-Ferguson con yema de huevo (Oxoid) e incubación durante 14 días a 20 °C en una jarra de anaerobios, con bolsitas generadoras de anaerobiosis (Oxoid) (Broda y col., 1998).

La población de *Pseudomonas* fue determinada por siembra en la superficie de agar base *Pseudomonas* (Oxoid) al que se había añadido previamente el suplemento selectivo CFC (cetrimida, fucidina, cefaloridina; Oxoid), con incubación de las placas a 25 °C durante 48 horas (Harrigan, 1998).

Las *Enterobacteriaceae* fueron contadas en placas de agar glucosa rojo neutro con cristal violeta y bilis (“*violet red bile glucose agar*”, VRBGA; Oxoid), con siembra en profundidad y sobrecapa, tras 24 h de incubación a 37 °C. Los recuentos de **bacterias ácido-lácticas** (BAL) se realizaron en placas de agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Oxoid), mediante siembra en profundidad y adición de sobrecapa e incubación a 30 °C durante 3 días. Ambas determinaciones fueron realizadas siguiendo los protocolos descritos por la “American Public Health Association” (Hall y col., 2001; Kornacki y Johnson, 2001).

La población de *Brochothrix thermosphacta* se determinó por siembra en superficie de agar con acetato de talio, cicloheximida y sulfato de estreptomicina (“streptomycin sulphate cicloheximide thallos acetate agar”, STAA, Oxoid) después de una incubación a 22 °C durante 2 días (Gardner, 1966).

La **población fúngica** fue determinada por siembra en la superficie de placas de agar extracto de levadura con glucosa y oxitetraciclina (“oxytetracycline glucose yeast extract agar”, OGYEA, Oxoid) que se incubaron a 25 °C durante 5 días. Se realizó una primera diferenciación entre levaduras y mohos según Harrigan (1998).

Análisis estadístico. Los recuentos de los diferentes grupos microbianos se transformaron en \log_{10} ufc/g. Los estadísticos descriptivos básicos (medias y desviaciones estándar) de los diferentes parámetros determinados se calcularon mediante el programa “Statistica for Windows” versión 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, www.statsoft.com).

El mismo programa fue utilizado para estimar la relación lineal entre los parámetros. Para establecer la influencia o no del tipo de atmósfera y del día de toma de muestras en cada uno de los parámetros investigados se llevó a cabo un análisis de la varianza (análisis factorial de la varianza), estimándose posteriormente la significatividad de las diferencias (por pares) mediante la prueba de Fisher de la menor diferencia significativa (“Fisher’s Least Significant Difference test”) también con el programa de análisis estadístico antes indicado. El mismo tipo de análisis (factorial de la varianza, y, en su caso, significatividad de las diferencias mediante la citada prueba de Fisher) se empleó para establecer, en cada condición de envasado, la influencia del lote.

Resultados

En la tabla 6.1 se muestran los resultados del análisis de la varianza indicando para cada uno de los parámetros analizados los valores indicativos de la influencia del día de almacenamiento, del tipo de atmósfera, de la conjunta de día y tipo de atmósfera, así como el efecto residual.

En la tabla 6.2 se presenta la evolución de los valores de pH, ERV y contenido en ácido L-láctico (media \pm desviación estándar) durante el almacenamiento de la carne de conejo en las tres condiciones atmosféricas ensayadas. En ninguna de las muestras analizadas se detectó ácido D-láctico (límite de detección de la metodología empleada: 0.006%). La evolución de las poblaciones de los diferentes grupos microbianos estudiados (\log_{10} ufc/g, media \pm desviación estándar), para las mismas muestras y condiciones, se muestra en la tabla 6.3. Para los tres tipos de atmósferas, el recuento de mohos fue inferior al límite de detección (25 ufc/g).

Tabla 6.1.- Influencia del día de almacenamiento, el tipo de atmósfera y su interacción (día x atmósfera) en los valores de pH, volumen de extracto liberado, contenido en ácido L-láctico así como en las principales poblaciones microbianas de la carne de conejo (análisis factorial de la varianza).

a) pH, volumen de extracto liberado (ERV) y contenido en ácido L-láctico

	Df	pH				ERV				L-láctico			
		SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p
Intersección	1	1760.394	1760.394	31868.04	0.000000	7764.268	7764.268	833.7447	0.000000	10.76549	10.76549	393.9315	0.000000
Día	3	0.017	0.006	0.10	0.959489	378.478	126.159	13.5473	0.000005	0.09983	0.03328	1.2176	0.326795
Atm	2	1.355	0.677	12.26	0.000092	57.448	28.724	3.0844	0.058376	0.13842	0.06921	2.5325	0.102364
Día*atm	6	0.156	0.026	0.47	0.825854	27.395	4.566	0.4903	0.811096	0.20918	0.03486	1.2757	0.308619
Error	36	1.933	0.055			325.938	9.313			0.60122	0.02733		
Total	47	3.485				792.138				1.01455			

Df, grados de libertad; SS, suma de los cuadrados de las desviaciones; MS, media cuadrática; F, valor del estadístico F; p, nivel de significación para la influencia del factor.

b) Microbiota aerobia mesófila (RAM), microbiota aerobia psicrotrofa (RAP) y *Pseudomonas*

	Df	RAM				RAP				<i>Pseudomonas</i>			
		SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p
Intersección	1	1541.61	1541.61	4953.624	0.0000	1589.21	1589.214	4918.889	0.0000	990.26	990.2617	1416.314	0.000
Día	3	64.48	21.49	69.070	0.0000	73.26	24.423	75.593	0.0000	45.81	15.2706	21.841	0.000
Atm	2	8.34	4.17	13.400	0.0000	17.39	8.699	26.926	0.0000	44.65	22.3283	31.935	0.000
día*atm	6	9.95	1.65	5.315	0.0005	10.00	1.667	5.160	0.0007	21.58	3.5969	5.144	0.007
Error	36	10.89	0.31			11.30	0.323			24.47	0.6992		
Total	47	93.47				113.94				138.49			

Df, SS, MS, F, p como en la tabla 6.1a.

Tabla 6.1 (continuación).- Influencia del día de almacenamiento, el tipo de atmósfera y su interacción (día * atmósfera) en los valores de pH, volumen de extracto liberado, contenido en ácido L-láctico así como en las principales poblaciones microbianas de la carne de conejo (análisis factorial de la varianza).

c) Bacterias ácido-lácticas y *Brochothrix thermosphacta*.

	Df	Bacterias ácido-lácticas				<i>Brochothrix thermosphacta</i>			
		SS	MS	F	p	SS	MS	F	p
Intersección	1	1093.599	1093.599	1523.030	0.000000	677.6553	677.6553	957.3102	0.000000
Día	3	87.494	29.165	40.617	0.000000	79.3472	26.4491	37.3641	0.000000
Atm	2	14.415	7.207	10.037	0.000359	40.1901	20.0950	28.3879	0.000000
día*atm	6	6.266	1.044	1.454	0.222419	14.7915	2.4653	3.4826	0.008448
Error	36	25.131	0.718			24.7756	0.7079		
Total	47	135.058				161.1964			

Df, SS, MS, F, p como en la tabla 6.1a.

d) Enterobacteriaceae y levaduras.

	Df	Enterobacteriaceae				Levaduras			
		SS	MS	F	p	SS	MS	F	p
Intersección	1	216.0715	216.0715	410.7232	0.000000	664.2189	664.2189	1288.558	0.000000
Día	3	37.7784	12.5928	23.9372	0.000000	26.0320	8.6773	16.834	0.000001
Atm	2	38.9838	19.4919	37.0515	0.000000	25.4802	12.7401	24.715	0.000000
día*atm	6	18.2816	3.0469	5.7918	0.000287	5.7280	0.9547	1.852	0.117301
Error	36	18.4126	0.5261			18.0416	0.5155		
Total	47	116.9976				76.5863			

Df, SS, MS, F, p como en la tabla 6.1a.

Tabla 6.2.- Evolución del pH, el volumen de extracto liberado y el contenido en ácido L-láctico de carne de conejo envasada en tres tipos de atmósfera modificada y almacenada a temperatura de refrigeración (3 ± 1 °C).

Día	pH			Volumen de extracto liberado (ERV) en ml			Contenido en ácido L-láctico (%)		
	Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase		
	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1 ⁽¹⁾	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1
0	⁽²⁾ 1 ⁽³⁾ 6.3±0.2 ^{(3) A}	¹ 6.1±0.3 ^A	¹ 6.1±0.2 ^A	¹ 21.0±7.0 ^A	¹ 16.2±2.4 ^A	¹ 19.1±2.0 ^A	¹ 0.52±0.05 ^A	¹ 0.60±0.25 ^A	¹ 0.64±0.18 ^A
7	¹ 6.4±0.2 ^A	¹ 6.1±0.3 ^B	¹ 5.9±0.1 ^B	² 12.4±5.0 ^A	² 9.7±0.8 ^A	¹ 14.4±1.4 ^A	¹ 0.54±0.05 ^A	² 0.98±0.44 ^B	¹ 0.56±0.10 ^A
14	¹ 6.3±0.4 ^A	¹ 6.0±0.1 ^A	¹ 6.1±0.2 ^A	² 10.0±1.6 ^A	² 8.6±1.1 ^A	¹ 11.7±4.9 ^A	¹ 0.51±0.05 ^A	² 0.59±0.09 ^A	¹ 0.61±0.02 ^A
18	NI ⁽⁴⁾	NI	¹ 6.0±0.3	NI	NI	¹ 12.7±2.9	NI	NI	¹ 0.51±0.10
21	¹ 6.5±0.2 ^A	¹ 6.1±0.1 ^B	¹ 5.9±0.2 ^B	² 10.6±3.1 ^A	² 11.9±4.4 ^A	¹ 11.9±1.1 ^A	¹ 0.52±0.14 ^A	² 0.65±0.12 ^A	¹ 0.51±0.05 ^A
28	¹ 6.3±0.1 ^A	¹ 6.2±0.1 ^A	NI	² 10.2±2.0 ^A	² 9.1±1.9 ^A	NI	¹ 0.55±0.11 ^A	² 0.69±0.08 ^A	NI
35	¹ 6.5±0.2 ^A	¹ 6.2±0.2 ^A	NI	² 8.9±2.6 ^A	² 7.3±1.4 ^A	NI	¹ 0.55±0.16 ^A	² 0.58±0.01 ^A	NI
42	¹ 6.4±0.2 ^A	¹ 6.0±0.1 ^A	NI	² 6.8±1.0 ^A	² 10.4±1.4 ^A	NI	¹ 0.44±0.03 ^A	² 0.54±0.11 ^A	NI

En cada caso, los valores (media ± desviación estándar) proceden de 4 lotes (2 muestras/lote).

⁽¹⁾Mezcla compuesta aproximadamente por 35% de CO₂, 35% de O₂ y 30% de N₂

⁽²⁾En cada columna y para cada parámetro, cada valor y el siguiente que porten el mismo número no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$)

⁽³⁾En cada fila y para cada parámetro, los valores que porten la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$)

⁽⁴⁾NI, no investigado

Tabla 6.3.- Influencia del tipo de envasado en la evolución de diferentes poblaciones microbianas durante el almacenamiento a refrigeración (3±1 °C) de carne de conejo.

a) Microbiota aerobia mesófila (RAM), microbiota aerobia psicrotrofa (RAP) y *Pseudomonas*

Día	RAM			RAP			<i>Pseudomonas</i>		
	Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase		
	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1 ⁽¹⁾	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1
0	⁽²⁾ 1 ³ 7.79±0.61 ^{(3)A}	¹ 4.42±0.30 ^A	¹ 4.05±0.30 ^A	¹ 3.95±0.61 ^A	¹ 4.25±0.51 ^A	¹ 3.68±0.12 ^A	¹ 3.57±0.97 ^A	¹ 3.28±0.51 ^A	¹ 2.89±0.72 ^A
7	² 5.91±0.46 ^A	¹ 4.76±0.80 ^B	² 5.24±0.73 ^{AB}	² 6.03±0.33 ^A	¹ 4.46±0.98 ^B	² 5.50±0.87 ^A	² 5.29±0.66 ^A	¹ 2.97±1.32 ^B	² 4.89±0.92 ^A
14	³ 7.14±0.25 ^A	¹ 5.21±0.68 ^B	³ 6.89±0.67 ^A	³ 7.47±0.16 ^A	¹ 5.23±0.48 ^B	³ 6.83±0.93 ^A	² 6.28±1.38 ^A	¹ 3.08±0.64 ^B	² 5.87±0.33 ^A
18	NI ⁽⁴⁾	NI	⁴ 7.75±0.37	NI	NI	³ 7.95±0.52	NI	NI	² 6.69±0.44
21	³ 7.54±0.39 ^A	² 6.21±0.47 ^B	⁴ 7.89±0.67 ^A	³ 8.01±0.28 ^A	¹ 6.06±0.45 ^B	³ 8.24±0.27 ^A	² 6.77±0.68 ^A	¹ 3.60±0.95 ^B	² 7.18±0.49 ^A
28	³ 8.12±0.46 ^A	² 6.56±0.35 ^B	NI	³ 8.31±0.43 ^A	¹ 6.73±0.39 ^B	NI	² 7.62±0.48 ^A	¹ 3.84±0.32 ^B	NI
35	³ 8.21±0.44 ^A	² 6.64±0.30 ^B	NI	³ 8.15±0.22 ^A	¹ 6.91±0.13 ^B	NI	² 7.24±0.23 ^A	¹ 4.38±0.50 ^B	NI
42	³ 7.82±0.49 ^A	² 6.49±0.09 ^B	NI	³ 8.14±0.06 ^A	¹ 6.89±0.12 ^B	NI	² 7.37±0.20 ^A	¹ 4.51±1.15 ^B	NI

En cada caso, los valores (media ± desviación estándar) proceden de 4 lotes (2 muestras/lote). Los resultados se expresan en log₁₀ ufc/g

⁽¹⁾Mezcla compuesta aproximadamente por 35% de CO₂, 35% de O₂ y 30% de N₂

⁽²⁾En cada columna y para cada parámetro, cada valor y el siguiente que porten el mismo número no presentan diferencias significativas (p>0.05)

⁽³⁾En cada fila y para cada parámetro, los valores que porten la misma letra no presentan diferencias significativas (p>0.05)

⁽⁴⁾NI, no investigado

Tabla 6.3 (continuación).- Influencia del tipo de envasado en la evolución de diferentes poblaciones microbianas durante el almacenamiento a refrigeración (3±1 °C) de carne de conejo.

b) Bacterias ácido-lácticas, *Brochothrix thermosphacta* y *Enterobacteriaceae*

Día	Bacterias ácido-lácticas			<i>Brochothrix thermosphacta</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase		
	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1 ⁽¹⁾	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1
0	⁽²⁾¹ 3.10±1.20 ^{(3)A}	¹ 2.91±0.54 ^{(4)A}	¹ 3.20±0.41 ^A	¹ 1.77±0.15 ^A	¹ 1.59±0.81 ^A	¹ 2.23±0.61 ^A	¹ 1.14±0.70 ^A	¹ 0.89±0.80 ^A	¹ 0.85±0.32 ^A
7	² 4.28±1.82 ^A	¹ 3.57±1.10 ^A	¹ 4.12±0.81 ^A	² 4.36±0.82 ^A	¹ 2.45±0.72 ^B	² 3.23±1.33 ^{AB}	² 2.80±0.95 ^A	¹ 1.04±0.48 ^B	¹ 1.17±0.70 ^B
14	³ 6.89±0.32 ^A	¹ 4.36±0.74 ^B	² 5.64±0.31 ^C	³ 5.96±0.78 ^A	¹ 2.50±0.53 ^B	³ 4.80±0.76 ^A	³ 4.14±0.69 ^A	¹ 1.31±0.86 ^B	² 2.30±0.65 ^B
18	NI ⁽⁴⁾	NI	² 6.73±0.61	NI	NI	⁴ 6.49±1.07 ^A	NI	NI	² 2.77±0.70
21	³ 7.48±0.21 ^A	² 5.60±0.50 ^B	² 6.84±0.58 ^A	³ 6.23±0.87 ^A	¹ 3.45±1.08 ^B	⁴ 6.62±0.77 ^A	³ 5.16±1.01 ^A	¹ 1.05±0.54 ^B	³ 3.91±0.55 ^C
28	³ 7.71±0.36 ^A	² 6.46±0.41 ^B	NI	³ 6.67±0.64 ^A	¹ 4.23±0.76 ^B	NI	⁴ 6.24±0.26 ^A	¹ 1.44±1.44 ^B	NI
35	³ 7.54±0.48 ^A	² 6.69±0.82 ^A	NI	³ 6.45±0.72 ^A	¹ 4.46±0.42 ^B	NI	⁴ 6.12±0.36 ^A	¹ 2.23±1.03 ^B	NI
42	³ 7.72±0.19 ^A	² 6.55±0.09 ^A	NI	³ 6.53±0.66 ^A	¹ 4.86±0.52 ^B	NI	⁴ 6.17±0.54 ^A	² 3.66±0.39 ^B	NI

En cada caso, los valores (media ± desviación estándar) proceden de 4 lotes (2 muestras/lote). Los resultados se expresan en log₁₀ ufc/g

⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ Como en la tabla 6.3a.

c) Levaduras y presuntos clostridios psicrotrofos sulfito reductores (CPSR)

Día	Levaduras			CPSR		
	Tipo de atmósfera del envase			Tipo de atmósfera del envase		
	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1 ⁽¹⁾	Vacío	100%CO ₂	Mezcla 1
0	⁽²⁾¹ 3.25±0.31 ^{(3)A}	¹ 2.52±0.75 ^{(4)A}	¹ 2.73±0.45 ^A	¹ 0.42±0.51	NI	NI
7	¹ 4.01±1.05 ^A	¹ 2.24±0.91 ^B	¹ 3.55±0.73 ^A	² 3.20±0.48	NI	NI
14	² 5.11±0.55 ^A	¹ 2.99±0.63 ^B	² 5.02±1.11 ^A	² 3.13±1.67	NI	NI
18	NI ⁽⁵⁾	NI	² 5.77±0.70	-	NI	NI
21	² 5.20±0.69 ^A	¹ 3.19±0.42 ^B	² 5.49±0.61 ^A	³ 5.14±1.12	NI	NI
28	² 5.97±0.82 ^A	¹ 3.89±0.49 ^B	NI	³ 5.10±0.68	NI	NI
35	² 5.78±0.56 ^A	¹ 4.23±0.75 ^B	NI	³ 5.60±0.91	NI	NI
42	² 6.08±0.20 ^A	¹ 4.28±0.04 ^B	NI	³ 5.69±0.73	NI	NI

En cada caso, los valores (media ± desviación estándar) proceden de 4 lotes (2 muestras/lote). Los resultados se expresan en log₁₀ ufc/g

⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ Como en la tabla 6.3a.

En las figuras 6.1 a 6.7 se compara la evolución de las medias (\log_{10} ufc/g) de las poblaciones de los grupos microbianos estudiados en las tres condiciones de almacenamiento de la carne de conejo (tras envasado a vacío, en atmósfera con 100% CO₂ ó en atmósfera con mezcla de 35% CO₂ + 35% O₂ + 30%N₂).

En la tabla 6.4 se presenta la correlación entre los diferentes parámetros físicos químicos y microbiológicos analizados para cada una de las condiciones de envasado probadas (tabla 6.4a) y para el conjunto de ensayos realizados (tabla 6.4b).

En la tabla 6.5 se muestra el ritmo de variación (\log_{10} ufc/g y día; supuesta una variación constante durante todo el período) de las diferentes poblaciones microbianas durante la primera semana de almacenamiento de los muslos de conejo en las tres condiciones de envasado ensayadas. En la misma tabla 6.5 se incluyen, asimismo, los datos equivalentes correspondientes al almacenamiento en condiciones aeróbicas (datos correspondientes a los experimentos del capítulo 2 de esta tesis). En la tabla 6.6 se presentan los ritmos de crecimiento (\log_{10} ufc/g y día; supuesta una variación constante durante todo el período) de las poblaciones microbianas durante las tres primeras semanas de almacenamiento de los muslos de conejo en las tres condiciones de envasado estudiadas.

Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7.- Evolución de la microbiota mesófila (RAM), la microbiota psicrotrofa (RAP), *Pseudomonas* (Pseudom.), Bacterias ácido-lácticas (BAL), *B. thermosphacta* (BT), *Enterobacteriaceae* (Enter.) y levaduras (Levs.) en carne de conejo almacenada a 3 ± 1 °C tras su envasado en diferentes atmósferas modificadas. Valores medios correspondientes a cuatro lotes (dos muestras/lote).

Figura 6.1

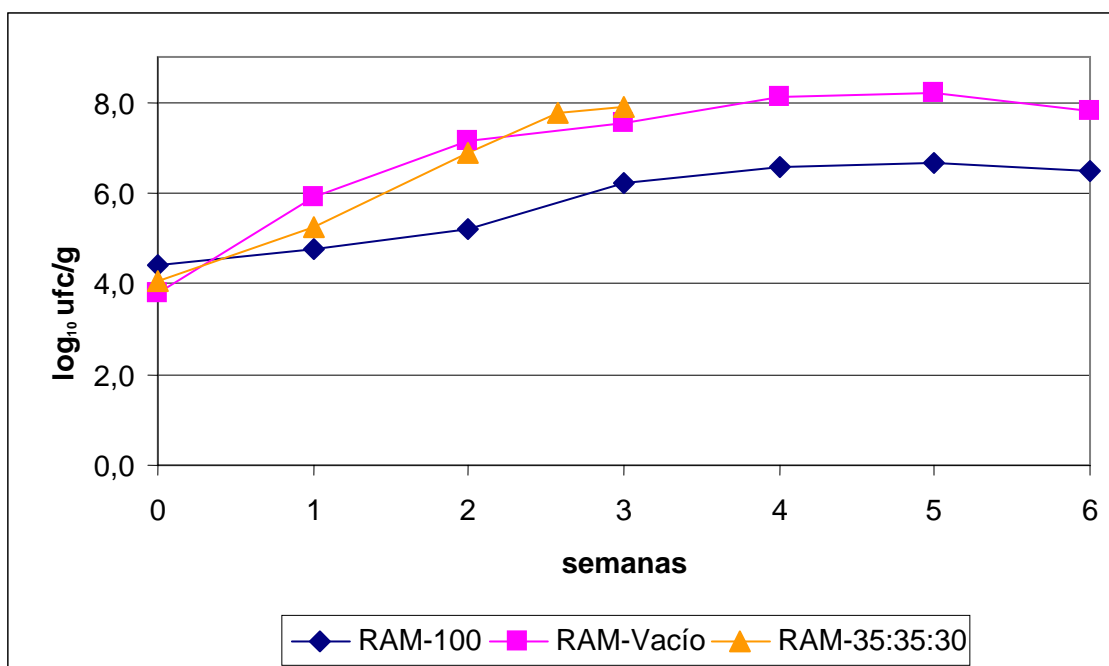


Figura 6.2

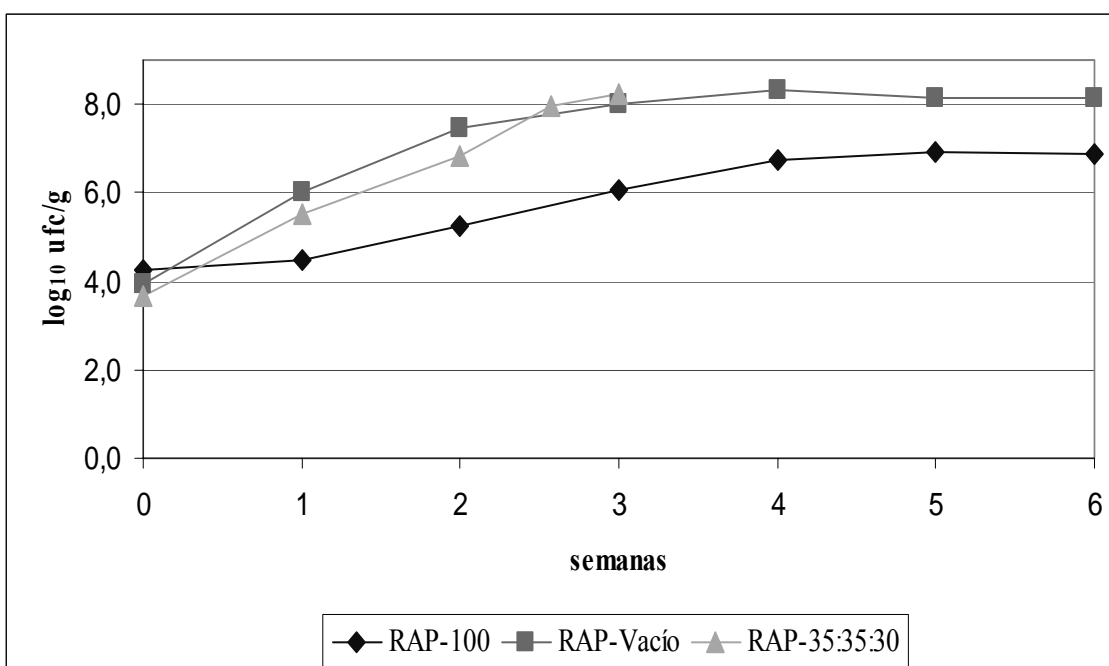


Figura 6.3

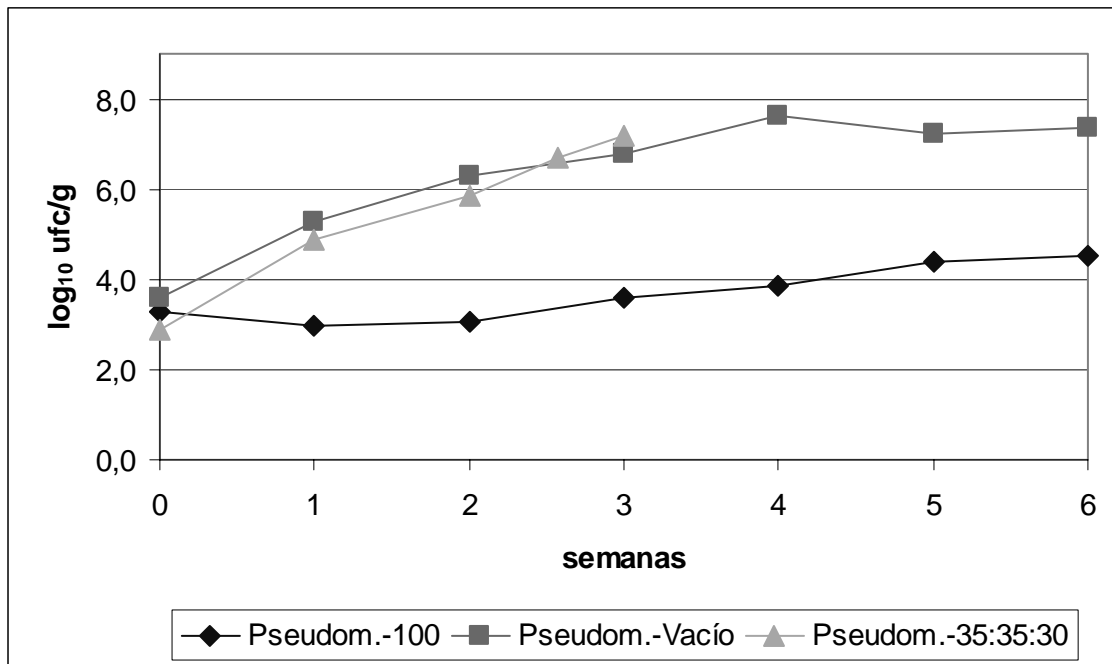


Figura 6.4

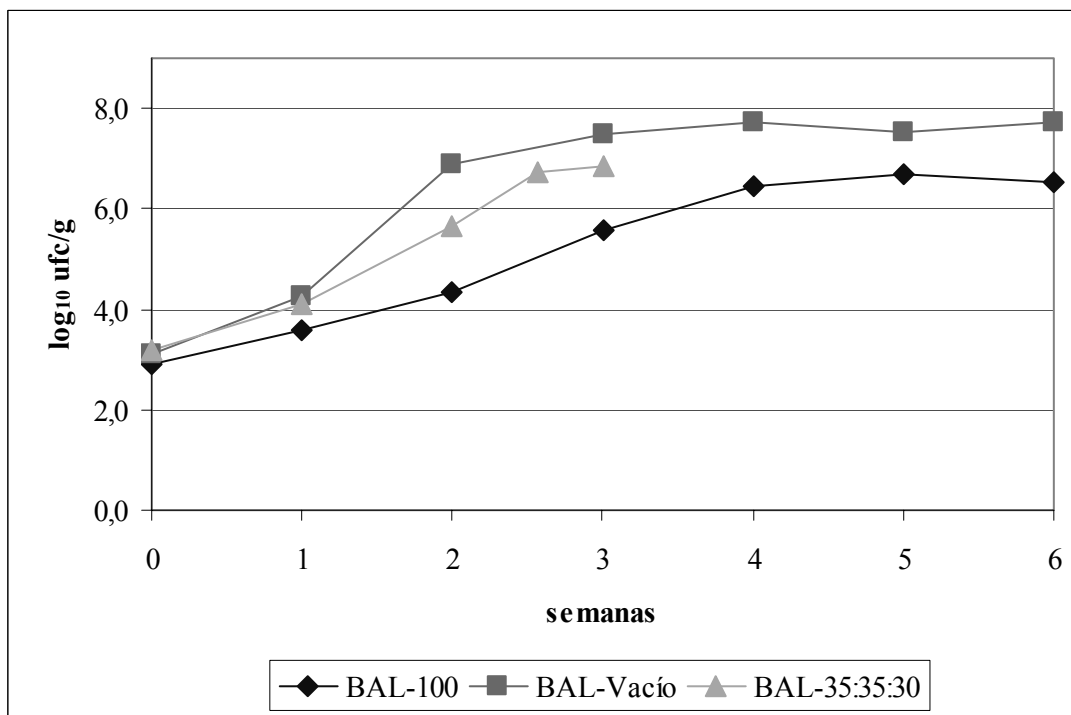


Figura 6.5

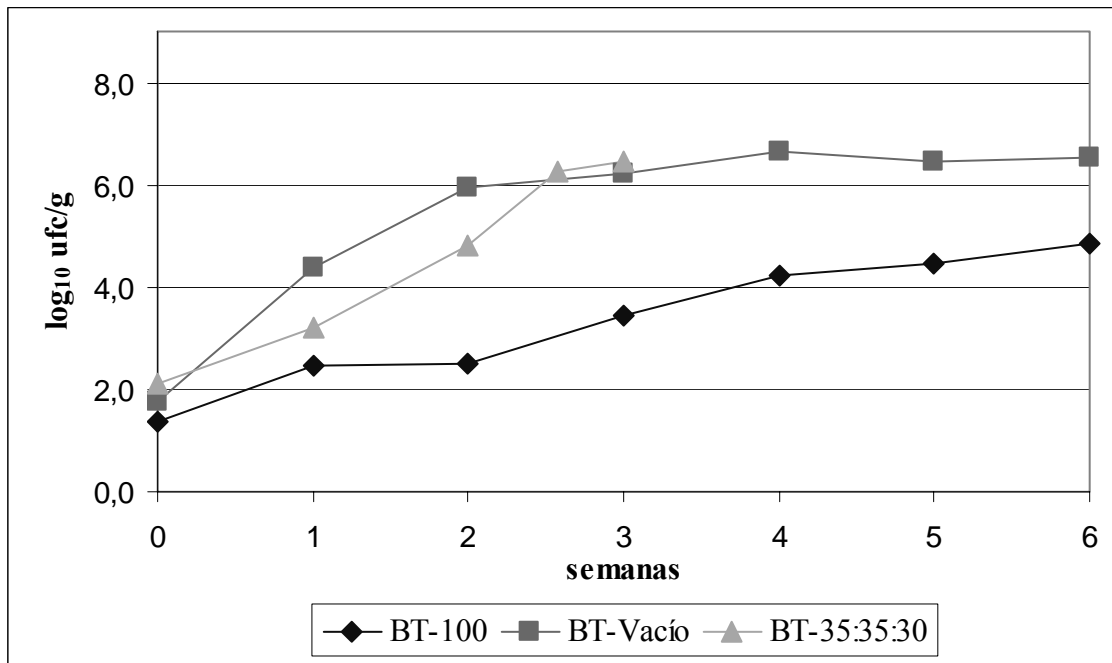


Figura 6.6

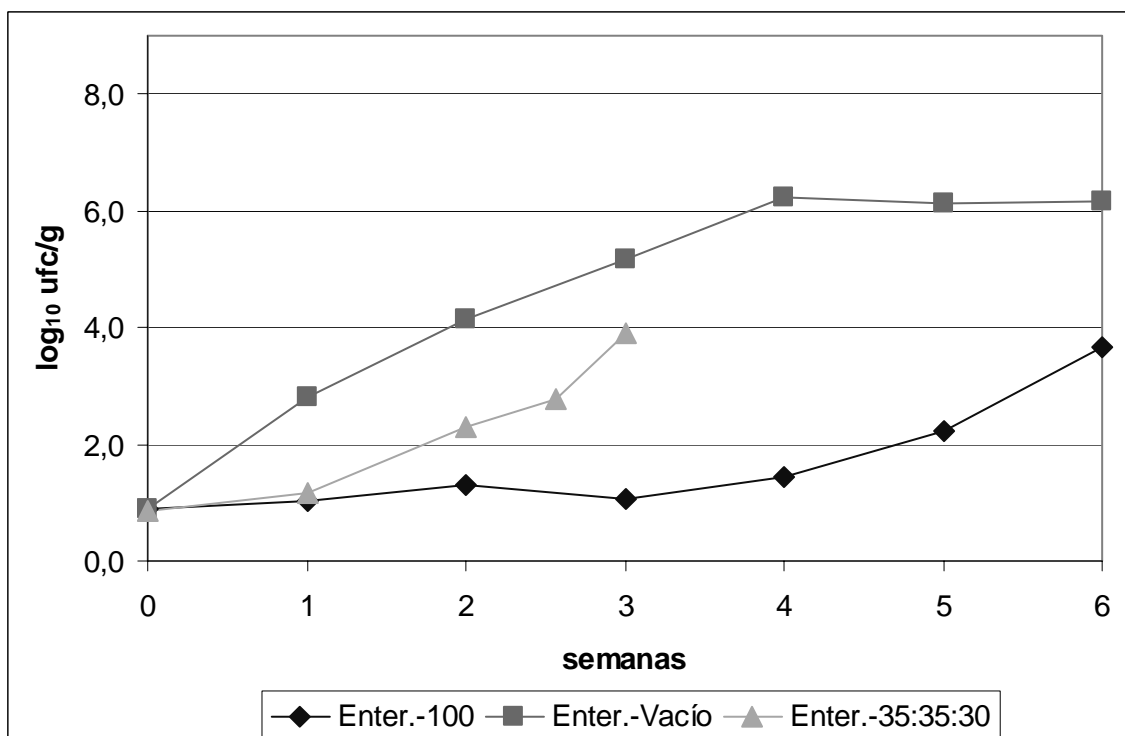


Figura 6.7

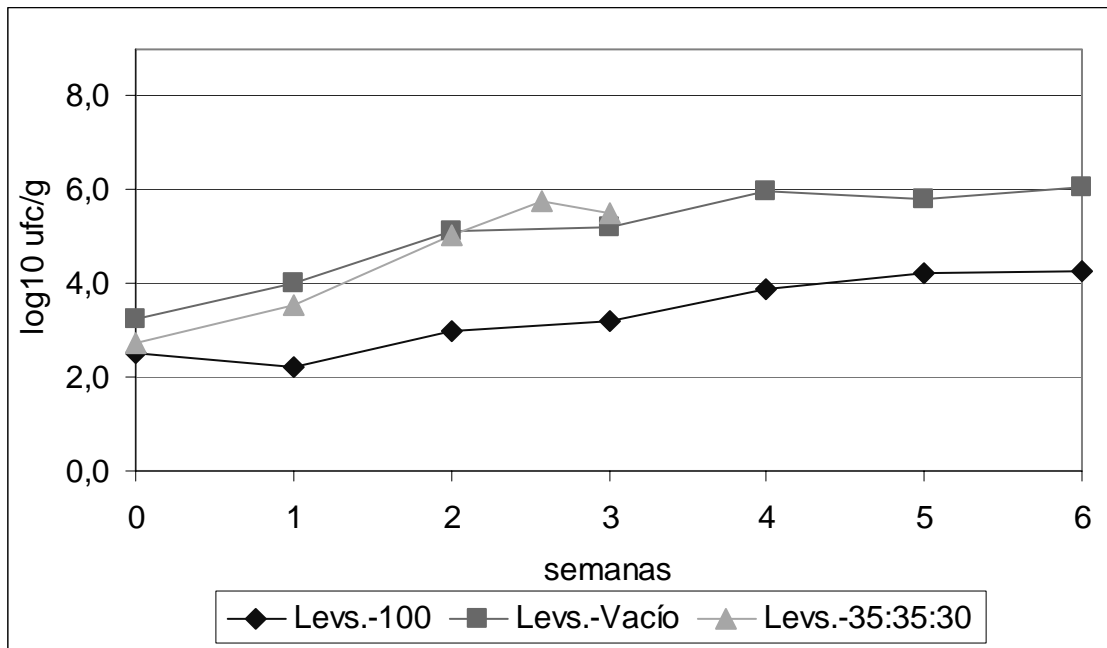


Tabla 6.4a.- Correlación entre diferentes parámetros microbiológicos, físicos, químicos y físico-químicos de carne de conejo envasada en tres tipos de atmósfera modificada y almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C).

a) Carne envasada a vacío

	RAM	RAP	Pseudom.	BAL	CPSR	BT	Enter.	Levs.	pH	ERV
RAM	1.00									
RAP	0.95	1.00								
Pseudom.	0.91	0.86	1.00							
BAL	0.86	0.90	0.83	1.00						
CPSR	0.86	0.86	0.81	0.83	1.00					
BT	0.95	0.95	0.84	0.87	0.81	1.00				
Enter.	0.92	0.92	0.91	0.90	0.87	0.90	1.00			
Levs.	0.83	0.83	0.83	0.87	0.75	0.80	0.86	1.00		
pH	0.18	0.23	0.30	0.18	0.33	0.04	0.20	0.19	1.00	
ERV	-0.69	-0.78	-0.63	-0.75	-0.71	-0.68	-0.73	-0.71	-0.38	1.00

b) Carne envasada en atmósfera con 100% CO₂.

	RAM	RAP	Pseudom.	BAL	BT	Enter.	Levs.	pH	ERV
RAM	1.00								
RAP	0.95	1.00							
Pseudom.	0.62	0.67	1.00						
BAL	0.95	0.94	0.62	1.00					
BT	0.93	0.88	0.68	0.92	1.00				
Enter.	0.28	0.40	0.27	0.37	0.38	1.00			
Levs.	0.61	0.65	0.37	0.71	0.66	0.67	1.00		
pH	0.15	0.30	0.34	0.21	0.13	0.14	-0.01	1.00	
ERV	-0.48	-0.51	-0.28	-0.46	-0.53	-0.25	-0.28	-0.24	1.00

RAM, recuentos de microbiota aerobia mesófila; RAP, recuentos de microbiota aerobia psicrotrofa; Pseudom., *Pseudomonas*; BAL, bacterias ácido-lácticas; CPSR, clostridios psicrotrofos sulfito reductores; BT, *Brochothrix thermosphacta*; Enter., *Enterobacteriaceae*; Levs., levaduras; ERV, volumen de extracto liberado. El valor que se incluye es el coeficiente de correlación de Pearson (r), señalándose en negrita las correlaciones que son significativas ($p < 0.05$).

Tabla 6.4a (continuación).- Correlación entre diferentes parámetros microbiológicos, físicos, químicos y físico-químicos de carne de conejo envasada en tres tipos de atmósfera modificada y almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C).

c) Carne envasada en atmósfera compuesta por una mezcla compuesta aproximadamente por 35% de CO₂, 35% de O₂ y 30% de N₂

	RAM	RAP	Pseudom.	BAL	BT	Enter.	Levs.	pH	ERV
RAM	1.00								
RAP	0.97	1.00							
Pseudom.	0.93	0.95	1.00						
BAL	0.95	0.94	0.88	1.00					
BT	0.95	0.95	0.94	0.93	1.00				
Enter.	0.89	0.90	0.84	0.91	0.92	1.00			
Levs.	0.94	0.93	0.89	0.92	0.94	0.90	1.00		
pH	-0.09	-0.08	-0.14	0.00	0.05	0.09	0.07	1.00	
ERV	-0.65	-0.62	-0.66	-0.61	-0.65	-0.51	-0.52	-0.08	1.00

RAM, recuentos de microbiota aerobia mesófila; RAP, recuentos de microbiota aerobia psicrotrofa; Pseudom., *Pseudomonas*; BAL, bacterias ácido-lácticas; BT, *Brochothrix thermosphacta*; Enter., *Enterobacteriaceae*; Levs., levaduras; ERV, volumen de extracto liberado. El valor que se incluye es el coeficiente de correlación de Pearson (r), señalándose en negrita las correlaciones que son significativas ($p < 0.05$).

Tabla 6.4b.- Correlación entre diferentes parámetros microbiológicos, físicos, químicos y físico-químicos de carne de conejo envasada en atmósferas modificadas y almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C).

	RAM	RAP	Pseudom.	BAL	BT	Enter.	Levs.	pH	ERV
RAM	1.00								
RAP	0.96	1.00							
Pseudom.	0.84	0.84	1.00						
BAL	0.90	0.91	0.75	1.00					
BT	0.94	0.94	0.88	0.87	1.00				
Enter.	0.78	0.79	0.82	0.77	0.80	1.00			
Levs.	0.83	0.84	0.84	0.81	0.86	0.83	1.00		
pH	0.25	0.31	0.38	0.31	0.26	0.49	0.31	1.00	
ERV	-0.53	-0.56	-0.32	-0.59	-0.47	-0.43	-0.36	-0.28	1.00

RAM, microbiota aerobia mesófila; RAP, microbiota aerobia psicrotrofa; Pse., *Pseudomonas*; BAL, bacterias ácido-lácticas; BT, *Brochothrix thermosphacta*; Ent., *Enterobacteriaceae*; Lev., levaduras; ERV, volumen de extracto liberado.

El valor que se incluye es el coeficiente de correlación de Pearson (r), señalándose en negrita las correlaciones que son significativas ($p < 0.05$)

Nota.- Para la correlación se han considerado la totalidad de los resultados, independientemente del tipo de atmósfera empleada para el envasado.

Tabla 6.5.- Ritmo de variación^a de diferentes poblaciones microbianas en muslos de conejo almacenados a 3 ± 1 °C durante 1 semana y envasados en diferentes condiciones.

Grupo microbiano	Envasado			
	Aerobiosis	Mezcla 1	Vacío	100% CO ₂
Microbiota psicrotrofa	0.53±0.07 ^a	0.26±0.13	0.30±0.09	0.03±0.16
<i>Pseudomonas</i>	0.71±0.12	0.29±0.12	0.25±0.12	-0.05±0.18
Bacterias ácido-lácticas	0.41±0.05	0.13±0.15	0.17±0.10	0.09±0.23
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0.61±0.12	0.19±0.13	0.37±0.11	0.12±0.21
Enterobacteriáceas	0.46±0.08	0.05±0.06	0.27±0.12	0.02±0.05
Levaduras	0.52±0.05	0.12±0.08	0.11±0.13	-0.04±0.13

^alog₁₀ ufc/g y día (valores medios de cuatro lotes, dos muestras/lote). Supuesto un ritmo constante desde el envasado al día 7 de almacenamiento.

Tabla 6.6.- Ritmo de crecimiento^a de diferentes poblaciones microbianas en muslos de conejo almacenados a 3±1 °C durante 3 semanas y envasados en diferentes condiciones.

Grupo microbiano	Envasado		
	Mezcla 1	Vacío	100% CO ₂
Microbiota psicrotrofa	0.22±0.01	0.19±0.04	0.09±0.03
<i>Pseudomonas</i>	0.20±0.02	0.15±0.05	0.02±0.02
Bacterias ácido-lácticas	0.17±0.04	0.21±0.05	0.13±0.05
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0.21±0.03	0.21±0.04	0.09±0.09
Enterobacteriáceas	0.15±0.02	0.20±0.07	0.01±0.01
Levaduras	0.13±0.02	0.09±0.13	0.03±0.03

^alog₁₀ ufc/g y día (valores medios de cuatro lotes, dos muestras/lote). Supuesto un ritmo constante entre el momento de envasado y el día 21 de almacenamiento.

Carne de conejo envasada a vacío

● *Variación entre los lotes.* De los cuatro lotes analizados, las muestras del lote n° 2 presentaron poblaciones de bacterias ácido-lácticas y levaduras significativamente ($p < 0.05$) inferiores a las del resto de los lotes. El pH de las muestras del lote 1 fue significativamente ($p < 0.05$) inferior al de los otros lotes. Para los demás parámetros estudiados no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los lotes.

● *Características sensoriales.* Durante las dos primeras semanas de almacenamiento, las características sensoriales de las muestras de carne de conejo se calificaron en todos los casos y por todos los jueces como aceptables o regulares para todas las características sensoriales analizadas. En la tercera ó cuarta semana (dependiendo del lote estudiado) los cambios observados permitieron calificar las muestras como alteradas (inaceptables en alguna característica para la mitad o más de los jueces). La característica organoléptica que alcanzó en primer lugar la calificación de inaceptable fue un desagradable olor percibido tras la apertura de los envases pero que no se detectaba transcurrido un minuto. Otras modificaciones organolépticas observadas con anterioridad

fueron el ablandamiento de la carne (calificado como “regular” a partir de la segunda semana) y la presencia de exudado (detectada a partir de la segunda o tercera semana, según el lote). El color de la carne no alcanzó la calificación de inaceptable por el grupo de expertos en ninguna de las muestras. El principal cambio en la coloración del producto envasado fue el enverdecimiento del exudado (observado a partir de la tercera semana). Por otra parte, la limosidad superficial sólo fue detectada en la sexta semana de almacenamiento.

Carne de conejo envasada en atmósfera de 100% CO₂

● *Composición de la atmósfera gaseosa.* El análisis de la composición gaseosa de los envases reveló que, durante el almacenamiento, la atmósfera mantenía un nivel de CO₂ del 85-95% y que la concentración de O₂ no superaba el 2%.

● *Variación entre los lotes.* De los cuatro lotes analizados, las muestras del lote nº 2 presentaron poblaciones de enterobacteriáceas significativamente ($p < 0.05$) superiores a las de los lotes números 3 y 4. Para el resto de los parámetros estudiados no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los lotes.

● *Características organolépticas.* Las muestras se calificaron como aceptables ó regulares por todos los expertos y para todas las características analizadas desde el envasado inicial hasta la quinta semana de almacenamiento, incluida. En la sexta semana de almacenamiento todas las muestras de carne de conejo evaluadas por el panel de expertos se consideraron alteradas. La principal característica de rechazo observada fue la presencia de limosidad superficial, sólo detectada en las muestras de seis semanas de almacenamiento. En la mayor parte de las muestras de la sexta semana de almacenamiento el olor fue calificado mayoritariamente como regular. Fue reseñada la presencia de exudado sobre las bandejas desde la tercera semana (excepto en dos muestras), al igual que el ablandamiento progresivo de la carne, que se apreció desde la cuarta semana. La carne

perdió la tonalidad brillante durante la primera semana de almacenamiento, si bien la calificación del color no bajó del nivel de regular a lo largo de todo del período de almacenamiento.

Carne de conejo envasada en atmósfera con mezcla 1 (35% CO₂ : 35% O₂ : 30% N₂)

● *Composición de la atmósfera gaseosa.* La composición gaseosa inicial de 35% CO₂ + 35% O₂ + 30% N₂ varió a lo largo del almacenamiento, disminuyendo la proporción de oxígeno (hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 25%) y aumentando la de anhídrido carbónico (hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 42%).

● *Variación entre los lotes.* De los cuatro lotes analizados, las muestras de los lotes números 1 y 4 presentaron valores de pH significativamente ($p < 0.05$) superiores a las de los otros dos lotes. Para el resto de los parámetros estudiados no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los lotes.

● *Características organolépticas.* Transcurridos 18 días desde el envasado de las muestras, el panel de expertos consideró inaceptable la apariencia general que presentaban la mitad de las muestras analizadas. En el día 21 de almacenamiento refrigerado, todos los muslos analizados fueron considerados alterados. De igual forma que los muslos envasados en 100% CO₂, la principal característica sensorial de inaceptabilidad fue la presencia de limosidad superficial, siendo en algunas muestras evidente desde el día 18. El olor percibido en ese momento no fue calificado como inaceptable. La textura fue calificada como blanda en la mayor parte de las muestras analizadas después de dos semanas de almacenamiento refrigerado, si bien la calificación no descendió en este período del valor 2 (regular). El color de la carne fue la característica sensorial que conservó su valoración inicial durante más tiempo, mostrando unos tonos rojizos vivos y brillantes que desaparecían a partir del día 18.

Discusión

Vida útil. El envasado en las diferentes atmósferas modificadas ensayadas permitió, en todos los casos, incrementar significativamente la vida útil de la carne de conejo que, almacenada a refrigeración, en aerobiosis presentaba una vida útil media de 6.8 días (capítulo 2). Así, en base a la evaluación sensorial, el fin de la vida útil de las muestras de muslos de conejo envasados en atmósfera modificada se estableció en la sexta semana, en la tercera semana (entre los días 18 y 21), y entre la tercera y la cuarta semana de almacenamiento refrigerado para los envasados en una atmósfera al 100% CO₂, en la atmósfera de la mezcla 1 (35:35:30 -CO₂:O₂:N₂-) y a vacío, respectivamente.

En el caso del envasado a vacío y del envasado en atmósfera al 100% de CO₂, estos aumentos de la vida útil son algo superiores a los encontrados por Garipey y col. (1986) (15 días a 3 °C y 35 días a 3 °C, respectivamente), aunque en dicho trabajo se empleaban canales enteras de conejo (cuya contaminación inicial superficial era 3 log ufc/g para la microbiota mesófila, claramente inferior a la encontrada en nuestro trabajo, véase tabla 6.3). Hay que considerar, sin embargo, que los criterios de valoración sensorial empleados en los dos estudios han sido diferentes (por ejemplo, los autores antes citados únicamente consideraron dos categorías para el olor: normal ó anormal).

El aumento de vida útil asociado al envasado en atmósferas modificadas se relaciona con: (1) la disminución del ritmo de crecimiento microbiano (en la tabla 6.5 se puede observar que, durante la primera semana de almacenamiento el ritmo medio de crecimiento de la microbiota psicrotrofa en las diferentes atmósferas modificadas era inferior al 57% del que se producía en un ambiente aerobio), (2) los cambios en las asociaciones microbianas predominantes (que se discuten más adelante) y, (3) los previsibles cambios en el metabolismo microbiano derivados de las diferentes condiciones

de crecimiento (Stanbridge y Davies, 1998). Estos dos últimos factores explican que las poblaciones microbianas asociadas con la alteración hayan sido distintas en las diferentes condiciones de almacenamiento (para la microbiota psicrotrofa: alrededor de $8 \log_{10}$ ufc/g en aerobiosis -capítulo 2-, más de $7.5 \log_{10}$ ufc/g para el envasado a vacío y en la mezcla 1, y menos de $7 \log_{10}$ ufc/g para el envasado en 100% de CO_2).

Signos de alteración y asociaciones microbianas alterantes. En las muestras de conejo envasadas a vacío, el olor fue la primera característica determinante del fin de la vida útil, al igual que ocurrió en el estudio de Garipey y col. (1986), que asociaron la detección de un olor anormal a un nivel de microorganismos psicrotrofos de $6 \log_{10}$ ufc/g, inferior al encontrado por nosotros ($7.71 - 8.94 \log_{10}$ ufc/g). Las bacterias ácido-lácticas predominaban entre la microbiota psicrotrofa en el momento de la alteración de los muslos de conejo envasados a vacío (40-54% de la misma, en función del lote), mientras que los recuentos de *Pseudomonas* representaban el 1-33% de los psicrotrofos y los de *Brochothrix thermosphacta* no suponían más del 3% de la microbiota psicrotrofa.

En las otras dos atmósferas modificadas, la limosidad superficial fue la primera característica que alcanzó la calificación de inaceptable. La presencia de este *biofilm* se relaciona habitualmente con la gran biomasa que producen *Pseudomonas* (Borch y col., 1996a) y las levaduras (Dillon, 1998). Para los muslos envasados en la mezcla 1, en el momento de la alteración, las *Pseudomonas* habían alcanzado poblaciones superiores a las desarrolladas en los muslos envasados a vacío (tabla 6.3), coincidiendo con un menor desarrollo comparativo de las bacterias ácido-lácticas. Para los muslos envasados en la mezcla 1, en el momento de la alteración, las *Pseudomonas* representaban del 4 al 11% de la microbiota psicrotrofa (según el lote), frente al 1-3% (25% en uno de los lotes) de las bacterias ácido-lácticas, sin embargo, las levaduras representaban habitualmente menos del

1% de la microbiota psicrotrofa en el momento de la alteración (0.03% a 0.8%, alcanzando un 2% en uno de los lotes).

Sin embargo, para los muslos envasados al 100% de CO₂, la limosidad superficial no parece relacionarse con las *Pseudomonas* (niveles en el momento de la alteración entre 3.7 y 5.8 log₁₀ ufc/g, representando menos del 1% de la microbiota psicrotrofa –un 11% para un lote-) ni con las levaduras (niveles medios de 4.28 log₁₀ ufc/g, tabla 6.3, que correspondían a menos del 0.7% de la microbiota psicrotrofa), por contra, la alteración parece relacionarse principalmente con las bacterias ácido-lácticas (poblaciones medias de 6.55 log₁₀ ufc/g, tabla 3, que representaban entre el 38 y el 52% de los psicrotrofos, según el lote).

La combinación comercial de gases (mezcla 1) fue la atmósfera que mejor conservó la apariencia general de los muslos de conejo de las tres estudiadas (los tonos rojizos vivos y brillantes se mantenían hasta el día 18), lo que se justifica por la concentración de oxígeno (inicialmente del 35%) y su efecto sobre los pigmentos de la carne (Gill, 1995), sin embargo, su vida útil fue algo más corta que la de los muslos envasados a vacío. Si bien en ambas atmósferas (mezcla 1 y vacío) la alteración se relacionó con una población de psicrotrofos superior a 7.5 log₁₀ ufc/g, el efecto de la atmósfera sobre los distintos grupos microbianos explica las diferencias en vida útil.

La mayor concentración de oxígeno, previsiblemente favorecería el desarrollo de las bacterias aerobias con mayor capacidad alterante (Gill, 1995), y así en los muslos envasados en la mezcla 1 la velocidad de crecimiento de las *Pseudomonas* hasta la alteración (0.20 ± 0.02 log₁₀ ufc/g y día, tabla 6) fue superior a la que presentaban en los muslos envasados a vacío (0.15 ± 0.05 log₁₀ ufc/g y día, tabla 6.6), mientras que para las bacterias ácido-lácticas se encontró la situación opuesta (incremento hasta la alteración a

un ritmo de $0.17 \pm 0.04 \log_{10}$ ufc/g y día y de $0.21 \pm 0.05 \log_{10}$ ufc/g y día en la mezcla 1 y a vacío, respectivamente, tabla 6.6).

Tanto en la carne envasada a vacío como en la envasada en la mezcla 1 los recuentos de *Pseudomonas* y levaduras fueron inferiores a los que se alcanzaban cuando se alteraba la carne envasada en aerobiosis (capítulo 2). Por el contrario, las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de *B. thermosphacta* eran claramente superiores en las carnes envasadas en los dos tipos de atmósfera modificada. El envasado de las carnes en atmósferas con una relativamente elevada concentración de CO₂ inhibe especialmente el crecimiento de los microorganismos más aerobios: *Pseudomonas* y levaduras (Stanbridge y Davies, 1998), favoreciéndose el desarrollo de las bacterias ácido-lácticas y, en determinadas condiciones de pH (valores superiores a 6.0), el de *Brochothrix thermosphacta* y las enterobacteriáceas (Gill y Penney, 1986).

En resumen, el envasado en 100% de CO₂, empleando una mezcla 35:35:30 (CO₂:O₂:N₂) y a vacío incrementa la vida útil de la carne de conejo almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C), no apreciándose cambios organolépticos significativos hasta las 5, 2-2.5 y 2-3 semanas respectivamente. Este aumento de la vida útil es considerablemente superior a la que presenta la carne mantenida en aerobiosis a la misma temperatura, que es inferior a una semana. En la carne envasada a vacío y en la envasada en la mezcla 35:35:30 (CO₂:O₂:N₂), la alteración organoléptica se asocia con una población psicotrofa superior a $7.5 \log_{10}$ ufc/g, siendo los grupos microbianos predominantes las bacterias ácido-lácticas y las *Pseudomonas*, respectivamente. En la condición de envasado en 100% de CO₂, los grupos microbianos predominantes fueron las BAL (45.8% de la microbiota psicotrofa) y *B. thermosphacta*, siendo la limosidad superficial la primera característica sensorial que alcanzó la calificación de inaceptable, no pareciendo relacionarse con la población de *Pseudomonas* ni con la de levaduras.

CAPÍTULO 7.-

INCIDENCIA, RADIORRESISTENCIA Y COMPORTAMIENTO DE *Psychrobacter* spp. EN CARNE DE CONEJO



▪ Introducción	177
▪ Material y Métodos	181
▪ Resultados	183
▪ Discusión	188
▪ <i>Artículo original:</i> “Incidence, radioresistance, and behavior of <i>Psychrobacter</i> spp. in rabbit meat”	192a

Este capítulo ha originado la siguiente publicación: *Rodríguez-Calleja y col.* 2005. Incidence, radioresistance, and behavior of *Psychrobacter* spp. in rabbit meat. "Journal of Food Protection". 68(3):538-43.

Introducción

El género *Psychrobacter*, actualmente incluido en la familia *Moraxellaceae* (Ito y col., 1976), incluye a bacterias tanto psicrotolerantes como halotolerantes. Son cocos Gram negativos, aerobios, inmóviles y oxidasa-positivos, anteriormente adscritos a los géneros *Achromobacter* o *Acinetobacter* o al grupo *Moraxella-Acinetobacter* (M-A) o "Moraxella-like" (Ito y col., 1976; Juni, 1992). Estos microorganismos se aíslan habitualmente de entornos fríos tanto acuáticos como terrestres, así como de diferentes alimentos: pescado, carne de pollo y otros tipos de carnes y productos cárnicos (Bjorkevoll y col., 2003; Gennari y col., 1992; Gennari y Tomaselli, 1988; González y col., 2000; Juni, 1992; Prieto y col., 1992; Shaw y Latty, 1988). Estudios realizados en las décadas de los años 70 y 80 (Anellis y col., 1973; Ito y col., 1976; Ito y Iizuka, 1983; Ma y Maxcy, 1981; Welch y Maxcy, 1975) han puesto de manifiesto que, en los alimentos proteicos irradiados para prolongar su vida útil, los cocobacilos psicrotrofos del grupo M-A eran la principal población bacteriana residual, constituyendo la microbiota predominante de algunos alimentos irradiados en el momento de su alteración.

Psychrobacter spp. se aíslan de carne cruda almacenada a refrigeración y en aerobiosis por lo que se asocian con la alteración de la carne fresca y otros alimentos proteicos (Dainty y Mackey, 1992; ICMSF, 2005).

Sin embargo, no hay datos disponibles sobre el desarrollo de estas bacterias en los alimentos frescos y los pocos estudios en los que se investiga su incidencia sugieren que constituyen una pequeña parte de la microbiota alterante de los mismos (García-López y Prieto, 1999). Como excepción, cabe citar la aportación de Shaw y Latty (1988), quienes concluyeron que *P. immobilis* constituía hasta el 50% de la microbiota de tejidos de pH alto (superficies grasas). También, en carne de ave, cepas del grupo M-A se aíslan con mayor frecuencia del músculo del muslo, de pH más alto que del músculo de la pechuga (McMeekin, 1975; McMeekin, 1977).

El tratamiento con radiaciones ionizantes es uno de los procesos de conservación de los alimentos de mayor importancia para la prevención de los riesgos de origen biótico. Su aplicación, junto con el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación, es una manera eficaz de producir alimentos seguros además de permitir aumentar su vida útil (Farkas, 1998).

La irradiación de los alimentos es un proceso por el cual éstos son expuestos a energía ionizante a partir de fuentes radiactivas (rayos gamma, haces de electrones, rayos X), con el consiguiente desplazamiento de electrones de las moléculas sobre las que incide. Este tratamiento está contemplado para su empleo en la conservación de alimentos en el *Código Alimentario Español* (CAE; Anónimo, 1983) y en el Real Decreto 348/2001 (Dir 1999/2/CE; Dir 1999/3/CE) por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados por radiación ionizante. Actualmente, en nuestro país no está autorizada la irradiación de la carne mientras que en otros países europeos (Francia, Holanda, Reino Unido) está autorizada la irradiación de carne de aves bajo determinadas condiciones (Anónimo, 2003a). Por su parte, la FDA ("Food and Drug Administration", USA) ha autorizado en Estados Unidos la irradiación de carne de pollo y carnes rojas, entre otros productos alimenticios (Food and

Drug Administration, 1997). El tratamiento de los alimentos por radiaciones ionizantes presenta, en Europa, una limitada utilización industrial en comparación con los Estados Unidos. Así, las instalaciones autorizadas en Europa son utilizadas mayoritariamente por la industria farmacéutica.

Diversos organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (“Food and Agriculture Organization”, FAO), la Organización Mundial de la Salud (“World Health Organization”, WHO) y la Agencia Internacional para la Energía Atómica (“International Atomic Energy Agency”, IAEA), han establecido que la irradiación controlada de los alimentos, a dosis menores de 10 kGy, no presenta riesgos toxicológicos ni especiales cambios nutricionales (World Health Organization, 1981) y que es un método eficaz para eliminar bacterias patógenas y alterantes de los alimentos. Hay que tener en cuenta que la radiación gamma no tiene suficiente energía para afectar a los neutrones del núcleo de las moléculas por lo que no son capaces de inducir radioactividad en los alimentos.

El efecto de un tratamiento por radiaciones ionizantes sobre los microorganismos se mide habitualmente con el valor D_{10} , que expresa la dosis de irradiación requerida para inactivar el 90% de la población inicial microbiana (reducción en un ciclo logarítmico). La sensibilidad de los microorganismos es muy variable, estando influenciada por diferentes factores aunque, en general, el orden de sensibilidad (de mayor a menor) es: bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y mohos, esporos y levaduras, y virus.

Este capítulo de la tesis ha tenido los siguientes objetivos: a) conocer la incidencia de *Psychrobacter* spp. en carne de conejo, b) determinar la sensibilidad de cepas del género *Psychrobacter*, tanto aisladas de carne de conejo como cepas tipo, a tratamientos de irradiación aplicados a carne estéril de conejo, y c) examinar el comportamiento de estas bacterias en carne estéril de conejo en cultivo puro y en compañía de otras bacterias alterantes de este tipo de carne.

Material y Métodos

El procedimiento seguido para determinar la incidencia de *Psychrobacter* spp. en carne de conejo, las condiciones en las que se llevaron a cabo los tratamientos de irradiación, las pruebas para determinar la sensibilidad de cepas de *Psychrobacter* spp. inoculadas en carne de conejo, los estudios de desarrollo de cultivos puros y mixtos en carne estéril de conejo y el análisis estadístico de los datos obtenidos se presentan en la publicación que se adjunta al final del presente capítulo.

Brevemente, la incidencia de *Psychrobacter* spp. se investigó durante la vida útil de 30 muestras de carne de conejo almacenada a 3 °C. Se llevó a cabo un análisis microbiológico para determinar la microbiota psicrotrofa de la que se seleccionaban al azar colonias representativas para realizar su examen fenotípico que incluía: tinción de Gram, morfología, producción de pigmentos, producción de oxidasa y catalasa, movilidad, y crecimiento en anaerobiosis (González y col., 2000). Las cepas aisladas sospechosas de pertenecer al género *Psychrobacter* se confirmaron con un ensayo de transformación. Éste consiste básicamente en la utilización de una cepa mutante de *P. immobilis*, que requiere tiamina e hipoxantina para crecer. Esta cepa se transforma en prototrofa en presencia de DNA procedente de miembros del género *Psychrobacter* (Gennari y col., 1992).

Para la irradiación se usó una fuente de cobalto 60. Se probaron 10 cepas de *Psychrobacter* spp. (cepas RM1, RM2 y RM3 aisladas por nosotros de carne de conejo, cepas SLL1, SLL2 y SLL3 aisladas también en nuestro laboratorio a partir de moluscos, y las cepas LMG 7062, LMG 7550, LMG 7551 y LMG 5008 de la colección belga de microorganismos) bajo diferentes dosis de irradiación (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 kGy) y se determinó el valor D₁₀, correspondiente a la dosis de irradiación (kGy) que produce una reducción del 90% en la población microbiana. Como sustrato se empleó carne picada de conejo que previamente se esterilizó por tratamiento de radiación ionizante a 20 kGy.

El estudio del comportamiento de *Psychrobacter* spp. en carne estéril de conejo se realizó con una cepa aislada en nuestro laboratorio a partir de carne de conejo (RM1) y con la cepa tipo LMG 7062. Ambas cepas junto a dos bacterias alterantes (*Pseudomonas fluorescens* cepa NCTC 10038 y *Brochrothrix thermosphacta* NCTC 10822) fueron utilizados para los experimentos en cultivos mixtos. Así, se realizaron: (1) estudios del comportamiento de *Psychrobacter* spp. inoculado en carne estéril de conejo tanto después de ser, la carne inoculada, irradiada como sin irradiar, (2) estudios del comportamiento microbiano cuando se inoculaba la carne estéril de conejo con una mezcla de tres cepas (*Psychrobacter* RM1, *P. fluorescens* y *B. thermosphacta*) y se irradiaba (2.5 kGy) o se almacenaba sin aplicar este tratamiento, y (3) estudios del comportamiento microbiano cuando se inoculaba carne estéril de conejo con una mezcla de dos cepas (*P. fluorescens* y *B. thermosphacta*) sin tratamiento de irradiación. Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces.

Para la realización del experimento (2) mencionado anteriormente, cuando se inoculaba la carne estéril de conejo con una mezcla de tres cepas y se almacenaba sin aplicar el tratamiento de radiación ionizante, y debido a que en la actualidad no se han desarrollado medios selectivos para la detección de *Psychrobacter* spp, fue necesario inocular, en las mismas condiciones, otras muestras adicionales que se almacenaron a refrigeración. Cada día de análisis, dos de ellas se irradiaron a 2.5 kGy para inactivar *P. fluorescens* y *B. thermosphacta*. De este modo, el recuento de *Psychrobacter* spp. se pudo estimar a partir del recuento de colonias en TSA-YE, el valor D_{10} y la dosis de tratamiento.

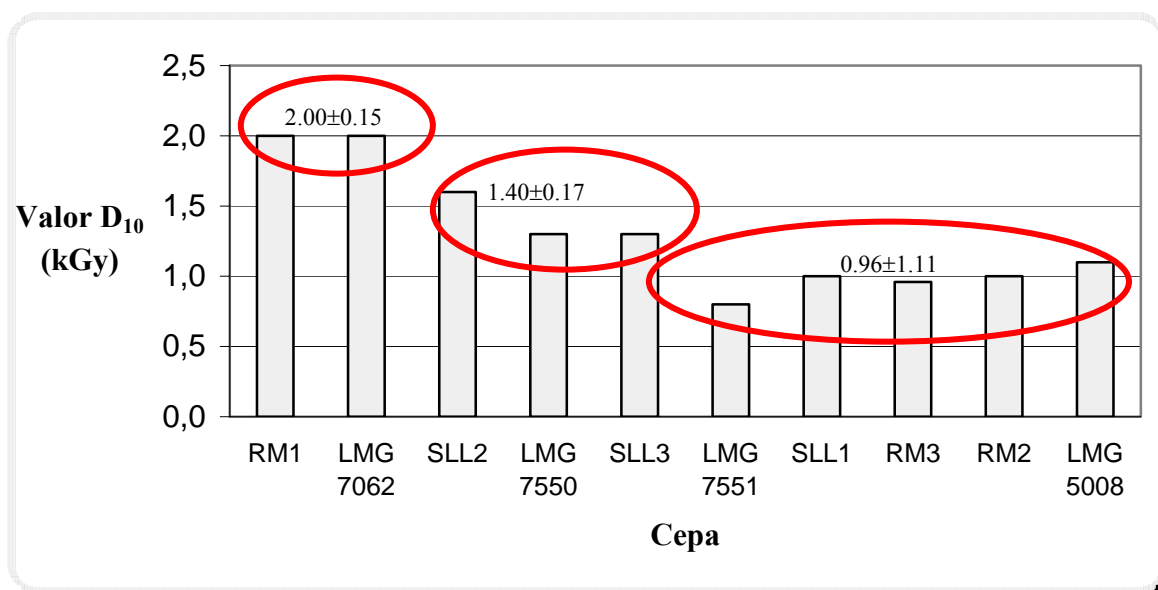
Tras 12 días de almacenamiento a 4 °C se recogieron aleatoriamente un total de 60 colonias, de las placas de recuentos totales en los experimentos con cultivos mixtos, para estimar la proporción de cada microorganismo en ese momento.

Resultados

Incidencia de *Psychrobacter* spp. en carne de conejo. Solamente cuatro cepas con el patrón fenotípico de *Psychrobacter* spp. fueron adscritas finalmente a dicho género tras realizar el ensayo de transformación; es decir, 4.2% de las presuntas *Psychrobacter* spp. Se recuperaron de cuatro canales diferentes y en diferentes días de almacenamiento.

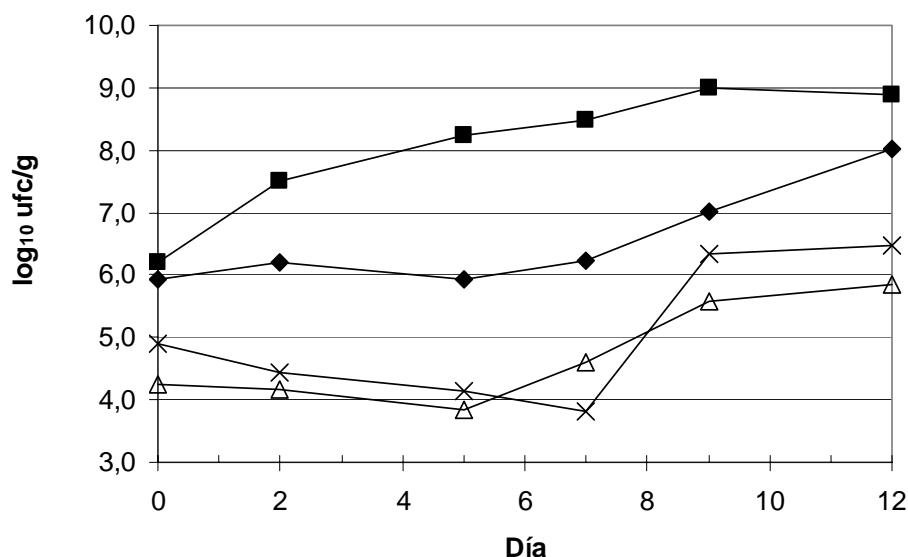
Radiorresistencia de *Psychrobacter* spp. Los valores de radiación D_{10} de las cepas estudiadas se presentan en el figura 7.1. Los coeficientes de determinación de las líneas de regresión (r^2) fueron superiores a 0.96 excepto en un caso (0.92). Los valores de D_{10} estuvieron en el rango de 0.8 a 2.0 kGy. Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cepas, las cuales pudieron ser divididas en tres grupos, con un valor medio D_{10} de 0.96 (cepas LMG 7551, SLL1, RM3, RM2, LMG 5008), 1.40 (cepas SLL2, LMG 7550, SLL3) y 2.00 kGy (cepas RM1, LMG 7062). Estos grupos no estuvieron relacionados con el origen de las cepas.

Figura 7.1.- Representación de los valores D_{10} de *Psychrobacter* spp. en carne picada estéril de conejo sometida a tratamientos con radiaciones ionizantes.



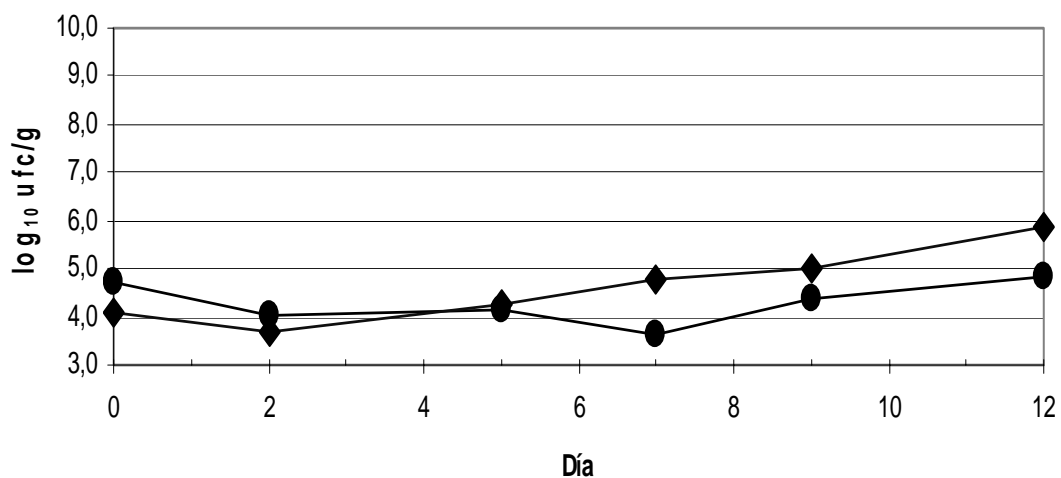
Experimentos con cultivos puros y mixtos en carne estéril de conejo. En la figura 7.2 se muestra el comportamiento de cultivos puros de las cepas de *Psychrobacter* LMG 7062 y RM1 inoculadas en carne estéril de conejo a 4 °C durante 12 días, tanto para las muestras irradiadas tras la inoculación como para las no irradiadas. El máximo incremento de la población de la cepa LMG 7062 en carne no irradiada fue de 2.1 log₁₀ ufc/g y se alcanzó al final del almacenamiento, con un incremento medio diario de 0.17 log₁₀ ufc/g. Para la cepa RM1 en carne no irradiada, los recuentos más altos (9 log₁₀ ufc/g) fueron alcanzados en el día 9. Entre el día 0 y el 12, el incremento de población fue de 2.7 log₁₀ ufc/g con un ritmo medio diario de 0.22 log₁₀ ufc/g. Después de la irradiación (2.5 kGy) de la carne de conejo, los recuentos de las dos cepas decrecieron durante un periodo de 5 a 7 días, tras el cual comenzaron a multiplicarse con un incremento similar sobre el número inicial (1.6-1.7 log₁₀ ufc/g).

Figura 7.2.- Comportamiento de cultivos puros de *Psychrobacter* spp. en carne picada estéril de conejo almacenada a 4 °C. Cepa LMG 7062 en carne no irradiada (◆) y en carne irradiada (tras la inoculación) a 2.5 kGy (Δ). Cepa RM1 en carne no irradiada (■) y en carne irradiada (tras la inoculación) a 2.5 kGy (x).



El efecto de un tratamiento de 2.5 kGy sobre la mezcla de las tres cepas se muestra en la figura 7.3. Después de la irradiación de la carne de conejo estéril inoculada con ambos co-cultivos, *P. fluorescens* y *B. thermosphacta* estuvieron por debajo del límite de detección ($1.7 \log_{10}$ ufc/g), permaneciendo así hasta el final del periodo de almacenamiento. En este tiempo, todas las colonias aleatoriamente seleccionadas de las placas de recuento fueron *Psychrobacter* spp. Durante el almacenamiento, los recuentos en agar triptona de soja con extracto de levadura (TSA-YE) de la carne inoculada con el co-cultivo conteniendo la cepa LMG 7062 se incrementó en $2.7 \log_{10}$ ufc/g con un ritmo medio diario de $0.20 \log_{10}$ ufc/g. Para las muestras inoculadas con el co-cultivo conteniendo la cepa RM1, estos valores fueron de $0.1 \log_{10}$ ufc/g y $0.01 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente.

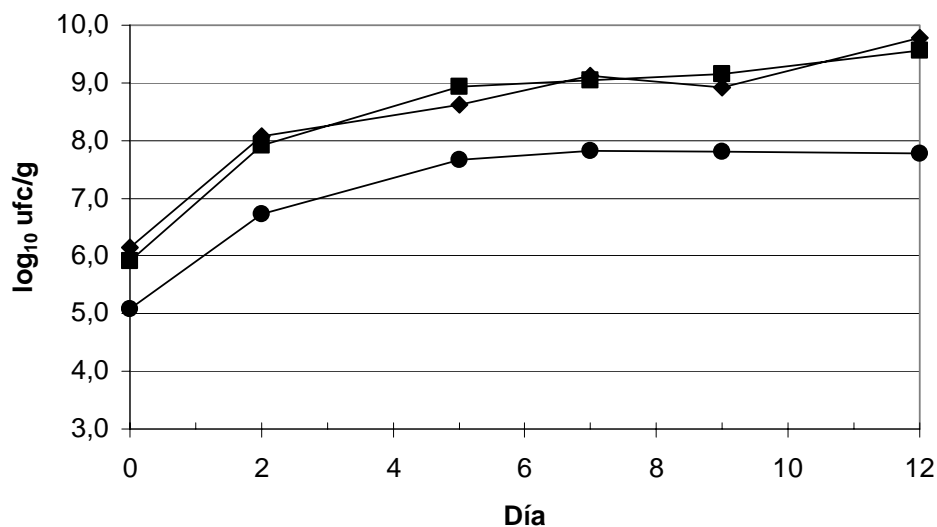
Figura 7.3.- Comportamiento de dos co-cultivos en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C después de su irradiación a 2.5 kGy. (♦), *Psychrobacter* cepa LMG 7062 + *P. fluorescens* + *B. thermosphacta*; (●), *Psychrobacter* cepa RM1 + *P. fluorescens* + *B. thermosphacta*.



NOTA.- Los recuentos que se presentan en la gráfica corresponden a *Psychrobacter* spp. (ver texto)

Cuando *P. fluorescens* y *B. thermosphacta* se inocularon en carne estéril de conejo, que se almacenó durante 12 días a 4 °C, la población de *Pseudomonas fluorescens* se incrementó en 3.7 log₁₀ ufc/g a un ritmo medio diario de 0.30 log₁₀ ufc/g y la de *B. thermosphacta* lo hizo en 2.7 log₁₀ ufc/g a un ritmo medio diario de 0.22 log₁₀ ufc/g (figura 7.4). En el último día de análisis, la proporción relativa de ambas bacterias entre la microbiota total fue de 59.3 y 40.7%, respectivamente.

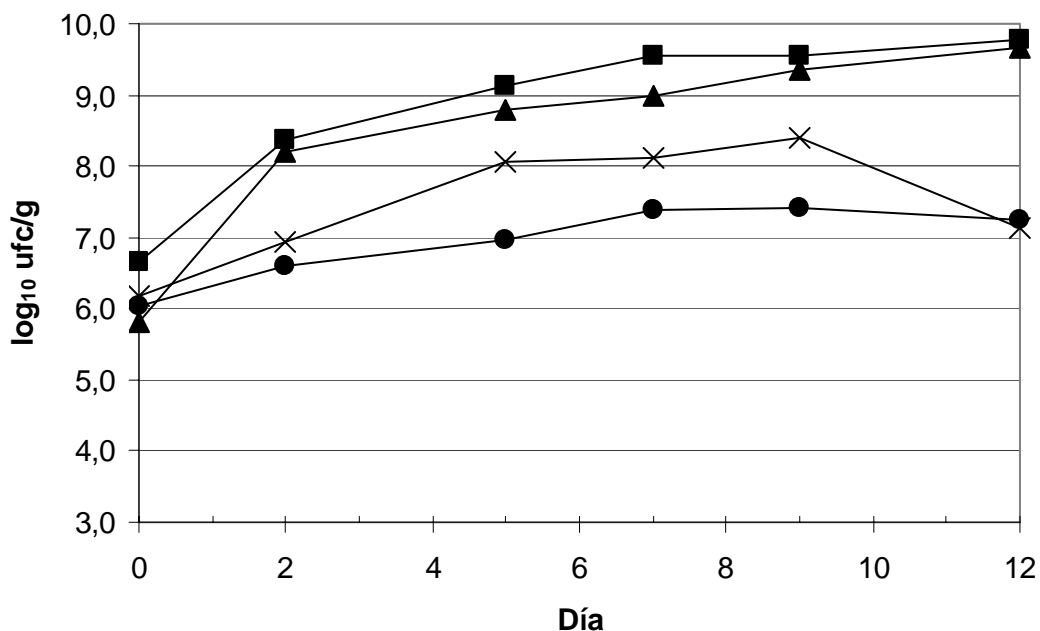
Figura 7.4.- Crecimiento de dos bacterias alterantes (*P. fluorescens* y *B. thermosphacta*) en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C. (◆), recuentos totales; (■), recuentos de *P. fluorescens*; (●), recuentos de *B. thermosphacta*.



El comportamiento en carne estéril de conejo de la mezcla de tres cepas (las bacterias alterantes mencionadas anteriormente y la cepa de *Psychrobacter* RM1) se muestra en la figura 7.5. De nuevo, *P. fluorescens* alcanzó su máxima población (9.7 log₁₀ ufc/g) después de 12 días, tras un incremento de 3.9 log₁₀ ufc/g a un ritmo medio de crecimiento diario de 0.32 log₁₀ ufc/g. *B. thermosphacta* logró su máximo nivel (8.4 log₁₀ ufc/g) después de 9 días de almacenamiento refrigerado con un incremento de

2.2 \log_{10} ufc/g a un ritmo medio diario de 0.25 \log_{10} ufc/g. Entre los días 9 y 12, la población de *B. thermosphacta* descendió 1.3 \log_{10} ufc/g a un ritmo medio de -0.42 \log_{10} ufc/g y día. Los recuentos máximos de *Psychrobacter* spp. (7.3 \log_{10} ufc/g) fueron obtenidos después de 7 días de almacenamiento, con un incremento de 1.4 \log_{10} ufc/g y un ritmo medio diario de 0.19 \log_{10} ufc/g. Entre los días 7 y 12 los números de psychrobacter descendieron 0.1 \log_{10} ufc/g a un ritmo medio diario de -0.03 \log_{10} ufc/g. De las placas de recuentos totales tras 12 días de almacenamiento a refrigeración, se recuperó solamente *P. fluorescens*.

Figura 7.5.- Comportamiento de los co-cultivos de las bacterias alterantes *P. fluorescens* y *B. thermosphacta*, junto a *Psychrobacter* cepa RM1, en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C. (■), recuentos totales; (▲), recuentos de *P. fluorescens*; (x), recuentos de *B. thermosphacta*; (●), recuentos estimados de *Psychrobacter* spp.



Discusión

La prevalencia de *Psychrobacter* spp. entre la microbiota de la carne de conejo (4.2% de las presuntas *Psychrobacter* spp.) es similar a la que se cita en la bibliografía para otros alimentos proteicos crudos mantenidos a refrigeración (carnes de vacuno, cordero, aves, peces de agua dulce, leche y quesos frescos) en los que esta bacteria representa entre el 1 y el 5% (Eribo y Jay, 1985; García-Armesto y col., 1993; Gennari y col., 1992; González y col., 2000; Prieto y col., 1992). *Psychrobacter* spp. parece tener una prevalencia mayor en pescado marino fresco, particularmente en arenque, sardina y bacalao (Bjorkevoll y col., 2003; Gennari y col., 1999; Gennari y Tomaselli, 1988; Molin y col., 1983), aunque su máxima prevalencia ha sido hallada en superficies grasas (hasta el 50%) y en salazones de bacalao rehidratadas (hasta el 90%). En estas últimas, una alteración conocida como “olor a humedad” se ha asociado con el crecimiento de *Psychrobacter* spp. (Bjorkevoll y col., 2003; Shaw y Latty, 1988).

Puesto que miembros del grupo M-A y cepas de “*Moraxella*-like” se aislaban de alimentos irradiados, el nuevo género *Psychrobacter* se consideró radiorresistente (Juni, 1992). Varios trabajos sobre la sensibilidad a la irradiación de cepas de M-A y “*Moraxella*-like” se publicaron en la década de los 70 y comienzos de los 80, pero sólo uno (Ito y Iizuka, 1983) se llevó a cabo con cepas identificadas mediante el ensayo de transformación. En ese trabajo, 11 cepas de cocobacilos psicrotrofos, seguramente *Psychrobacter* spp., presentaron valores D_{10} , en tampón fosfato salino a 20 °C, comprendidos en el rango de 0.25-0.66 kGy. En condiciones similares, los valores D_{10} de cuatro cepas de M-A obtenidas de salchichas radurizadas oscilaban entre 0.44 y 0.54 kGy (Ito y col., 1976). Mayores variaciones en la radiorresistencia se observaron entre cepas de M-A tratadas en medio líquido por Tiwari y Maxcy (1972), ya que los valores de D_{10} estaban comprendidos entre 0.15 y 1.12 kGy. Cuando Welch y Maxcy (1975) estudiaron

las células vegetativas más radiorresistentes obtenidas de carne fresca de vacuno irradiada, observaron la extrema radiorresistencia a -30 °C de dos cepas de M-A (valores D_{10} de 2.73 y 4.80 kGy) y cuando combinaron temperaturas de subcongelación y deshidratación con irradiación, los valores D_{10} de cepas de M-A alcanzaron el valor de 28.3 kGy (Ma y Maxcy, 1981). Una cepa de *Moraxella phenylpyruvica* (ahora *Psychrobacter phenylpyruvicus*) tratada en carne de ave picada mostró un valor D_{10} de 0.86 kGy (Patterson, 1988). Finalmente, analizando un elevado número de datos publicados, van Germen y col. (1999) identificaron varios miembros del grupo M-A que poseían una alta resistencia cuando se irradiaban a bajas temperaturas (≤ -30 °C), estimando en estas condiciones un valor D_{10} medio de 3.65 kGy.

En este estudio, los valores D_{10} para *P. immobilis* y *Psychrobacter* spp., irradiadas a 4 °C en carne de conejo, estuvieron comprendidos entre 0.8 y 2.0 kGy dependiendo de la cepa ensayada. Es destacable, sin embargo, que incluso la cepa más sensible fue más radiorresistente que la mayoría de las células vegetativas presentes en alimentos frescos de origen animal, mostrando algunas de ellas una resistencia a las radiaciones gamma comparable a la de algunas esporas bacterianas (Farkas, 1999; Farkas, 2001; Monk y col., 1995). Aunque la sensibilidad a la irradiación depende de varios factores, la resistencia elevada en bacterias no esporuladas se atribuye a su capacidad para reparar los daños causados por la irradiación en el DNA (Farkas, 2001).

En un estudio previo Snyder y Maxcy (1979) observaron que cepas de M-A radiorresistentes aisladas de carne de vacuno no crecían en carne estéril de esta especie y tampoco lo hacían en carne de pollo ni en exudados de carne fresca de vacuno mantenidos durante 14 días en un rango de temperatura de 5-32 °C. Por el contrario, los cultivos puros de *Psychrobacter* spp. utilizados por nosotros, especialmente el de la cepa obtenida a partir

de carne de conejo (RM1), crecieron sustancialmente a 4 °C en carne de conejo estéril (figura 7.2). Cuando el experimento se realizó con co-cultivos de *P. fluorescens* y *B. thermosphacta*, el crecimiento de la cepa RM1 se vió afectado, tanto en la densidad máxima de células como en el ritmo de crecimiento que fue significativamente más bajo ($p < 0.01$) que cuando creció en solitario (figuras 7.2 y 7.3). En el experimento con tres cepas (figura 7.5), el crecimiento de *P. fluorescens* fue similar al observado en ausencia de la cepa RM1 (figura 7.4), pero el comportamiento de *B. thermosphacta* fue diferente en el día 12 y, a pesar de que creció más rápido y alcanzó un nivel más elevado que la cepa de *Psychrobacter*, su población final fue ligeramente más baja. Así pues, al final del almacenamiento, *B. thermosphacta*, que representaba el 40.7% de la microbiota total en el experimento con dos cepas, no pudo ser detectada en el experimento con tres cepas.

La importancia relativa de los grupos bacterianos que constituyen la microflora alterante de la carne refrigerada almacenada en aerobiosis, se ha atribuido a sus diferentes velocidades de crecimiento. Sin embargo, el éxito no parece depender sólo de esto (Dainty y Mackey, 1992). Así, parte de la actividad inhibidora de algunas bacterias Gram negativas, en particular la de *Pseudomonas fluorescens*, se atribuye a la competencia por el hierro y a la producción de compuestos antibacterianos (Gram y col., 2002; Gram y Melchiorsen, 1996). Aunque la mayoría de las cepas de *Psychrobacter* spp., como es el caso de la cepa RM1, producen sideróforos este trabajo sugiere que es improbable que los miembros de este género contribuyan de manera significativa a la alteración de la carne de conejo, y probablemente tampoco contribuye a la alteración de otros alimentos proteicos en los que *Pseudomonas* predomine.

Puesto que cepas radiorresistentes del grupo M-A responsables de la alteración de salchichas irradiadas (Ito y col., 1973) predominaban durante el almacenamiento de carne de pollo y pescado irradiados (Laycock y col., 1970; Thornley y col., 1960), se sugirió que

estas bacterias (probablemente *Psychrobacter*) podrían desempeñar un papel directo en la alteración de alimentos proteicos irradiados (Shaw y Latty, 1988). En este estudio, al irradiar (2.5 kGy) los cultivos puros de *Psychrobacter* spp. la población se vió inicialmente afectada y, tras un periodo de latencia considerable, se incrementaron en menos de $2 \log_{10}$ ufc/g (figura 7.2). Cuando se irradiaron junto con las otras cepas alterantes, las células supervivientes de la cepa LMG 7062 tuvieron una fase de recuperación más corta y alcanzaron el mismo nivel máximo pero en el caso de la cepa RM1 fueron precisos 12 días para alcanzar el número inicial (figura 7.3). Este comportamiento no podía ser debido a las bacterias alterantes ya que no se detectaron durante el almacenamiento. En conjunto, nuestros datos sugieren que las cepas radiorresistentes de *Psychrobacter* spp. irradiadas en carne de conejo necesitan un prolongado periodo de almacenamiento a refrigeración para reparar el daño subletal (Farkas, 1998) y alcanzar niveles altos. Esto y su escaso potencial alterante (Gennari y col., 1999; Prieto y col., 1992) hacen improbable que estas bacterias tengan un papel significativo en la alteración de la carne irradiada.

En conclusión, *Psychrobacter* spp. son bacterias no esporuladas radiorresistentes con escasa incidencia entre la población microbiana de la carne de conejo y que aparentemente son incapaces de competir con las bacterias alterantes que comúnmente están presentes en este ecosistema. También parece improbable que puedan ser responsables de la alteración de la carne de conejo irradiada.

Incidence, Radioresistance, and Behavior of *Psychrobacter* spp. in Rabbit Meat

JOSÉ M. RODRÍGUEZ-CALLEJA,¹ MARGARET F. PATTERSON,² ISABEL GARCÍA-LÓPEZ,¹ JESÚS A. SANTOS,¹ ANDRÉS OTERO,¹ AND MARÍA-LUISA GARCÍA-LÓPEZ^{1*}

¹Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071 León, Spain; and ²Agriculture, Food, and Environmental Science Division, Department of Agriculture and Rural Development, Queen's University, Belfast, UK

MS 04-325: Received 9 July 2004/Accepted 16 October 2004

ABSTRACT

The relative incidence of *Psychrobacter* spp. in rabbit meat, the radioresistance of these bacteria, and the growth of nonirradiated and irradiated psychrobacter isolates, alone and in coculture, during chilled storage of inoculated sterile rabbit meat was investigated. *Psychrobacter* spp. accounted for 4.2% of the storage psychrotrophic flora of 30 rabbit carcasses. The radiation D_{10} -values of 10 *Psychrobacter* isolates, irradiated at 4°C in minced rabbit meat, ranged from 0.8 to 2.0 kGy, with significant ($P < 0.05$) differences among strains. Over 12 days of storage at 4°C, pure cultures of two nonirradiated psychrobacter strains ($D_{10} = 2$ kGy) were capable of substantial increases (up to 3 log CFU/g) in sterile rabbit meat, but when the fastest growing strain was cocultured with *Pseudomonas fluorescens* and *Brochothrix thermosphacta* isolates, maximum cell densities and growth rates were significantly ($P < 0.01$) lower. After irradiation (2.5 kGy) of pure cultures in sterile rabbit meat, surviving cells of both *Psychrobacter* strains decreased for a period of 5 to 7 days and then resumed multiplication that, at day 12, resulted in a similar increase (1.6 to 1.7 log CFU/g) over initial survivor numbers. When irradiated in combination with the spoilage bacteria, one of the strains required 12 days to reach initial numbers. In conclusion, *Psychrobacter* spp. are radioresistant nonsporeforming bacteria with a low relative incidence among the storage flora of rabbit meat, unable to compete with food spoilage bacteria in this ecosystem and apparently not a major contributor to the spoilage of rabbit meat after irradiation.

The genus *Psychrobacter*, currently included in the family *Moraxellaceae* (12), comprises psychrotolerant and halotolerant gram-negative, coccoid, aerobic, nonmotile, oxidase-positive bacteria, which were originally allocated to “*Achromobacter*” or *Acinetobacter* or referred to as *Moraxella-Acinetobacter* (M-A) group or *Moraxella*-like (23, 24). These organisms are isolated from aquatic and terrestrial cold environments, including food commodities such as fish, poultry, meat, and several meat products (2, 13, 14, 16, 24, 33, 35). Earlier studies reported that in contrast to most of the vegetative cells found in these flesh foods, psychrotrophic coccobacilli of the M-A group were the main residual bacterial populations after irradiation for preservation purposes and constituted the predominant flora of certain spoiled irradiated foods (1, 21, 23, 27, 40).

Since *Psychrobacter* spp. can occur in chilled raw meat stored in air, they have been associated with meat spoilage (3, 20). However, there are no available data on psychrobacter development in foods, and the few studies from which their relative incidence can be determined suggest that they constitute a small proportion of the storage flora (11). One exception is that observed by Shaw and Latty (35), who found that *Psychrobacter immobilis* comprised up to 50% of the flora on a high-pH tissue (fat surfaces). Also, in poultry meat, M-A strains are isolated more fre-

quently from leg muscle (high pH) than from breast muscle (28, 29).

In previous work (34), we have observed that ultimate pH of rabbit meat is close to 6.0 and that its storage microflora is somehow different from that on the meat of other food animals.

This work was undertaken to determine (i) the incidence of *Psychrobacter* spp. on a high-pH meat (rabbit meat), (ii) the sensitivity of these bacteria to irradiation when inoculated in rabbit meat, and (iii) the growth of nonirradiated and irradiated strains in pure cultures and cocultures during chilled storage of sterile rabbit meat.

MATERIALS AND METHODS

Incidence of *Psychrobacter* spp. on rabbit meat. At intervals, between 0 and 7 days of storage at 3°C (shelf life of 1 week), 30 samples from rabbit meat carcasses in polystyrene trays overwrapped with oxygen-permeable films were tested for psychrotrophic counts at 4.5°C and pH values as described elsewhere (35). Subsequently, a total of 95 randomly selected isolates were submitted to a phenotypic examination. Gram staining, cellular morphology, colonial pigmentation, and oxidase and catalase production were examined as described by Downes and Ito (4). Motility and ability to grow anaerobically were investigated as described by García-López et al. (10). *P. immobilis* strain CECT (Spanish Collection of Type Cultures) 5008 and one *Pseudomonas aeruginosa* strain from our laboratory collection were used as controls.

Definitive identification of suspected *Psychrobacter* isolates was achieved on the basis of a transformation assay (24, 25) by using the hypoxanthine and thiamine-requiring mutant *P. immo-*

* Author for correspondence. Tel: +34987291119; Fax: +34987291284; E-mail: dhtmg1@unileon.es.

bilis strain ATCC 43117, the M9A medium (24), and the type strain *P. immobilis* CECT 5008 as control.

Irradiation conditions. In all cases, the irradiation was carried out at 4°C. Samples were irradiated using a cobalt-60 source (Gammabeam 650, Nordion International Inc., Ottawa, Ontario, Canada) with a dose rate of 6.32 kGy/h. Gammachrome YR dosimeters (AEA Technology, Harwell, UK) were used to confirm the dose received by samples. The change in absorbance of the dosimeters at 530 or 603 nm was spectrophotometrically measured and the corresponding doses obtained from a calibration graph provided by the National Physical Laboratory, Teddington, UK.

Irradiation resistance of *Psychrobacter* spp. in inoculated rabbit meat: test strains. Ten *Psychrobacter* strains were used. *P. immobilis* LMG 7062 (clinical specimen), LMG 7551 (fish), LMG 5008 (green bean), and LMG 7550 (cod) were obtained from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms; three *Psychrobacter* spp. strains were obtained in this study (strains RM1, RM2, and RM3); and three *Psychrobacter* spp. strains were recovered from shellfish specimens (strains SLL1, SLL2, and SLL3). Working cultures were maintained on tryptone soya agar (TSA; Oxoid, Basingstoke, UK) slants at 4°C.

Preparation, inoculation, and treatment of rabbit meat. Frozen rabbit carcasses were purchased from a local supermarket, thawed, deboned, minced, and packaged (10 g) in polyester-polyethylene bags as described by Patterson (32). After heat sealing, the bags were irradiated to 20 kGy to remove microflora and stored at 4°C until required.

Strains were grown in 10 ml of tryptone soya broth (Oxoid) for 48 h at 25°C to obtain cells in the late exponential phase of growth. Sterilized bags were partially opened and 100- μ l volumes, containing ca. 10^7 cells, were mixed with 10 g of rabbit meat mince samples. Bags were resealed and treated within 1 h of inoculation, in triplicate with doses of 0 (control), 1, 2, 3, 4, 5, and 6 kGy.

Determination of radiation D_{10} -values. After irradiation, each sample was mixed with 90 ml of peptone saline water (Oxoid), homogenized for 2 min with a Colworth 400 stomacher (A. J. Seward, London, UK), and serially diluted in 0.1% peptone solution (Oxoid). Spread plating on TSA (Oxoid) containing 0.6% yeast extract (TSAYE; Oxoid) was used to enumerate surviving bacterial populations. Two plates per dilution were incubated at 25°C for 48 h.

The logarithm of surviving fractions of the populations was plotted against the radiation dose to determine the death rate of each *Psychrobacter* strain. Individual regression lines were calculated (Statistica V.5.5., Statsoft, Inc., Tulsa, Okla.) and D_{10} -values obtained by taking the negative reciprocal of the slope.

Pure cultures and cocultures studies in sterile rabbit meat mince: strains and inocula. Pure culture experiments were performed with *P. immobilis* strain LMG7062 and *Psychrobacter* spp. strain RM1, which showed the highest radioresistance ("Results" section). For coculture experiments, *Pseudomonas fluorescens* strain NCTC 10038 and *Brochothrix thermosphacta* strain NCTC 10822 were selected. All strains were grown separately in tryptone soya broth at 25°C for 48 h.

Inocula for pure culture experiments were 100- μ l aliquots of culture broth, containing about 10^7 CFU of each *Psychrobacter* strain in the late exponential growth phase. Two-strain inocula were 200- μ l volumes containing approximately equal populations (ca. 10^7 cells) of *P. fluorescens* and *B. thermosphacta*. Three-

strain inocula were 300- μ l volumes containing approximately equal populations (ca. 10^7 cells) of *Psychrobacter* strain RM1, *P. fluorescens*, and *B. thermosphacta*.

Growth of nonirradiated and irradiated pure cultures of *Psychrobacter* strains. To investigate the behavior of nonirradiated and irradiated pure cultures of *Psychrobacter* in rabbit meat mince, 24 bagged sterile samples (10 g) were spiked with each *Psychrobacter* strain and half of them treated at 2.5 kGy. All samples were maintained at 4°C for up to 12 days and 4 bags (2 treated and 2 untreated) examined at intervals of 0, 2, 5, 7, 9, and 12 days of storage for microbiological analysis.

Growth of irradiated three-strain inocula. Growth of the three-strain mixtures after irradiation was studied by inoculating each combination in 12 sterile samples of rabbit meat mince, which were then irradiated at 2.5 kGy and chilled stored, two of them being examined each sampling day.

Growth of nonirradiated two-strain inocula. Twelve bags of sterile rabbit meat mince were inoculated with the combination of *P. fluorescens* and *B. thermosphacta*, stored, and examined as above.

Growth of nonirradiated three-strain inocula. Twelve sterile rabbit meat mince samples were spiked with the three-strain mixture, chilled stored, and examined at intervals. There are no differential media available for psychrobacters, so 12 additional samples were inoculated and kept refrigerated. Each sampling day, two of them were irradiated at 2.5 kGy to eliminate *P. fluorescens* and *B. thermosphacta* and analyzed.

Microbiological analysis. Each sample was mixed with 90 ml of peptone saline water, homogenized for 2 min, and serially diluted in peptone water as described above. In monoculture experiments, 100- μ l aliquots of the appropriate dilutions were surface plated in duplicate on TSAYE plates, which were incubated at 25°C for 48 h.

In coculture experiments, total counts were determined on TSAYE, *P. fluorescens* on cetrimide-fucidin-cephaloridine (Oxoid) medium, and *B. thermosphacta* on streptomycin-thallos-acetate agar (Oxoid). Numbers of *Psychrobacter* strain RM1 were estimated on the basis of colony counts, D_{10} -value, and treatment dose after incubation of appropriated dilutions on TSAYE. All incubations were done at 25°C for 48 h. After 12 days of storage, the relative incidence of each inoculated species was estimated by random selection, using a Harrison disc (19), of 60 colonies from total count plates. Subcultured colonies were Gram stained and tested for oxidase and catalase production, oxidation-fermentation test, and motility (19).

Growth rate of the different strains. The daily growth rate of each strain was calculated from counts on solid media (log CFU per gram) using the following formula: daily growth rate between days *a* and *b* = (counts on day *b* - counts on day *a*)/number of days between *a* and *b*.

Replication of the experiments. All experiments about the behavior of pure cultures and cocultures in sterile rabbit meat mince were repeated twice (two lots). Each sampling day two bags were analyzed from each lot.

Statistical analysis. Mean D_{10} -values, mean log numbers, maximum numbers, and growth rates were compared by the *t* test (Statistica V.5.5.).

TABLE 1. Radiation D_{10} -values of *Psychrobacter* spp. inoculated in irradiated rabbit meat mince

Strain of <i>Psychrobacter</i>	D_{10} -value (kGy) ^a	R^{2b}
RM1	2.0 ± 0.2 A ^c	0.96
LMG 7062	2.0 ± 0.1 A	0.96
SLL2	1.6 ± 0.1 AB	0.99
LMG 7550	1.3 ± 0.2 B	0.99
SLL3	1.3 ± 0.1 B	0.92
LMG 7551	0.8 ± 0.2 C	0.98
SLL1	1.0 ± 0.2 C	0.98
RM3	0.9 ± 0.1 C	0.98
RM2	1.0 ± 0.1 C	0.99
LMG 5008	1.1 ± 0.1 C	0.98

^a Negative reciprocal of the slope of each regression line (log CFU per gram of surviving population versus radiation dose).

^b Coefficient of determination of the regression line.

^c Values with no letter in common are significantly different ($P < 0.05$). Each D_{10} -value is the mean of three sets of data (not significantly different, $P > 0.05$).

RESULTS

Incidence of *Psychrobacter* spp. on rabbit meat.

Only four isolates (4.2%) gave positive results when tested for the transformation assay. They were recovered from four different carcasses at different storage days.

Radiation resistance of *Psychrobacter*. Radiation D_{10} -values of the tested strains are shown in Table 1. The coefficients of determination of the regression lines (R^2) were between 0.92 and 0.99, all but one being higher than 0.96. The D_{10} -values ranged from 0.8 to 2.0 kGy. There were statistically significant differences ($P < 0.05$) between strains, which could be divided into three groups with average D_{10} -values of 0.96 (LMG 7551, SLL1, RM3, RM2, LMG 5008), 1.40 (SLL2, LMG 7550, SLL3), and 2.00 kGy (RM1, LMG 7062). These groups were not related to the origin of the strains.

Pure cultures and cocultures experiments in sterile rabbit meat mince. Figure 1 shows growth of nonirradiated and irradiated pure cultures of *Psychrobacter* strains LMG 7062 and RM1 in sterile rabbit meat mince over 12 days at 4°C. The maximum increase of nonirradiated strain

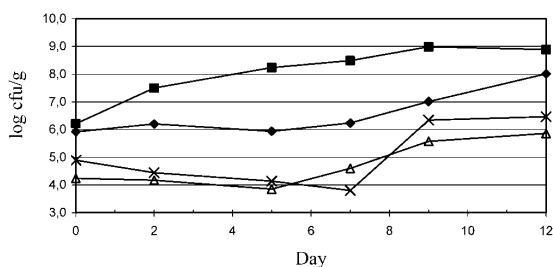


FIGURE 1. Growth of *Psychrobacter* pure cultures in sterile rabbit meat stored at 4°C. Strain LMG 7062 nonirradiated (◆) and irradiated at 2.5 kGy (△). Strain RM1 nonirradiated (■) and irradiated at 2.5 kGy (×).

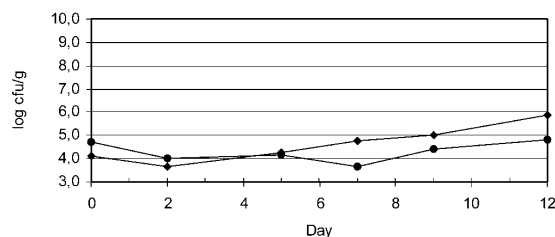


FIGURE 2. Growth after irradiation (2.5 kGy) of two cocultures: ◆, *Psychrobacter* strain LMG 7062 plus *P. fluorescens* plus *B. thermosphacta*; ●, *Psychrobacter* strain RM1 plus *P. fluorescens* plus *B. thermosphacta*, in sterile rabbit meat stored at 4°C.

LMG 7062 was 2.1 log CFU/g at the end of storage, with a daily increase of 0.17 log CFU/g. For nonirradiated strain RM1, maximum numbers (9 log CFU/g) were attained at day 9. Between days 0 and 12, population increase was 2.7 log units per g at a daily rate of 0.22 log CFU/g. After irradiation (2.5 kGy) in rabbit meat, both strains decreased in numbers for a period of 5 to 7 days and then resumed multiplication that resulted in a similar increase over initial survivor numbers (1.6 to 1.7 log CFU/g).

The effect of 2.5 kGy on the three-strain mixtures is shown in Figure 2. After treatment of sterile rabbit meat spiked with both cocultures, *P. fluorescens* and *B. thermosphacta* were under the detection level (1.7 log CFU/g) and remained so until the end of the storage period. At this time, all randomly selected colonies were psychrobacters. During storage, TSAYE counts on rabbit meat inoculated with the coculture containing strain LMG 7062 increased by 2.4 log CFU/g at a daily rate of 0.20 log CFU/g. For samples inoculated with the coculture containing strain RM1, the values were 0.1 log CFU/g and 0.01 log CFU/g, respectively.

When *P. fluorescens* and *B. thermosphacta* were grown in sterile rabbit meat for 12 days (Fig. 3), *Pseudomonas* numbers increased by 3.7 log CFU/g at a daily rate of 0.30 log CFU/g and *B. thermosphacta* increased by 2.7 log CFU/g at a daily rate of 0.22 log CFU/g. At the end of storage, the relative proportions of *P. fluorescens* and *B. thermosphacta* among the total flora were 59.3 and 40.7%, respectively.

Growth in sterile rabbit meat of the three-strain mixture

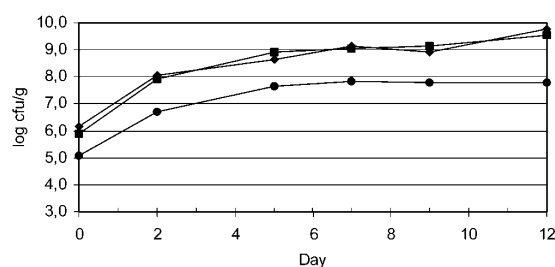


FIGURE 3. Growth of cocultured food spoilage bacteria (*P. fluorescens* plus *B. thermosphacta*) in sterile rabbit meat stored at 4°C. ◆, Total counts; ■, *P. fluorescens* counts; ●, *B. thermosphacta* counts.

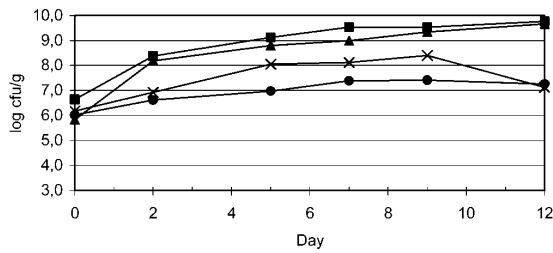


FIGURE 4. Growth of cocultured food spoilage bacteria (*P. fluorescens* plus *B. thermosphacta*) and *Psychrobacter* strain RM1 in sterile rabbit meat stored at 4°C. ■, total counts; ▲, *P. fluorescens* counts; ×, *B. thermosphacta* counts; ●, estimated *Psychrobacter* counts.

consisting of the above spoilage bacteria and *Psychrobacter* strain RM1 is shown in Figure 4. Again, *P. fluorescens* attained its maximum population (9.7 log CFU/g) after 12 days, with numbers increasing by 3.9 log CFU/g at a daily rate of 0.32 log CFU/g. *B. thermosphacta* reached its maximum levels (8.4 log CFU/g) after 9 days of storage with an increase of 2.2 log CFU/g at a daily rate of 0.25 log CFU/g. Between days 9 and 12, *B. thermosphacta* population declined by 1.3 log CFU/g at a daily rate of -0.42 log CFU/g. The maximum counts of *Psychrobacter* (7.3 log CFU/g) were obtained after 7 days of storage, with an increase in numbers of 1.4 log CFU/g at a daily rate of 0.19 log CFU/g. Between days 7 and 12, *Psychrobacter* numbers declined by 0.1 log CFU/g at a daily rate of -0.03 log CFU/g. Only *P. fluorescens* was recovered from total count plates after 12 days of storage.

DISCUSSION

The relative incidence of *Psychrobacter* spp. among the storage flora of rabbit meat (4.2%) compares well with findings in other chilled raw proteinaceous foods (beef, lamb, poultry, freshwater fish, milk, and soft and fresh cheeses) in which they accounted for less than 1 to 5% (5, 9, 13, 16, 33). These bacteria appear to be more prevalent in fresh marine fish, particularly in herring, sardine, and cod (2, 14, 15, 30), although their highest relative incidences have been reported on fat surfaces (up to 50%) and in rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (up to 90%). A musty off odor has been associated with psychrobacters growth in rehydrated salted cod products (2, 35).

Because members of the M-A group and *Moraxella*-like strains have been found surviving in irradiated foods, psychrobacters are recognized as radiation-resistant organisms (24). A number of reports on irradiation sensitivity of M-A and *Moraxella*-like isolates were published in the 1970s and early 1980s, but only one (21) was performed with strains tested for the definitive transformation assay. Eleven psychrotrophic coccobacilli, certainly psychrobacters, had D_{10} -values in phosphate buffer at 20°C in the range of 0.25 to 0.66 kGy. In similar conditions, the D_{10} -values of four M-A isolates from radurized Vienna sausages ranged from 0.44 to 0.54 kGy (23). More variation in radiation resistance existed among the M-A isolates treated

in culture broth by Tiwari and Maxcy (38), who reported D_{10} -values ranging from 0.15 to 1.12 kGy. When isolating the most radiation-resistant vegetative cells from raw beef, Welch and Maxcy (40) found the extreme radiation resistance at -30°C of two M-A cultures (D_{10} -values of 2.73 and 4.80 kGy), and when a combination of drying and sub-freezing temperature of irradiation was assayed, the D_{10} -value of representative M-A isolates was as high as 28.3 kGy (27). One strain of *Moraxella phenylpyruvica* (now *Psychrobacter phenylpyruvicus*) treated in minced poultry meat had a D_{10} -value of 0.86 kGy (32). Analyzing data in the literature, van Gerwen et al. (39) identified several members of the M-A group as having very high resistance at very low temperatures ($\leq -30^{\circ}\text{C}$), estimating an average D_{10} -value of 3.65 kGy under this condition.

In this study, D_{10} -values obtained for *P. immobilis* and *Psychrobacter* spp. irradiated at 4°C in rabbit meat varied between 0.8 and 2.0 kGy depending on the strain. However, even the most sensitive strain was more resistant to gamma radiation than the majority of vegetative cells in fresh foods of animal origin, and there were isolates with radiation resistance comparable to that of some bacterial spores (7, 8, 31). Although sensitivity to irradiation depends on several factors, high resistance in nonsporulating bacteria is attributed to the ability to repair DNA damage caused by irradiation (8).

An early study (36) reported that radioresistant M-A isolates from beef were unable to multiply in sterilized ground beef, ground chicken meat, or fresh beef exudates incubated for 14 days in the range 5 to 32°C. In contrast, the two *Psychrobacter* isolates tested in the present study, especially that obtained from rabbit meat (RM1), were capable of substantial growth at 4°C in pure culture rabbit meat experiments (Fig. 1). When cocultured with *P. fluorescens* and *B. thermosphacta*, growth of isolate RM1 was affected, as its maximum cell density and growth rate were significantly lower ($P < 0.01$) than when grown alone (Figs. 1 and 4). In this three-strain experiment (Fig. 4), growth of the *P. fluorescens* isolate was similar to that observed in absence of strain RM1 (Fig. 4). But the behavior of the *B. thermosphacta* isolate differed at day 12, and although it grew faster and reached a higher maximum level than the *Psychrobacter* isolate, its final population was slightly smaller. Thus, at the end of storage, *B. thermosphacta*, which accounted for 40.7% of the total flora in the two-strain experiment, could not be detected in the three-strain experiment.

The relative proportions of the different organisms that comprise the storage flora of chilled meat in air are related to their relative growth rates, but this alone is not responsible for success (3). Part of the inhibitory activity of certain gram-negative bacteria, particularly pseudomonads of the fluorescent group, has been attributed to competition for iron and production of antibacterial compounds (17, 18). Although most *Psychrobacter* strains produce siderophores, as did strain RM1 (data not shown), this study shows that it is unlikely for this bacterium to be an important contributor to the spoilage of rabbit meat or to any of the other proteinaceous foods where *Pseudomonas* predominate.

Since radioresistant strains of the M-A group have been found to be responsible for the spoilage of irradiated Vienna sausages at 10°C (22) and predominating on irradiated stored fish and poultry (26, 37), it was suggested that these organisms (probably psychrobacters) could play a more direct role in spoilage of irradiated muscle foods (35). In this study, numbers of irradiated (2.5 kGy) pure cultures of *Psychrobacter* in rabbit meat were affected initially and, after a considerable lag time, increased by less than 2 log CFU/g (Fig. 1). When irradiated in combination with spoilage bacteria, surviving cells of strain LMG 7062 showed a shorter lag time and reached identical maximum number, but those of RM1 took 12 days to reach initial numbers (Fig. 2). This unexpected behavior cannot be related to surviving spoilage bacteria, since they were not detected over the storage period. Overall, our data suggest that radioresistant *Psychrobacter* strains irradiated in rabbit meat need prolonged refrigerated storage to repair sublethal damage (6) and to attain high numbers. This and their low spoiling potential (15, 33) make unlikely that these bacteria have a major role in spoilage of irradiated meat.

In conclusion, *Psychrobacter* spp. are radioresistant nonsporeform bacteria with a low incidence among the storage flora of rabbit meat that apparently are unable to compete with common spoilage bacteria in this ecosystem. It also seems unlikely that they are responsible for the spoilage of irradiated rabbit meat.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the technical support of Mr. W. D. Graham and Mr. R. Gray. Moreover, special thanks to Mr. Linton for laboratory assistance. J. M. Rodríguez-Calleja is supported by the Spanish MCYT (project AGL-2000 1159).

REFERENCES

- Anellis, A., D. Berkowitz, and D. Kemper. 1973. Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. *Appl. Microbiol.* 25:517–523.
- Bjorkevoll, I., R. L. Olsen, and O. T. Skjerdal. 2003. Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *Int. J. Food Microbiol.* 84:175–187.
- Dainty, R. H., and B. M. Mackey. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 21:103S–114S.
- Downes, F. P., and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Eribo, B. E., and J. M. Jay. 1985. Incidence of *Acinetobacter* spp. and other gram-negative, oxidase-negative bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:256–257.
- Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44:189–204.
- Farkas, J. 1999. Radiation processing: an efficient means to enhance the bacteriological safety of foods. *New Food* 2:31–33.
- Farkas, J. 2001. Physical methods of food preservation, p. 567–591. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montvill (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- García-Armesto, M. R., M. Prieto, C. Alonso, M. L. García-López, M. C. García-Fernández, and A. Otero. 1993. Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes' milk. *J. Dairy Res.* 60:371–383.
- García-Lopez, I., A. Otero, M. L. García-Lopez, and J. A. Santos. 2004. Molecular and phenotypic characterization of nonmotile gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *J. Appl. Microbiol.* 96:878–886.
- García-López, M. L., and M. Prieto. 1999. *Psychrobacter*, p. 1875–1882. In R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press, London.
- Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn. 2003. Taxonomic outline of the prokaryotes, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. Release 4.0. Springer-Verlag, New York.
- Gennari, M., M. Parini, D. Volpon, and M. Serio. 1992. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 15:61–75.
- Gennari, M., and S. Tomaselli. 1988. Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int. J. Food Microbiol.* 6:341–347.
- Gennari, M., S. Tomaselli, and V. Cotrona. 1999. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiol.* 16:15–28.
- González, C. J., J. A. Santos, M. L. García-López, and A. Otero. 2000. Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J. Food Prot.* 63:315–321.
- Gram, L., and J. Melchiorsen. 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J. Appl. Bacteriol.* 80:589–595.
- Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen, and M. Giversuskov. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78:79–97.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*, 3rd ed. Academic Press, London.
- International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF). 1998. *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. Blackie Academic Press and Professional, London.
- Ito, H., and H. Iizuka. 1983. Genetic transformation of *Moraxella*-like psychrotrophic bacteria and their radiation-sensitivity. *Agric. Biol. Chem.* 47:603–605.
- Ito, H., T. Sato, and H. Iizuka. 1973. [Radiation preservation of Vienna sausage. IV. Study of *Acinetobacter* as contaminant of Vienna sausages and their radio-sensitivities.]. *Food Irradiation [Shokuhin Shosha]* 8:51–57.
- Ito, H., T. Sato, and H. Iizuka. 1976. Study of the intermediate type of *Moraxella* and *Acinetobacter* occurring in radurized Vienna sausages. *Agric. Biol. Chem.* 40:867–873.
- Juni, E. 1992. The genus *Psychrobacter*, p. 3241–3246. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Juni, E., and G. A. Heym. 1980. Transformation assay for identification of psychrotrophic achromobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:1106–1114.
- Laycock, R. A., L. W. Regier, L. Gram, L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen, and M. Giversuskov. 1970. Pseudomonads and achromobacters in the spoilage of irradiated haddock of different preirradiation quality. *Appl. Microbiol.* 20:333–341.
- Ma, K., and R. B. Maxcy. 1981. Factors influencing radiation-resistance of vegetative bacteria and spores associated with radappertization of meat. *J. Food Sci.* 46:612–616.
- McMeekin, T. A. 1975. Spoilage association of chicken breast muscle. *Appl. Microbiol.* 29:44–47.
- McMeekin, T. A. 1977. Spoilage association of chicken leg muscle. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1244–1246.
- Molin, G., I. M. Stenstroem, and A. Ternstroem. 1983. The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2°C. *J. Appl. Bacteriol.* 55:49–56.
- Monk, J. D., L. R. Beuchat, and M. P. Doyle. 1995. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *J. Food Prot.* 58:197–208.
- Patterson, M. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmosphere. *Lett. Appl. Microbiol.* 7:55–58.
- Prieto, M., M. R. García-Armesto, M. L. García-López, A. Otero, and B. Moreno. 1992. Numerical taxonomy of gram-negative, non-

- motile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2245–2249.
34. Rodríguez-Calleja, J. M., J. A. Santos, A. Otero, and M. L. García-López. 2004. Microbiological quality of rabbit meat. *J. Food Prot.* 67:966–971.
35. Shaw, B. G., and J. B. Latty. 1988. A numerical taxonomic study of non-motile non-fermentative gram-negative bacteria from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 65:7–21.
36. Snyder, L. D., and R. B. Maxcy. 1979. Effect of a_w of meat products on growth of radiation resistant *Moraxella-Acinetobacter*. *J. Food Sci.* 44:33–36.
37. Thornley, M. J., M. Ingram, and E. M. Barnes. 1960. The effects of antibiotics and irradiation on the *Pseudomonas-Achromobacter* flora of chilled poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 23:487–498.
38. Tiwari, N. P., and R. B. Maxcy. 1972. *Moraxella-Acinetobacter* as contaminants of beef and occurrence in radurized product. *J. Food Sci.* 37:901–903.
39. van Gerwen, S.-J. C., F. M. Rombouts, K. van't Riet, and M. H. Zwietering. 1999. A data analysis of the irradiation parameter D_{10} for bacteria and spores under various conditions. *J. Food Prot.* 62: 1024–1032.
40. Welch, A. B., and R. B. Maxcy. 1975. Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef. *Appl. Microbiol.* 30:242–250.

CONCLUSIONES-



1.- Las muestras de carne de conejo que han sido analizadas en este estudio poseen bajos niveles de microorganismos indicadores pero números relativamente altos de recuentos totales. Por otra parte, nuestros datos sugieren que, al igual que en otras carnes, la microbiota de la carne de conejo cruda refrigerada está dominada por *Pseudomonas* pero las levaduras y algunas bacterias Gram positivas no esporuladas parecen ser también relevantes.

2.- Durante el almacenamiento a refrigeración en presencia de oxígeno los principales microorganismos que se desarrollan en canales de conejo normales, que habitualmente tienen valores de pH (músculo *Biceps femoris*) superiores a los que presentan las canales de otras especies de abasto, son *Pseudomonas* spp. y en menor medida levaduras y *Brochothrix thermosphacta*. Como ocurre con otras carnes DFD, las canales de conejo DFD presentaron un pH más alto, menor ERV y se alteraron más rápidamente que las canales normales.

3.- Nuestros resultados, y también los de otros investigadores, sugieren que ni las canales ni los cortes parecen ser un vehículo importante de agentes zoonóticos como *Salmonella*, *Escherichia coli* verotoxigénico o *Yersinia enterocolitica*. Sin embargo, la prevalencia de bacterias patógenas de diversos orígenes como *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* móviles y *Listeria monocytogenes*, capaces de colonizar el ambiente de los establecimientos alimentarios, es similar e incluso superior a la observada en otras carnes. El tratamiento térmico culinario inactivará a éstas últimas pero hay que tener en cuenta que pueden acceder al hombre por manipulación, cocinado incompleto o contaminación cruzada.

4.- Por su biotipo, las cepas de *Staphylococcus aureus* que hemos aislado de carne de conejo son probablemente de origen humano o sin hospedador específico. Los resultados obtenidos con la técnica de PFGE, que fue el método con mayor poder de

discriminación, ponen de manifiesto que existían diferentes pulsotipos dentro de cada establecimiento y que algunos de ellos persistían a lo largo del tiempo. Asimismo, en los diferentes establecimientos se observó también una diseminación de cepas genéticamente relacionadas pertenecientes, la mayoría, al pulsotipo A y al fenotipo “biotipo NHS CV:C-fagotipo 3A/3C/55/71”. Este último ha sido detectado, hasta ahora, en conejos afectados de estafilococosis crónica en granjas europeas. La ubicuidad de este fenotipo virulento y la alta incidencia de cepas resistentes a antibióticos usados en medicina humana es preocupante tanto en salud pública como en sanidad animal.

5.- En las condiciones en las que se realizó este estudio, *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias más resistente a los tratamientos por ultrasonidos con presión pero sensible a los tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje. La supervivencia de *S. aureus* a los tratamientos térmicos depende de la cepa por la gran variación intraespecie en la resistencia. Sin embargo, las variaciones intraespecie en la resistencia a la manosonicación y los pulsos eléctricos de alto voltaje es mucho menor. La resistencia al calor de *S. aureus* se correlacionó con el contenido en pigmento carotenoide, hecho que se relaciona con la expresión del factor sigma alternativo de fase estacionaria (σ^B). No hubo relación entre los patrones de resistencia de *Staphylococcus aureus* a las tres tecnologías de conservación de alimentos. Para el diseño de tratamientos que utilicen alguna de estas tecnologías, nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de elegir cuidadosamente la cepa más resistente a cada uno, especialmente para los tratamientos térmicos, por la anteriormente citada escasa relación entre la resistencia a los tres agentes de estrés.

6.- El envasado en 100 % CO₂, empleando una mezcla 35:35:30 (CO₂:O₂:N₂) y a vacío incrementa la vida útil de la carne de conejo almacenada a refrigeración (3±1 °C), no apreciándose cambios organolépticos significativos hasta las 5, 2-2.5 y 2-3 semanas

respectivamente. Esta vida útil es considerablemente superior a los 6.8 días que presenta la carne mantenida en aerobiosis a la misma temperatura. En la carne envasada a vacío y en la envasada en la mezcla 35:35:30 (CO₂:O₂:N₂), la alteración organoléptica se asocia con una población psicrotrofa superior a 7.5 log₁₀ ufc/g, siendo los grupos microbianos predominantes las bacterias ácido-lácticas y las *Pseudomonas*, respectivamente. En la condición de envasado en 100% de CO₂, los grupos microbianos predominantes fueron las bacterias ácido-lácticas (45.8% de la microbiota psicrotrofa) y *Brochothrix thermosphacta*, siendo la limosidad superficial la primera característica sensorial que alcanzó la calificación de inaceptable.

7.- El género *Psychrobacter* está constituido por bacterias no esporuladas radiorresistentes con baja incidencia entre la población microbiana de la carne de conejo y que aparentemente son incapaces de competir con las bacterias alterantes que comúnmente están presentes en este ecosistema. También parece improbable que puedan convertirse en responsables de la alteración de la carne de conejo irradiada.

BIBLIOGRAFÍA-



- Aarestrup, F. M., H. C. Wegener, y V. T. Rosdahl. 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet.Microbiol.*, 45:139-150.
- Ajuwape, A. T. P., y E. A. Aregbesola. 2001. Biochemical characterization of staphylococci isolated from rabbits. Disponible en:
http://www.isrvma.org/article/56_2_2.htm. Último acceso el 20/01/2006.
- Alpas, H., N. Kalchayanand, F. Bozoglu, A. Sikes, C. P. Dunne, y B. Ray. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl.Environ.Microbiol.*, 65:4248-4251.
- Álvarez, I., P. Mañas, S. Condón, y J. Raso. 2003. Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *J.Food Sci.*, 68:2316-2320.
- AMACO. 2003. Estudio actualizado del sector de industrias cárnicas de mataderos de carne de aves y conejos: "La atomización y la apuesta por los elaborados, principales características del sector industrial avícola y cunícola". *Cárnica 2000*, Septiembre 2003:18-24.
- Andrews, W. H., R. S. Flowers, J. Silliker, y J. S. Bailey. 2001. *Salmonella*, p. 357-380. En Downes F. P., y K. Ito (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. APHA, Washington, D.C.
- Anellis, A., D. Berkowitz, y D. Kemper. 1973. Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. *Appl.Microbiol.*, 25:517-523.
- Anónimo. 1983. Real decreto 1353/1983, de 27 de abril, por el que se modifica el capítulo V (conservación de alimentos) del Código Alimentario Español, aprobado por Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre. *B.O.E.*, 126:14781-14782.
- Anónimo. 1990. Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo, de 26 de junio, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal [última modificación consultada, Reglamento (CE) 1148/2005, de la Comisión, de 15 julio de 2005 (DOUE L 185, 16/7/2005:20-21)]. *D.O.U.E.*, L 224, 18/08/1990:1-8.
- Anónimo. 1991. Directiva 91/495/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a los problemas sanitarios y de policía sanitaria en materia de producción y puesta en el mercado de carne de conejo y de caza de cría. *D.O.C.E.*, L 228, 24/09/1991:41-55.

- Anónimo. 1994a. Directiva 94/65/CE del Consejo, de 14 de diciembre, por la que se establecen los requisitos aplicables a la producción y a la comercialización de carne picada y preparados de carne. *D.O.C.E.*, L 368, 21/12/1994:10-31.
- Anónimo. 1994b. Real Decreto 1543/1994, de 8 de julio, por el que se establecen los requisitos sanitarios y de policía sanitaria aplicables a la producción y a la comercialización de carne de conejo doméstico y de caza de granja. *B.O.E.*, 216:28097-29109.
- Anónimo. 2001. Decisión 2001/471/CE de la Comisión, de 8 de junio, por la que se establecen normas para los controles regulares de la higiene realizados por los explotadores de establecimientos, de conformidad con la Directiva 64/433/CEE, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios de carne fresca, y con la Directiva 71/118/CEE, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios de carnes frescas de aves de corral. *D.O.U.E.*, L 165, 21/06/2001:48-53.
- Anónimo. 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. Última modificación en el R.D. 257/2004, BOE 39 de 2004. *B.O.E.*, 44:6756-6799.
- Anónimo. 2003a. Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante. *D.O.U.E.*, C 56, 11/03/2003:5-5.
- Anónimo. 2003b. Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, sobre los aditivos en la alimentación animal. *D.O.U.E.*, L 268, 18/10/2003:29-43.
- Anónimo. 2004a. Corrección de errores del Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO L 139 de 30.4.2004). *D.O.U.E.*, L 226, 25/06/2004:22-82.
- Anónimo. 2004b. Corrección de errores del Reglamento (CE) 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano (DOUE L 139 de 30.4.2004). *D.O.U.E.*, L 226, 25/06/2004:83-127.

- Anónimo. 2005a. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2004. *Boletín Epidemiológico. Instituto de Salud Carlos III. MSC* **13**(10):109-120.
- Anónimo. 2005b. Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *D.O.U.E.*, L 338, 22/12/2005:1-26.
- Asensio, M. A., J. A. Ordóñez, y B. Sanz. 1988. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J.Food Prot.*, 51:356-360.
- Badr, H. M. 2004. Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Sci.*, 67:541-548.
- Bannerman, T. L., G. A. Hancock, F. C. Tenover, y J. M. Miller. 1995. Pulsed-Field Gel-Electrophoresis as a replacement for bacteriophage-typing of *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Microbiol.*, 33:551-555.
- Barnes, E. M., y C. S. Impey. 1973. The sampling of chickens, turkeys, ducks and game birds, p. 63-76. En Board R. G., y D. W. Lovelock (ed.), *Sampling Microbiological Monitoring of Environments*. Academic Press, London.
- Barrón, G., G. Rosas, Ch. Sandoval, O. Bonilla, G. Reyes, P. Rico, L. Cardona, y F. Zamora. 2005. Effect of genotype and sex on pH of *Biceps femoris* and *Longissimus dorsi* muscles in rabbit carcasses. *Actas del 8º Congreso Mundial del Conejo*. Disponible en: <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>. Último acceso el 17/01/2006.
- Bell, C., y A. Kyriakides. 2002a. *Listeria monocytogenes*, p. 337-362. En Blackburn C. W., y P. J. McClure (ed.), *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Bell, C., y A. Kyriakides. 2002b. *Salmonella*, p. 307-336. En Blackburn C. W., y P. J. McClure (ed.), *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Ben Jaafar, K., M. Jiridi, M. Fodha, y I. Salem. 2002. Study of *Salmonella* contamination of restaurant meat products collected over a period of one year. *Tunis Med.*, 80:207-213.
- Benito, A., G. Ventoura, M. Casadei, T. Robinson, y B. Mackey. 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl.Environ.Microbiol.*, 65:1564-1569.

- Berruga, M. I., H. Vergara, y M. B. Linares. 2005. Control of microbial growth and rancidity in rabbit carcasses by modified atmosphere packaging. *J.Sci.Food Agric.*, 85:1987-1991.
- Bin Kingombe, C. I., G. Huys, M. Tonolla, M. J. Albert, J. Swings, R. Peduzzi, y T. Jemmi. 1999. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl.Environ.Microbiol.*, 65:5293-5302.
- Bischoff, M., y B. Berger-Bächli. 2001. Teicoplanin stress-selected mutations increasing σ^B activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 45:1714-1720.
- Bjorkevoll, I., R. L. Olsen, y O. T. Skjerdal. 2003. Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *Int.J.Food Microbiol.*, 84:175-187.
- Blickstad, E., y G. Molin. 1983. Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork, with special reference to temperature and sodium chloride. *J.Food Prot.*, 46:756-763.
- Bobbitt, J. 2002. Self life and microbiological safety of selected new and emerging meats destined for export markets. Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication no. 02/038, Disponible en:
<http://www.rirdc.gov.au/reports/NAP/02-038.pdf>. Último acceso el 15/07/2006.
- Bobbitt, J. 2003. Buffalo, Camel, Crocodile, Emu, Kangaroo, Ostrich and Rabbit Meat. New value added products. Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication no. 03/036, Disponible en:
<http://www.rirdc.gov.au/reports/NAP/03-036.pdf>. Último acceso el 15/07/2005.
- Bonardi, S., G. Pizzin, R. Ridolfini, y G. Antignano. 1999. Isolation of *Salmonella enterica* serotype brancaster from slaughtered rabbits. Disponible en:
<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bonardi/bonardi.htm>. Último acceso el 15/07/2005.
- Borch, E., M. L. Kant-Muermans, y Y. Blixt. 1996a. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int.J.Food Microbiol.*, 33:103-120.
- Borch, E., T. Nesbakken, y H. Christensen. 1996b. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*, 30:9-25.
- Borch, E., y H. Agerhem. 1992. Chemical, microbial and sensory changes during the anaerobic cold storage of beef inoculated with a homofermentative *Lactobacillus* sp. or a *Leuconostoc* sp. *Int.J.Food Microbiol.*, 15:99-108.

- Botta, J. R. 1995. Evaluation of Seafood Freshness Quality. VCH Publishers, Inc., New York.
- Broda, D. M., K. M. Lacy, y R. G. Bell. 1998. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Int.J.Food Microbiol.*, 39:69-78.
- Cabanes, R. A., J. Ouhayoun, y S. Gilbert. 1994. Qualité de la viande de lapin. Influence de trois modes de conservation sur l'évolution des propriétés microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles. *Viandes et Produits Carnes.*, 15:175-178.
- Cantoni, C. 1976. Preservation of rabbit meat. *Industri Alimentari*, 15:128-130.
- Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin, y I. Phillips. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J.Antimicrob.Chemother.*, 52:159-161.
- Catellani, P., C. Malocco, y M. Rasetti. 1999. Possible role of breed rabbits as asymptomatic carriers of *Salmonella* spp. at slaughterhouse. *Atti Soc.Ital.Sci.Vet.*, LIII:321-322.
- Cerrone, A., F. Mariani, M. Ciabrelli, G. Galiero, E. De Carlo, A. Fioretti, A. Baiano, y M. Bartoli. 2004. A survey of zoonotic agents in italian rabbit slaughterhouses. Proceedings of 8th World Rabbit Congress. Puebla City, Mexico. Disponible en: <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>. Último acceso el 01/12/2005.
- Church, N. 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends Sci.Technol.*, 5:345-352.
- Clark, D. S., y C. P. Lentz. 1969. The effect of carbon dioxide on growth of slime producing bacteria on fresh beef. *Can.Inst.Food Sci.*, 2:72-75.
- Condón, S., A. Palop, J. Raso, y F. J. Sala. 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett.Appl.Microbiol.*, 22:149-152.
- Costell, E. 2002. A comparison of sensory methods in quality control. *Food.Qual.Prefer.*, 13:341-353.
- Cruz, J. 2002. La situación de la producción de carne de conejo en España. *Eurocarne*, 112:21-24.
- Dainty, R. H., y B. M. Mackey. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J.Appl.Bacteriol.*, Symposium Supplement 21:103S-114S.

- Dainty, R., B. G. Chaw, y T. A. Roberts. 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats, p. 151-178. En Roberts T. A., y F. A. Skinner (ed.), Food Microbiology: Advances and Prospects. Academic Press, London.
- Dalle Zotte, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest.Prod.Sci.*, 75:11-32.
- Davies, A. R. 1995. Advances in modified-atmosphere packaging, p. 304-320. En Gould G. W. (ed.), New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Professional, London.
- Davies, A., y R. G. Board (ed.). 1998. The Microbiology of Meat and Poultry. Blackie Academic and Professional, London.
- de Saxe, M. J., y C. M. Notley. 1978. Experiences with the typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A*, 241:46-59.
- Devriese, L. A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J.Appl.Bacteriol.*, 56:215-220.
- Devriese, L. A. 1987. Infecties met een special konijnpathogeen *Staphylococcus aureus* biotype op een konijnen proefbedrijf: resultaten van behandelingen en eradicatiepogingen. *Landbouwtijdschrift*, 5:1243-1245.
- Devriese, L. A. 1990. Staphylococci in healthy and diseased animals. *J.Appl.Bacteriol.*, 19:71S-80S.
- Devriese, L. A., C. Godard, L. Okerman, y L. Renault. 1981. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Ann.Rech.Vet.*, 12:327-332.
- Devriese, L. A., M. Yde, C. Godard, y B. K. Isigidi. 1985. Use of biotyping to trace the origin of *Staphylococcus aureus* in foods. *Int.J.Food Microbiol.*, 2:365-369.
- Dillon, V. M. 1998. Yeasts and moulds associated with meat and meat products, p. 85-117. En Davies A., y R. G. Board (ed.), The Microbiology of Meat and Poultry. Blackie Academic and Professional, London.
- Doevenspeck, H. 1961. Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. *Fleischwirtschaft*, 13:986-987.
- Downes, F. P., y K. Ito (ed.). 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA, Washington, D.C.
- Eribo, B. E., y J. M. Jay. 1985. Incidence of *Acinetobacter* spp. and other gram-negative, oxidase-negative bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Appl.Environ.Microbiol.*, 49:256-257.

- Evrendilek, G. A., Q. H. Zhang, y E. R. Richter. 2004. Application of pulsed electric fields to skim milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering*, 87:137-144.
- FAOSTAT. 2005. Los datos de FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0>. Último acceso el 24/11/2005.
- Farber, J. M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology - a review. *J.Food Prot.*, 54:58-70.
- Farber, J. M., y K. L. Dodds (ed.). 1995. Principles of modified-atmosphere and sous vide product packaging. Technomic Publishing AG, Basel, Switzerland.
- Farber, J. M., y P. I. Peterkin. 1999. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products, p. 505-564. En Ryser E. T., y E. H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *Int.J.Food Microbiol.*, 44:189-204.
- Farkas, J. 1999. Radiation processing: an efficient means to enhance the bacteriological safety of foods. *New Food*, 2:31-33.
- Farkas, J. 2001. Physical Methods of Food Preservation, p. 567-591. En M.P.Doyle, L.R.Beuchat y T.J.Montvill (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Food and Drug Administration. 1997. Irradiation in the production, processing and handling of food. *Federal Register*, 62:64107-64121.
- Fredriksson-Ahoma, M., y H. Korkeala. 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin.Microbiol.Rev.*, 16:220-229.
- Fricker, C. R., y S. Tompsett. 1989. *Aeromonas* spp. in foods - a significant cause of food poisoning. *Int.J.Food Microbiol.*, 9:17-23.
- Gallo, L., R. E. Schmitt, y W. Schmidtlorenz. 1988. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers.1. Bacterial-Flora and Growth During Storage. *Lebensm.-Wiss.Technol.-Food Sci.Technol.*, 21:216-223.
- García Rodríguez, J. A., R. Cantón, J. E. García Sánchez, M. L. Gómez-Lus, L. Martínez Martínez, C. Rodríguez-Avial, y J. Vila. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, En Picazo J. J. (ed.), Procedimientos en

- Microbiología Clínica. Disponible en:
<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/indice11.htm>. Último acceso el 30/01/2006.
- García, A., y J. G. Fox. 2003. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg.Infect.Dis.*, 9:1592-1597.
- García, D., N. Gómez, P. Mañas, S. Condón, J. Raso, y R. Pagán. 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J.Appl.Microbiol.*, 99:94-104.
- García, M. L., B. Moreno, y M. S. Bergdoll. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl.Environ.Microbiol.*, 39:548-553.
- García-Armesto, M. R., M. Prieto, C. Alonso, M. L. García-López, M. C. García-Fernandez, y A. Otero. 1993. Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes' milk. *J.Dairy Res.*, 60:371-383.
- García-López, M. L., M. Prieto, y A. Otero. 1998. The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products, p. 1-34. En Davies A., y R. G. Board (ed.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.
- García-López, M. L., y M. Prieto. 1999. *Psychrobacter*, p. 1875-1882. En Robinson R. K., C. A. Batt y P. Patel (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London.
- Gardner, F. A., J. H. Denton, y S. E. Hatley. 1977. Effects of carbon dioxide environments on shelf life of broiler carcasses. *Poultry Science*, 56:1715-1716.
- Gardner, G. A. 1966. A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *J.Appl.Bacteriol.*, 29:455-460.
- Gardner, G. A., A. W. Carson, y J. Patton. 1967. Bacteriology of Prepacked Pork with Reference to Gas Composition Within Pack. *J.Appl.Bacteriol.*, 30:321-333.
- Garipey, C., J. Amiot, R. E. Simard, A. Boudreau, y D. P. Raymond. 1986. Effect of vacuum-packing and storage in nitrogen and carbon-dioxide atmospheres on the quality of fresh rabbit meat. *Journal of Food Quality*, 9:289-309.
- Garrity, G. M., J. A. Bell, y T. G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Release 5.0, Springer-Verlag,

- New York. Disponible en: DOI: 10.1007/bergeysoutline200405. Último acceso el 17/11/2005.
- Genigeorgis, C. A., D. Dutulescu, y J. F. Garayzabal. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J.Food Prot.*, 52:618-624.
- Gennari, M., M. Parini, D. Volpon, y M. Serio. 1992. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *Int.J.Food Microbiol.*, 15:61-75.
- Gennari, M., S. Tomaselli, y V. Cotrona. 1999. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiol.*, 16:15-28.
- Gennari, M., y S. Tomaselli. 1988. Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int.J.Food Microbiol.*, 6:341-347.
- Geornaras, I., G. A. Dykes, y A. vonHoly. 1994. Microbial-Populations Associated with Refrigerated Poultry. *S.Afr.J.Sci.*, 90:579-582.
- Gerwen, S.-J. C., F. M. Rombouts, K. v. Riet, y M. H. Zwietering. 1999. A data analysis of the irradiation parameter D_{10} for bacteria and spores under various conditions. *J.Food Prot.*, 62:1024-1032.
- Gill, C. O. 1982. Microbial interaction with meats, p. 225-264. En Brown M. H. (ed.), *Meat Microbiology*. Applied Science Publishers Ltd, London.
- Gill, C. O. 1986. The control of microbial spoilage in fresh meats, p. 49-88. En Pearson A. M., y T. R. Dutson (ed.), *Advances in Meat Research. Meat and Poultry Microbiology*. MacMillan Publishers LTD, Basingstoke, England.
- Gill, C. O. 1995. MAP and CAP of Fresh, Red Meats, Poultry and Offals, p. 105-136. En Farber J. M., y K. L. E. Dodds (ed.), *Principles of Modified Atmosphere and Sous Vide Product Packaging*. Technomic Publishing AG, Basel, Switzerland.
- Gill, C. O. 1998. Microbial contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs, p. 118-157. En Davies A., y R. G. Board (ed.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.
- Gill, C. O. 2000. HACCP in primary processing: red meat, p. 81-122. En Brown M. (ed.), *HACCP in the Meat Industry*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Gill, C. O., J. C. L. Harrison, y N. Penney. 1990. The storage life of chicken carcasses packaged under carbon dioxide. *Int.J.Food Microbiol.*, 11:151-157.

- Gill, C. O., J. C. McGinnis, y J. Bryant. 1998. Microbial contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. *Int.J.Food Microbiol.*, 42:175-184.
- Gill, C. O., y M. Badoni. 2002. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef. *Int.J.Food Microbiol.*, 74:111-118.
- Gill, C. O., y N. Penney. 1986. Packaging conditions for extended storage of chilled dark, firm, dry beef. *Meat Sci.*, 18:41-53.
- González, C. J., J. A. Santos, M. L. García-López, y A. Otero. 2000. Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J.Food Prot.*, 63:315-321.
- González, C. J., T. M. López-Díaz, M. L. García-López, M. Prieto, y A. Otero. 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J.Food Prot.*, 62:1270-1277.
- González-Rodríguez, M. N., J. A. Santos, A. Otero, y M. L. García-López. 2002. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold-smoked freshwater fish. *J.Appl.Microbiol.*, 93:675-680.
- González-Serrano, C. J., J. A. Santos, M. L. García-López, y A. Otero. 2002. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J.Appl.Microbiol.*, 93:414-419.
- Goñi, P., Y. Vergara, J. Ruiz, I. Albizu, J. Vila, y R. Gómez-Lus. 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 23:268-272.
- Gould, G. W. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *Int.J.Food Microbiol.*, 33:51-64.
- Gracey, J. F., D. S. Collins, y R. J. Huey. 1999. Meat Hygiene. 10th ed. W. B. Saunders Company LTD, London.
- Gram, L. 1993. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Appl.Enviro.Microbiol.*, 59:2197-2203.
- Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen, y M. Givskov. 2002. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*, 78:79-97.
- Gram, L., y J. Melchiorson. 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J.Appl.Bacteriol.*, 80:589-595.

- Grau F.H., Eustace I.J., y Bill B.A. 1985. Microbial flora of lamb carcasses stored at 0 °C in packs flushed with nitrogen or filled with carbon dioxide. *J.Food Sci.*, 50:482-485.
- Grundmann, H., S. Hori, M. C. Enright, C. Webster, A. Tami, E. J. Feil, y T. Pitt. 2002. Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: A comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. *J.Clin.Microbiol.*, 40:4544-4546.
- Grundmann, H., S. Hori, y G. Tanner. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J.Clin.Microbiol.*, 39:4190-4192.
- Gutiérrez, L. M., I. Menes, M. L. García, B. Moreno, y M. S. Bergdoll. 1982. Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. *J.Food Prot.*, 45:1282-1286.
- Hajek, V., y V. Horak. 1978. A comparison of the lytic activity of poultry, human, and bovine phages with staphylococci of different origin. *Zbl.Bakt.Mikrobiol.Hyg.A*, 242:446-455.
- Hall, P. A., L. Ledenbach, y R. S. Flowers. 2001. Acid-producing microorganisms, En Downes F. P., y K. Ito (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. APHA, Washington, D.C.
- Haque, Q. M., A. Sugiyama, Y. Iwade, Y. Midorikawa, y T. Yamauchi. 1996. Diarrheal and environmental isolates of *Aeromonas* spp. produce a toxin similar to Shiga-like toxin 1. *Curr.Microbiol.*, 32:239-245.
- Harrigan, W. F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd ed. Academic Press, London.
- Hauben, K. J., D. H. Bartlett, C. C. Soontjens, K. Cornelis, E. Y. Wuytack, y C. W. Michiels. 1997. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl.Environ.Microbiol.*, 63:945-950.
- Heinz, V., I. Alvarez, A. Angersbach, y D. Knorr. 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends Sci.Technol.*, 12:103-111.
- Hennekinne, J. A., A. Kerouanton, A. Brisabois, y M. L. De Buyser. 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J.Appl.Microbiol.*, 94:321-329.

- Hermans, K., F. Haesebrouck, M. Vaneechoutte, L. A. Devriese, C. Godard, y P. De Herdt. 2000. Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet.Microbiol.*, 72:311-319.
- Hermans, K., L. A. Devriese, y F. Haesebrouck. 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet.Microbiol.*, 91:57-64.
- Hermans, K., P. De Herdt, L. A. Devriese, W. Hendrickx, C. Godard, y F. Haesebrouck. 1999. Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet.Microbiol.*, 67:37-46.
- Heuzenroeder, M. W., C. Y. F. Wong, y R. L. P. Flower. 1999. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol.Lett.*, 174:131-136.
- Hinton-A., Jr., J. A. Cason, y K. D. Ingram. 2002. Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry processing and spoilage of refrigerated broiler carcasses. *J.Food Prot.*, 65:993-998.
- Huisman, G., D. Siegele, M. Zambrano, y R. Kolter. 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase, p. 1672-1682. En Neidhardt F. C., R. I. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2 ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Hulot, F., y J. Ouhayoun. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 7:15-36.
- Humphrey, T. J., E. Slater, K. McAlpine, R. J. Rowbury, y R. J. Gilbert. 1995. *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *Appl.Environ.Microbiol.*, 61:3161-3164.
- Hunter, P. R. 1990. Reproducibility and indexes of discriminatory power of microbial typing methods. *J.Clin.Microbiol.*, 28:1903-1905.
- ICMSF. 2005. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 2 ed. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York.

- Insausti, K., M. J. Beriain, C. Gorraiz, y A. Purroy. 2002. Volatile compounds of raw beef from 5 local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. *J.Food Sci.*, 67:1580-1589.
- INTERCUN. 2005. Nota de prensa: Organización Interprofesional para Impulsar el Sector Cunícola (INTERCUN). Disponible en: <http://www.agrodigital.com/PlArtStd.asp?CodArt=38538>. Último acceso el 17/01/2006.
- Ismail, S. A. S., T. Deak, H. A. Abd El-Rahman, M. A. M. Yassien, y L. R. Beuchat. 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int.J.Food Microbiol.*, 62:113-121.
- Ito, H., T. Sato, y H. Iizuka. 1973. [Radiation preservation of Vienna sausage. IV. Study of *Acinetobacter* as contaminant of Vienna sausages and their radio-sensitivities.]. *Food Irradiation [Shokuhin Shosha]*, 8:51-57.
- Ito, H., T. Sato, y H. Iizuka. 1976. Study of the intermediate type of *Moraxella* and *Acinetobacter* occurring in radurized vienna sausages. *Agr.Biol.Chem.*, 40:867-873.
- Ito, H., y H. Iizuka. 1983. Genetic transformation of *Moraxella*-like psychrotrophic bacteria and their radiation-sensitivity. *Agric.Biol.Chem.*, 47:603-605.
- Jablonski, L. M., y G. A. Bohach. 2001. *Staphylococcus aureus*, p. 410-434. En Doyle M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Jackson, T. C., D. L. Marshall, G. R. Acuff, y J. S. Dickson. 2001. Meat, poultry, and seafood, p. 91-110. En Doyle M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Janda, J., y S. L. Abbott. 1999. Unusual food-borne pathogens. *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* species. *Clin.Lab.Med.*, 19:553-582.
- Jay, J. M. 1966. Response of the extract-release volume and water-holding capacity phenomena to microbiologically spoiled beef and aged beef. *Appl.Microbiol.*, 14:492-496.
- Jay, J. M. 1986. Microbial spoilage indicators and metabolites, p. 219-240. En Pierson M. D., y N. J. Stern (ed.), *Foodborne Microorganisms and their Toxins: developing methodology*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Jay, J. M., y K. S. Kontou. 1964. Evaluation of the extract-release volume phenomenon as a rapid test for detecting spoilage in beef. *Appl.Microbiol.*, 12:378-383.

- Johnson, W. M., y S. D. Tyler. 1993. PCR detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus*, p. 294-299. En Persing D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover y T. J. White (ed.), Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Johnston, A. M. 2000. HACCP and farm production, p. 37-80. En Brown M. (ed.), HACCP in the meat industry. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Juni, E. 1992. The genus *Psychrobacter*, p. 3241-3246. En Balows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer (ed.), The Prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Juni, E., y G. A. Heym. 1986. *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive, coccobacilli. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 36:388-391.
- Kakouri, A., y G. J. E. Nychas. 1994. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs. Possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *J.Appl.Bacteriol.*, 76:163-172.
- Kauffmann, F. 2005. Zue serologie der Coli-Gruppe. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.*, 21:20-45.
- Khalafalla, F. A. 1993. Microbiological status of rabbit carcasses in Egypt. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.A-Food Res.Technol.*, 196:233-235.
- Kirk, R. S., y R. Sawyer. 1991. Pearson's Composition and Analysis of Food. 9th ed. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, England.
- Kirov, S. M. 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, p. 301-327. En Doyle M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (ed.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kornacki, J. L., y J. L. Johnson. 2001. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators, En Downes F. P., y K. Ito (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. APHA, Washington, D.C.
- Krause, T. R., J. G. Sebranek, R. E. Rust, y M. S. Honeyman. 2003. Use of carbon monoxide packaging for improving the shelf life of pork. *J.Food Sci.*, 68:2596-2603.

- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. i. Aoki, y Y. Nagai. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357:1225-1240.
- Lado, B. H., y A. E. Yousef. 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl.Environ.Microbiol.*, 69:2223-2229.
- Lancette, G. A., y R. W. Bennett. 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins, p. 387-403. En Downes F. P., y K. Ito (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Lange, C., M. Cardoso, D. Senczek, y S. Schwarz. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet.Microbiol.*, 67:127-141.
- Laycock, R. A., L. W. Regier, L. Gram, L. Ravn, M. Rasch, J. B. Bruhn, A. B. Christensen, y M. Givskov. 1970. Pseudomonads and achromobacters in the spoilage of irradiated haddock of different preirradiation quality. *Appl.Microbiol.*, 20:333-341.
- Lebas, F., P. Coudert, H. de Rochambeau, y R. G. Thébault. 1997. The Rabbit - Husbandry, Health and Production. Animal Production and Health Series no. 21. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/t1690E/t1690e07.htm#chapter%205%20pathology>. Último acceso el 30/01/2006.
- M.A.P.A. 2003a. Encuesta nacional de cunicultura. Disponible en:
<http://www.mapya.es/es/estadistica/pags/cunicultura/cunicultura2003.htm>. Último acceso el 24/11/2005.
- M.A.P.A. 2003b. La alimentación en España: Capítulo V -tabla 3-. Disponible en:
<http://www.mapya.es/es/alimentacion/pags/consumo/libro/capitulo05.htm>. Último acceso el 20/01/2006.
- M.A.P.A. 2004a. Anuario de estadística agraria. Disponible en:
http://www.mapya.es/estadistica/Anu_04/capitulos/AEA-C20.pdf. Último acceso el 25/11/2005.
- M.A.P.A. 2004b. La alimentación española en 2004. Resumen de los datos más relevantes. Disponible en: <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/resumen.htm>. Último acceso el 25/11/2005.

- Ma, K., y R. B. Maxcy. 1981. Factors influencing radiation-resistance of vegetative bacteria and spores associated with radappertization of meat. *J.Food Sci.*, 46:612-616.
- Mackey, B. M., y T. A. Roberts. 1993. [Improvement of slaughter hygiene by HACCP and monitoring.] Verbesserung der Schlachthygiene durch HACCP und Ueberwachung. *Fleischwirtschaft.*, 73:34-38.
- Mano, S. B., J. A. Ordóñez, y G. D. García de Fernando. 2002. Shelf life extension and microbiology of pork meat packaged in modified atmosphere. *Ciênc.Tecnol.Aliment.*, 22:1-10.
- Mañas, P., R. Pagán, I. Leguerinel, S. Condón, P. Mafart, y F. Sala. 2001. Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella typhimurium*. *Int.J.Food Microbiol.*, 63:209-216.
- Mañas, P., R. Pagán, J. Raso, F. J. Sala, y S. Condón. 2000. Inactivation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella Senftenberg* by ultrasonic waves under pressure. *J.Food Prot.*, 63:451-456.
- Mañas, P., y R. Pagán. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J.Appl.Microbiol.*, 98:1387-1399.
- Marshall, D. L., L. S. Andrews, J. H. Wells, y A. J. Farr. 1992. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *Food Microbiol.*, 9:303-309.
- Martín, M. C., J. M. Fueyo, M. A. González-Hevia, y M. C. Mendoza. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int.J.Food Microbiol.*, 94:279-286.
- McClure, P. J. 2000. Microbiological hazard identification in the meat industry, p. 157-176. En Brown M. (ed.), HACCP in the meat industry. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- McMeekin, T. A. 1975. Spoilage association of chicken breast muscle. *Appl.Microbiol.*, 29:44-47.
- McMeekin, T. A. 1977. Spoilage association of chicken leg muscle. *Appl.Environ.Microbiol.*, 33:1244-1246.
- Mead, G. C. 2000. HACCP in primary processing: poultry, p. 123-153. En Brown M. (ed.), HACCP in the meat industry. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Mead, G. C., y C. E. Dodd. 1990. Incidence, origin and significance of staphylococci on processed poultry. *J.Appl.Bacteriol.*, 19:81S-91S.

- Meng, J., M. P. Doyle, T. Zhao, y S. Zhao. 2001a. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, En Doyle M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology*. Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM PRESS, Washington, D.C.
- Meng, J., P. Feng, y M. P. Doyle. 2001b. Pathogenic *Escherichia coli*, p. 331-341. En Downes F. P., y K. Ito (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Minsch, F. 1896. *Münch.Med.Wochensch.*, 5, 101, & 9, 202:
- Molin, G., I. M. Stenstroem, y A. Ternstroem. 1983. The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2 °C. *J.Appl.Bacteriol.*, 55:49-56.
- Monk, J. D., L. R. Beuchat, y M. P. Doyle. 1995. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *J.Food Prot.*, 58:197-208.
- Morikawa, K., A. Maruyama, Y. Inose, M. Higashide, H. Hayashi, y T. Ohta. 2001. Overexpression of sigma factor, varsigma(B), urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 288:385-389.
- Moseley, B. E. B. 1989. Ionizing irradiation: action and repair, p. 43-70. En Gould G. W. (ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science, London.
- Nassos, P. S., J. King-AD, y A. E. Stafford. 1988. Lactic acid concentration as an indicator of acceptability in refrigerated or freeze-thawed ground beef. *Appl.Environ.Microbiol.*, 54:822-823.
- Neyts, K., G. Huys, M. Uyttendaele, J. Swings, y J. Debevere. 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Lett.Appl.Microbiol.*, 31:359-363.
- Noll, F. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer, London.
- Nychas, G. J., V. M. Dillon, y R. G. Board. 1988. Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10:203-231.
- Nychas, G.-J. E., E. H. Drosinos, y R. G. Board. 1998. Chemical changes in stored meat, p. 288-326. En Davies A., y R. Board (ed.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.
- Okrend, A. J. G., B. E. Rose, y B. Bennett. 1987. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas* species in retail poultry, beef and pork. *J.Food Prot.*, 50:509-513.

- Ouhayoun, J., D. Delmas, y B. Poujardieu. 1989. [Rabbit meat. Effects of carcass refrigeration and storage conditions on muscle pH and weight loss]. *Viandes et Produits Carnes*, 10:87-89.
- Ouhayoun, J., y A. Dalle Zotte. 1996. Harmonization of muscle and meat criteria in rabbit meat research. *World Rabbit Science*, 4:211-218.
- Pagán, R., P. Mañas, J. Raso, y S. Condón. 1999. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:297
- Palumbo, S. A., F. Maxino, A. C. Williams, R. L. Buchanan, y D. W. Thayer. 1985. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:1027-1030.
- Parigi Bini, R., G. Xiccato, M. Cinetto, y A. Dalle Zotte. 1992. Effetto dell'età e peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della carne cunicola. 2. Composizione chimica e qualità della carne. *Zoot. Nutr. Anim.*, 18:173-190.
- Patterson, M. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmosphere. *Lett. Appl. Microbiol.*, 7:55-58.
- Patterson, M. F., M. Quinn, R. Simpson, y A. Gilmour. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food Prot.*, 58:524-529.
- Perez-Chabela, M. L., G. M. Rodriguez-Serrano, C. P. Lara, y I. Guerrero. 1999. Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat Sci.*, 51:279-282.
- Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. de Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, y J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53:28-52.
- Pooni, G. S., y G. C. Mead. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry-meat products. *Food Microbiol.*, 1:67-78.
- Prieto, M., M. R. García-Armesto, M. L. García-López, A. Otero, y B. Moreno. 1992. Numerical taxonomy of gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2245-2249.
- Pritchard, G. C., S. Williamson, T. Carson, J. R. Bailey, L. Warner, G. Willshaw, y T. Cheasty. 2001. Wild rabbits - a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.*, 149:567-567.

- Raso, J., I. Álvarez, S. Condón, y F. J. Sala. 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric field. *Inno.Food Sci.Emerg.Technol.*, 1:21-29.
- Raso, J., R. Pagán, S. Condón, y F. J. Sala. 1998. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Appl.Environ.Microbiol.*, 64:465-471.
- Raso, J., y G. V. Barbosa-Canovas. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.*, 43:265-285.
- Robins-Browne, R. M. 2001. *Yersinia enterocolitica*, p. 199-224. En Doyle M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology*. Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rodgers, J. D., J. J. McCullagh, P. T. McNamee, J. A. Smyth, y H. J. Ball. 1999. Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet.Microbiol.*, 69:189-198.
- Rosell, J. M. 2000a. Enfermedades del conejo. Tomo I -*Generalidades*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Rosell, J. M. 2000b. Enfermedades del conejo. Tomo II -*Enfermedades*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Rossau, R., A. Van Landschoot, M. Gillis, y J. De Ley. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 41:310-319.
- Rossi, G., C. Stanzel, y W. Witte. 1995. *Staphylococcus aureus* infections in rabbits and the transmission of the pathogens with the sperma, p. 251-257. Arbeitstagung uber Haltung und Krankheiten der Kaninchen.Pelztiere und Heimtiere.Celle, Germany.
- Ryser, E. T. 1999. Foodborne Listeriosis, p. 299-358. En Ryser E. T., y E. H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Sabour, P. M., J. J. Gill, D. Lepp, J. C. Pacan, R. Ahmed, R. Dingwell, y K. Leslie. 2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J.Clin.Microbiol.*, 42:3449-3455.
- Santos, J. A., C. J. González, A. Otero, y M. L. García-López. 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl.Environ.Microbiol.*, 65:5612-5614.
- Satin, M. 2002. Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situacion and perspectives. *Meat Sci.*, 62:277-283.

- Saucier, L., C. Gendron, y C. Gariépy. 2000. Shelf life of ground poultry meat stored under modified atmosphere. *Poult.Sci.*, 79:1851-1856.
- Sawaya, W. N., A. S. Elnawawy, R. Abu, S. Khalafawi, y B. Dashti. 1995. Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of chicken carcasses under refrigerated storage conditions. *Journal of Food Safety*, 15:35-51.
- Schlichting, C., C. Branger, J. M. Fournier, W. Witte, A. Boutonnier, C. Wolz, P. Gouillet, y G. Doring. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J.Clin.Microbiol.*, 31:227-232.
- Shah, D. B., J. G. Bradshaw, y J. T. Peeler. 1991. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *J.Food Sci.*, 56:391-393.
- Shaw, B. G., y J. B. Latty. 1988. A numerical taxonomic study of non-motile non-fermentative gram-negative bacteria from foods. *J.Appl.Bacteriol.*, 65:7-21.
- Sherry, A. E., M. F. Patterson, y R. H. Madden. 2004. Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *J.Appl.Microbiol.*, 96:887-893.
- Silliker, J. H., R. E. Woodruff, J. R. Lugg, S. K. Wolfe, y W. D. Brown. 1977. Preservation of refrigerated meats with controlled atmospheres: Treatment and post-treatment effects of carbon dioxide on pork and beef. *Meat Sci.*, 1:195-204.
- Skandamis, P. N., y G. J. Nychas. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *Int.J.Food Microbiol.*, 79:35-45.
- Skovgaard, N. 1985. *Brochothrix thermosphacta* - Comments on its taxonomy, ecology and isolation. *Int.J.Food Microbiol.*, 2:71-79.
- Smith, R. D., y J. Coast. 2002. Antimicrobial resistance: a global response. *Bull.World Health Organ.*, 80:126-133.
- Snyder, L. D., y R. B. Maxcy. 1979. Effect of aw of meat products on growth of radiation resistant *Moraxella-Acinetobacter*. *J.Food Sci.*, 44:33-36.
- Spahl, A., G. Reineccius, y S. Tatini. 1981. Storage life of pork chops in CO₂-containing atmospheres. *J.Food Prot.*, 44:670-673.
- Stanbridge, L. H., y A. Davies. 1998. The microbiology of chill-stored meat, p. 177-219. En Davies A., y R. Board (ed.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London.

- Stiles, M. E. 1991. Modified atmosphere packaging of meat, poultry and their products, p. 118-147. En Ooraikul B., y M. E. Stiles (ed.), Modified atmosphere packaging of food. Ellis Horwood, New York.
- Struelens, M. J. 1998. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current issues and perspectives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*, 93:581-585.
- Suslick, K. S. 1990. Sonochemistry. *Science*, 247:1439-1445.
- Swaminathan, B., y G. Matar. 1993. Molecular typing methods, p. 26-49. En Persing D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover y T. Wait (ed.), Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tantiñá, M., J. M. Rosell, y E. Facchin. 2000. Salud pública, p. 465-514. En Rosell J. M. (ed.), Enfermedades del Conejo (tomo II). Mundi-Prensa, Madrid.
- Teale, C. J. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. *Symp.Ser.Soc.Appl.Microbiol.*, 31:85S-89S.
- Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G. A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, W. R. Jarvis, B. Kreiswirth, W. Eisner, J. Maslow, L. K. McDougal, J. M. Miller, M. Mulligan, y M. A. Pfaller. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Microbiol.*, 32:407-415.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, y B. Swaminathan. 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., R. D. Arbeit, y R. V. Goering. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, 18:426-439.
- Teuber, M. 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol.Life Sci.*, 56:755-763.
- Thornley, M. J., M. Ingram, y E. M. Barnes. 1960. The effects of antibiotics and irradiation on the *Pseudomonas-Achromobacter* flora of chilled poultry. *J.Appl.Bacteriol.*, 23:487-498.
- Tiwari, N. P., y R. B. Maxcy. 1972. *Moraxella-Acinetobacter* as contaminants of beef and occurrence in radurized product. *J.Food Sci.*, 37:901-903.

- Tsigarida, E., y G. J. E. Nychas. 2001. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp and a *Pseudomonas* sp on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *J.Appl.Microbiol.*, 90:696-705.
- USDA. 1986. Nutrition and your health: dietary guidelines for Americans. vol. No. 232, 2 ed. Home and Garden Bull, USDA/DHHS, Washington, D.C.
- Vancraeynest, D., K. Hermans, A. Martel, M. Vaneechoutte, L. A. Devriese, y F. Haesebrouck. 2004. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet.Microbiol.*, 101:245-251.
- Vergara, H., M. I. Berruga, y M. B. Linares. 2005. Effect of gas composition on rabbit meat quality in modified atmosphere packaging. *J.Sci.Food Agric.*, 85:1981-1986.
- Wang, R.-F., W.-W. Cao, y C. E. Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J.Appl.Microbiol.*, 83:727-736.
- Weagant, S. D., y P. Feng. 2001. *Yersinia*, p. 421-428. En Downes F. P., y K. Ito (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Welch, A. B., y R. B. Maxcy. 1975. Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef. *Appl.Microbiol.*, 30:242-250.
- Weller, T. M. A. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J.Hosp.Infect.*, 44:160-172.
- Wong, C. Y. F., M. W. Heuzenroeder, y R. L. P. Flower. 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiol.-UK*, 144:291-298.
- World Health Organization. 1976. Worldwide spread of infections with *Yersinia enterocolitica*. *WHO Chronicle*, 30:494-496.
- World Health Organization. 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee in food irradiation (WHO Technical Report Series 659). Geneva.
- World Health Organization. 2000. Base de Datos de Especificaciones Microbiológicas para los Países Seleccionados. Disponible en:
http://www.who.dk/foodsafety/Microbiological/20020418_8. Último acceso el 30/01/2006.

- World Health Organization. 2002. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/index.html>. Último acceso el 27/07/2005.
- Wouters, P. C., I. Álvarez, y J. Raso. 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Sci.Technol.*, 12:112-121.
- Zimmermann, U., G. Pilwat, y F. Riemann. 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys.J.*, 14:881-899.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS-



Introducción general:

- ❏ Figura 0.1.- Representación de la producción mundial de carne de conejo en el año 2004.
- ❏ Figura 0.2.- Producción de carne de conejo en mataderos españoles en el año 2003 agrupada por Comunidades Autónomas.

Capítulo 1:

- ❏ Tabla 1.1.- Características físico-químicas y sensoriales de la carne de conejo.
- ❏ Figura 1.1.- Puntuaciones totales obtenidas en el análisis sensorial de carne de conejo en función de su lugar de adquisición.

- ❏ Figura 1.2.- Comparación de los recuentos microbiológicos obtenidos sobre carne fresca de conejo.

Capítulo 2:

- ❏ Tabla 2.1.- Recuentos microbiológicos (log₁₀ ufc/g) de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.

- ❏ Figura 2.1.- Perfil microbiano de carne de conejo almacenada a 3 ± 1 °C durante 7 días.

- Figura 2.2.- Ritmos diarios de variación (incremento de unidades logarítmicas por gramo) de los parámetros físico-químicos y microbiológicos estudiados entre el día inicial (D1) y el último día (D8) de almacenamiento de carne de conejo en aerobiosis y a refrigeración.
- Figura 2.3.- Comparación del valor de pH de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.
- Figura 2.4.- Comparación del ERV de muestras de carne de conejo DFD y normales en el día inicial (D1) y tras 4 días (D5) de almacenamiento a refrigeración y en atmósfera de aire.

Capítulo 3:

- Tabla 3.1.- Prevalencia y genotipos de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Listeria* spp., *Aeromonas* spp. y *S. aureus* en carne de conejo.

- Figura 3.1.- Prevalencia de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en 51 muestras de carne de conejo diferenciadas por origen.

Capítulo 4:

- Tabla 4.1.- Resultados de la tipificación genética de 26 cepas de *S. aureus* aisladas en carne de conejo obtenida en cinco establecimientos diferentes.
- Tabla 4.2.- Resultados de la tipificación fenotípica de 26 cepas de *S. aureus* aisladas en carne de conejo obtenida en cinco establecimientos diferentes.

- Figura 4.1.- Distribución de 26 cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo según patrones de resistencia a diferentes antimicrobianos.
- Figura 4.2.- Patrones de bandas de 26 cepas de *S. aureus* obtenidos por PFGE.
- Figura 4.3.- Patrones de bandas de 26 cepas de *S. aureus* obtenidos por RAPD.
- Figura 4.4.- Patrones de bandas de *S. aureus* obtenidos por Ribotipado (*EcoRI*).

Capítulo 5:

- Tabla 5.1.- D_t , D_{MS} , b , valores n y contenido de carotenoides (A_{465}) de cepas de *S. aureus* aisladas de carne de conejo.

- Figura 5.1.- Componentes del resistómetro.
- Figura 5.2.- Equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje.
- Figura 5.3.- Esquema de funcionamiento del equipo de generación de PEF.
- Figura 5.4.- Curvas de supervivencia a los tratamientos por el calor a 58 °C de *S. aureus* 11, 12, 29, 30, 31, 40, 41, 49, 84, 85, 87, 88, 121, 122 y 124.
- Figura 5.5.- Efecto de la temperatura en la inactivación térmica de *S. aureus* 11 y *S. aureus* 124 en tampón McIlvaine citrato-fosfato.
- Figura 5.6.- Curvas de supervivencia a la MS (117 μ m, 200 kPa, 37 °C) de *S. aureus* 11, 12, 29, 30, 31, 40, 41, 49, 84, 85, 87, 88, 121, 122 y 124.
- Figura 5.7.- Curvas de supervivencia a los tratamientos con PEF a 22 kV/cm de *S. aureus* 11, 12, 29, 30, 31, 40, 41, 49, 84, 85, 87, 88, 121, 122 y 124.
- Figura 5.8.- Tiempo para inactivar 3 ciclos logarítmicos a 22 kV/cm en cepas de *S. aureus*.

- ▣ Figura 5.9.- Curvas de supervivencia de *S. aureus* 41 a tratamientos por PEF a 15 kV/cm, 19 kV/cm, 22 kV/cm, 25 kV/cm y 28 kV/cm.
- ▣ Figura 5.10.- Influencia del campo eléctrico en el valor b de *S. aureus* 41 y *S. aureus* 122.

Capítulo 6:

- ▣ Tabla 6.1.- Influencia del día de almacenamiento, el tipo de atmósfera y su interacción (día x atmósfera) en los valores de pH, volumen de extracto liberado, contenido en ácido L-láctico así como en las principales poblaciones microbianas de la carne de conejo (análisis factorial de la varianza).
- ▣ Tabla 6.2.- Evolución del pH, el volumen de extracto liberado y el contenido en ácido L-láctico de carne de conejo envasada en tres tipos de atmósfera modificada y almacenada a temperatura de refrigeración (3 ± 1 °C).
- ▣ Tabla 6.3.- Influencia del tipo de envasado en la evolución de diferentes poblaciones microbianas durante el almacenamiento a refrigeración (3 ± 1 °C) de carne de conejo.
- ▣ Tabla 6.4a.- Correlación entre diferentes parámetros microbiológicos, físicos, químicos y físico-químicos de carne de conejo envasada en tres tipos de atmósfera modificada y almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C).
- ▣ Tabla 6.4b.- Correlación entre diferentes parámetros microbiológicos, físicos, químicos y físico-químicos de carne de conejo envasada en atmósferas modificadas y almacenada a refrigeración (3 ± 1 °C) -resultados globales-.

■ Tabla 6.5.- Ritmo de variación de diferentes poblaciones microbianas en muslos de conejo almacenados a 3 ± 1 °C durante 1 semana y envasados en diferentes condiciones.

■ Tabla 6.6.- Ritmo de crecimiento de diferentes poblaciones microbianas en muslos de conejo almacenados a 3 ± 1 °C durante 3 semanas y envasados en diferentes condiciones.

■ Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7. Evolución de la microbiota mesófila, la microbiota psicrotrofa, *Pseudomonas*, Bacterias ácido-lácticas, *B. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* y levaduras en carne de conejo almacenada a 3 ± 1 °C tras su envasado en diferentes atmósferas modificadas.

Capítulo 7:

■ Figura 7.1. Representación de los valores D_{10} de *Psychrobacter spp.* en carne picada estéril de conejo sometida a un tratamiento de radiaciones ionizantes.

■ Figura 7.2. Comportamiento de cultivos puros de *Psychrobacter spp.* en carne picada estéril de conejo almacenada a 4 °C.

■ Figura 7.3. Comportamiento de dos co-cultivos en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C después de su irradiación a 2.5 kGy.

■ Figura 7.4. Crecimiento de dos bacterias alterantes (*P. fluorescens* y *B. thermosphacta*) en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C.

■ Figura 7.5. Comportamiento de los co-cultivos de las bacterias alterantes *P. fluorescens* y *B. thermosphacta*, junto a *Psychrobacter* cepa RM1, en carne estéril de conejo almacenada a 4 °C.

