

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI RURAL**



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**EVALUACIÓN DE RIESGO DE *Staphylococcus aureus* EN
QUESO**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Gestión de la Seguridad y Calidad Alimentaria

Natalia Fernández Hidalgo

Director: Antonio Martínez López

Codirectores: Alejandro Rivas Soler, Dolores Rodrigo Aliaga y Fabián

Torres Bello

Valencia, Junio 2015

AGRADECIMIENTOS

Tras el camino que me ha llevado hasta aquí, quiero dar las gracias a todos aquellos que de una forma u otra han formado parte de este trabajo y han hecho posible que saliera adelante.

A Antonio y Alejandro, por las continuas revisiones, propuestas, reuniones, siempre dando respuesta a mis inquietudes y dudas. Al Departamento de Conservación y Calidad de los Alimentos del IATA, por la gran acogida y momentos compartidos, gracias!

A Bea, mi eterna compi de máster, sin ella este trabajo no habría sido igual, gracias por estar ahí, día a día, creo que hemos formado piña durante todo este tiempo, ha sido una suerte conocerte.

A mis amigos, por aguantar mis historias sobre este trabajo, por preguntar un día sí y otro también que tal me iba, en especial a Vicky por ese cable al final del trabajo que tanto necesitaba y por el compartir charlas vía WhatsApp o Skype, animándome en todo momento, gracias!

A mi familia, porque sin ellos esto no habría salido adelante, son mi apoyo desde siempre, por aguantar mis devenires, mis días malos, mis nervios, mis agobios, pero sobre todo por estar ahí SIEMPRE, es una tremenda SUERTE. En especial a mi hermana, la pequeña de la casa, porque siempre sabes darme ese toque de alegría y sinceridad cuando más lo necesito.

Y por último a ti Fer, mi compañero de viaje, el que siempre tiene tanta paciencia y sabe entenderme cuando ni yo misma me entiendo, por poner SIEMPRE esa luz en mi camino y apoyarme en cada paso que voy dando. Gracias!

EVALUACIÓN DE RIESGO DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO

Natalia Fernández Hidalgo, Antonio Martínez López¹, Dolores Rodrigo Aliaga¹, Alejandro Rivas Soler¹, Fabián Torres Bello¹

RESUMEN

El presente trabajo pretende dar respuesta a una problemática industrial relacionada con *Staphylococcus aureus* y su toxina en la industria quesera. En la Unión Europea (UE), según la información obtenida de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) durante los años 2009-2013, se han registrado un total de 290 brotes causados por toxinas estafilocócicas, lo que supone un 7% del total de brotes relacionados con los alimentos.

Se ha llevado a cabo una evaluación de riesgos mediante la herramienta Risk Ranger, la cual ha permitido estimar la implicación de la toxina estafilocócica en el queso y hallar qué tipo de queso, según su origen, es el que presenta un mayor riesgo.

Los resultados han indicado que el queso de oveja presentaba un mayor riesgo en comparación con el de cabra y vaca. Para valorar el impacto que podrían tener determinados factores en el riesgo de consumo de queso de oveja, se han simulado dos grandes escenarios: la contaminación del queso en fábrica y en el hogar. Los factores que afectan en gran medida en el crecimiento del *S.aureus* y por lo tanto en la producción de su toxina, son el contenido en sal y la temperatura de almacenamiento.

Finalmente, se obtuvo que un aumento en la temperatura de almacenamiento del queso, influye notablemente en el crecimiento de *S.aureus* y, que el queso que se contamina en el hogar a través de una contaminación cruzada, es el que más riesgo presenta.

PALABRAS CLAVE: *Staphylococcus aureus*, toxina estafilocócica, queso, riesgo.

RESUM

Aquest treball té com a finalitat donar resposta a una problemàtica industrial relacionada amb *Staphylococcus aureus* i la seua toxina en l'industria del formatge. En la Unió Europea (UE), segons la informació obtinguda de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) durant els anys 2009-2013, s'han registrat un total de 290 brots causats per toxines estafilocòccies, el que implica un 7% del total dels brots relacionats amb els aliments.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna, Valencia.

L'avaluació de riscos s'ha dut a terme mitjançant la ferrament de treball Risk Ranger, la qual permet estimar la implicació de la toxina en el formatge i esbrinar quin tipus de formatge segons el seu origen presenta un major risc.

Els resultats indiquen que es el formatge d'ovella el que presentava un major risc en comparació amb el de de cabra i vaca. Per valorar l'impacte que podrien tindre alguns factors en el risc del consum del formatge d'ovella, s'han simulat dos grans escenaris: la contaminació del formatge en la fàbrica i en la llar. Els factors importants que afecten molt en el creixement de *S. aureus* i en la producció de toxina, són el contingut en sal i la temperatura d'emmagatzematge.

A la fi, s'ha obtingut que augmentar la temperatura en l'emmagatzematge del formatge augmenta el creixement de *S.aureus* i que el formatge que es contamina en la llar mitjançant una contaminació creuada és el que més risc presenta.

PARAULES CLAU: *Staphylococcus aureus*, toxina estafilocòccia, formatge, risc.

ABSTRACT

This study aims to address the industrial problems related to *Staphylococcus aureus* and its toxin in the cheese industry. Between the years 2009-2013, according to the European Food Safety Authority (EFSA), there have been a total of 290 outbreaks caused by staphylococcal toxins in the European Union. This number represents the 7% of the total outbreaks related to food industry.

This study has carried out a risk assessment using Risk Ranger software, which has allows us to researched the involvement of staphylococcal toxin in the cheese and which type of cheese by origin is posing a higher risk of contamination. The present study has proved that sheep cheese possess a greater risk than goat and cow cheese. Therefore, two scenarios have been simulated for sheep cheese; its contamination in the cheese factory and its contamination at home. To examine these scenarios, temperature and salt concentration in the cheese, which greatly affects the growth of *S. aureus* and its production of the toxin, has been changed.

Lastly, it has been observed that an increase in cheese storage temperature significantly affects the growth of *S. aureus* and that cheese contaminated through cross contamination represent the highest risk.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxin, cheese, risk.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

S.aureus es uno de los principales patógenos responsables de la mastitis clínica y subclínica en ganado vacuno, caprino y bovino. Esto supone grandes pérdidas económicas y un empeoramiento de la calidad de la leche, además de representar una fuente de contaminación para leche cruda y productos derivados (Cortimiglia et al., 2015).

La problemática causada por este patógeno, como se plantea en el estudio de Ross and Sumner (2002), y el interés de una industria láctea colombiana productora de queso fresco, ha llevado a realizar una evaluación de riesgos cuantitativa para estudiar la implicación de *S.aureus* en el sector quesero. El objetivo fundamental de la evaluación de riesgos, es aportar apoyo para tomar decisiones. Sin embargo, la realización de una evaluación de riesgos de forma cuantitativa es muy costosa desde los puntos de vista económico, de tiempo y laboral. Esta limitación supone un problema a la hora de evaluar el riesgo de un patógeno en un alimento. Como se comenta en el estudio de EFSA (2015b) existen herramientas que permiten determinar el riesgo de un patógeno en un alimento como son: Risk Ranger, a Swift Quantitative Microbiological Risk Assessment (sQMRA), FDA-iRisk entre otros. Estas herramientas incluyen sistemas semi-cuantitativos de puntuación, árboles de decisión, etc. que permiten evaluar y obtener una estimación del riesgo entre diferentes patógenos y alimentos, para poder así compararlos.

1.2. *S. aureus* y su toxina

Taxonomía y morfología

El género *S.aureus* se caracteriza por ser cocos Gram-positivos, de 0,5-1,5 μm de diámetro que se agrupan formando racimos. Son catalasa positiva, inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas y generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula. Muchas de las cepas pueden ser coagulasa positivo y negativo. Además poseen la capacidad de crear toxinas altamente estables al calor. Es una bacteria ubicua y patógena que pertenece a la familia *Micrococcaceae*. (FDA, 2012).

Características de las toxinas estafilocócicas

Las toxinas estafilocócicas son producidas tanto por cepas coagulasa positivas como negativas de *S.aureus* (FDA, 2012). Están nombradas de forma consecutiva por una letra del alfabeto (A-O) en el orden en que han sido descubiertas (EFSA, 2003).

Este tipo de toxinas se encuentran principalmente en las comidas como se ha podido notificar en diferentes países (Bhatia and Zahoor, 2007).

Siendo las toxinas de tipo A y D las más implicadas en la intoxicación alimentaria estafilocócica (Hummerjohann et al., 2014).

Características de crecimiento de *S. aureus* y formación de sus toxinas

La presencia de ácido láctico, el pH, la concentración de sal y la temperatura a la que se elabora el queso, son variables fundamentales para el crecimiento o no de microorganismos, durante la elaboración y maduración del queso. *S.aureus* es muy tolerante a la sal, siendo capaz de producir la toxina en medios donde la concentración es superior al 10% ($a_w = 0,92$). Puede crecer también en un amplio rango de temperaturas y pH. Sin embargo, ve reducido su crecimiento en presencia de la flora bacteriana natural de la leche y cuando las temperaturas son de refrigeración. Estas condiciones de crecimiento se recogen en la tabla 1 tanto para *S.aureus* como para su toxina (EFSA, 2003).

TABLA 1. Factores que afectan al crecimiento *S.aureus* y la producción de su toxina (EFSA, 2003)

Factor	Crecimiento microorganismo		Producción toxina estafilocócica	
	Óptimo	Intervalo	Óptimo	Intervalo
Temperatura	37°C	7 - 48 °C	40 - 45 °C	10 - 48 °C
pH	6 – 7	4 - 10	7 - 8	4 – 9,6
Actividad de agua (a_w)	0,98	0,83 - >0,99 ¹	0,98	0,85 - >0,99 ²
NaCl (%)	0	0-20	0	0 - 10
Potencial redox (E_h)	>+200 mV	<-200mV hasta >+200mV	>+200 mV	<-100mV hasta >+200mV
Atmósfera	Aerobia	Anaerobia - Aerobia	Aerobia (5-20% oxígeno disuelto)	Anaerobia - Aerobia

¹Aerobia (anaerobia 0,90 - > 0,99)

¹Aerobia (anaerobia 0,92 - > 0,99)

Intoxicación causada por la toxina estafilocócica

La intoxicación alimentaria estafilocócica, es una enfermedad que se adquiere por la ingesta de alimentos contaminados con la toxina. Los alimentos que suelen estar implicados son: leche, nata, queso, jamón, salchichas, ensaladas, champiñones y alimentos precocinados (Hummerjohann et al., 2014). Se caracteriza por producir calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarrea. Es considerada una de las enfermedades más frecuente transmitida por alimentos en todo el mundo,

aunque la mayoría de los casos no son notificados al no requerir intervención médica (Linage et al., 2012).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Búsqueda de datos

La disponibilidad de datos es la clave para una evaluación de riesgos semicuantitativa o cuantitativa. La primera actividad a realizar previa a cualquier evaluación de riesgos, es una búsqueda bibliográfica de la información necesaria, consultando diferentes fuentes y bases de datos disponibles en la UE. El trabajo se ha centrado en el periodo comprendido entre 2009 y 2013.

Los valores de prevalencia se han obtenido a partir de los informes realizados por la EFSA (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a). En estos documentos se recogen el número de muestras que presentaron toxina a partir del total de las mismas analizadas.

Los datos de consumo de queso a nivel de la UE se recopilaron de Eurostat (2015), obteniéndose el total de consumo de los diferentes tipos de queso según su origen.

La información referente a contaminación cruzada se obtuvo de bibliografía científica y de los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento CE 2073/2005.

2.2. Cálculo del riesgo relativo en consumo de queso de diferente origen: Risk Ranger

La evaluación de riesgos de las toxinas estafilocócicas producidas por *S.aureus* en queso se ha realizado mediante la herramienta Risk Ranger, una hoja de cálculo que trabaja bajo entorno Excel. Está diseñada para convertir datos cualitativos y cuantitativos (INPUTS), relativos a severidad, susceptibilidad, consumo entre otros; en cuantitativos (OUTPUTS), como son la probabilidad de enfermar el consumidor por día, la predicción total de enfermos y el porcentaje de riesgo del alimento estudiado.

Este software permite comparar y analizar diferentes combinaciones producto-patógeno, evaluando qué combinación tiene un mayor riesgo y cual produce más enfermos (Ross and Sumner, 2002).

2.3. Parámetros de entrada (INPUTS) de Risk Ranger

1. Severidad

La severidad se calcula, teniendo en cuenta el número de casos y hospitalizaciones que se produjeron durante un periodo de tiempo determinado. Para ello se ha examinado la información de EFSA en el período de 2009-2013.

El programa ofrece cuatro entradas a seleccionar: riesgo severo, moderado, leve y menor.

2. Susceptibilidad

Existen cuatro opciones a seleccionar dentro del programa: susceptibilidad general, ligeramente susceptible, muy susceptible y extremadamente susceptible.

Con respecto a la toxina estafilocócica, se ha considerado que toda la población sería susceptible de sufrir intoxicación.

3. Frecuencia de consumo

La frecuencia de consumo se define como la cantidad de alimento que un habitante consume en un periodo de tiempo. En primer lugar, se ha estimado el tamaño de las porciones, para ello se han considerado las recomendaciones de consumo de queso curado (40-60g/día) y fresco (80-125g/día) (Carbajal, A., 2013). De acuerdo a esta información, se estableció 100 gramos como porción estándar, sin hacer distinción entre queso curado, semi-curado, blando o fresco.

A continuación se obtuvo el consumo de porciones. Para ello se dividió el consumo total de cada uno de los tipos de queso (vaca, cabra u oveja) entre el tamaño de la porción consumida.

Por último, la frecuencia de consumo se calculó en función de las porciones consumidas por habitante/semana de la siguiente manera (ecuación 1):

$$\frac{\text{Porciones consumidas de 100g en 5 años}}{5} = X \rightarrow \frac{X}{\text{n}^\circ \text{ habitantes UE}} = X' \rightarrow \frac{X'}{52 \text{ semanas que tiene un año}} = X'' \quad (1)$$

dónde: X=porciones consumidas/año (g); X'=porciones consumidas/hab·año (g); X''=porciones consumidas/hab·semana(g)

A la hora de introducir los datos en el programa hay 5 entradas a elegir con respecto al consumo del alimento: diariamente, semanalmente, mensualmente, unas pocas veces al año u otro.

4. Proporción población que consume cada producto

El programa ofrece cuatro opciones para considerar la proporción de la población que consume un determinado producto (todos, la mayoría, algunos o muy pocos consumen el producto).

5. Población

En este apartado se introduce el número de personas que componen la población en estudio.

En el caso de los escenarios generales se considera el total de la población de la UE y para los escenarios específicos, la población presente en los hogares formados por 4 miembros y que poseen el frigorífico entre 10-12°C de la UE.

6. Probabilidad de encontrar una porción contaminada

La prevalencia nos indica el porcentaje de muestras que están contaminadas con toxina estafilocócica del total que se han analizado. La probabilidad de encontrar una porción contaminada sería el resultado de dividir la prevalencia entre 100.

Las opciones a elegir van desde rara vez hasta siempre, también ofrece la opción “otro”.

7. Efecto del procesado

Este apartado hace referencia a las diferentes acciones a las que se puede someter un alimento a nivel de procesado, y como éstas puede influir en la contaminación del mismo.

Las opciones de la hoja de cálculo para este apartado se agrupan desde “El procesado elimina el riesgo” hasta “El procesado incrementa el riesgo por mil”. Tanto en el caso que se consuma el queso directamente como si se cocina, el procesado no influye en el riesgo.

8. Recontaminación del producto

El queso es un producto que se suele comprar envasado, bien en piezas, lonchado o en cuñas cortadas. El riesgo de recontaminación puede tener lugar a nivel doméstico si se trata de la pieza de queso y ésta se trocea en casa. Otro punto de recontaminación es el lonchado que se suele hacer en los supermercados o en las propias fábricas. En este caso, la recontaminación suele producirse por las cuchillas de corte. Una vez que el producto se ha recontaminado con estafilococo, este se puede desarrollar y producir la toxina si no hay una medida de control adicional como la refrigeración.

A la hora de introducir la información en el programa hay cuatro posibilidades, las cuales están comprendidas entre “ausencia de recontaminación” y “100% de recontaminación”.

9. Efectividad del sistema de control en el post-procesado

En este estudio, se ha considerado que el único sistema de control que se lleva a cabo en el post-procesado es la conservación del queso en el frigorífico. Este tendrá o no influencia dependiendo del escenario con el que se esté trabajando.

Con respecto al sistema de control tras el post-procesado las opciones a elegir en la hoja de cálculo son: bien controlado, controlado, no controlado, gravemente no controlado o no relevante.

10. Tras el post-procesado, cuánto se ha de aumentar el nivel de contaminación para que cause infección o intoxicación a la media de los consumidores.

En este apartado, se debe introducir información relativa a la cantidad de microorganismo o toxina que es capaz de producir una sintomatología en el consumidor. Para ello, el programa ofrece cinco opciones a elegir: no aumenta, ligero aumento, aumento moderado, aumento significativo u otro.

11. Efecto de la preparación de la comida

El queso no lleva ninguna preparación previa para ser consumido.

Las entradas que ofrece el programa van desde “la preparación de la comida elimina el riesgo” hasta “la preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Brotes asociados a *S.aureus*

En la UE durante el período 2009-2013 (tabla 2) se han registrado un total de 3.468 brotes causados por toxinas bacterianas, de los cuales 759 han sido verificados (18,64%). Dentro de este grupo se encuentra la toxina estafilocócica, que durante este período de tiempo ha ocasionado un total de 1.644 brotes, de los cuales 290 han sido verificados, lo que supone un 7,06% del total de los brotes causados por enfermedades transmitidas por alimentos (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a).

Tabla 2. Brotes causados por toxinas bacterianas y la toxina estafilocócica

Año	Toxinas bacterianas				Toxina estafilocócica			
	Brotes totales		Brotes con fuerte evidencia		Brotes totales		Brotes con fuerte evidencia	
	N	%	N	%	N	%	N	%
2009	558	10,1	218	22,3	293	5,3	88	9,1
2010	461	8,8	87	12,5	274	5,2	38	5,45
2011	730	12,9	119	17	345	6	35	5
2012	777	14,5	127	16,6	346	6,45	35	4,57
2013	942	18,13	208	24,79	386	7,43	94	11,2
Total	3468	12,89	759	18,64	1644	6,08	290	7,06

Si se especifica por años, en 2009 esta toxina provocó el 9% del total de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos; en 2010 un 5,46%; en 2011 un 5%; en 2012 un 4,57% y en 2013 un 11,2%. Se puede observar que, la contribución de la toxina estafilocócica a la enfermedad transmitida por alimentos se mantiene entre aproximadamente un 5 y un 11 %, es decir,

no se observa una disminución a lo largo de los años. Bajo el punto de vista de la seguridad alimentaria, esto puede significar que las medidas de control en fábrica, distribución y en el hogar no están siendo efectivas a la hora reducir la incidencia de esta enfermedad.

3.2. Severidad

Tras el análisis de la información procedente de EFSA (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a) recogida en la tabla 3 y de acuerdo al programa de cálculo, se asigna un valor de 0,01 al 100% de hospitalizaciones, es decir, todos los individuos enfermos requieren intervención médica. A partir de este dato, se realizó una equivalencia y se obtuvo el nivel de riesgo correspondiente al número de hospitalizaciones descritas en EFSA en el periodo 2011-2015a (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a).

TABLA 3. Datos epidemiológicos de la toxina estafilocócica por el consumo de alimentos (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a).

Año	Nº brotes	Casos	Hospitalizados	Defunciones	%hospitalizados
2009	88	978	165	2	16,8
2010	38	941	189	0	20
2011	35	394	110	0	27
2012	35	497	88	0	17
2013	94	1304	52	0	3,9
Media	58	823	121	2	19,4

Como se puede apreciar en la tabla 3, el porcentaje de hospitalización por toxina estafilocócica oscila entre 3,9 y el 27 % con un valor medio de 19,4%. A partir de ese dato y realizando la equivalencia explicada anteriormente, se obtiene el valor a introducir en el programa que equivalió a riesgo leve.

3.3. Consumo de queso

El consumo de queso se ha calculado mediante la ecuación 1 descrita en materiales y métodos, considerando la información recopilada en EUROSTAT (2015) tal como se muestra en la tabla 4.

TABLA 4. Consumo porciones queso UE 2009-2013 (EUROSTAT, 2015)

Características consumo-queso						
Tipo queso	Población	Porciones consumidas 5 años	Porciones/año	Porciones/hab/año	Porciones/hab/semana	% consumo
Queso Vaca	506.824.509	$3,80 \cdot 10^{11}$	$7,60 \cdot 10^{10}$	152	2,88	75
Queso Cabra	506.824.509	$7,30 \cdot 10^{10}$	$1,46 \cdot 10^{10}$	28,8	0,55	14
Queso oveja	506.824.509	$2,90 \cdot 10^{11}$	$5,80 \cdot 10^{10}$	118	2,27	57

Como se observa en la tabla 4, el número de porciones de 100 gramos de queso de vaca, cabra y oveja consumidas por habitante y semana sería 2,88; 0,55 y 2,27 respectivamente.

De acuerdo a los datos de consumo, se ha estimado la proporción de la población que consume cada producto. Dado el alto volumen de consumo de queso de vaca, se ha considerado que al menos el 75% (la mayoría) de la población lo consume. Teniendo en cuenta este dato y los datos de consumo del resto de quesos (cabra y oveja), se ha calculado el porcentaje de la población que consumiría estos dos tipos de queso (tabla 4).

3.4. Probabilidad de encontrar una porción contaminada

De acuerdo a la información suministrada por (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a) la prevalencia a considerar en este estudio se muestra en la tabla 5.

TABLA 5. Prevalencia toxina estafilocócica en los diferentes tipos de queso (EFSA, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a).

	Toxina estafilocócica		
	Año 2009-2013		
	Total muestras	Total positivos	Prevalencia (%)
Queso de vaca	11007	9	0,081
Queso de cabra	589	3	0,51
Queso de oveja	8959	20	0,22

Si se observan los datos obtenidos de la tabla 5, el queso de cabra es el que mayor prevalencia presenta, seguido del de oveja y por último el de vaca.

3.5. Efecto del procesado

El alimento evaluado fue queso, el cual se vende listo para su consumo. En el caso en que el producto se calentase antes de su consumo (sándwich o gratinado) no influiría en la cantidad de toxina estafilocócica, ya que es

resistente al tratamiento térmico. Un ejemplo de esta resistencia es el tratamiento que se suele llevar a cabo en las industrias de productos lácteos como se puede observar en la tabla 6 (EFSA, 2003).

TABLA 6. Inactivación térmica de las toxinas A y D en leche y derivados 72°C-15 segundos¹ (EFSA, 2003)

Tipo de muestra	Porcentaje de la actividad de la toxina estafilocócica ²	
	Toxina tipo A	Toxina tipo D
Leche entera	36	30
Leche desnatada	56	30
Nata	24	15

¹40-50 segundos para alcanzar los 72 °C

²1µg/ml concentración inicial

3.6. Aumento en el nivel de contaminación o de toxina capaz de producir sintomatología en el consumidor

De acuerdo a la bibliografía consultada, la población más sensible es aquella que puede comenzar a tener síntomas de intoxicación estafilocócica cuando la ingesta es próxima a 200 ng de toxina (FDA, 2012). Si se considera una relación dosis respuesta exponencial como la de la figura 1, con una zona de proporcionalidad de la curva que comprende tanto a la dosis mínima para que se den los primeros síntomas (200 ng) como la ID₅₀ (1000 ng). Esta proporcionalidad es la que permite comparar la ID₅₀ con la cantidad de toxina del producto y poder así calcular el aumento del nivel de contaminación para que cause infección.

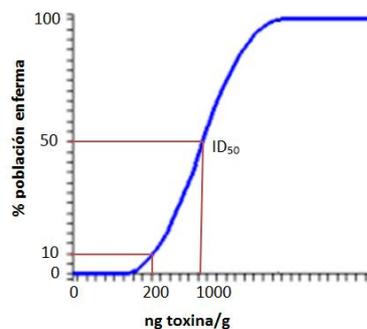


Figura 1. Modelo dosis-respuesta de la toxina estafilocócica

3.7. Evaluación de riesgos

3.7.1. Escenarios generales

En la primera parte de la evaluación, se analizó qué tipo de queso, según el origen de la leche, era el de mayor riesgo para la población. No se pudo estudiar según su maduración (fresco, blando, semi-curado o curado), ya que no había suficiente información y los datos no habrían sido

representativos. Se asume tal incertidumbre a la hora de realizar la evaluación de riesgos.

La población evaluada ha sido la población en general, ya que toda la población es susceptible a la intoxicación estafilocócica, aunque la intensidad de la sintomatología puede variar en función de la cantidad de alimento ingerido y de la susceptibilidad individual a la toxina que cada persona presenta (Food Safety Government New Zeland, 2001).

Tras la obtención de toda la información, se ha suministrado ésta al programa (como se ha explicado en el apartado de material y métodos) obteniendo los siguientes resultados, tabla 7.

Tabla 7. Evaluación de riesgos escenarios generales

Parámetros de Entrada			
Escenarios generales			
Parámetro	Queso Vaca	Queso Cabra	Queso Oveja
Severidad	Riesgo leve	Riesgo leve	Riesgo leve
Susceptibilidad	General	General	General
Frecuencia de consumo	Otros: valor que se introduce es 2,92	Otros: valor que se introduce es 0,56	Otros: valor que se introduce es 2,23
Proporción población que consume cada producto(*)	75%	5%	25%
Población	506.824.509	506.824.509	506.824.509
Probabilidad de encontrar porción contaminada	0,00081	0,0051	0,0022
Efecto procesado	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo
Recontaminación en el hogar	No	No	No
Efectividad sistema control post-procesado	No relevante	No relevante	No relevante
Tras el post-procesado, cuánto se ha de aumentar el nivel de contaminación para que cause infección o intoxicación a la media de los consumidores (**)	Otro: 1000/200	Otro: 1000/200	Otro: 1000/200
Efecto preparación comida	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo
Parámetros de Salida			
Prob enfermar/día/consumidor de interés	$6,75 \cdot 10^{-7}$	$1,45 \cdot 10^{-6}$	$1,42 \cdot 10^{-6}$
total enfermos/año/población estudiada	$9,26 \cdot 10^4$	$3,72 \cdot 10^4$	$1,48 \cdot 10^5$
Risk Ranger	47	45	48

(*) La proporción de consumidores se seleccionó según las opciones del programa, pero en la hoja de codificación del mismo se ajustaron los valores para que coincidieran con los porcentajes calculados Tabla 3.

(**) Para los tres escenarios generales se considera 200 ng de toxina, que es la mínima cantidad a la que se empieza a tener sintomatología. El valor que se introduce en el programa es la ID_{50} /cantidad toxina.

De acuerdo a los resultados de los cálculos realizados por el programa, se estima que el queso que presenta un mayor riesgo para la población es el queso de oveja con un 48%, frente al queso de vaca y cabra con un 47% y 45% respectivamente (tabla 7). Destacar que estos valores simplemente indican un riesgo relativo. Este queso en concreto no es el más consumido como se observa en la tabla 4, ni tiene la mayor prevalencia de toxina estafilocócica, tabla 5. Sin embargo, si se analizan los datos con detenimiento, se puede ver que aunque el consumo de queso de oveja es algo inferior respecto al de vaca ($2,90 \cdot 10^{11}$ y $3,80 \cdot 10^{11}$ porciones, respectivamente), la prevalencia de la toxina estafilocócica es mucho mayor (0,22 queso oveja y 0,081 queso vaca). Por otro lado, el queso de oveja posee una prevalencia algo inferior de toxina estafilocócica que el de cabra (0,22 queso de oveja y 0,51 queso de cabra) pero la cantidad de queso que se consume de oveja es muy superior al de cabra ($2,90 \cdot 10^{11}$ y $7,30 \cdot 10^{10}$ porciones, respectivamente). Por lo tanto, es razonable que el queso con mayor riesgo sea el de oveja.

Comparando los resultados obtenidos con los datos epidemiológicos (tabla 3), el número estimado de enfermos es superior, pero se ha de considerar que los datos recogidos por la epidemiología son únicamente de aquellos enfermos que han requerido intervención médica. Seguramente, el número de casos reales de intoxicación por la toxina fue mayor que la recogida por los datos oficiales, pues habría enfermos que no presentaron una sintomatología grave y por lo tanto no requirieron intervención médica y no se registraron.

3.7.2. Escenarios específicos

La segunda parte del trabajo, consistió en el estudio de escenarios específicos, donde el producto seleccionado fue el queso de oveja por ser el de mayor riesgo. Se llevó a cabo una simulación de posibles escenarios (queso que ya viene troceado de fábrica y queso que se trocea en el hogar) donde se modificaron diferentes parámetros (temperatura y sal), para ver como influían en el crecimiento de *S.aureus* y, por consiguiente, en el riesgo de intoxicación por consumo de esos productos. Estas modificaciones conllevaron una variación de los valores de algunos de los INPUTS explicados en el apartado material y métodos, como el tamaño de la población que se expone al riesgo y la cantidad de toxina presente en el queso.

Respecto al tamaño de la población, se consideró aquella que tiene el frigorífico de su hogar a una temperatura alrededor de 10-12°C, ya que es la temperatura mínima a partir de la cual puede desarrollarse la toxina estafilocócica.

Se estableció como unidad familiar el hogar formado por cuatro personas, pues es aquel que representa a un mayor porcentaje de la población, un 16,2% (138.567.800 personas) (Eurostat, 2015).

James et al. (2008) realizó un estudio sobre las temperaturas de los frigoríficos en la UE como se puede ver en la figura 2. A partir de este

estudio, se obtuvo el porcentaje de aquellos frigoríficos que superaban los 10°C (tabla 8).

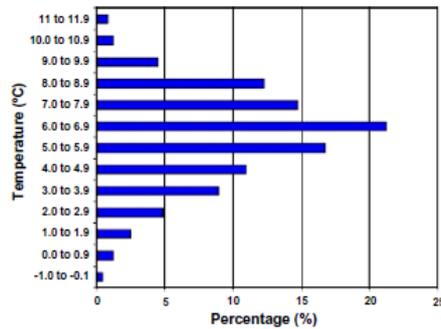


Figura 2. Temperatura media de todos los frigoríficos encuestados (James et al., 2008)

Tabla 8. Total frigoríficos con temperatura $\geq 10^{\circ}\text{C}$ (James et al., 2008)

Temperatura frigoríficos (°C)	% frigoríficos
10-10,9	1,17
11-11,9	0,8
Total frigoríficos $\geq 10^{\circ}\text{C}$	1,97

A partir de estos valores y asumiendo que en cada uno de los hogares existe un frigorífico, se calculó la población de riesgo, siendo un total de 2.729.785 personas.

Al simular los escenarios específicos, se varió la población de *S.aureus* y, por tanto, la concentración de toxina. En un estudio llevado a cabo por Kim et al. (2009), se estableció una relación entre la concentración de *S.aureus* (UFC/ml) y la concentración de toxina producida (ng/ml) (figura 3). A partir de esa relación se calculó la toxina para los diferentes escenarios.

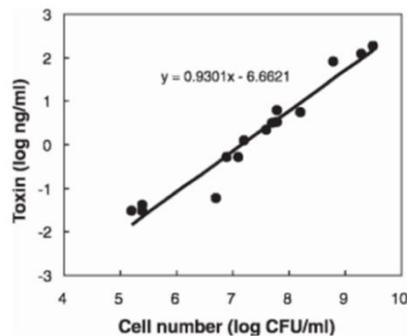


Figura 3. Relación lineal entre UFC/ml y ng toxina/ml (Kim et al., 2009)

Mediante el programa COMBASE se realizaron las estimaciones en el crecimiento de *S.aureus* al variar la temperatura y la concentración de sal.

3.7.2.1. Escenario específico 1: queso cortado en fábrica

En este escenario, se consideró el queso que se compra ya troceado y que por tanto viene con una carga microbiana determinada de fábrica. Se barajaron cuatro casos, en función de la temperatura del frigorífico (10°C y 12°C) y del contenido en sal (0,12% y 4 %). En la tabla 9, se muestran los datos introducidos en el programa COMBASE para llevar a cabo los diferentes escenarios.

Tabla 9. Datos de entrada COMBASE escenario específico 1.

Parámetros de entrada COMBASE		
Parámetros		Referencias
Carga inicial <i>S.aureus</i>	10 ⁴ ufc/g	Se estableció la contaminación inicial del queso en la zona de venta a partir del Reglamento CE 2073/2005, eligiendo el caso más desfavorable (10-10 ⁴ ufc/g).
Temperatura	10°C y 12°C	Temperatura a la que ya se desarrolla la toxina.
pH	5,5	Buendía et al. (2011) establecieron que el pH del queso fresco oscila entre 5-6. Se escogió el valor medio.
Sal	0,12g/100g	REGLAMENTO (CE) nº1924/2006 (declaración nutricional), para el queso bajo en sal.
	4 g/100g	Se obtuvo de la normativa técnica para queso de oveja curado.
Tiempo	240h	Se estimó la carga de <i>S.aureus</i> a los 10 días (240 horas) de vida útil del producto.

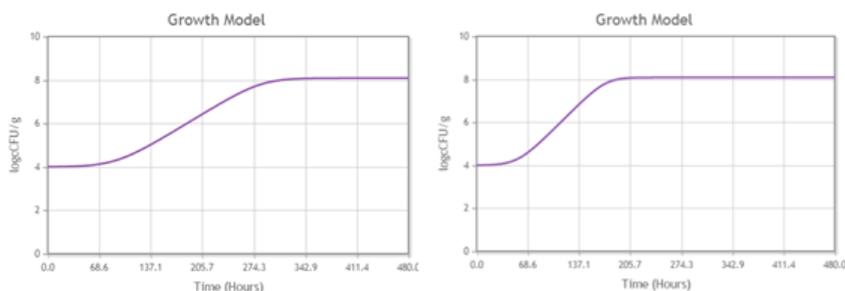


Figura 4. Crecimiento *S.aureus* en queso de oveja a baja concentración de sal almacenado a 10°C y 12°C durante 10 días

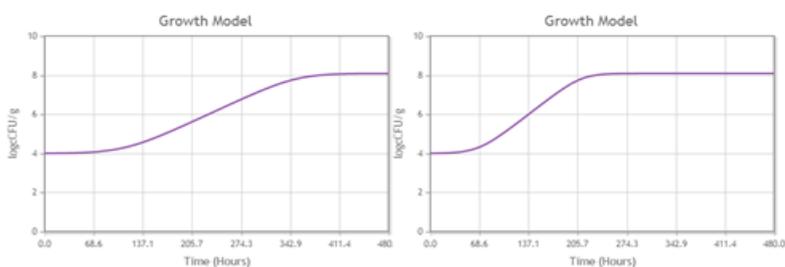


Figura 5. Crecimiento *S.aureus* en queso de oveja a elevada concentración de sal almacenado a 10°C y 12°C durante 10 días

En las figuras 4 y 5 se observa el crecimiento de *S.aureus* en función de la concentración de sal y temperatura. Una mayor concentración de sal ralentiza el crecimiento de *S.aureus* (figura 5). Sin embargo el factor determinante en el crecimiento es la temperatura, ya que al variar

únicamente 2°C (pasar de 10 a 12°C), el crecimiento de *S.aureus* se duplica independientemente de la concentración de sal que haya en el medio. Tras obtener para cada tipo de queso la carga microbiana de *S.aureus* y la cantidad de toxina estafilocócica a los 10 días de vida útil (la vida útil de un queso envasado es superior a 10 días) (tabla 10), se procedió a introducir todos los datos en Risk Ranger obteniendo así la evaluación de riesgos para cada escenario (tabla 11).

Tabla 10. Cantidad de toxina para cada tipo de queso, escenario específico 1

Tipo de queso	Ufc/g <i>S.aureus</i>	[ng/g]Toxina estafilocócica	Tiempo de almacenamiento (h)
0,12% sal-10°C	10 ^{7,11}	89,3	240
0,12% sal-12°C	10 ⁸	600	240
4% sal-10°C	10 ^{6,18}	12,18	240
4% sal-10°C	10 ⁸	600	240

Tabla 11. Evaluación de riesgos escenario específico 1

Parámetros de Entrada				
Escenario específico 1: Queso de oveja troceado de fábrica				
Parámetro	0,12%sal 10°C	0,12%sal 12°C	4%sal 10°C	4%sal 12°C
Severidad	Riesgo leve	Riesgo leve	Riesgo leve	Riesgo leve
Susceptibilidad	General	General	General	General
Frecuencia de consumo	Otros: valor que se introduce es 2,23			
Proporción población que consume cada producto	25%	25%	25%	25%
Población	2.729.785	2.729.785	2.729.785	2.729.785
Probabilidad de encontrar porción contaminada	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022
Efecto procesado	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo
Recontaminación en el hogar	No	No	No	No
Efectividad sistema control post-procesado	No controlado	No controlado	No controlado	No controlado
Tras el post-procesado, cuánto se ha de aumentar el nivel de contaminación para que cause infección o intoxicación a la media de los consumidores (*)	Otro: 1000/89,3	Otro: 1000/600	Otro: 1000/12,18	Otro: 1000/600
Efecto preparación comida	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo
Parámetros de Salida				
Prob enfermar/día/consumidor de interés	2,85·10 ⁻⁶	1,88·10 ⁻⁵	3,82·10 ⁻⁷	1,88·10 ⁻⁵
total enfermos/año/población estudiada	1,62·10 ³	1,07·10 ⁴	2,17·10 ²	1,07·10 ⁴
Risk Ranger	50	55	45	55

(*) El valor que se introduce en el programa es la ID₅₀/cantidad toxina.

Tras analizar los resultados obtenidos, se observa que los casos que presentaron un mayor riesgo fueron los quesos almacenados a 12°C sin importar la concentración de sal.

3.7.2.2. Escenario específico 2: queso cortado en el hogar

En la etapa de consumo doméstico, la contaminación cruzada se considera uno de los factores más importantes en la aparición de brotes alimentarios. En España entre 1993-1998, el 49% de los brotes sucedieron en el hogar, siendo *Staphylococcus spp.* el segundo patógeno en importancia. Los consumidores muchas veces no almacenan los productos de forma adecuada, asimismo manipulan y preparan la comida sin la higiene necesaria (Perez-Rodriguez et al., 2007). Por eso se planteó el siguiente escenario: un queso que se trocea en el hogar y se contamina a partir del utensilio de corte que previamente se ha contaminado con *S. aureus* proveniente de otro alimento. Por lo tanto, se trata de una contaminación cruzada en la que el cuchillo es la vía de transferencia de la contaminación. En este escenario se varía la carga inicial (pues se considera la carga que transmite el cuchillo), pero el resto de parámetros se mantienen como en el escenario anterior (tabla 12).

Tabla 12. Datos de entrada COMBASE escenario específico 2

Parámetros de entrada COMBASE		
Parámetros		Observaciones
Carga inicial <i>S.aureus</i>	7,52·10 ² ufc/g	Se considera como carga inicial de contaminación cruzada la que se ha obtenido del trabajo de Álvarez et al.(2013)
Temperatura	10°C y 12°C	Temperatura a la que ya se desarrolla la toxina.
pH	5,5	Buendía et al. (2011) establecieron que el pH del queso fresco oscila entre 5-6. Se escogió el valor medio.
Sal	0,12g/100g	Se obtuvo del REGLAMENTO (CE) n°1924/2006 (declaración nutricional), para el queso bajo en sal.
	4 g/100g	Se obtuvo de la normativa técnica para queso de oveja curado (Orden DES/83/2009).
Tiempo	240h	Se estimó la carga de <i>S.aureus</i> a los 10 días (240 horas) de vida útil del producto.

Se llevó a cabo la simulación mediante COMBASE, obteniendo las cargas microbianas de *S. aureus* y de su toxina tras 10 días de almacenamiento (tabla 13).

Tabla 13. Cantidad de toxina en los diferentes quesos tras 10 días de almacenamiento (escenario específico 2)

Tipo de queso	Ufc/g <i>S.aureus</i>	[ng/g]Toxina estafilocócica	Tiempo de almacenamiento (h)
0,12% sal-10°C	10 ⁵	1,34	240
0,12% sal-12°C	10 ^{7,81}	400	240
4% sal-10°C	10 ⁴	0	240
4% sal-10°C	10 ^{6,83}	49	240

Los recuentos estimados obtenidos del COMBASE se introdujeron en el Risk Ranger. Para este escenario además se modificó el INPUT de recontaminación en el hogar ya que se consideró un caso de contaminación cruzada. Los resultados obtenidos tras la evaluación de riesgos se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Evaluación de riesgos escenario específico 2

Parámetros de Entrada				
Escenario específico 2: Queso de oveja troceado en el hogar				
Parámetro	0,12%sal 10°C	0,12%sal 12°C	4%sal 10°C	4%sal 12°C
Severidad	Riesgo leve	Riesgo leve	Riesgo leve	Riesgo leve
Susceptibilidad	General	General	General	General
Frecuencia de consumo	Otros: valor que se introduce es 2,23			
Proporción población que consume cada producto	25%	25%	25%	25%
Población	2.729.785	2.729.785	2.729.785	2.729.785
Probabilidad de encontrar porción contaminada	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022
Efecto procesado	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo	El procesado no tiene efecto en el riesgo
Recontaminación en el hogar	Si-Menor (1%frecuencia)	Si-Menor (1%frecuencia)	Si-Menor (1%frecuencia)	Si-Menor (1%frecuencia)
Efectividad sistema control post-procesado	No controlado	No controlado	No controlado	No controlado
Tras el post-procesado, cuánto se ha de aumentar el nivel de contaminación para que cause infección o intoxicación a la media de los consumidores (*)	Otro: 1000/1,34	Otro: 1000/400	Otro: 1000/0	Otro: 1000/49
Efecto preparación comida	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo	La preparación de la comida no tiene efecto en el riesgo
Parámetros de Salida				
Prob enfermar/día/consumidor de interés	$1,91 \cdot 10^{-5}$	$5,70 \cdot 10^{-3}$	-	$6,98 \cdot 10^{-4}$
total enfermos/año/población estudiada	$1,08 \cdot 10^4$	$3,24 \cdot 10^6$	-	$3,97 \cdot 10^5$
Risk Ranger	55	69	-	64

Del mismo modo que en el escenario específico anterior, los quesos que presentaron un mayor riesgo son aquellos que se almacenan a una temperatura de 12°C. Además, se observa que el queso bajo en sal almacenado a 12°C presenta un mayor crecimiento de *S.aureus* y por tanto tiene mayor riesgo (riesgo relativo del 69%).

4. CONCLUSIONES

Llevada a cabo la evaluación de riesgos de la toxina estafilocócica en quesos mediante la herramienta Risk Ranger, se pudo comprobar que ésta es una herramienta válida y que puede tener interés tanto a nivel industrial como para las autoridades sanitarias, para llevar a cabo una priorización y distribución de recursos en una acción de gestión. Destacar que los resultados obtenidos son compatibles con aquellos que provienen de estudios epidemiológicos.

El riesgo de intoxicación por *S. aureus* en queso se evaluó según el origen de la leche, siendo el queso de oveja el de mayor riesgo frente al de vaca y cabra.

Existen dos factores fundamentales que influyen en mayor o menor medida en el crecimiento del *S. aureus* en queso. En primer lugar la temperatura, un simple aumento de 2°C (de 10°C a 12°C) implica una duplicación del crecimiento *S.aureus* y por tanto de su toxina. Otro factor a considerar es el contenido en sal. Se ha observado que su efecto depende de la carga inicial, creciendo más rápidamente el patógeno en medios con cargas iniciales bajas (10^2 ufc) y con bajo contenido en sal.

Por último, resaltar la importancia de la manipulación de alimentos en el hogar. La contaminación cruzada supone un aumento en el riesgo, pues la exposición de la población a ese alimento que se ha contaminado es del 100%. Por ello, son fundamentales unas buenas prácticas de higiene y manipulación de alimentos en el hogar.

Agradecimientos

Agradecer al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) y a la industria láctea ALPINA, por facilitar los recursos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

5. REFERENCIAS

- Álvarez, M., Dómenech, E., Botella, S., 2013. El papel del consumidor en la transferencia de *Listeria* por contaminación cruzada en el hogar. Trabajo fin de máster. Universidad Politécnica de Valencia. Dirección URL: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/33765/Maria-TFM-1jl_2.pdf?sequence=1>. [Consulta: 14 Mayo. 2015].
- Bhatia, A., Zahoor, S., 2007. Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A Review. JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH 3, 188-197.
- Buendía Monreal Manuel, González Rodríguez Vanessa, Mendoza Márquez Ana M., Muñoz Hernández J. Enrique, Reyes Díaz C. Alejandra.,2011. Queso fresco. Universidad Autónoma de Méjico. Dirección URL: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TEMA3.QUESO_2832.pdf> [Consulta:20 Mayo. 2015].
- Cortimiglia, C., Bianchini, V., Franco, A., Caprioli, A., Battisti, A., Colombo, L., Stradiotto, K., Vezzoli, F., Luini, M., 2015. Short communication: Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy. Journal of Dairy Science 98, 2307-2311.
- EFSA, 2003. Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. EFSA, 1-73.
- EFSA, 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA J. 2090, 1-378.
- EFSA, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010 EFSA J. 2597, 1-442.
- EFSA, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011 EFSA J. 3129, 1-250.
- EFSA, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012 EFSA J. 3547, 1-312.
- EFSA, 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 EFSA J. 3991, 1-162.
- EFSA, 2015b. Scientific Opinion on the development of a risk ranking toolbox for the EFSA BIOHAZ Panel. EFSA, J. 3939.
- FDA, 2012. Bad Bug Book-Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 1-292.
- Food Safety Government New Zeland, Mayo 2001. Staphylococcus aureus. Dirección URL: <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Staphylococcus_Aureus-Science_Research.pdf> [Consulta: 16 Abril. 2015]
- Hummerjohann, J., Naskova, J., Baumgartner, A., Graber, H.U., 2014. Enterotoxin-producing Staphylococcus aureus genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. Journal of Dairy Science 97, 1305-1312.
- James, S.J., Evans, J., James, C., 2008. A review of the performance of domestic refrigerators. Journal of Food Engineering 87, 2-10.
- Kim, H.J., Griffiths, M.W., Fazil, A.M., Lammerding, A.M., 2009. Probabilistic Risk Model for Staphylococcal Intoxication from Pork-Based Food Dishes Prepared in Food Service Establishments in Korea. Journal of Food Protection 72, 1897-1908.
- Linage, B., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., García-Lopez, M.L., Santos, J.A., 2012. Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. Journal of Dairy Science 95, 1639-1644.
- Orden DES/83/2009, de 4 de diciembre, por la que se aprueba la norma técnica para el uso de la marca de garantía CC Calidad Controlada en el queso de oveja curado.
- Perez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E.C.D., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2007. Modeling transfer of Escherichia coli O157 : H7 and Staphylococcus aureus during slicing of a cooked meat product. Meat Science 76, 692-699.
- REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

REGLAMENTO (CE) nº 1924/2006 de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos.

Ross, T., Sumner, J., 2002. A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. *International Journal of Food Microbiology* 77, 39-53.

Sistema Europeo de Estadísticas, 2015. Dirección URL: <<http://ec.europa.eu/eurostat>>