



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*Instituto de Estudios de Posgrado*



## **Máster Universitario en Salud Pública Veterinaria**

Campus Internacional Agroalimentario ceiA3

### **Trabajo Fin de Máster**

Trabajo de investigación

## **Modelo predictivo de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en productos lácteos**

Predictive model of the growth of *Staphylococcus aureus* in diary products

Autor/a: Carlota Lara Maldonado

Director/a: Rosa María García Gimeno

Codirector/a: Arícia Mara Melo Possas

Firma del autor/a

07/09/2022



**DOCUMENTO 7. INFORME DEL DIRECTOR PARA LA DEFENSA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER**

*El tutor/Director del TFM deberá dar su visto bueno para que el trabajo pueda ser defendido. Si el trabajo ha sido cotutelado por un segundo director este informe deberá presentarse por duplicado.*

D. Rosa María García Gimeno profesora del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y Arícia Mara Melo Possas, codirectora del trabajo presentado por D. Carlota Lara Maldonado, NIF -----, bajo el Título “Modelo predictivo de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en productos lácteos”.

**INFORMA**

Que el trabajo presentado Si  No  Reúne los requisitos para su lectura y defensa, estando adaptado en contenido, profundidad y duración a la asignación de créditos ECTS del Plan de Estudios del Máster en Salud Pública Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

En Córdoba, a 7 de septiembre de 2022

Fdo: \_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	6
Introducción.....	7
Objetivos e Hipótesis.....	12
Material y Métodos.....	13
Material.....	13
Métodos .....	14
Elaboración del modelo predictivo de <i>S. aureus</i> .....	14
Diseño experimental .....	14
Preparación del inóculo .....	14
Preparación de las condiciones.....	15
Elaboración de la recta de calibrado.....	15
Obtención de las curvas de crecimiento .....	16
Ajuste del modelo primario de crecimiento a datos .....	17
Ajuste del modelo secundario a los parámetros cinéticos de crecimiento .....	17
Validación del modelo predictivo de crecimiento a <i>S. aureus</i> .....	18
Resultado y Discusión .....	19
Evaluación y modelización del crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	19
Validación del modelo de crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	25

Calibración del modelo de crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	26
Implementación del modelo en MicroHibro .....	27
Limitaciones .....	29
Conclusiones.....	30
Bibliografía.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Captura de pantalla del software DMFit, utilizado para el ajuste del modelo de Baranyi para las curvas del modelo .....	20
Figura 2. Modelo de Ratkowsky (línea recta) para temperatura ajustado a la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento. <i>S. aureus</i> en queso .....	24
Figura 3. . Línea de equivalencia entre los valores observados y los valores predichos por el modelo “corregido” .....	27
Figura 4. Predicciones de crecimiento y producción de toxinas de <i>S. aureus</i> en queso para distintas temperaturas (rojo: 10°C; azul: 17°C; amarillo: 24°C; verde: 30°C).....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Brotes alimentarios producidos por <i>S. aureus</i> y relacionados con distintos tipos de quesos .....	9
Tabla 2. Parámetros de Bioscreen C para obtener las curvas de crecimiento .....	16
Tabla 3. Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i> a diferentes temperaturas y concentraciones de sal.....	20
Tabla 4. Factores y rangos que influyen en el crecimiento de <i>S. aureus</i> en quesos.....	22
Tabla 5. Tasas de crecimiento (log UFC/h) de <i>S. aureus</i> en queso determinadas por el modelo predictivo de ComBase para determinadas combinaciones de temperatura y concentración de sal.....	23
Tabla 6. Valores utilizados para el cálculo de $B_f$ y $A_f$ .....	25

## RESUMEN

En este estudio se ha determinado el efecto combinado que ejercen la temperatura (10; 17; 24; 30°C) y la concentración de sal (0; 1,5; 3; 4%) sobre el comportamiento de *Staphylococcus aureus* en quesos. Para ello, se han obtenido los datos por absorbancia en el BioScreen C a partir del cultivo de la cepa 534 en caldo M-17 y las curvas de crecimiento para cada condición mediante introducción de los datos en el software informático ComBase. Seguidamente, se ajustó el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) y, tras esto, se ajustó el modelo secundario de Ratkowsky a los datos para obtener la ecuación que nos predice el comportamiento de *S. aureus* en función de la temperatura ( $\sqrt{\mu_{max}} = 0,0153 (T - 2,37)$ ). A mayor temperatura, para una misma concentración inicial de patógeno, más rápido fue el crecimiento de *S. aureus* en quesos. Por su lado, la concentración de sal en el rango estudiado no influyó en este crecimiento. El modelo elaborado a partir de las observaciones de este estudio se ha validado mediante el cálculo del  $R^2$  (0,9366), el RMSE (0,0194), el  $B_f$  (1,38) y el  $A_f$  (1,38). Además, se ha aplicado un factor de corrección de 0,81 estimado por el calibrado para evitar la sobreestimación que predecían los índices de validación. Este modelo se ha publicado en MicroHibro para hacerlo accesible a toda persona interesada.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*; temperatura; concentración de sal; microbiología predictiva.

**ABSTRACT**

In this study, it has been determined the combined effect exerted by temperature (10; 17; 24; 30°C) and salt concentration (0; 1.5; 3; 4%) on the behavior of *Staphylococcus aureus* in cheese. For this, the absorbance data in BioScreen C from the culture of strain 534 in M-17 broth and the growth curves for each condition were obtained by entering the data in the ComBase computer software. Next, the primary model of Baranyi and Roberts (1994) and, after this, the secondary model of Ratkowsky were fitted to the data to obtain the equation that predicts the behavior of *S. aureus* as a function of temperature ( $\sqrt{\mu_{max}} = 0,0153 (T - 2,37)$ ). The higher the temperature, for the same initial pathogen concentration, the faster the growth of *S. aureus* in cheese. On the other hand, the concentration of salt in the range studied does not influence this growth. The model developed from the observations of this study has been validated by calculating the  $R^2$  (0.9366), the RMSE (0.0194), the  $B_f$  (1.38) and the  $A_f$  (1.38). In addition, a correction factor of 0.81 estimated by calibration has been applied to avoid the overestimation predicted by the validation indices. This model has been published on MicroHibro to make it accessible to anyone interested.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; temperature; salt concentration; predictive microbiology

## INTRODUCCIÓN

Anualmente se producen en el mundo unos 20 millones de toneladas de queso, una cifra que ha aumentado cerca del 4% cada año desde hace 30 años (Barrientos & Soria, 2020). La producción de queso en España es muy elevada, llegando a cerca de 465.000 toneladas anuales, lo cual representa alrededor de un 4% de la producción total de la Unión Europea. La producción láctea en España proviene principalmente del ganado bovino, ovino y caprino; siendo nuestros quesos producidos a partir de la leche de estos animales. Especial importancia tiene en nuestro país el queso puro de vaca, seguido muy de cerca del queso de mezcla de distintas leches (Sanz, 2017).

El queso es un producto que se encuentra en la mayoría de hogares españoles, siendo consumido en casi todos ellos de forma diaria o al menos semanal. Aunque el consumo de este producto en nuestro país (8 kg por persona en 2017) está bastante lejos de la media en la Unión Europea (17 kg por persona y año), la tendencia es creciente y cada vez más el queso ocupa un papel importante no sólo en nuestros hogares sino también en la restauración. Al mayor reconocimiento de este producto ha contribuido, sin duda, la elevada calidad de los quesos que se producen en España, muchos de ellos bajo una marca de calidad reconocida (Sanz, 2017); como el queso Idiazábal, la Torta del Casar o el Queso de Tetilla, todos ellos con Denominación de Origen (Santamaría, 2020).

Nutricionalmente, el queso aporta una elevada cantidad de proteína de alta calidad (incluyendo aminoácidos esenciales), vitaminas y minerales. Los hidratos de carbono son escasos, y el contenido en grasa varía en función del tipo y grado de maduración. Esto es, el queso tiene concentrados los mismos nutrientes que aporta la leche. Es por esto que los nutricionistas recomiendan el consumo de queso, especialmente en la infancia. Los nutrientes que aporta el queso favorecen la formación de los huesos durante el crecimiento de los niños, además de ser muy convenientes para conservar la masa ósea en los adultos (Quirón Salud, 2016).

Se estima que la leche, al salir de la ubre, contiene menos de  $5 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Esta cantidad se ve aún más reducida por el posterior enfriamiento de la leche, sus condiciones de almacenamiento y el proceso de pasteurización al que generalmente se somete este producto. El objetivo de la pasteurización es eliminar los microorganismos patógenos o alterantes que pueda haber en la leche. Sin

embargo, algunos quesos como el Idiazábal se elaboran con leche cruda (Beresford & Williams, 2004).

El queso, al tratarse de un producto en que se puede producir fermentación, gracias tanto a la microflora natural como a los cultivos iniciadores que se le añaden, puede llegar a alcanzar concentraciones de  $10^9$  UFC/g. El riesgo de presencia de patógenos aparece cuando se producen malas prácticas higiénicas en la manipulación de las materias primas, como es el caso de *Staphylococcus aureus*. Según la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (2006), la enfermedad alimentaria producida por *S. aureus* es un problema de salud pública en el mundo; al igual que las producidas por los demás patógenos alimentarios.

*S. aureus* son cocos gram positivos, anaerobios facultativos, que crecen a una temperatura óptima de 37°C. De la familia *Micrococcaceae*, se distinguen de otros estafilococos porque tienen las enzimas coagulasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa. Además, producen dos exotoxinas: la hemolisina y la enterotoxina (Murray et al., 2009). Esta bacteria se encuentra en el ambiente, aire, agua y alimentos; especialmente en derivados lácteos y embutidos (ELIKA, 2013). Se caracteriza por ser una bacteria muy resistente en condiciones extremas, como elevadas concentraciones de sal. Sus toxinas son termoresistentes, siendo muy difícil eliminarlas del alimento una vez han sido formadas y son las responsables de producir la enfermedad en el hombre. Su presencia en los alimentos está regulada en la UE por el Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

A pesar de que la prevalencia de intoxicación estafilocócica en Europa es baja (de 0,06 casos/ 100.000 habitantes, según datos de la EFSA (2017)); esta bacteria es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis en el mundo (Soriano et al., 2002). En Estados Unidos hubo más de 200.000 casos de intoxicación estafilocócica en 2006, falleciendo 6 de ellos (Scallan et al., 2011). Con respecto a Europa, en 2014 hubo un brote en un internado en el que las 14 personas que comieron un queso contaminado contrajeron la enfermedad (Johler et al., 2015). En Andalucía, en un estudio se describió de los 24 quesos artesanales de la zona estudiados, 19 resultaron positivos a la presencia de *S. aureus*, suponiendo estos un peligro en caso de ser consumidos (Medeiros et al., 2019).

Existen muchos otros casos de brotes producidos por intoxicación con *S. aureus* al comer queso alrededor del mundo, que se han ido sucediendo a lo largo del tiempo y que han

llegado a afectar a cientos de personas (Kousta et al., 2010). Destaca un brote en Suiza en el año 1985 que produjo 215 muertes. La causa de este brote estuvo en el consumo de una especialidad de queso blando de Suiza, el Vacherin Mont-d'Or, que se elabora a partir de leche cruda (Anónimo, 1986). Otros brotes similares sucedidos en otros países del mundo se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Brote alimentarios producidos por *S. aureus* y relacionados con distintos tipos de quesos.

Tipo de queso	Nº de casos (muertes)	Año	País	Referencia
<b>Queso elaborado con leche pasteurizada</b>	16	1981	Estados Unidos	Altekruse et al. (1998)
<b>Queso de oveja elaborado con leche cruda</b>	20	1983	Francia	De Buyser et al. (1985)
<b>Queso elaborado con leche pasteurizada</b>	2	1983	Inglaterra	Barrett (1986)
<b>Queso de oveja elaborado con leche cruda</b>	27	1984	Escocia	Bone et al. (1989)
<b>Queso blando elaborado con leche cruda</b>	215	1985	Suiza	Anónimo (1986)
<b>Queso <i>Stilton</i> elaborado con leche no pasteurizada</b>	155	1988	Inglaterra	Maguire et al. (1991)
<b>Queso elaborado con leche no especificada</b>	7	1994	Brasil	Pereira et al. (1996)

Condiciones desfavorables durante el almacenamiento o la preparación del alimento pueden dar lugar al crecimiento de *S. aureus*, con la consecuente producción de sus toxinas en el alimento (Todd et al., 2008). De forma general, la dosis de enterotoxinas en el alimento necesaria para que se produzca sintomatología clínica es  $\leq 1.0 \mu\text{g}$ , la cual se corresponde con una concentración de *S. aureus* en el alimento superior a  $10^5$  UFC/g (Notermans & Heuvelam, 1983).

La Microbiología Predictiva es una rama de la Microbiología de los Alimentos encargada de estimar de forma cuantitativa cómo se comportan los microorganismos en determinados ambientes alimentarios en función de los factores extrínsecos e intrínsecos que les afectan, proporcionando además modelos matemáticos que explican este comportamiento (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Con esta herramienta, se pueden estimar parámetros cinéticos como la velocidad máxima de crecimiento y la tasa de inactivación. Estos parámetros nos permiten describir la probabilidad de crecimiento, inactivación o supervivencia de los microorganismos en distintos tipos de alimentos (Martínez, 2021).

Tradicionalmente, los modelos de microbiología predictiva se clasifican en: primarios, secundarios y terciarios (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Los modelos primarios explican el comportamiento de los microorganismos en función del tiempo, con unas condiciones ambientales concretas. Los modelos secundarios explican los cambios que se dan en los parámetros cinéticos de crecimiento, sobrevivencia/inactivación (tasa de crecimiento, tiempo de latencia, tasa de inactivación, etc.) cuando cambian las condiciones ambientales (temperatura, pH, aw). Los modelos terciarios, por su parte, informatizan los anteriores de forma que se puedan aplicar directamente en herramientas o software de fácil uso (Martínez, 2021).

De especial importancia y utilidad son estos modelos predictivos matemáticos para asegurar el cumplimiento del Reglamento 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. La Microbiología Predictiva es una herramienta muy útil para los operadores económicos ya que les permite obtener predicciones de la respuesta microbiana en los alimentos en nuevas condiciones sin necesidad de realizar challenge test, y por lo tanto, aplicar medidas correctoras en caso de que se obtengan resultados insatisfactorios (Martínez, 2021).

En este trabajo se emplearán técnicas y herramientas de Microbiología Predictiva para conocer de qué forma influyen la temperatura y la concentración de sal en el crecimiento de *S. aureus* en un producto lácteo como el queso.

## OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

El objetivo general de este trabajo de investigación fue el estudio y la modelización del efecto de la temperatura de almacenamiento y de la concentración de sal sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar el crecimiento de *S. aureus* en medios con diferentes concentraciones de sal, bajo diferentes temperaturas de almacenamiento.
- Modelizar los datos de crecimiento de *S. aureus* en queso utilizando herramientas de microbiología predictiva.
- Validar y calibrar el modelo de crecimiento de *S. aureus* en queso, utilizando datos disponibles en la literatura científica.
- Implementar el modelo desarrollado en la herramienta informática de microbiología predictiva MichoHibro.

## HIPÓTESIS

¿Influye la sal sobre el comportamiento de *S. aureus* en el queso?

¿Influye la temperatura de almacenamiento sobre el comportamiento de *S. aureus* en el queso?

¿Son los modelos predictivos herramientas útiles para predecir el comportamiento microbiano en los quesos?

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material

- Aceite de parafina (Panreac, 141003)
- Agar Bacteriológico (Oxoid, L11)
- Agar Baird Parker (Oxoid, CM275)
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid CM361)
- Agua de peptona tamponada (Oxoid, CM509)
- Analizador Bioscreen C y software Biolink (Labsystem, Finlandia)
- Balanza de precisión, autoclave, baño termostático, frigorífico, mezclador Vortex, agitador magnético
- Cabina estéril por flujo laminar vertical CV-100 (Burdinola, Vizcaya)
- Caldo M-17 (Oxoid, CM0817)
- Caldo Triptona Soja (TSB, Oxoid CM129)
- Cámaras para incubación a 2.3, 6.5, 10, 13.5, 17.7 y 37°C
- Cepa nº 534 de *Staphylococcus aureus* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Universidad de Valencia)
- Cloruro sódico (Panreac 121659)
- Contador de colonias Digital-S 5905000 (Comecta, Barcelona)
- Emulsión de yema de huevo-telurito (Oxoid, SR054C)
- Filtros Whatman de 0,2 µm (Whatman International Ltd. Maidstone, Reino Unido)
- Material de vidrio diverso, asas de siembra, cajas de Petri desechables 90 × 15 mm, mechero Bunsen, pinzas y tijeras estériles
- Nitrito sódico (Panreac, 131703)
- pHmetro Crison Basic 20 (Alella, Barcelona)
- Pipetas graduables Nichiryo de 10-100 y 100-1000 µl (Tokyo, Japón)
- Placas Honeycomb multipocillos (Labsystem, Finlandia)
- Solución de ácido clorhídrico 5N (Panreac, 141019)
- Solución de hidróxido sódico 5N (Panreac, 182159)
- Solución Salina Fisiológica (0,85% NaCl)
- Stomacher 400 Seward (Reino Unido)

## 2. Métodos

### 2.1. Elaboración del modelo predictivo de crecimiento de *S. aureus*

#### 2.1.1. Diseño experimental

Se siguió un Diseño Factorial Completo (DFC) 2x4 donde se escogieron como variables más importantes la temperatura (°C) y la concentración de cloruro sódico (NaCl, %), para estudiar el efecto combinado de las mismas en el crecimiento de *S. aureus* en caldo de cultivo M-17 (Oxoid), mediante datos de absorbancia en el Bioscreen C (Labsystem). Se realizaron cinco réplicas para cada condición del diseño experimental para estimar la varianza experimental.

Los rangos de las variables estudiadas y la naturaleza de las sales se escogieron en función de los procesos seguidos por la industria quesera y comprendieron los siguientes valores:

Temperatura (°C): 10, 17, 24 y 30

Concentración de NaCl (%): 0; 1,5; 3 y 4,5 (m/v)

El límite inferior de temperatura estudiado se situó en 10°C, valor que se encuentra cercano a la temperatura mínima de crecimiento de *S. aureus*, con objeto de estudiar el efecto de la refrigeración en el crecimiento o supervivencia del microorganismo. El límite superior del DFC se situó en 30°C, con el fin de conocer el efecto de una elevación de la temperatura en el crecimiento de *S. aureus*. El rango estudiado en relación con la concentración de cloruro sódico es representativo de productos lácteos.

#### 2.1.2. Preparación del inóculo

La cepa utilizada en nuestro estudio fue *Staphylococcus aureus* 534, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, Universidad de Valencia). La cepa seleccionada presenta las siguientes características: colonias doradas en Triptona Soja Agar (TSA), no hemólisis, reacciones positivas al telurito, lecitinasa y coagulasa y DNasa. La reconstitución de la cepa de *S. aureus* liofilizada se ha realizado siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se ha conservado en criobolas comerciales a -20°C (Microbank™, Pro-LabDiagnostics, EEUU) hasta el momento de su utilización. Para llevar a cabo la reconstitución de la cepa, cada criobola fue transferida a un tubo de ensayo con 5 ml de caldo TSB, que se mantuvo en incubación durante 24 horas a 37°C (pH 7,3; sin NaCl

añadido). Se hicieron subcultivos durante tres días sucesivos, transfiriendo 100 µl de cultivo a 10 ml de TSB. El tercer subcultivo creció durante 18 horas a 37°C hasta alcanzar una fase estacionaria temprana, a partir del cual se realizaron las diluciones necesarias en Caldo M-17 para alcanzar un tamaño de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Paralelamente a partir de diluciones decimales seriadas en solución salina se sembraron placas de Agar Baird Parker que se incubaron a 37°C durante 24 horas para confirmar el tamaño del inóculo.

### **2.1.3. Preparación de las condiciones**

Para preparar las condiciones experimentales especificadas en el DFC, se añadió de 0 hasta 4,5% NaCl en frascos con 100 ml de Caldo M-17. Seguidamente se procedió a la esterilización en autoclave, a 121 °C durante 15 minutos. Se realizaron tantas series como temperaturas establecidas en el diseño y sus réplicas.

### **2.1.4. Elaboración de la recta de calibrado**

Para conocer la concentración de células (UFC/ml) que se corresponde con un cierto valor de absorbancia (OD) se confeccionó una recta de calibrado enfrentando lecturas de absorbancia frente a recuento en placa. Los valores de recuento en placa se determinaron a partir de una serie de diluciones de un cultivo en fase estacionaria temprana de *S. aureus*, incubado a 37°C durante 18 horas en Caldo-M17. Se realizó la siembra en superficie del microorganismo a partir de las diluciones seriadas en caldo TSB en placas de Agar Baird Parker, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Las medidas de densidad óptica se realizaron con ayuda del espectrofotómetro Bioscreen C, utilizando el filtro de 600 nm. Se realizaron series de diluciones en Caldo M-17 del inóculo para evitar lecturas cuya turbidez (muy elevada o demasiado baja) no fuera diferenciable por el equipo. Se dispusieron 250 µl de cada una de las diluciones por quintuplicado en los pocillos, para aceptar como válidos aquellos valores de densidad óptica en los que se observa una relación lineal entre absorbancia y concentración microbiana.

Los datos de recuento en placa, expresados como log<sub>10</sub> UFC/ml, se representaron gráficamente frente a los datos de absorbancia para la elaboración de la recta de calibración y para establecer el límite de detección del instrumento. La relación entre las medidas de absorbancia y los valores de recuento en placa se calculó a partir del coeficiente de correlación de Pearson.

### 2.1.5. Obtención de las curvas de crecimiento

En cada pocillo de las placas del Bioscreen C se transfirieron 200  $\mu$ l de medio Caldo M-17 estéril y 50  $\mu$ l de inóculo de *S. aureus* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/ml. Por cada combinación de factores (temperatura, NaCl) se efectuaron 5 réplicas. Además, en paralelo se colocaron pocillos controles con 250  $\mu$ l de medio sin inocular, que sirvieron como blanco y también para chequear la esterilidad del medio. Finalmente se obtuvieron 80 curvas de crecimiento.

El Bioscreen C es un espectrofotómetro que realiza lecturas verticales de un total de 200 muestras líquidas dispuestas en placas multipocillo. Mediante la ayuda del software Biolink, operando en MSDOS, los datos de absorbancia son procesados y los archivos se pueden transferir al programa Excel. El programa de trabajo llevado a cabo por el Bioscreen se ejecutó con las medidas mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de Bioscreen C para obtener las curvas de crecimiento (Elaboración propia).

Tipo de medida	Simple
Forma de medida	Cinética
Longitud de onda (nm)	600
Temperatura de incubación (°C)	Según el diseño experimental
Tiempo de precalentamiento (min)	10
Tiempo de medida (días)	2 – 20
Intervalo de tiempo entre medidas (min)	30
Intensidad de agitación	Media
Momento en que se realiza la agitación de placas multipocillo	Antes de la lectura
Tiempo de agitación (seg)	20

El crecimiento del microorganismo se manifiesta con un aumento de turbidez del medio Caldo M-17, a una velocidad que dependerá en cada caso de la condición experimental, a una temperatura de incubación fija. *S. aureus* describirá una curva de crecimiento de densidad óptica en función del tiempo.

## 2.2. Ajuste del modelo primario de crecimiento a los datos

Los valores de turbidez obtenidos y tras restarle el valor del blanco para cada tiempo se transformaron a recuentos microbianos por medio de las curvas de calibrado obtenidas previamente. Seguidamente se ajustó el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) a los valores de recuentos frente al tiempo con la ayuda de la herramienta DMFit, disponible online en <https://www.combase.cc/index.php/en/>, el cual nos permite obtener los principales parámetros cinéticos de crecimiento descritos por *S. aureus* bajo las diferentes condiciones estudiadas, junto con otros índices computacionales y estadísticos.

El principal parámetro cinético de crecimiento, denominado tasa o velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), es la tasa máxima potencial estimada por el ajuste del modelo. El parámetro de crecimiento denominado 'lag' denota la duración de la fase de adaptación tal y como se describe por Baranyi y Roberts (1994). El parámetro  $N_0$  ("initial value") es el punto inicial de la curva sigmoideal y el parámetro  $N_{max}$  ("final value") es la asíntota superior de la curva.

## 2.3. Ajuste del modelo secundario a los parámetros cinéticos de crecimiento

El efecto combinado de diferentes niveles de los factores ambientales, temperatura y concentración de cloruro sódico en el crecimiento de *S. aureus* se estudió en medio líquido Caldo M-17. Los datos de turbidez obtenidos con el Bioscreen C nos permitieron estimar los parámetros cinéticos principales, las tasas máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), con las que se elaboraron el modelo predictivo secundario de crecimiento de *S. aureus*.

Se comprobaron mediante análisis de varianza si existen o no diferencias significativas entre las condiciones ambientales estudiadas. Los parámetros cinéticos de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) estimados se relacionaron con los factores estudiados por medio de regresión lineal, ajustando el modelo secundario de Ratkowsky a los datos (Ecuación 1). El método de estimación de los parámetros de crecimiento es la minimización de los valores de los errores residuales, que es la diferencia entre los valores observados de la respuesta y los predichos estimados por el modelo.

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \times (T - T_{min}) \quad \text{Ec.1}$$

donde  $b$  es la pendiente de la recta y  $T_{min}$  es la temperatura mínima teórica de crecimiento de *S. aureus*.

La evaluación de la fiabilidad o bondad de ajuste de los modelos predictivos elaborados para describir las respuestas de crecimiento observadas se llevó a cabo por medio de representaciones gráficas y por índices matemáticos y estadísticos como son: la raíz del promedio del error cuadrado (RMSE) y el coeficiente de regresión múltiple ( $R^2$ ).

El  $R^2$  se emplea para evaluar modelos lineales, puesto que informa sobre el total de la variación de datos que se explica por el modelo ajustado (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Cuanto más cercano a 1 sea el valor de  $R^2$ , mejor es el ajuste del modelo a los datos.

El RMSE está definido por la siguiente fórmula:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (pred_i - obs_i)^2}{n}} \quad \text{Ec. 2}$$

donde *pred* son los valores de las tasas de crecimiento de *S. aureus* predichas por el modelo secundario y *obs* son los valores de tasas de crecimiento observadas o disponibles en la literatura.

Este es uno de los índices más utilizados para probar la bondad de ajuste de los modelos a los datos. RMSE es un índice válido para funciones matemáticas tanto lineales como no lineales (Ratkowsky 1983). Un valor bajo indica un buen ajuste de los datos que se obtienen al aplicar este modelo, al haber una baja diferencia entre los valores observados y los predichos por el modelo (Lee et al., 2015).

#### 2.4. Validación y calibración del modelo predictivo de *S. aureus*.

Para la validación y calibración del modelo predictivo, se hizo una búsqueda bibliográfica de tasas de crecimiento de *S. aureus* en quesos bajo temperaturas de almacenamiento entre 10 y 30°C. Para la búsqueda bibliográfica se utilizó la base de datos de ComBase utilizándose las palabras clave “*Staphylococcus aureus*” y “quesos”. La validación del modelo predictivo se hizo por medio del cálculo de los índices sesgos ( $B_f$ ) y exactitud ( $A_f$ ) (Baranyi et al., 1999).

$B_f$  queda definido por la siguiente fórmula:

$$B_f = 10^{(\sum \log(\frac{g_{pred}}{g_{obs}}))/n} \quad \text{Ec. 3}$$

$B_f$  es un promedio general de la relación entre las predicciones del modelo y las observaciones; y evalúa si el modelo sobreestima el crecimiento del patógeno, lo subestima o

lo indica perfectamente. Un valor de 1 significa que las observaciones se distribuyen por igual por encima y por debajo de las predicciones, lo que produce una concordancia perfecta; los valores  $< 1$  significan un modelo que tiende a subestimar y los valores  $> 1$  indican un modelo que tiende a sobreestimar (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

Por su parte,  $A_f$  queda definido de la siguiente manera:

$$A_f = 10^{(\sum \log(\frac{g_{pred}}{g_{obs}})) / n} \quad \text{Ec.4}$$

El  $A_f$  es similar al factor de sesgo, excepto que es el valor absoluto de la relación entre las predicciones y la observación, lo que proporciona cómo de cercanas son las predicciones a las observaciones. Un valor de 1 indica coincidencia perfecta, en promedio, entre predicciones y observaciones, mientras que un valor de 2 significa que, en promedio, las predicciones presentan dos factores de diferencia con respecto a las observaciones (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

La calibración del modelo predictivo consiste en la aplicación de un factor de corrección al modelo, calculado a partir de datos de respuestas microbianas en quesos, de manera que las predicciones sean lo más próximas posible a las observaciones. Para el cálculo del factor de corrección ( $F_c$ ) se compararon los valores de tasas de crecimiento de *S. aureus* en quesos disponibles en la literatura con los valores estimados por el modelo predictivo secundario desarrollado según la Ecuación 5 (Pin et al., 2011).

$$F_c = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n \ln pred - \ln obs}{n}\right) \quad \text{Ec. 5}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Evaluación y modelización del crecimiento de *S. aureus*

Las características intrínsecas de los quesos (como el pH y la actividad del agua [aw]) y las condiciones de temperatura determinan el comportamiento de la microbiota del queso durante la maduración y el almacenamiento (Martínez et al., 2016; Rogga et al., 2005). El comportamiento de los patógenos en los quesos es variable debido a las variaciones en estos parámetros dentro de las matrices alimentarias y porque el pH, la  $a_w$  y la temperatura pueden interactuar de formas complejas para influir en el crecimiento bacteriano (Skandamis et al., 2007). Los modelos predictivos permiten simular respuestas de crecimiento microbiano

dentro de una matriz alimentaria en función de varios factores de control (Sutherland et al., 1994; Tiwari et al., 2014). Sin embargo, se necesitan más datos sobre las respuestas asociadas con el crecimiento de diversas cepas de patógenos en los alimentos para mejorar la aplicación de modelos predictivos de crecimiento para la evaluación de riesgos alimentarios (Martínez et al., 2016, Santillana et al., 2013).

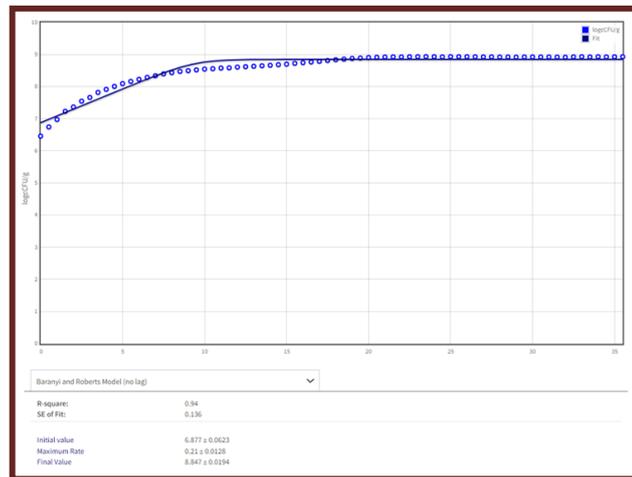


Figura 1. Captura de pantalla del software DMFit, utilizado para el ajuste del modelo de Baranyi para las curvas del modelo (Elaboración propia)

En este estudio se obtuvieron un total de 80 curvas de crecimiento de *S. aureus* in vitro para diferentes temperaturas y concentraciones de sal (Figura 1). Para cada una de las curvas se ajustó el modelo de crecimiento de Baranyi y se estimaron los parámetros de crecimiento mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento de *S. aureus* a diferentes temperaturas y concentraciones de sal (Elaboración propia).

Concentración de sal (%)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tasa de crecimiento (log UFC/mL)	R <sup>2</sup> de ajuste de las curvas
0	10	0,01 ± 0,002	0,119 – 0,806
0	17	0,04 ± 0,001	0,967 – 0,983
0	24	0,12 ± 0,005	0,974 – 0,984
0	30	0,17 ± 0,011	0,924 – 0,933

1,5	10	0,01 ± 0,001	0,294 – 0,869
1,5	17	0,04 ± 0,001	0,971 – 0,982
1,5	24	0,13 ± 0,005	0,981 – 0,986
1,5	30	0,17 ± 0,012	0,897 – 0,921
3	10	0,02 ± 0,006	0,231 – 0,61
3	17	0,05 ± 0,001	0,974 – 0,987
3	24	0,10 ± 0,004	0,963 – 0,974
3	30	0,16 ± 0,003	0,983 – 0,996
4,5	10	0,01 ± 0,001	0,864 – 0,963
4,5	17	0,03 ± 0,001	0,971 – 0,984
4,5	24	0,09 ± 0,003	0,962 – 0,966
4,5	30	0,20 ± 0,011	0,928 – 0,96

De los datos obtenidos en este estudio se observa que la concentración de sal en el rango estudiado no influye en las tasas de crecimiento de *S. aureus*, pero sí lo hace la temperatura. Para cada concentración de sal, las tasas de crecimiento de *S.aureus* van aumentando conforme incrementa la temperatura. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a una misma temperatura y a diferentes concentraciones de sal ( $p>0.05$ ). Esto puede ser debido a la característica halotrofa de este patógeno. Así, se deduce que para cualquier concentración de sal en el rango estudiado, a mayor temperatura mayor crecimiento del patógeno estudiado en el medio.

Tal como informa la Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria (FSAI, 2011) y se muestra en la Tabla 4, el rango de temperaturas a las cuales se pueden observar el crecimiento de *S.aureus* es muy amplio, distribuyéndose las temperaturas evaluadas en este estudio uniformemente a lo largo de este rango. Así, la temperatura más baja empleada (10°C) es muy cercana al límite inferior del rango dado (7°C); mientras que la temperatura superior utilizada (30°C) es cercana al óptimo de crecimiento (37°C). Esto nos ha permitido observar en nuestro estudio el efecto de la temperatura sobre el comportamiento de *S. aureus*.

Sin embargo, para la concentración de sal no ocurre lo mismo. De nuevo el rango de concentraciones de sal que permiten el crecimiento de *S. aureus* es amplio, pero las concentraciones utilizadas en este estudio no se distribuyen uniformemente a lo largo del mismo. Las concentraciones de sal con las que hemos trabajado en este estudio se corresponden, de menor a mayor, con una  $a_w$  de 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96. Estos valores permiten crecer a *S. aureus* fácilmente, puesto que están muy alejados del valor a partir del cual el crecimiento de este patógeno se enlentece y está muy cerca del valor óptimo que permite su desarrollo según se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores y rangos que influyen en el crecimiento de *S. aureus* en quesos (FSAI, 2011)

Factor	Óptimo para crecimiento de <i>S.aureus</i>	Rango	Óptimo para producción de toxinas	Rango
Temperatura (°C)	37	7 – 48	40 – 45	10 - 48
pH	6 - 7	4 - 10	7 - 8	4 – 9,6
Actividad agua (aw)	0,98	0,83 – 0,99	0,98	0,85 – 0,99
NaCl (%)	0	0 – 20	0	0 - 10

Diversos autores han estudiado el efecto de la temperatura en el comportamiento de *S. aureus* en quesos. Gomes et al. (2017) obtuvieron un incremento de la tasa de crecimiento de

este patógeno en el queso Coalho (Brasil) de más de 0,04 log CFU/g/h al pasar de una temperatura de almacenamiento de 8,5°C a 13,8°C. Lee et al. (2015) estudiaron el efecto conjunto de la temperatura y la  $a_w$  en quesos, llegando a la conclusión de que el efecto de la temperatura es evidente (rango 7-30°C), mientras que el efecto de la  $a_w$  (rango 0,97-0,99) únicamente se observó a una temperatura de 15°C, siendo irrelevante en el resto de temperaturas. Este rango coincide con el que hemos trabajado en este estudio. Además, Lee et al. (2014) investigaron el efecto de la temperatura en el crecimiento de *S. aureus* específicamente en los quesos Brie y Camembert, observando también un incremento del crecimiento conforme se eleva la temperatura (rango 4-30°C). Los distintos estudios encontrados en la literatura, con el propio en este trabajo presentado, confirman que la exposición del queso a temperaturas elevadas puede acelerar el crecimiento de *S. aureus* bajo las condiciones fisicoquímicas habituales de este producto.

Tabla 5. Tasas de crecimiento (log UFC/h) de *S. aureus* en queso determinadas por el modelo predictivo de ComBase para determinadas combinaciones de temperatura y concentración de sal (ComBase, 2022)

		CONCENTRACIÓN DE SAL (%)			
		0	1,5	3	4,5
TEMPERATURA (°C)	10	0,022	0,025	0,024	0,021
	17	0,106	0,127	0,121	0,11
	24	0,302	0,374	0,361	0,333
	30	0,488	0,623	0,61	0,568

Los resultados obtenidos en este estudio han sido comparados con los que ofrece el modelo predictivo de *S. aureus* en la herramienta informática ComBase (Baranyi & Tamplin, 2004) y que se muestran en la Tabla 5. ComBase es un depósito de datos y herramientas de

microbiología predictiva que permite al usuario conocer la supervivencia y crecimiento de distintos microorganismos para distintas condiciones ambientales. Las tasas de crecimiento para el patógeno estudiado en queso ofrecidas por el modelo predictivo de ComBase también siguen la misma tendencia que las obtenidas con el modelo presentado en este trabajo, incrementando conforme incrementa la temperatura y no viéndose alteradas por los cambios en las concentraciones de sal del rango estudiado.

El modelo secundario de Ratkowsky se ajustó posteriormente a las tasas de crecimiento de *S. aureus* estimadas a partir de los datos obtenidos en Bioscreen por medio del ajuste del modelo de Baranyi.

La función obtenida siguiendo este modelo es la siguiente:

$$\sqrt{\mu_{max}} = 0,0153 (T - 2,37) \quad \text{Ec. 6}$$

La representación gráfica de la Ecuación 6 se muestra en la Figura 2.

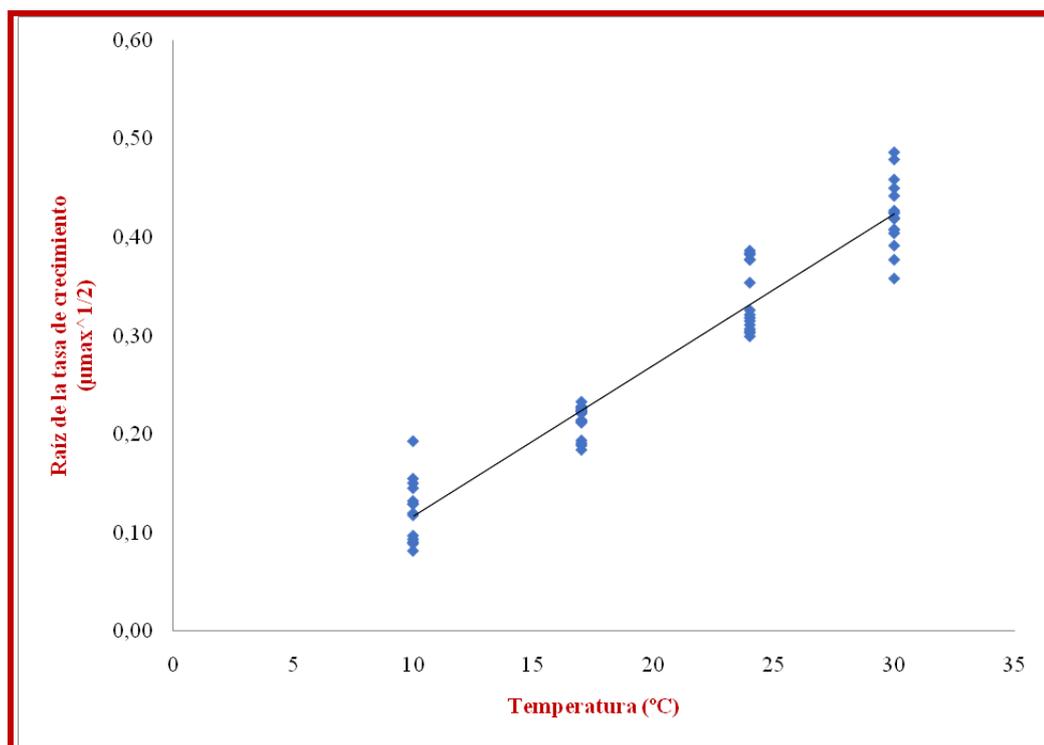


Figura 2. Modelo de Ratkowsky (línea recta) para temperatura ajustado a la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento. *S. aureus* en queso (Elaboración propia).

Este modelo secundario se ha desarrollado para evaluar el efecto de la temperatura sobre el comportamiento de *S. aureus* en quesos; y permite explicar y predecir su crecimiento conforme varía la temperatura.

El  $R^2$  obtenido en este modelo es de 0,9366. El coeficiente obtenido es alto, lo que indica que el modelo de Ratkowsky implementado presenta un buen ajuste a los valores de tasas de crecimiento de *S. aureus*. Por su parte, el RMSE obtenido en este modelo es bajo, de 0,0194. Esto indica un buen ajuste de los datos que se obtienen al aplicar este modelo, al haber una baja diferencia entre los valores observados y los predichos por el modelo (Lee et al., 2015).

**2. Validación del modelo de crecimiento de *S. aureus***

La validación del modelo es un paso fundamental, puesto que los modelos no pueden ser implementados si no se han validado previamente. La validación consiste en confirmar las predicciones del modelo experimentalmente utilizando algún método cuantitativo (Dym, 2004). Se ha realizado una validación externa, consistente en comparar las predicciones del modelo desarrollado con aquellas dadas por conjuntos de datos independientes disponibles en la literatura (Ross et al. 2000). En el proceso de validación del modelo se han determinado los factores de sesgo y de exactitud del mismo.

Los datos utilizados para la validación fueron obtenidos de los modelos de cultivo existentes en ComBase, utilizando en esta herramienta unos criterios de búsqueda definidos por “*Staphylococcus aureus*” y “cheese”. Los datos obtenidos (Tabla 6) únicamente hacen referencia al tipo de queso Burgos, un queso fresco que se ha tomado como ejemplo por su elevada  $a_w$ , lo que permite un crecimiento adecuado de *S. aureus* (Otero et al., 1988).

Tabla 6. Valores de tasa máxima de crecimiento de *S. aureus* observados en queso Burgos y extraídos de diferentes registros de ComBase y valores predichos por el modelo de Ratkowsky obtenido y utilizados para el cálculo de  $B_f$  y  $A_f$  (Elaboración propia).

Temperatura (°C)	10	10	10	10	15	15	15	15
<b>Observaciones</b>	0,011	0,013	0,010	0,012	0,027	0,019	0,020	0,029
<b>Predicciones</b>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,037	0,037	0,037	0,037

El valor del factor de sesgo ( $B_f$ ) obtenido para el modelo desarrollado es de 1,38, lo que indica que el modelo es a “prueba de fallo”. Esto significa que las predicciones del modelo tenderán a sobreestimar el crecimiento de *S. aureus* en queso, lo que lleva a un error que refuerza la seguridad del modelo. Esto es, cuando el modelo indique que hay crecimiento puede que este sea menor al indicado, pero nunca se predecirá ausencia de crecimiento cuando realmente sí puede haberlo.

El factor de exactitud ( $A_f$ ) obtenido para este modelo es de 1,38. Esto indica que, en promedio, las predicciones del modelo presentan 1,38 factores de diferencia con respecto a las observaciones, sobreestimando el crecimiento de *S. aureus* en queso.

Cuando se estudian los índices de validación, las predicciones deben ser consideradas según estos índices indiquen que el modelo tiende a sobreestimarlas o subestimarlas.

### **3. Calibración del modelo de crecimiento de *S. aureus***

Teniendo en cuenta que el modelo secundario desarrollado en este estudio sobreestima el crecimiento de *S. aureus* en el queso, se llevó a cabo un proceso de calibración del modelo, por medio del cálculo de un factor de corrección ( $F_c$ ). La multiplicación de la ecuación propuesta en el modelo (Ec. 6) por un factor de corrección hace más precisas las predicciones obtenidas con el mismo.

Para la calibración se han utilizado los valores de crecimiento de *S. aureus* en queso Burgos utilizados para la validación externa del modelo (Tabla 6, Otero et al. (1988)). Se pueden realizar calibraciones adicionales para otros tipos de quesos, siempre que se dispongan de los datos necesarios para completar este proceso. En este caso, se ha estimado un valor de corrección igual a 0,81. La línea de equivalencia presentada en la Figura 3 ha sido elaborada para demostrar la exactitud del modelo aplicando el factor de corrección. Mientras más cercanos a la línea sean los puntos, más equivalencia habrá entre los valores de tasas de crecimiento observados y los predichos por el modelo.

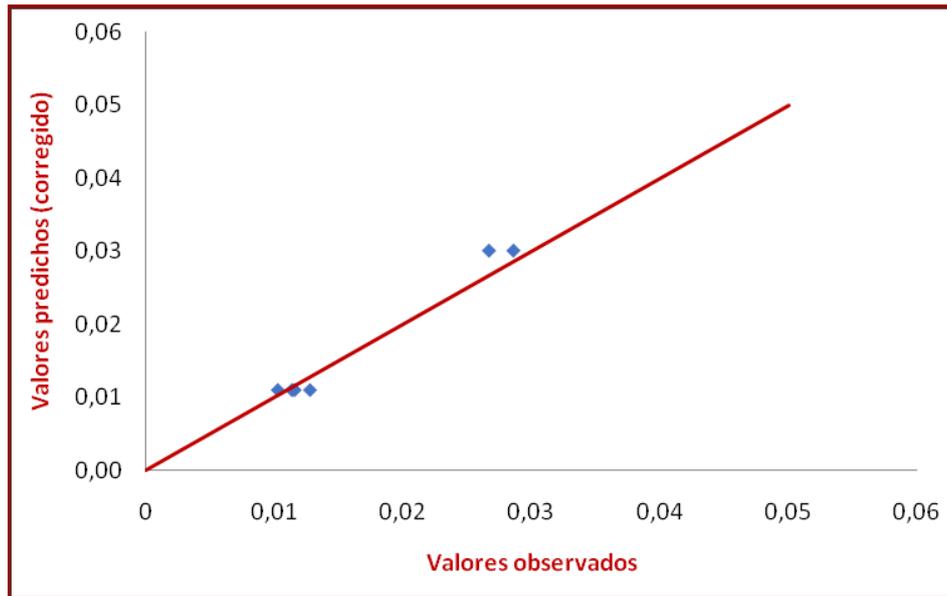


Figura 3. Línea de equivalencia entre los valores observados y los valores predichos por el modelo “corregido” (Elaboración propia)

#### 4. Implementación del modelo en MicroHibro

El modelo desarrollado en este trabajo ha sido implementado en MicroHibro, un software informático de microbiología predictiva que ofrece modelos microbianos, modelos de vida útil y herramientas para evaluación del riesgo y para elaborar planes de muestreo (González et al., 2019). El objetivo de este paso es publicar el modelo para que pueda acceder a él cualquier persona interesada. Para ello, se han definido en un primer lugar el patógeno cuyo crecimiento predice el modelo y el alimento en que lo predice: *S. aureus* en queso. Tras ello, se ha insertado la ecuación calibrada obtenida en este estudio y se ha publicado para ponerla disponible a todo usuario de la plataforma.

El modelo se encuentra disponible en MicroHibro bajo la referencia de Lara y Possas (2022). La implementación del mismo con las mismas condiciones de temperatura que se han trabajado en este estudio genera la Figura 4. Para esta representación gráfica se ha estimado una concentración inicial de 3 log CFU/g, de forma que se pueda observar el crecimiento que predice el modelo a partir de esta concentración. En la Figura 4, el color rojo presenta el crecimiento a 10°C, el azul a 17°C, el amarillo a 24°C y el verde a 30°C. Se observa que sigue la tendencia estudiada de que a mayor temperatura hay un crecimiento más exponencial.

Este modelo se puede aplicar, por ejemplo, para estimar el tiempo que requiere *S. aureus* para alcanzar una concentración límite en los quesos. Se ha estimado que *S. aureus*

comienza a producir toxinas a partir de una concentración de 5 log CFU/g (Lindqvist et al., 2002). Por lo tanto, utilizándose el modelo implementado en MicroHibro, se puede estimar en que tiempos de almacenamiento se darían la producción de toxina a diferentes temperaturas. Este momento ha sido marcado en la Figura 4 para las diferentes temperaturas por medio de una línea discontinua vertical, observándose que la temperatura es un factor fundamental para la prevención de la producción de toxinas en caso de contaminación del alimento con *S. aureus*.

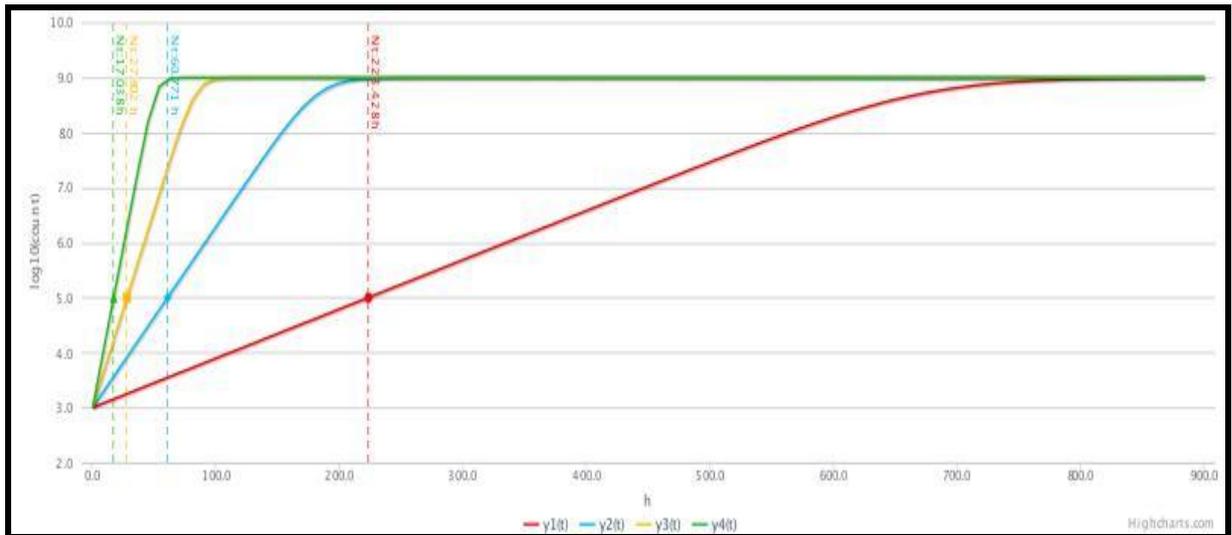


Figura 4. Predicciones de crecimiento y producción de toxinas de *S. aureus* en queso para distintas temperaturas (rojo: 10°C; azul: 17°C; amarillo: 24°C; verde: 30°C) (Lara y Possas, 2022).

Para interpretar este modelo es importante destacar que se ha calibrado y representado (Figura 4) a partir de las predicciones estimadas para el queso de Burgos, un queso blanco, blando, acuoso (MAPA, 2022) cuyas características son, teóricamente, más favorables para el desarrollo de *S. aureus* que las de otros tipos de quesos, como los curados. Este tipo de quesos es importante conservarlos en refrigeración debido a su elevada actividad agua, que favorece el desarrollo bacteriano.

Así, la microbiología predictiva se presenta como una herramienta útil para predecir el comportamiento microbiano en los alimentos. En este caso, el crecimiento de *S. aureus* en queso a distintas temperaturas de almacenamiento. Esta herramienta nos permite no solo elaborar un modelo que nos prediga este crecimiento, sino adaptarlo y calibrarlo a las características de los diferentes quesos en los que queramos implementarlo.

## LIMITACIONES

Se presentan dos limitaciones perceptibles en la implementación del modelo propuesto:

- Los modelos desarrollados a partir de observaciones en medios de cultivo, como el propuesto en este trabajo, tienden a sobreestimar el crecimiento de patógenos en relación a las situaciones que se dan en un alimento real. Esta limitación ha sido superada al calibrar la ecuación propuesta con observaciones y datos de crecimiento de *S. aureus* en queso Burgos.
- El rango de concentración de sal utilizado en este estudio no ha sido suficiente para determinar el efecto de este factor sobre el crecimiento de *S. aureus*. Es necesario trabajar con concentraciones de sal más altas para observar cómo influyen distintas concentraciones de sal en el crecimiento del patógeno estudiado.

## CONCLUSIONES

Se deducen tres conclusiones principales de este estudio:

- El efecto de la temperatura de almacenamiento fue crucial para el crecimiento de *S. aureus*, el cual aumenta conforme se incrementa la temperatura, en contraste con el efecto de las concentraciones de sal estudiadas con las que no se observaron diferencias significativas. Por ello, para prevenir el desarrollo del patógeno el parámetro fundamental de control debe ser la temperatura.
- El modelo de Ratkowsky permite predecir adecuadamente el crecimiento de *S. aureus* en queso a distintas condiciones de temperatura en el medio y por ello podría ser de gran utilidad para la empresa alimentaria u organismos de gestión del riesgo.
- La validación y calibración del modelo permite aumentar la precisión de las predicciones para un producto dado, en este caso un queso, y compensar las sobreestimaciones de los parámetros cinéticos de crecimiento de *S. aureus* obtenidas por modelos elaborados en medio de cultivo.
- La implementación del modelo desarrollado en la aplicación MicroHibro permite evaluar el comportamiento de *S. aureus* en queso en una interfaz amigable y de fácil acceso, tanto para las empresas alimentarias como las autoridades competentes.
- Este estudio demuestra que la microbiología predictiva es una herramienta útil para estudiar el comportamiento de los distintos agentes patógenos en los alimentos. Dada la imposibilidad del estudio en condiciones reales de todas las condiciones para todos los alimentos y microorganismos, es una herramienta necesaria para el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ainia (13 de mayo, 2015). *Microbiología predictiva y vida útil del alimento: 7 pasos para obtener modelos de diagnóstico*. Ainia. Recuperado el 6 de junio de 2022 de <https://www.ainia.es/ainia-news/microbiologia-predictiva-y-vida-util-del-alimento-7-pasos-para-obtener-modelos-de-diagnostico/>
- Altekruse, S. F., Timbo, B. B., Mowbray, J. C., Bean, N. H., & Potter, M. E. (1998). *Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: Sanitary manufacturing practices protect consumers*. *Journal of Food Protection*, 61, 1405–1407.
- Anónimo (1986). *Epidémie de salmonellose due à un fromage à pâte molle*. *Bulletin de l'office fédéral de la santé publique*, 8, 48–49.
- Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria (2011). *Staphylococcus aureus*. Microbial Factsheet series. Issue n°1, sept 2011.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. *Validating and comparing predictive models*. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 159–166.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L., 2004. *ComBase: a common database on microbial responses to food environments*. *J. Food Prot.* 67, 1967–1971.
- Barrett, N. J. (1986). *Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1983-1984*. *Journal of Infection*, 12, 265–272.
- Barrientos M, Soria C. (2020). *Dairy, Cheese Production by Country in 1000 MT*. IndexMundi. Recuperado el 10 de junio de 2022 de <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=cheese&graph=production>
- Beresford T, Williams A. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3 ed. London: Elsevier; 2004.
- Bone, F. J., Bogie, D., & Morgan-Jone, S. C. (1989). *Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese*. *Epidemiology and Infection*, 103, 449–458.
- ComBase. (2022). *Acerca de ComBase*. Consultado el 16 de julio de 2022.
- De Buyser, M. L., Janin, F., & Dilasser, F. (1985). *Contamination of ewe cheese with Staphylococcus aureus: Study of an outbreak of food poisoning*. In J. Jeljaszewicz (Ed.), *The Staphylococci* (pp. 677–678). Stuttgart, Germany.
- Dym CL (2004) *Principles of mathematical modeling*. Elsevier Academic Press, London, 4
- EFSA, ECDC (2017). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016*. *EFSA Journal* 2017; 15(12):5077
- ELIKA (25 de mayo, 2022). *Patógenos alimentarios más importantes*. ELIKA. Recuperado el 6 de junio de 2022 de <https://personaconsumidora.elika.es/patogenos-mas-importantes/>
- Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria, Elika. (2013). *Staphylococcus aureus*. Recuperado el 6 de junio de 2022 de: <http://www.elika.net/datos/>
- Gomes de Araújo, V., de Oliveira Arruda, M.D., Danta Duarte, F.N., Batista de Sousa, J.M., Da Costa Lima, M., Da Conceição, M.L., Schaffner, D.W., Leite de Souza, E. (2017). *Predicting and*

- modelling the growth of potentially pathogenic bacteria in Coalho cheese*. Journal of Food Protection. Vol. 80, nº 7, 2017, Pages 1172-1181.
- González, S.C., Possas, A., Carrasco, E., Valero, A., Bolívar, A., Posada-Izquierdo, G.D., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., Pérez-Rodríguez, F. (2019). 'MicroHibro': *A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods*. International Journal of Food Microbiology, Volume 290, 2019. Pages 226-236. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.007.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2006). *Guía simplificada para el entendimiento y uso de objetivos de inocuidad de los alimentos y objetivos de rendimiento*. 14-15
- Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M.C., Robert, L., Hummerjohann, J., Stephan, R. (2015). *Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk*. J. Dairy Sci. 98:2944-2948.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Dronisos, E.H. (2010). *Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels*. Food Control 21: 805-815.
- Lindqvist, R., Sylvén, S., Vagsholm, I. (2022). *Quantitative microbial risk assessment exemplified by Staphylococcus aureus in unripened cheese made from raw milk*. International Journal of Food Microbiology 78 (2002): 155-170.
- Lee, M., Kim, K., Lee, S., Yoon, Y. (2015). *Kinetic behaviour of Staphylococcus aureus on cheese as a function of water activity and temperature*. Journal of Dairy Research, 2015: 82; 64-69.
- Lee, M., Kim, K., Lee, S., Han, M., Yoon, Y. (2014). *Growth kinetics of Staphylococcus aureus on Brie and Camembert cheeses*. Journal of Dairy Research, 2014: 81; 252-256.
- Maguire, H. C. F., Boyle, M., Lewis, M. J., Pankhurst, J., Wieneke, A. A., Jacob, M., et al. (1991). *A large outbreak of food poisoning of unknown aetiology associated with Stilton cheese*. Epidemiology and Infection, 106, 497–505.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). *Información: Queso de Burgos*. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/queso-burgos\\_tcm30-102672.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/queso-burgos_tcm30-102672.pdf) (consultado el 29 de julio de 2022)
- Martínez Peral, A. (14 de septiembre, 2021). *Estimación de la vida útil segura de embutidos fermentados con respecto a Listeria monocytogenes*. Universidad de Córdoba.
- Martinez-Rios, V., N. B. Østergaard, E. Gkogka, P. S. Rosshaug, and P. Dalgaard. 2016. *Modelling and predicting growth of psychrotolerant pseudomonads in milk and cottage cheese*. Int. J. Food Microbiol. 216:110–120.
- Medeiros, M.I.M., Nader Filho, A., Jordano, R., Ruz, V., Medina, L.M., García Viejo, F. (2019). *Occurrence of Staphylococcus aureus and its toxins in cheeses from the región of Andalusia, Spain*. Journal of Dairy, Veterinary and Animal Research. Vol. 8. Issue I.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Panamericana.
- Notermans, S., Heuvelman, C.J., (1983) *Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science 48, 1832–1835.

- Otero, AGarcía, M.C., García, M.L., Prieto, M. and Moreno, B. (et al.), (1988) *Behaviour of Staphylococcus aureus strains producers of enterotoxins C1 or C2 during the manufacture and storage of Burgos cheese*. Journal of Applied Bacteriology 64: 117 - 122
- Pereira, M. L., Do Carmo, L. S., Dos Santos, E. J., Pereira, J. L., & Bergdoll, M. S. (1996). *Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning*. Journal of Food Protection, 59, 559–561.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A. (2013). *Predictive Microbiology in Foods*. SpringerBriefs in Food Health and Nutrition Series: 49-51.
- Pin, C., Avendaño-Perez, G., Cosciani-Cunico, E., Gómez, N., Gounadakis, A., Nychas, G.J., Skandamis, P., Barker, G. (2011). *Modelling Salmonella concentration throughout the pork supply chain by considering growth and survival in fluctuating conditions of temperature, pH and aw*. International Journal of Food Microbiology, Volume 145, Supplement 1, 2011, Pages S96-S102. Ddoi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.025.
- Quirón Salud. (25 de noviembre de 2016). *Las propiedades nutricionales del queso*. Nota de prensa. Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Quirón Salud Madrid. <https://www.quironsalud.es/es/comunicacion/notas-prensa/propiedades-nutricionales-queso>
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. (1983) *Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range*. J Bacteriol. 1983 Jun;154(3):1222-6. doi: 10.1128/jb.154.3.1222-1226.1983.
- Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE-L-2005-82539: 18-20.
- Rodríguez, J. E. (2015). *Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja*, 53 (39), 1-4.
- Rogga, K. J., J. Samelis, A. Kakouri, M. Katsiari, I. N. Savvaidis, and M. G. Kontominas. 2005. *Survival of Listeria monocytogenes in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 48C and 128C*. Int. Dairy J. 15:59–67.
- Ross T (1996) *Indices of performance evaluation of predictive models in food microbiology*. J Appl Bacteriol 81:501–508. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x
- Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S (2000) *Predictive modelling of the growth and survival of Listeria in fishery products*. Int J Food Microbiol 62:231–245. doi:10.1016/S0168-1605(00) 00340-8
- Santamaría, P. (2020). *Estos son los 26 quesos españoles con Denominación de Origen*. ABC Viajar, 20 de enero de 2020. [https://www.abc.es/viajar/gastronomia/abci-estos-26-quesos-espanoles-denominacion-origen-202001200137\\_noticia.html](https://www.abc.es/viajar/gastronomia/abci-estos-26-quesos-espanoles-denominacion-origen-202001200137_noticia.html)
- Santillana Farakos, S. M., J. F. Frank, and D. W. Schaffner. 2013. *Modelling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods*. Int. J. Food Microbiol. 166:280–293.
- Sanz, A. 2017. *El sector del queso afianza su crecimiento*. Distribución y Consumo 5, 44-48.
- Scallan E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, and P. M. Griffin. 2011. *Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens*. Emerg. Infect. Dis. 17:7–15.

- Skandamis, P. N., J. D. Stopforth, P. A. Kendall, K. E. Belk, J. A. Scanga, G. C. Smith, and J. N. Sofos. 2007. *Modelling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/non growth interface of Escherichia coli O157:H7*. Int. J. Food Microbiol. 120:237–249.
- Soriano, J.M., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J., 2002. *Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods*. Trends of Food Science and Technology 13, 60–67.
- Sutherland, J. P., A. J. Bayliss, and T. A. Roberts. 1994. *Predictive modelling of growth of Staphylococcus aureus: the effects of temperature, pH and sodium chloride*. Int. J. Food Microbiol. 21:217–236.
- Tiwari, U., D. Walsh, L. Rivas, K. Jordan, and G. Duffy. 2014. *Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behavior of Listeria monocytogenes in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening*. Food Control 42:248–256.
- Todd, E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, C.A., Michaels, B.S., 2008. *Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease*. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. Journal of Food Protection 71 (11), 2339–2373.