Cuba Salud
IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

Análisis de Riesgo Cuantitativo de enterototoxinas de *Staphylococcus aureus* en queso fresco artesanal con enfoque UNA SALUD

Ailin Martínez Vasallo[1]
Nivian Montes de Oca[1]
Dianys Remón Díaz[1]
René Tejedor Arias [2]

[1]Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria/Departamento Salud Animal, Mayabeque, Cuba, ailin@censa.edu.cu
[2]Instituto de Farmacia y Alimentos/Departamento Alimentos, La Habana, Cuba, tejedor@ifal.edu.cu

Resumen: La inocuidad de los alimentos es una prioridad en el enfoque Una Salud para la prevención de los riesgos en toda la cadena de producción de "la granja al plato", por la necesaria cooperación entre los diferentes sectores que intervienen en la misma. Los quesos elaborados con leche sin pasteurizar son una fuente potencial de transmisión de microorganismos patógenos. En Cuba una importante proporción del queso fresco artesanal es vendido en el mercado informal, estas ventas representan una amenaza para la salud pública. Diferentes estudios reportan la contaminación con *S. aureus* en los quesos frescos. El estudio de caso se realizó para estimar el riesgo de intoxicación por consumo de queso fresco artesanal contaminado con enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. El modelo fue construido acorde con la metodología de Análisis de Riesgos Cuantitativo recomendada por el *Codex Alimentarius*, comprendió la evaluación de la contaminación inicial durante el proceso de fabricación del queso, el crecimiento durante el almacenamiento y la dosis respuesta después del consumo. El programa @Risk versión 7.5 (Palisade, USA) se utilizó para correr las simulaciones Monte Carlo, se ejecutaron 1000 iteraciones. Para determinar la incertidumbre de la prevalencia de *S. aureus* enterotoxigénico se utilizaron 95 muestras de quesos. El modelo predijo que en el 51,7 % de los casos, los consumidores se encuentran expuestos a una dosis mínima de enterotoxinas de *S. aureus*, mientras que el 46,9 % tiene riesgo de enfermar por esta causa.

Palabras clave: queso fresco artesanal, inocuidad, salud pública, Una Salud

I.

I. INTRODUCCIÓN

La leche y los productos lácteos se encuentran entre los alimentos más producidos y valiosos desde el punto de vista nutricional a nivel mundial (1), ocupan el tercer lugar en cuanto a volúmenes de producción y constituyen el principal producto agrícola en términos de valor agregado en todo el mundo (27 % en el caso del ganado y el 10 % del sector agropecuario) (2). Estos productos se encuentran entre los alimentos más importantes y necesarios en la cadena alimentaria (1), principalmente para sectores vulnerables como los niños, enfermos y ancianos, lo que condiciona una vigilancia especial de la calidad e inocuidad de estos productos.

La salud de las personas se encuentra vinculada a la sanidad de los animales, de las plantas y al medio ambiente. Los microorganismos patógenos transmisibles a través de los alimentos, el aguay el medio ambiente tienen un impacto en la salud pública y el bienestar socioeconómico. La creciente preocupación de la población por la inocuidad de los alimentos, la aparición de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) ha contribuido a la toma de conciencia de la estrecha interacción entre la salud humana, la sanidad animal, vegetal y el medio ambiente. Esto ha conducido al desarrollo del concepto de "Una Salud", cuyo objetivo es abordar los problemas sanitarios de forma holística (3).Las enfermedades humanas, de los animales y las plagas de las plantas limitan la eficiencia de los sistemas alimentarios; aumentan los costos de producción, dada la necesidad de introducir medidas de control y prevención y reducen la productividad de los trabajadores agropecuarios.

Se reconoce que el consumo de leche cruda y derivados lácteos constituye un factor de riesgo de infección o intoxicación con microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, principalmente *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Listeria monocytogenes* (4). En los países industrializados, los brotes de ETA causadas por derivados lácteos, se encuentran entre el 2 y el 6% (5,6), mientras que en los países subdesarrollados se informan valores desde el 1 % hasta el 10% (7). En el 2013, Cuba, informó que los principales patógenos asociados abrotes de ETA fueron: *E. coli* (25 %), *Staphylococcus* (19,7 %) y *C. perfringens* (18,4 %). En el 17 % de los brotes estudiados se determinó la presencia de dos microorganismos, las principales combinaciones de bacterias fueron: *Staphylococcus/Salmonella, Staphylococcus/B. cereus, B. cereus/Salmonella* spp. (8).

Particularmente, *S. aureus* es de los peligros bacterianos más identificados en los brotes ETA y de mayor preocupación en cuanto a la inocuidad alimentaria (9, 10). *S. aureus*, es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, responsable de la mayoría de las intoxicaciones alimentarias a nivel mundial por su ubicuidad y habilidad de persistir y crecer bajo diferentes condiciones. Puede sobrevivir y multiplicarse en diferentes matrices de alimentos, en un amplio rango de temperatura (7-48°C), pH (4,5-9,3) y actividad de agua (0,83-0,99) (11).

La evaluación de riesgos requiere un enfoque holístico de la inocuidad alimentaria, es el marco bajo el cual se puede organizar toda la información sobre seguridad alimentaria para proteger la salud pública. La evaluación de riesgos incluye la identificación de peligros, la evaluación tanto de la exposición como de la respuesta a la dosis, y la caracterización del riesgo (12). Los resultados de la evaluación cuantitativa de riesgos microbianos se pueden utilizar en el desarrollo de estrategias con base científica para gestionar los riesgos y salvaguardar la salud pública (13).

En Cuba, existe la venta de queso fresco artesanal en el mercado informal como en otros países en vías de desarrollo. El queso fresco artesanal cubano tiene una alta humedad (76,6 ± 5,7), pH alrededor de 5,25 ± 0,1 y una vida útil máxima de siete días en refrigeración (14). Diferentes estudios informan contaminaciones con *S. aureus* en quesos frescos artesanales desde 3 hasta 6,8 log ufc/g (15,16,17,18).

Sin embargo, son limitados los estudios que conduzcan a la evaluación de la exposición de los microorganismos patógenos en la leche y los derivados lácteos, así como las probabilidades asociadas del riesgo de enfermar.

II. MÉTODO

Análisis de Riesgo Cuantitativo de enterotoxinas *de S. aureus* en queso fresco artesanal.

Se empleó una distribución RiskBeta para describir la incertidumbre sobre la prevalencia de *S. aureus* en el queso fresco artesanal. La proporción de *S. aureus* enterotoxigénico se determinó mediante la distribución RiskPerk, utilizando los datos descritos por Kim *et al*. (19), (25 % como mínimo, 52,6 % como más probable y 73 % como máximo. Se utilizaron los datos de los resultados del recuento de *Staphylococcus aureus* de 95 muestras de queso fresco artesanal para estimar la mejor distribución de los datos mediante el programa @Risk.

Para determinar el crecimiento de *S. aureus* en los quesos frescos artesanales durante la venta en el mercado informal, se tuvieron en cuenta las temperaturas mínimas y máximas en Cuba tomadas de los datos del Instituto de Meteorología de Cuba en el año 2016 (20). Las temperaturas reportadas fueron 21°C como mínima y 30°C como máxima. Para predecir el crecimiento mínimo y máximo de *S. aureus* en función de la temperatura y el tiempo de venta se empleó el modelo Combase (21). El incremento en el número de células de *S. aureus* durante la venta con variabilidad se calculó mediante la distribución RiskUniform.

Para predecir la concentración logarítmica por hora, se empleó el modelo Combase, se usaron condiciones estáticas de temperatura y tiempo (mínimo y máximo). En el caso de la temperatura de los refrigeradores se realizó la medición en 30 hogares durante un mes, en la parte superior derecha de los mismos. El incremento en el número de células de *S. aureus* durante la venta con variabilidad se calculó utilizando la distribución RiskUniform.

La variable enterotoxina de *S. aureus* (SE) (Tox), como ng/g, se calculó a partir de la ecuación obtenida por Kim *et al*.(19):

Tox = 10 ^ Ptox X (0,9300751 X número de células (log ufc/g)-6,662092)

Para los microorganismos toxigénicos, la relación de dosis-respuesta son esencialmente las de un producto químico (toxina), es decir, un modelo umbral (22). Para esta evaluación de riesgos se empleó una Distribución RiskUniform para la evaluación de la relación dosis-respuesta con un valor mínimo de 20 ng y un valor máximo de 100 ng de SE, según Soejima et al. (23). Los datos del tamaño de la porción se determinaron a través de una encuesta de consumo realizada a 30 personas, se tomaron los datos de 50 g como mínimo, 100g como más probable y 150g como máximo, se utilizó la distribución RiskPert. La exposición por porción se calculó por multiplicación de la dosis de enterotoxinas en el momento del consumo por la exposición por porción. El riesgo de la enfermedad por porción se obtuvo dividiendo la exposición por porción entela dosis-respuesta.

La integración de los pasos: identificación del peligro, caracterización del peligro y evaluación de la exposición permitió caracterizar cuantitativamente el riesgo, mediante la aplicación del programa @Risk, versión 7.5 (Palisade, USA); con el fin de obtener una estimación cualitativa y cuantitativa de la probabilidad y gravedad de la exposición por porción, el riesgo de enfermar por porción, así como los efectos adversos para la salud de los consumidores.

III. RESULTADOS

La concentración inicial en el proceso de fabricación de queso estuvo condicionada por el nivel de contaminación con *S. aureus* y su prevalencia en el queso fresco artesanal. Se tuvo en cuenta el estudio realizado en 95 muestras de queso fresco artesanal, el cual evidenció que todas las muestras resultaron positivas a *S. aureus*, por encima del límite de detección teórico del método analítico, 100 ufc/g. La distribución de los datos de los conteos de *S. aureus* en las muestras de queso fresco artesanal mediante el software @Risk se muestran en la **Figura 1**.

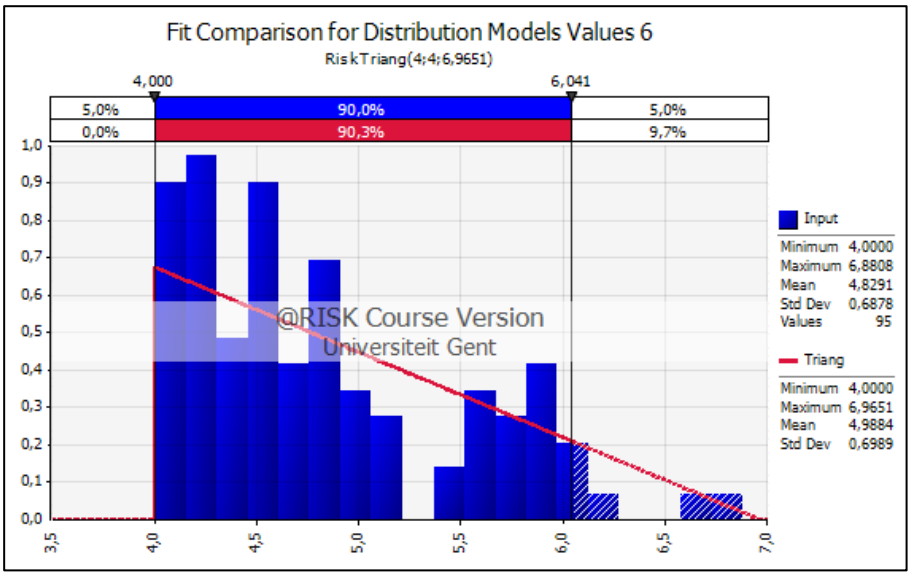


Figura 1. Ajuste de la distribución para los resultados de los recuentos de *S. aureus* en 95 muestras de queso fresco artesanal

La contaminación de la leche y los derivados lácteos puede ocurrir durante el proceso de obtención, producción y manipulación. La producción poco higiénica del queso, también favorece que este producto se contamine con esta bacteria patógena (24). Una vez que la leche está contaminada, las SE pueden producirse cuando la leche no se enfría rápidamente o no se pasteuriza de manera eficiente (25).

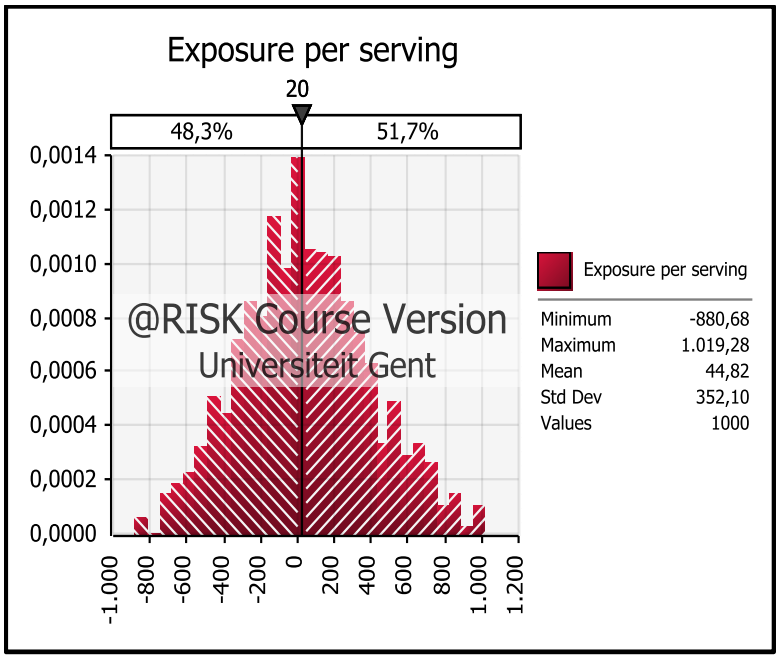
La presencia de *S. aureus* enterotoxigénico y sus enterotoxinas se identifican con frecuencia en leche cruda y quesos elaborados a partir de leche sin pasteurizar (24). Las SE pueden ser producidas cuando la fermentación es retardada debido a la falta de adición de cultivo sin iniciadores o cuando *S. aureus* se encuentra presente en la leche en concentraciones superiores a 10^4-10^5 ufc/mL antes que el pH disminuya a niveles inhibitorios en la producción de queso (26).

En la **Figura 2** se muestra la distribución de frecuencia de las enterotoxinas de *S. aureus* en el queso fresco artesanal en el momento del consumo.

Los resultados de la simulación Monte Carlo mostraron que en el 51,7 % de la población se encuentra expuesta a una dosis de 20 ng/porción o más, con un valor promedio de 44,2 ng/porción, en un rango entre 0 y 1,0 µg/porción. Por debajo del percentil P48 %, la población no se encuentra expuesta a la dosis mínima de 20 ng/porción de enterotoxina de *S. aureus* por consumo de queso fresco artesanal. Sin embargo, el resto de la población que se encuentra por encima del percentil P48 %, es decir, el 52 % están expuestos a dosis riesgosas de enterotoxinas de *S. aureus*.

La probabilidad de riesgos de enfermar por una exposición a enterotoxina de *S. aureus* resultó en aproximadamente 52 000 enfermos por cada 100 000 consumidores de queso fresco artesanal. El riesgo de exposición a SE depende directamente de la dosis que se considera tóxica. La dosis tóxica se determina a partir de estudios clínicos y epidemiológicos, puede variar entre la población y los grupos de edades (27).

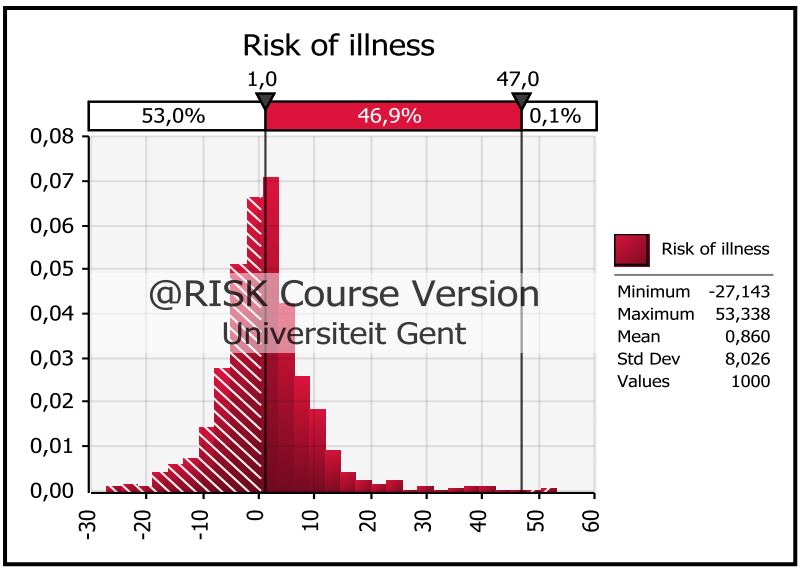
Heidinger*et al.* (27) consideraron una dosis tóxica de SEA de 94 ng, basada en un brote de intoxicación alimentaria por estafilococos que involucró leche con chocolate que se produjo en los Estados Unidos de América. Estos autores utilizaron los modelos ComBase, PMP y @Risk, encontraron que esta dosis puede ser excedida en el percentil 99,99 después del consumo de leche cruda por la población estadounidense. Concluyeron que las porciones de leche cruda no representan un riesgo significativo de intoxicación por SEA.



Valores en el eje de X corresponden a ng de enterotoxina por porción

Figura 2. Distribución de frecuencia de enterotoxinas de *S. aureus* en el queso fresco artesanal en el momento de consumo

La **Figura 3** muestra el riesgo de enfermar por el consumo de enterotoxinas de *S. aureus* en el queso fresco artesanal.



Valores en el eje de X corresponden a ng de enterotoxina por porción

Figura 3. Distribución de frecuencia de riesgos de enfermar por enterotoxinas de *S. aureus* en el queso fresco artesanal en el momento de consumo

En este estudio, la estimación del riesgo de enfermar por el consumo de enterotoxinas de *S. aureus* resultó ≥ 1; el modelo de predicción indicó que el 46,9 % de las personas corren riesgos de ingerir la dosis de 20 ng, que es la dosis mínima para causar la enfermedad. A partir de la distribución del riesgo, el 5 % de las personas que no están expuestas al riesgo puede ser explicado por su sistema inmunológico. Lindqvist*et al.* (28) realizaron una evaluación microbiológica de riesgo cuantitativo de *S. aureus* en quesos no madurados a partir de leche cruda. Esta investigación demostró que los niveles estimados de *S. aureus* en el queso estaban por debajo del umbral, mientras que estaban por encima en la simulación del peor de los escenarios posible.

Estos resultados indican la importancia de las buenas prácticas de fabricación y las condiciones de almacenamiento adecuadas en el punto de venta del queso fresco artesanal. Las inspecciones en las fincas de producción de queso y los puntos de venta por parte de las autoridades de salud, seguidas de acciones legales, cuando sea necesario, son esenciales para garantizar que los productos estén disponibles para los consumidores en buenas condiciones sanitarias.

IV. CONCLUSIONES

El 51,7 % de las personas consumidoras de queso fresco artesanal se encuentra expuesto a una dosis mínima de enterotoxinas estafilocócicas; el riesgo de enfermedad por consumir ese producto contaminado es de un 46,9 %.

REFERENCIAS

1. Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, &Jaspal MH. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge, *Lipids in Health and Dis.* 2019; 18(41). https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8.
2. Bhat R, Di Pasquale J, Bánkuti FI; SiqueiraTTdS, Shine P, Murphy M.D. Global Dairy Sector: Trends, Prospects, and Challenges. *Sustainability.* 2022; 14 4193. https://doi.org/10.3390/su14074193.
3. Organización Mundial de la Salud. El enfoque multisectorial de la OMS «Una salud». OMS. 2020 [acceso 29/01/2021]. Disponible en: https://www.who.int/features/qa/one-health/es/
4. Pierezan MD, Maran BM, Maran EM, Verruck S, Pimentel TC, da Cruz AG. Relevant safety aspects of raw milk for dairy foods processing. *Adv Food Nutr Res*. 2022; 100:211-264. doi: 10.1016/bs.afnr.2022.01.001. Epub 2022 May 24. PMID: 35659353.
5. Lahuerta A, Westrell T, Takkinen J, Boelaert F, Rizzi V, Helwigh B, et al. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. Eurosurveillance (Online Edition). 2011;16(13):5-8.
6. Claeys WL, Cardoen S, Daube G, De Block J, Dewettinck K, Dierick K, et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*. 2013;31(1):251-62.
7. Mossel D, editor Water and micro-organisms in foods—a synthesis. Water Relations of Foods: Proceedings of an International Symposium held in Glasgow, September 1974; 2012: Elsevier.
8. Puig Y, Leyva V, Robert BA, Pérez Y. Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana, 2006-2010. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2013;51(1):74-83.
9. Fetsch A, and Johler S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Curr. Clin. Microbiol*. 2018; 5 88–96. doi: 10.1007/s40588-018-0094-x.
10. Costard S, Espejo L, Groenendaal H, &Zagmutt FJ. Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. *Emerging infectious diseases*, 2017; *23*(6), 957.
11. ICMSF. (2018). Guidance on Microbiological Sampling and Testing for Key Commodities. International Comission on Microbiological Specification for Foods., 1-32.
12. Oscar TP. Plenary lecture: Innovative modeling approaches applicable to risk assessments. *Food* Microbiology, 2011; 28, 777-781.
13. Oscar TP. A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens. FoodMicrobiology, 2004; 231-247.
14. Martínez A, Ribot A, Riverón Y, Remón D, Martínez YA, Jacsens L, &Uyttendaele M. *Staphylococcus aureus* in the production chain of artisan fresh cheese. *Rev Salud Anim*, 2019; 41(1), 1-9.
15. Martínez A, Villoch A, Ribot A, & Ponce P. Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. *Revista de Salud Animal*, 2013; *35*(3) 210-213.
16. Martínez A, Montes de Oca N, &Villoch A. Determinación de indicadores sanitarios en quesos artesanales. *Revista de Salud Animal*, 2016; *38*(1) 64-66.
17. Martínez A, Montes de Oca N, Armenteros M, Uffo O, Riverón Y, González D, ... &Villoch A. Identification of bacterial hazards in the production of artisan fresh cheese in Cuba. *Journal of Dairy Research*, 2020; *87*(2), 263-265.

18. Flores Y, Armenteros M, Riverón Y, Remón D, & Martínez A. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de los quesos frescos artesanales de la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Salud Animal*, 2020; *42*(2).
19. Kim HJ, Griffiths MW, Fazil AM, Lammerding AM. Probabilistic risk model for *staphylococcal* intoxication from pork-based food dishes prepared in food service establishments in Korea. *Journal of Food Protection,* 2009; 72(9):1897-1908.
20. ComBase (2016). A combined database for predictive microbiology. http://www. combase.cc/index.php/en/ AccessedonAugust2016.
21. Meteorology Institute of Cuba.Annual report 100, Cuba.
22. Buchanan RL, Smith JL & Long W. Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. Int J Food Microbiol; 2000; 58:159-72; PMID:10939266; http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00270-1.
23. Soejima T, Nagao E, Yano Y, Yamagata H, Kagi H, et al. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *Int J Food Microbiol*, 2007; 115(1): 29-34.
24. Hummerjohann J, Naskova J, Baumgartner A, Graber H. Enterotoxin-producing Staphylococcus aureus genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. J. Dairy Science, 2014; 97 (3): 1305-1312.
25. Nunez M &Calda E Preliminary Quantitative Microbial Risk Assessment for Staphylococcus enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. Food Control, 2017; 73: 524-531.
26. Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Unveiling Staphylococcus aureus enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Science & Technology, 2011; 91(2):127-150.
27. Heidinger JC, Winter CK, Cullor JS. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus*enteroxon A in raw milk. *J Food Prot*, 2009; 72(8): 1641-1653.
28. Lindqvist R, Sylvén S, Vågsholm I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol*, 2002; 78(1–2): 155-170.