

CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECTAR BACTERIAS PATÓGENAS LESIONADAS EN ALIMENTOS¹

FACTORES DE ESTRÉS EN LA CADENA ALIMENTARIA Y BACTERIAS LESIONADAS

A lo largo de la cadena alimentaria, las bacterias están expuestas a diversos estreses (Yousef y Courtney, 2003). Por ejemplo, durante la producción de materias primas de origen vegetal, están expuestas al frío y al calor ambiental; la fermentación o la adición de acidulantes y sales de ácidos orgánicos durante el procesado de los alimentos constituyen un estrés por ácido; los productos acabados suelen mantenerse en refrigeración durante su distribución y almacenamiento; y, finalmente, ingredientes ácidos como el vinagre o el zumo de limón pueden añadirse durante la preparación de los alimentos para su consumo. Estos estreses dañan diversos mecanismos y estructuras de la célula, alterando su homeostasis y afectando adversamente su crecimiento y supervivencia (Abee y Wouters, 1999). Como resultado, algunas bacterias mueren. Sin embargo, otras, aunque lesionadas, pueden responder al estrés induciendo cambios en su metabolismo y estructura que les permiten contrarrestar los efectos negativos de dicho estrés y adaptarse a él (Phadtare, 2004).

Las respuestas de adaptación al estrés de las bacterias patógenas tienen importantes implicaciones en la seguridad alimentaria, ya que les proporcionan capacidad para sobrevivir a los tratamientos de conservación de los alimentos, así como para crecer y recuperar la virulencia (Archer, 1996; Yousef y Courtney, 2003; Wesche *et al.*, 2009). De hecho, se han detectado bacterias lesionadas después de aplicar determinados tratamientos por calor (Mackey *et al.*, 1994), frío (Fratamico y Bagi, 2007), ácido (Liao y Fett, 2005), alta presión (Chilton *et al.*, 2001; Somolinos *et al.*, 2008) o pulsos eléctricos (Yaqub *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011). Así pues, la presencia de bacterias lesionadas podría ser habitual en los alimentos y los ambientes relacionados con su procesado (Johnson, 2003). No obstante, los medios de cultivo selectivo tradicionales usados en la detección y recuento de patógenos pueden resultar inadecuados para ponerlas de manifiesto, ya que los agentes selectivos que contienen evitan el crecimiento de estas bacterias lesionadas a causa de las alteraciones en el metabolismo y/o estructura que presentan (Kell *et al.*, 1998; Mackey, 2000; Stephens y Mackey, 2003). En consecuencia, se sobreestima la efectividad de los tratamientos de conservación y la seguridad de los alimentos.

¹ Alicia Subires Orenes
alicia.subires@gmail.com

DETECCIÓN DE BACTERIAS LESIONADAS

Debido a su estado fisiológico, las bacterias lesionadas tienen requerimientos de crecimiento especiales, de manera que, para detectarlas, es necesario adaptar las condiciones de cultivo (tipo y composición del medio, temperatura y tiempo de incubación) a estos requerimientos. La estrategia más habitual consiste en realizar un paso de recuperación en un medio no selectivo, líquido o sólido, previo a la inoculación en el medio selectivo (Stephens y Mackey, 2003). Sin embargo, este enfoque implica que es necesario optimizar las condiciones de recuperación mediante ensayo y error. Además, si se quieren cuantificar las bacterias lesionadas específicamente, es necesario analizar la muestra mediante recuento en placa en medio no selectivo y en medio selectivo, de manera que la diferencia entre ambos recuentos corresponde al recuento de células lesionadas subletalmente (Kell *et al.*, 1998; Wesche *et al.*, 2009). Otros inconvenientes, asociados a todos los métodos de detección basados en el cultivo, incluyen (i) el prolongado tiempo necesario para la aparición de colonias visibles, (ii) la obtención de resultados globales que no dan noción sobre la heterogeneidad en el estado fisiológicos de las bacterias presentes en una muestra, y (iii) la falta de información sobre el mecanismo de acción de un determinado tratamiento (Ueckert *et al.*, 1997; Lemarchand *et al.*, 2001).

Por el contrario, la citometría de flujo es una técnica que analiza célula por célula de manera rápida y precisa. En esta técnica, las bacterias se encuentran suspendidas en una corriente líquida y pasan de una en una a través de un haz de luz, que habitualmente proviene de un láser, con una velocidad de 1.000 a 100.000 células por segundo (Givan, 2001; Díaz *et al.*, 2010). Como resultado de la intersección de cada célula con el haz de luz, ésta última es dispersada en todas direcciones. Además, las células emiten fluorescencia si han sido teñidas con uno o varios fluorocromos. Estos fluorocromos pueden ser indicadores de parámetros fisiológicos como, por ejemplo, la integridad de membrana o diversas actividades metabólicas. Así, la citometría de flujo permite diferenciar varios tipos de células (poblaciones) según la correlación de combinaciones de los diversos parámetros de dispersión de luz y emisión de fluorescencia, de manera que se obtiene información cuantitativa sobre la heterogeneidad en el estado fisiológico de las bacterias (Davey, 2002).

PRINCIPIOS BÁSICOS SOBRE CITOMETRÍA DE FLUJO

Generalmente, un citómetro de flujo está compuesto por tres sistemas principales: (i) el sistema de fluidos, que transporta las células en suspensión al punto de análisis (la intersección con el haz de luz); (ii) el sistema óptico, que incluye una o más fuentes de luz dotadas de lentes de enfoque para iluminar las células, así como un sistema de lentes y filtros ópticos que recogen, separan y seleccionan la luz de longitudes de onda específicas que emerge de las células y la dirigen a los fotodetectores; y (iii) el sistema electrónico de procesamiento de señales, que convierte las señales ópticas en pulsos eléctricos proporcionales a la intensidad de éstas y, éstos a su vez, en valores digitales (Figura 1).

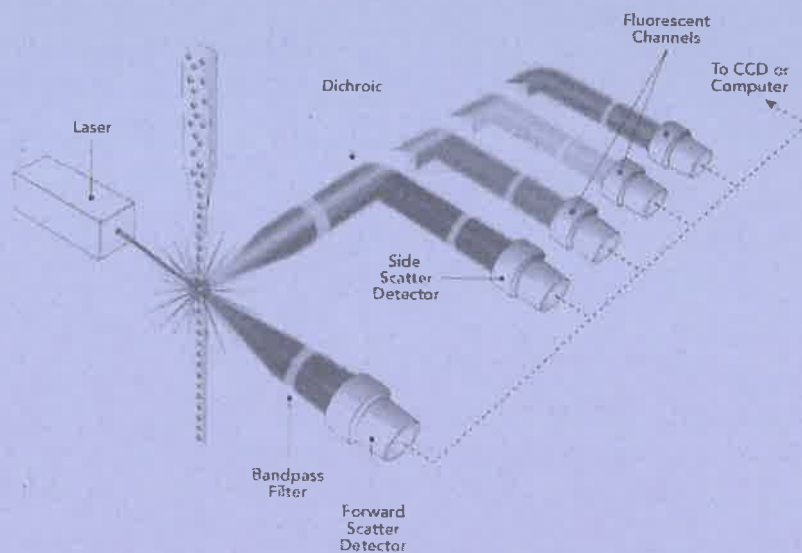


Figura 1. Configuración típica de un citómetro de flujo.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando una célula llega al punto de análisis, ésta dispersa luz en todas direcciones, pero el citómetro de flujo sólo registra la luz que es dispersada con dos ángulos específicos respecto a la fuente de iluminación. Estos parámetros se utilizan para obtener información sobre las características morfológicas de las células (Givan, 2001):

- Luz dispersa de ángulo pequeño o *forward scatter (FSC) light*: corresponde a la luz que es dispersada con un ángulo de unos $0,5^\circ$ y está relacionada con el tamaño de la célula.
- Luz dispersa de ángulo recto o *side scatter (SSC) light*: corresponde a la luz que es dispersada con un ángulo de 90° y está relacionada con las características de la superficie de la célula y la presencia de material granular en su citoplasma.

Factores como la diferencia entre el índice de refracción del medio de suspensión y el de las células o la geometría del sistema óptico del citómetro de flujo afectan también los parámetros FSC y SSC, de manera que no siempre es posible establecer una correlación entre éstos y la morfología de la célula (Müller y Nebe-von-Caron, 2010). Sin embargo, a menudo son útiles para diferenciar las células de las señales de fondo, es decir, de las señales interferentes que provienen de la matriz de la muestra, así como del ruido óptico y electrónico del citómetro de flujo (Davey y Kell, 1996; Sharpe y Wulff, 2006).

Una vez adquiridos los valores de los parámetros de dispersión de luz y fluorescencia para cada célula, estos datos son analizados mediante programas informáticos específicos que los representan en gráficas de dos variables en las que estos parámetros se pueden combinar como se desee. En la **Figura 2**, se muestra una gráfica de los valores de FSC y SSC para una muestra de *Escherichia coli* O157:H7. Puesto que en este ejemplo las células predominan sobre las señales de fondo, es posible distinguir los puntos que corresponden a *E. coli* O157:H7. Para eliminar las señales de fondo del análisis, el programa informático permite dibujar una región alrededor de la población

de células, de manera que solo éstas sean consideradas en el cálculo de recuentos, porcentajes o valores medios de intensidad de fluorescencia.

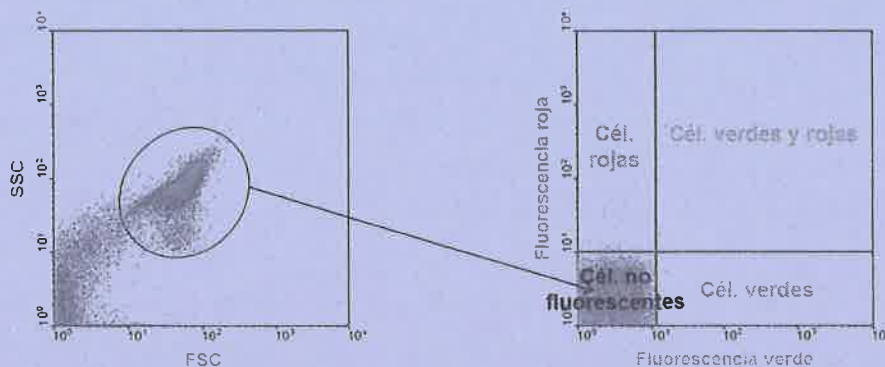


Figura 2. Análisis de una suspensión de *Escherichia coli* O157:H7 por citometría de flujo.

En la **Figura 2**, se puede observar además una gráfica de los valores de fluorescencia verde y roja para los puntos que se considera que corresponden a *E. coli* O157:H7. Ambas intensidades de fluorescencia son muy bajas, ya que, en este caso, las células no han sido teñidas. Sin embargo, éste tipo de muestra puede ser útil para delimitar los valores de fluorescencia que diferencian las células no teñidas de las que son verdes, rojas, o verdes y rojas a la vez.

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS MEDIANTE FLUOROCROMOS

El análisis de múltiples funciones celulares durante la exposición a diversos estreses ha puesto de manifiesto que éstas se pierden progresiva y secuencialmente, de manera que es posible definir diversos estadios entre la vida y la muerte (Joux *et al.*, 1997; Nebe-von-Caron *et al.*, 1998; Davey, 2011). Así, la función que se ve afectada en primer lugar es la multiplicación, ya que es necesario que la célula conserve su actividad metabólica e integridad de membrana para que ésta sea posible (Vives-Rego *et al.*, 2000). Sin embargo, la célula puede perder su capacidad para multiplicarse, pero mantener diversas actividades metabólicas, que, a su vez, se darán siempre y cuando la membrana celular esté íntegra (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000). Generalmente, la permeabilización irreversible de la membrana es el último estadio en la lesión de la célula e implica su muerte, ya que ésta ya no es capaz de generar y mantener los gradientes electroquímicos necesarios para ser funcional y la exposición de sus estructuras internas al medio externo hace que éstas se acaben degradando (Hewitt *et al.*, 1999; Nebe-von-Caron *et al.*, 2000).

Hay una gran variedad de fluorocromos que, por sus características químicas, actúan como indicadores de diversos tipos de actividad metabólica (bombas de eflujo, pH intracelular, potencial de membrana, esterasas, deshidrogenasas, etc.) y de la integridad de la membrana celular y que, por lo tanto, permiten evaluar el estado fisiológico de las bacterias más allá de su capacidad para crecer en un medio de cultivo (Breeuwer y Abee, 2000; Müller y Nebe-von-Caron, 2010). Debido a su papel fundamental en la supervivencia, la integridad de membrana es el parámetro fisiológico más

comúnmente evaluado (Trevors, 2003; Müller y Nebe-von-Caron, 2010). El yoduro de propidio (YP) es uno de los fluorocromos más usados para evidenciar la permeabilización de la membrana. Debido a su carácter hidrofílico y elevado peso molecular, el YP sólo puede entrar en una célula si su membrana presenta poros (**Figura 3**). Una vez en el interior, se une a los ácidos nucleicos, lo cual hace que emita fluorescencia roja. Las células así teñidas son consideradas células muertas (Manini y Danovaro, 2006; Müller y Nebe-von-Caron, 2010). Para detectar tanto las células con la membrana dañada como las que la tienen intacta (sanas), el YP se suele combinar con otro fluorocromo que por su carácter hidrofóbico puede entrar además en las células con la membrana intacta como, por ejemplo, el SYTO 9 (Bunthof y Abee, 2002; Stocks, 2004) o el SYBR Green I (Barbesti *et al.*, 2000; Grégori *et al.*, 2001; Berney *et al.*, 2008) (**Figura 3**). En el caso de estos dos fluorocromos, la unión con los ácidos nucleicos da lugar a la emisión de fluorescencia verde.

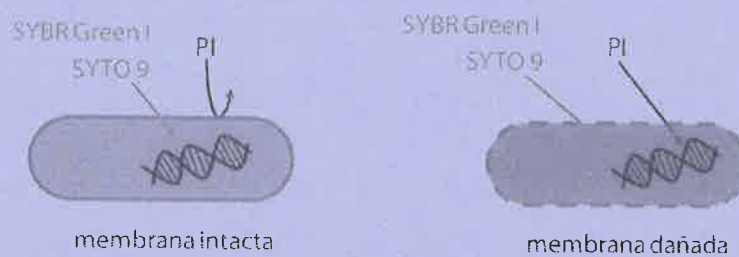


Figura 3. Mecanismo de tinción del yoduro de propidio, el SYTO 9 y el SYBR Green I.

Cuando el YP se combina con el SYTO 9 o el SYBR Green I, las células con la membrana intacta emiten fluorescencia verde, mientras que las células con la membrana dañada emiten fluorescencia roja y pierden la fluorescencia verde, ya que el YP tiene mayor afinidad por los ácidos nucleicos que el SYTO 9 o el SYBR Green I y los desplaza de su unión (Stocks, 2004; Manini y Danovaro, 2006) (**Figura 4**). La optimización exhaustiva de las concentraciones y la ratio de concentración de los dos fluorocromos, la composición del medio de tinción y los parámetros de operación del citómetro de flujo permite además detectar una tercera población de células que emiten fluorescencia verde y roja (Subires *et al.*, 2014). Este perfil de fluorescencia se ha atribuido a un estadio intermedio en la permeabilización de la membrana que permitiría la entrada de YP, pero no en cantidades suficientes para desplazar eficientemente el SYTO 9 o el SYBR Green I (Barbesti *et al.*, 2000; Ben-Amor *et al.*, 2005; Saegeman *et al.*, 2007). Así, estas células son consideradas células lesionadas.

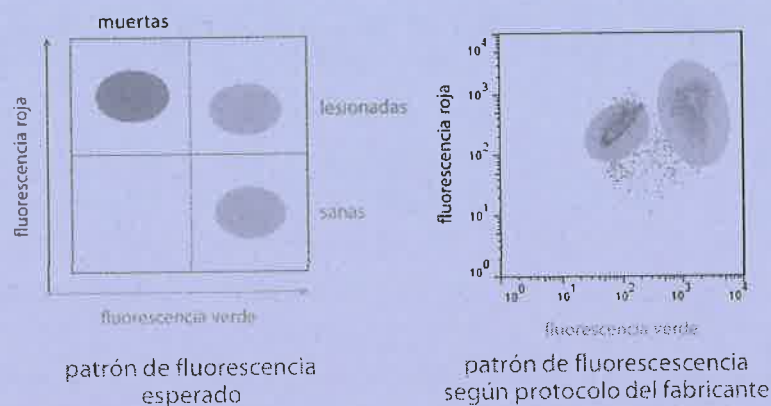


Figura 4. Patrones de fluorescencia de células sanas, muertas y lesionadas teñidas con yoduro de propidio y SYTO 9 (kit LIVE/DEAD® BacLight™) y analizadas por citometría de flujo.

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO A LA DETECCIÓN DE BACTERIAS LESIONADAS EN ALIMENTOS

La detección por citometría de flujo de bacterias en alimentos se ve enormemente dificultada por la presencia de una gran cantidad de partículas que se libera durante la dilución y homogeneización de la muestra (Raybourne y Tortorello, 2003; Wilkes *et al.*, 2012). Debido a la similitud en el tamaño de las células bacterianas y algunas partículas de alimento, así como en la intensidad de fluorescencia, en caso de que haya tinción inespecífica de algunos componentes de la matriz, la discriminación entre las señales analíticas y las interferentes es prácticamente imposible (Figura 5). Este hecho compromete el límite de detección del ensayo, así como la fiabilidad de sus resultados.

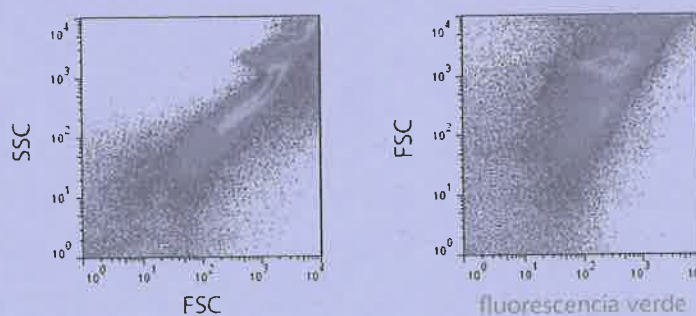


Figura 5. Análisis por citometría de flujo de una muestra de ensalada de pasta inoculada con *Escherichia coli* O157:H7 después de su dilución (1:10), homogeneización y tinción con SYTO 9.

Así pues, es necesario optimizar el protocolo de preparación de muestra para separar las células bacterianas de las partículas de alimento y mejorar así su discriminación. La filtración centrífuga es un método simple, rápido, barato y eficaz para este fin, ya que permite reducir la presencia de partículas de alimento de manera similar a como lo hace una dilución 1:100 de la muestra sin necesidad de diluir simultáneamente la concentración de células, lo cual reduciría a su vez la

relación señal/ruido (Subires *et al.*, 2014). Además, es compatible con la evaluación del estado fisiológico de las células, puesto que no tiene un efecto relevante sobre él. La aplicación de la filtración centrífuga junto con la tinción mediante un anticuerpo primario marcado con R-ficoeritrina (proteína que emite fluorescencia naranja), YP y SYBR Green I permitió la detección específica de *E. coli* O157:H7 en un plato preparado de ensalada de pasta con vinagreta y la evaluación de su integridad de membrana durante la vida útil del producto en refrigeración. Este enfoque puso de manifiesto la presencia de células lesionadas de *E. coli* O157:H7 y la capacidad de este patógeno para reparar progresivamente su membrana durante el almacenamiento en refrigeración (Figura 6), lo cual refuerza la importancia de implementar medidas de control para limitar su presencia en platos preparados (Subires *et al.*, 2014).

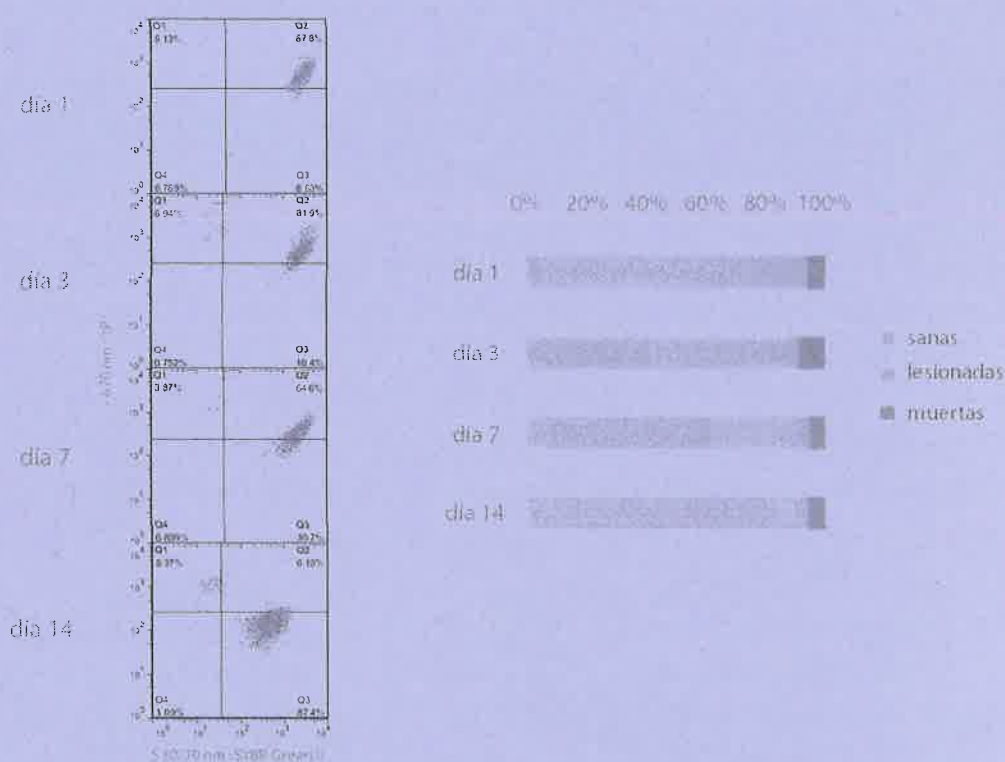


Figura 6. Evaluación de la integridad de membrana de *Escherichia coli* O157:H7 detectada por inmunofluorescencia en un plato preparado de ensalada de pasta durante su almacenamiento en refrigeración.

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee, T., y J.A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*. 50:65–91.
- Archer, D.L. 1996. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends in Food Science & Technology*. 7:91–95.
- Barbesti, S., S. Citterio, M. Labra, M.D. Baroni, M.G. Neri, y S. Sgorbati. 2000. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry Part A*. 40:214–218.
- Ben-Amor, K., H. Heilig, H. Smidt, E.E. Vaughan, T. Abee, y W.M. de Vos. 2005. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:4679–4689.
- Berney, M., M. Vital, I. Hülshoff, H.U. Weilenmann, T. Egli, y F. Hammes. 2008. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Research*. 42:4010–4018.
- Breeuwer, P., y T. Abee. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 55:193–200.
- Bunthof, C.J., y T. Abee. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2934–2942.
- Chilton, P., N.S. Isaacs, P. Mañas, y B.M. Mackey. 2001. Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 71:101–104.
- Davey, H.M. 2002. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods in Cell Science*. 24:91–97.
- Davey, H.M. 2011. Life, death and in-between: meanings and methods in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:5571–5576.
- Davey, H.M., y D.B. Kell. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*. 60:641–696.
- Díaz, M., M. Herrero, L.A. García, y C. Quirós. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 48:385–407.
- Fratamico, P.M., y L.K. Bagi. 2007. Comparison of methods for detection and isolation of cold- and freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *Journal of Food Protection*. 70:1663–1669.
- García, D., P. Mañas, N. Gómez, J. Raso, y R. Pagán. 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology*. 100:428–435.
- Givan, A.L. 2001. Instrumentation: into the black box. *En Flow cytometry. First principles*. Wiley-Liss, New York, NY. 15–39.

- Grégori, G., S. Citterio, A. Ghiani, M. Labra, S. Sgorbati, y S. Brown. 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 10:4662–4670.
- Hewitt, C.J., G. Nebe-von-Caron, A.W. Nienow, y C.M. McFarlane. 1999. The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *Journal of Biotechnology*. 75:251–264.
- Johnson, E.A. 2003. Microbial adaptation and survival of foods. *En Microbial stress adaptation and food safety*. A.E. Yousef y V.K. Juneja, editores. CRC Press, Boca Raton, FL. 75–103.
- Joux, F., P. Lebaron, y T. Marc. 1997. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. 22:65–76.
- Kell, D.B., A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.R. Harwood, y M.R. Barer. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:169–187.
- Lemarchand, K., N. Parthuisot, P. Catala, y P. Lebaron. 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology*. 25:301–309.
- Liao, C.H., y W.F. Fett. 2005. Resuscitation of acid-injured *Salmonella* in enrichment broth, in apple juice and on the surfaces of fresh-cut cucumber and apple. *Letters in Applied Microbiology*. 41:487–492.
- Mackey, B.M. 2000. Injured bacteria. *En Microbiological safety and quality of food*. B.M. Lund, T. Baird-Parker, y G.W. Gould, editores. Springer-Verlag, Gaithersburg, MD. 315–341.
- Mackey, B.M., E. Boogard, C.M. Hayes, y J. Baranyi. 1994. Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 22:227–237.
- Manini, E., y R. Danovaro. 2006. Synoptic determination of living/dead and active/dormant bacterial fractions in marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 55:416–423.
- Müller, S., y G. Nebe-von-Caron. 2010. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 34:554–587.
- Nebe-von-Caron, G., P.J. Stephens, y R.A. Badley. 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology*. 84:988–998.
- Nebe-von-Caron, G., P.J. Stephens, C.J. Hewitt, J.R. Powell, y R.A. Badley. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*. 42:97–114.
- Phadtare, S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*. 6:125–136.
- Raybourne, R.B., y M.L. Tortorello. 2003. Microscopy techniques: DEFT and flow cytometry. *En Detecting pathogens in food*. T. McMeekin, editor. Woodhead Publishing, Cambridge, England. 186–216.

- Saegeman, V.S., R. De Vos, N.D. Tebaldi, J.M. van der Wolf, J.H. Bergervoet, J. Verhaegen, D. Lismont, B. Verduyck, y N.L. Ectors. 2007. Flow cytometric viability assessment and transmission electron microscopic morphological study of bacteria in glycerol. *Microscopy and Microanalysis*. 13:18–29.
- Sharpe, J., y S. Wulff. 2006. Small-particle analysis. *En Guide to flow cytometry*. S. Wulff, editor. Dako, Carpinteria, CA. 69–75.
- Somolinos, M., D. García, R. Pagán, y B.M. Mackey. 2008. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:7570–7.
- Stephens, P.J., y B.M. Mackey. 2003. Recovery of stressed microorganisms. *En Handbook of culture media for food microbiology*. J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, y R.M. Baird, editores. Elsevier, Amsterdam. 25–48.
- Stocks, S.M. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry Part A*. 61:189–95.
- Subires, A., J. Yuste, y M. Capellas. 2014. Flow cytometry immunodetection and membrane integrity assessment of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat pasta salad during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*. 168-169:47–56.
- Trevors, J.T. 2003. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 57:87–103.
- Ueckert, J., G. Nebe-von-Caron, A.P. Bos, y P.F. ter Steeg. 1997. Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Letters in Applied Microbiology*. 25:295–299.
- Vives-Rego, J., P. Lebaron, y G. Nebe-von-Caron. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:429–448.
- Wesche, A.M., J.B. Gurtler, B.P. Marks, y E.T. Ryser. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 72:1121–1138.
- Wilkes, J.G., R.K. Tucker, J.A. Montgomery, W.M. Cooper, J.B. Sutherland, y D.A. Buzatu. 2012. Reduction of food matrix interference by a combination of sample preparation and multi-dimensional gating techniques to facilitate rapid, high sensitivity analysis for *Escherichia coli* serotype O157 by flow cytometry. *Food Microbiology*. 30:281–288.
- Yaqub, S., J.G. Anderson, S.J. MacGregor, y N.J. Rowan. 2004. Use of a fluorescent viability stain to assess lethal and sublethal injury in food-borne bacteria exposed to high-intensity pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*. 39:246–251.
- Yousef, A.E., y P.D. Courtney. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. *En Microbial stress adaptation and food safety*. A.E. Yousef y V. Juneja, editores. CRC Press, Boca Raton, FL. 1–30.
- Zhao, W., R. Yang, H.Q. Zhang, W. Zhang, X. Hua, y Y. Tang. 2011. Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques. *Food Control*. 22:566–573.