

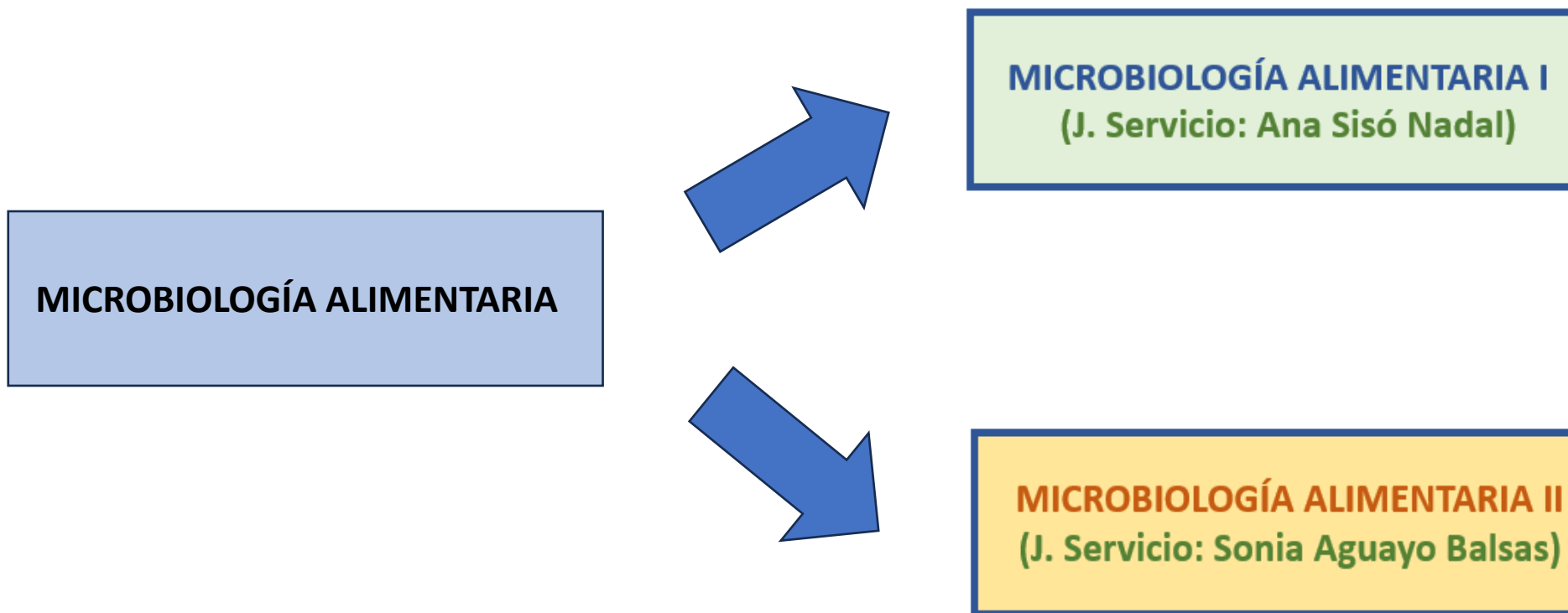


ACTUALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE REFERENCIA PARA *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

JORNADAS DE REFERENCIA CNA
4 y 5 JUNIO 2024

M^a Teresa Rodríguez Torrecilla
Responsable de la Unidad de Bacteriología Alimentaria
Servicio de Microbiología Alimentaria I (MA)

Reestructuración del Servicio de Microbiología Alimentaria



Referencias del Servicio de Microbiología Alimentaria I

- *Salmonella* en alimentos
- *Listeria monocytogenes* en alimentos
- *Campylobacter* en alimentos
- *Escherichia coli* en alimentos, incluida *E.coli* verotoxigénica (STEC)
- Estafilococos coagulasa positivos en alimentos
- Virus transmitidos por alimentos



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Listeriosis

L.monocytogenes: Criterio de seguridad recogido en el Reglamento 2073/2005

Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos

Sistema de control y recogida información de zoonosis de la UE

- ANEXO I: Listado A (Zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia)

LISTERIOSIS Y SUS AGENTES CAUSALES

12.12.2003

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 325/31

DIRECTIVA 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 17 de noviembre de 2003

sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea, y en particular la letra b) del apartado 4 de su artículo 152,

Vista la propuesta de la Comisión (*),

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo (*),

Prevía consulta al Comité de las Regiones,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado (*),

Considerando lo siguiente:

- (1) Los animales vivos y los productos de origen animal se recogen en la lista del anexo I del Tratado. La ganadería y la puesta en el mercado de los alimentos de origen animal constituyen una importante fuente de ingresos para los agricultores. La aplicación de medidas veterinarias destinadas a elevar el nivel de la salud pública y de la sanidad animal en la Comunidad contribuye al desarrollo racional del sector agrícola.
- (2) La protección de la salud humana frente a las enfermedades e infecciones transmisibles directa o indirectamente entre animales y seres humanos (zoonosis) reviste una importancia capital.
- (3) Las zoonosis que se transmiten por los alimentos pueden causar dolencias a los seres humanos y pérdidas económicas a la industria agroalimentaria.
- (4) Las zoonosis que se transmiten por fuentes distintas de los alimentos, especialmente las que lo hacen por medio de la fauna salvaje y de los animales de compañía, también constituyen un motivo de preocupación.
- (5) La Directiva 92/117/CEE del Consejo, de 17 de diciembre de 1992, relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos (*), preveía el establecimiento de mecanismos de vigilancia de determinadas zoonosis tanto en los Estados miembros como a escala comunitaria.

(6) Con la cooperación con el laboratorio comunitario de referencia de epidemiología de las zoonosis, la Comisión recoge anualmente los resultados de la vigilancia de los Estados miembros y se encarga de su recopilación. La publicación de los resultados ha tenido lugar anualmente desde 1995. Sirven de base para valorar la situación actual de las zoonosis y de los agentes zoonóticos. Sin embargo, los sistemas de recopilación de datos no están armonizados y, por consiguiente, no es posible hacer comparaciones entre los Estados miembros.

(7) Otras disposiciones comunitarias prevén la vigilancia y el control de ciertas zoonosis en la población animal. En particular, la Directiva 64/432/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina (*), trata de la tuberculosis bovina y la brucelosis bovina. La Directiva 91/68/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina (*), trata de la brucelosis ovina y caprina. La presente Directiva no debe crear una duplicación innecesaria de los requisitos vigentes.

(8) Además, un futuro reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre higiene de los productos alimenticios debe abarcar también aspectos específicos necesarios para la prevención, el control y la vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos e incluir normas específicas relativas a la calidad microbiológica de los alimentos.

(9) La Directiva 92/117/CEE establece que se recojan datos sobre los casos de zoonosis en seres humanos. El objeto de la Decisión n° 2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de septiembre de 1998, por la que se crea una red de vigilancia epidemiológica y de control de las enfermedades transmisibles en la Comunidad (*), es potenciar la recopilación de esos datos y contribuir a mejorar la prevención y el control de las enfermedades transmisibles en la Comunidad.

(10) La recopilación de datos sobre la presencia de zoonosis y agentes zoonóticos en los animales, los alimentos, los



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Informe EFSA/ECDC zoonosis 2022 (Publicado 12/12/2023):

“The European Union ONE Health 2022 Zoonoses Report”

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/8442>

The European Union One Health 2022 Zoonoses Report

European Food Safety Authority (EFSA) | European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

Correspondence: zoonoses@efsa.europa.eu

Abstract

This report by the European Food Safety Authority and the European Centre for Disease Prevention and Control presents the results of the zoonoses monitoring and surveillance activities carried out in 2022 in 27 Member States (MSs), the United Kingdom (Northern Ireland) and 11 non-MSs. Key statistics on zoonoses and zoonotic agents in humans, food, animals and feed are provided and interpreted historically. In 2022, the first and second most reported zoonoses in humans were campylobacteriosis and salmonellosis, respectively. The number of cases of campylobacteriosis and salmonellosis remained stable in comparison with 2021. Nineteen MSs and the United Kingdom (Northern Ireland) achieved all the established targets in poultry populations for the reduction of *Salmonella* prevalence for the relevant serovars. *Salmonella* samples from carcasses of various animal species, and samples for *Campylobacter* quantification from broiler carcasses, were more frequently positive when performed by the competent authorities than when own checks were conducted. Yersiniosis was the third most reported zoonosis in humans, followed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Listeria monocytogenes* infections. *L. monocytogenes* and West Nile virus infections were the most severe zoonotic diseases, with the most hospitalisations and highest case fatality rates. In 2022, reporting showed an increase of more than 600% compared with 2021 in locally acquired cases of human West Nile virus infection, which is a mosquito-borne disease. In the EU, the number of reported foodborne outbreaks and cases, hospitalisations and deaths was higher in 2022 than in 2021. The number of deaths from outbreaks was the highest ever reported in the EU in the last 10 years, mainly caused by *L. monocytogenes* and to a lesser degree by *Salmonella*. *Salmonella* and in particular *S. Enteritidis* remained the most frequently reported causative agent for foodborne outbreaks. Norovirus (and other calicivirus) was the agent associated with the highest number of outbreak human cases. This report also provides updates on brucellosis, *Coxiella burnetii* (Q fever), echinococcosis, rabies, toxoplasmosis, trichinellosis, infection with *Mycobacterium tuberculosis* complex (focusing on *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*) and tularaemia.

KEYWORDS

Campylobacter, foodborne outbreaks, *Listeria*, monitoring, parasites, *Salmonella*, West Nile, zoonoses

- Listeriosis fue la quinta zoonosis por casos notificados
- La enfermedad zoonótica más severa junto con la infección por virus del Nilo

TABLE 2 Reported hospitalisations and deaths due to zoonoses in confirmed human cases and among foodborne outbreak cases in the EU, 2022.

Disease	Surveillance data on human cases (source: ECDC)											Foodborne outbreaks (source: EFSA)					
	Confirmed human cases	Hospitalisations					Deaths					Outbreaks	Cases	Hospitalisations and proportion of hospitalised cases	Deaths and case fatality		
		Status available	Reporting MSs ^a	Cases and proportion of hospitalised cases	Outcome available	Reporting MSs ^a	Deaths and Case fatality										
N	N	%	N	N	%	N	%	N	N	%	N	N	N	%	N	%	
Campylobacteriosis	137,107	44,876	327	16	10,551	23.5	84,425	61.6	17	34	0.04	255	1097	83	7.6	0	0
Salmonellosis	65,208	29,003	44.5	17	11,287	38.9	36,856	56.5	17	81	0.22	1014	6632	1406	21.2	8	0.12
Yersiniosis	7919	2113	26.7	17	636	30.1	3765	47.5	17	0	0	14	96	4	4.2	0	0
STEC infections	7117	2933	41.2	17	1130	38.5	4824	67.8	21	28	0.58	71	408	63	15.4	1	0.25
Listeriosis	2738	1386	50.6	19	1330	96.0	1578	57.6	21	286	18.1	35	296	242	81.8	28	9.5
West Nile virus infection ^b	1111	366	32.9	8	318	86.9	1111	100.0	11	92	8.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Echinococcosis	722	277	38.4	15	128	46.2	405	56.1	15	1	0.25	0	0	0	–	0	–
Q fever	719	NA	NA	NA	NA	NA	445	61.9	14	4	0.90	0	0	0	–	0	–
Tularaemia	620	151	24.4	10	91	60.3	227	36.6	11	2	0.88	0	0	0	–	0	–
Brucellosis	198	79	39.9	10	55	69.6	81	40.9	10	0	0	0	0	0	–	0	–
Tuberculosis caused by <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i>	130	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Trichinellosis ^c	41	11	26.8	5	7	63.6	11	26.8	5	0	0	7	68	10	14.7	0	0
Rabies	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Abbreviation: NA, Not applicable, as information is not collected for this disease.

Note: Data on congenital toxoplasmosis are not shown, since 2022 data are not available yet.

^aNot all countries provided case data for all diseases.

^bFor West Nile virus infection, the total number of locally acquired infection cases was used (includes probable and confirmed cases).

^cThe number of cases also includes two cases reported from Finland, by error.

2738 casos

1330 hospitalizaciones

286 muertes

35 BROTES

- 296 casos

- 242 hospitalizaciones

- 28 muertes

Listeria in the EU, 2022

Human cases

Notification rate
(per 100,000 population) **0.62**

Trend
(2018-2022)  Increasing
Decreasing
Stable

2,738 Cases of illness

1,778 Infections acquired in the EU

12 Infections acquired outside the EU

948 Unknown travel status or unknown country of infection

1,330 Hospitalisations

286 Deaths

ECDC data

Foodborne outbreaks and related cases

35 Foodborne outbreaks

17 Strong-evidence outbreaks

18 Weak-evidence outbreaks

296 Cases of illness

242 Hospitalisations

28 Deaths

Implicated food vehicles (Strong-evidence outbreaks)

Top
food
vehicles

 Pig meat and
products thereof
5 Outbreaks

 Fish and
fish products
4 Outbreaks

 Mixed food
3 Outbreaks

 Vegetables and juices and
other products thereof
2 Outbreaks

 Dairy products
(other than cheeses)
2 Outbreaks



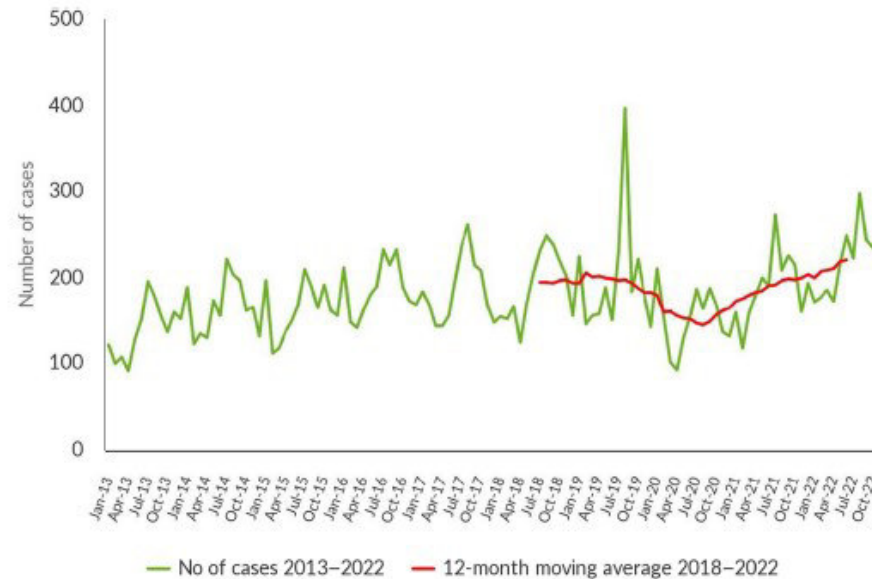
MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

50

50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

- **Tasa de letalidad alta (18,1 %), superior a 2021 (13,7 %) y 2020 (13,0 %).**
 - La mayoría en personas mayores de 64 años (59,8 % muertes en el grupo de 65 - 84 años y el 24,3 % en el grupo > 84 años)
- **Aumento del nº casos respecto a 2021 (+15,8 % por brotes en algunos países) pero la tendencia general de la listeriosis se considera estable, ningún aumento o disminución significativa entre 2018 y 2022.**



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Datos de España (Informe EFSA/ECDC 2022)



LISTERIA MONOCYTOGENES

591 BROTES

7136 casos

233 hospitalizaciones

4 muertes

3 BROTES

24 casos

0 hospitalizaciones

0 muertes

437 casos en total

Ratio 0,95



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Muestras Control Oficial UE

312.849 muestras analizadas

Producción



Mayor % de resultados positivos que en distribución.

Mayor % de resultados positivos en:

- Pescado (2,6 %)
- Productos derivados de pescado (2,5 %)
- Productos de origen cárnico distintos a embutidos fermentados (2,5 %)

Distribución



% Resultados positivos raro (0,1 %) a muy bajo (0,1 % - 1,0 %) en 9 de las 10 categorías de alimentos listos para consumo

Mayor % de resultados positivos en pescado (2,3 %)



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

PROPORCIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS EN PRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN

TABLE 33 Proportions (%) of positive single samples at the manufacturing and distribution stage from official sampling by CAs in the context of verification of implementation by FBOs of the *Listeria monocytogenes* FSC according to Regulation (EC) No 2073/2005, EU, 2022.

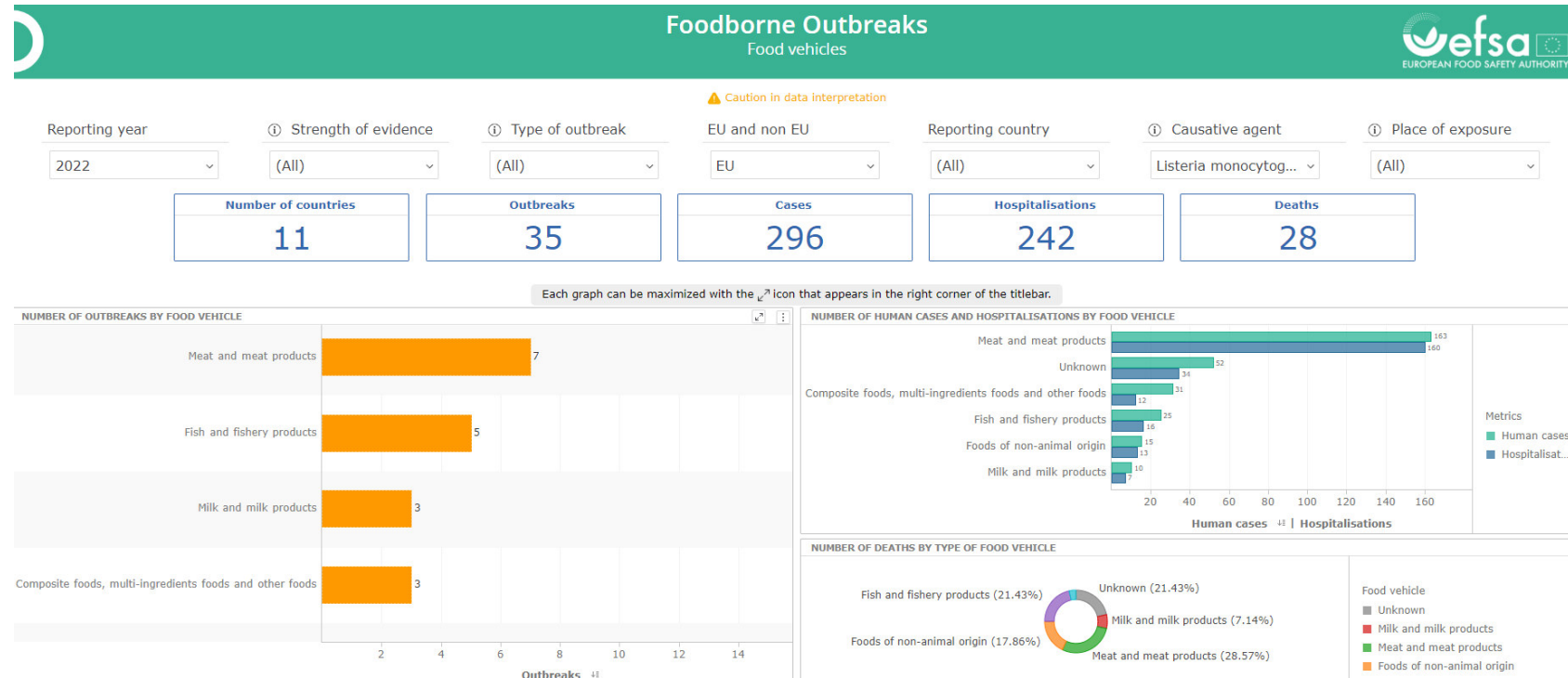
RTE food category ^a	Manufacturing ^b	Distribution ^c		
	Analytical method ^d			
	Detection (EN ISO 11290-1)	Detection (EN ISO 11290-1)	Enumeration (EN ISO 11290-2)	
	% positive samples (N samples tested, N reporting MS) ^d	% positive samples (N samples tested, N reporting MS) ^d	% positive samples (N samples tested, N reporting MS) ^d	% of samples exceeding 100 CFU/g ^e
Foods intended for infants and for medical purposes: data reported from BE, CY, GR, HR, HU, IT, RO, SK, SI, ES		0 (N= 1244; 10 MS)		
Fish: data reported from AT, BE, BG, CY, CZ, DK, ES, FR, GR, HR, HU, IT, LV, PL, SI, SK	2.6 (N= 971; 9 MS)		2.3 (N= 1022; 14 MS)	0
Fishery products: data reported from AT, BE, BG, DK, EE, ES, FR, HR, IT, LV, RO, SI, SK	2.5 (N= 842; 8 MS)		0.67 (N= 1935; 11 MS)	0.05
Cheeses, soft and semi-soft: data reported from AT, BE, BG, CZ, ES, GR, HR, HU, IT, LV, PL, RO, SK	0.33 (N= 6407; 11 MS)		0.08 (N= 2537; 11 MS)	0.08
Cheeses, hard: data reported from BG, CZ, ES, IT, SK			0.56 (N= 359; 5 MS)	0
Cheeses, unspecified: data reported from AT, BE, ES, HU, IT, PL, SI	1.5 (N= 1981; 6 MS)		0.30 (N= 337; 5 MS)	0.30
Other dairy products (excluding cheeses) – entire category: data reported from AT, BE, BG, CZ, ES, GR, HR, HU, IT, PL, RO, SI, SK	0.14 (N= 6544; 11 MS)		0 (N= 1857; 10 MS)	0
Milk: data reported from AT, BG, CY, CZ, E+S, GR, HR, IT, PL, RO, SK	0 (N= 566; 9 MS)		0 (N= 167; 6 MS)	0
Products of meat origin, fermented sausages: data reported from BE, BG, CY, DK, EE, HR, HU, SK			0.28 (N= 359; 8 MS)	0
Products of meat origin, other than fermented sausages: data reported from AT, BE, BG, CZ, DK, EE, ES, GR, HR, HU, IT, LV, PL, RO, SI, SK	2.5 (N= 18,061; 13 MS)		0.41 (N= 4628; 15 MS)	0.13
Other products: data reported from AT, BE, BG, CY, CZ, DK, ES, GR, HR, HU, IT, LV, MT, RO, SK	0.79 (N= 2403; 8 MS)		0.31 (N= 6803; 15 MS)	0.12

Para todas las categorías de alimentos listos para el consumo, el % de muestras en distribución que excedieron el límite de 100 ufc/g fue de raro a muy bajo (0 % a 0,30 %)



Paneles virtuales

<https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard>



Listeria monocytogenes story map (arcgis.com)



- ¿Qué es *Listeria*?
- Causas
- ¿Cómo se produce la infección?
- ¿Cómo prevenirlo?
- Prevalencia en 2022
- Controles que se realizan en la UE y el papel de EFSA



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

LABORATORIO DE REFERENCIA DE LA UE

- ANSES (Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria, Medio Ambiente y Seguridad en el Trabajo) designado LR-UE para *L.monocytogenes* en mayo de 2006.
- Objetivo: proporcionar métodos de alta calidad y garantizar la competencia de los LNRs para *L.monocytogenes* mediante orientación y proyectos de evaluación y mejora de los métodos de análisis (Reglamento 2017/625, Art. 94: Responsabilidades y tareas LR-UEs).



EURL
European Union Reference Laboratory for
LISTERIA MONOCYTOGENES



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Actualización actividades del LR-UE/LNRs

- 1) Revisión del documento guía del LR-UE para muestreo en áreas de procesado
- 2) Guía para la implementación de la Norma ISO 19036 para estimación de la incertidumbre de medida asociada al recuento de bacterias
 - Publicación de valores de incertidumbre de la matriz
 - Publicación del documento “Questions and answers”
- 3) Mejora de la etapa de pre-enriquecimiento para la detección de *L.monocytogenes* (ISO 11290-1)
- 4) Mejora de la sensibilidad del recuento de *L.monocytogenes* a niveles bajos de contaminación (ISO 11290-2)

1) Revisión del documento guía del LR-UE para muestreo en áreas de procesado

Realizado por un Grupo de Trabajo con LNRs voluntarios, Autoridades Competentes y Centros Técnicos.

Importancia por la contaminación de alimentos listos para el consumo en áreas de procesado

Objetivos:

- Adaptar la información a las nuevas versiones publicadas de las ISO 11290 (partes 1 y 2) e ISO 18593.
- Proporcionar nuevas herramientas de ayuda.



[Tutorials for the implementation of sampling techniques | EURL
\(anses.fr\)](https://eurl.anses.fr)

ACTUALIZACIÓN DE DOCUMENTOS DE *Listeria monocytogenes*

María Jesús Zamora Escribano
Sección de Bacteriología.
Servicio Microbiología Alimentaria.
Código LNR MA Nº 2023/05

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT
on sampling the food processing area and equipment for the
detection of *Listeria monocytogenes*
Version 4 – 3 October 2023

Documento guía publicado el 3 de octubre de 2023
y enviado a los LNRs el 17 de octubre de 2023.

El CNA envió el documento a la red de Laboratorios
de Control Oficial en la Comunicación Nº 711.

2) Guía para la implementación de la Norma ISO 19036 (estimación incertidumbre de medida en recuentos)

- Elaborada por los LR-UEs de *Campylobacter*, *Estafilococos coagulasa positivos* y *L.monocytogenes*.
- Publicada en Junio de 2022.
- Objetivo: ayudar a los laboratorios en la implementación de la Norma ISO 19036.
- Proporciona criterios para evaluar valores aceptables de MU, en especial para laboratorios que realizan Control Oficial.

Principales componentes de la incertidumbre:

- Incertidumbre técnica (u_{tec})
- Incertidumbre de la matriz (u_{matriz})
- Incertidumbre de la distribución (u_{Poisson})
- Incertidumbre de la confirmación (u_{conf}) (para métodos de recuento de colonias con confirmación)

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tec}}^2 + u_{\text{matriz}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2}$$

PUBLICACIÓN DE VALORES DE INCERTIDUMBRE DE LA MATRIZ

u_{matriz} : incertidumbre que resulta del grado en el que la porción de ensayo no es verdaderamente representativa de la muestra de laboratorio.

- Valor fijo: para muestras homogéneas o bien mezcladas.
- Valor calculado experimentalmente: análisis de múltiples porciones de ensayo en condiciones de repetibilidad.
- Valor conocido: incertidumbre de la matriz calculada previamente.



ESTUDIO COLABORATIVO PARA OBTENER VALORES DE INCERTIDUMBRE DE LA MATRIZ
(COORGANIZADO POR LOS 3 LR-UEs)



ESTUDIO COLABORATIVO PARA OBTENER VALORES DE INCERTIDUMBRE DE LA MATRIZ

- 12 LNRs participaron en el estudio.
- Se obtuvieron datos de incertidumbre de la matriz (u_{matriz}) para 31 matrices de 20 tipos de alimentos y 11 categorías diferentes.
- Los datos obtenidos pueden ser usados por cualquier laboratorio.
- Base de datos publicadas en las páginas web de los tres LR-UEs (*L.monocytogenes*, *Campylobacter* y Estafilococos coagulasa positivo).
- Junio 2023: Propuesta del Comité ISO/TC 34/SC 9 para crear una base de datos común incluyendo los datos obtenidos en este estudio.

Matrix uncertainty EURL database (anses.fr)



Matrix uncertainty EURL database

EURLs [Campylobacter](#) - [Coagulase+ Staphylococci](#) - [L. monocytogenes](#)

Category

[Click here to select the matrix](#)

Type

Matrix

Sr (log CFU/mL)

Source

[Go to MaU EURL's webpage](#)

[- User guide of matrix uncertainty](#)

[- How to provide additional data](#)



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Matrix uncertainty EURL database

EURLs [Campylobacter](#) - [Coagulase+ Staphylococci](#) - [L. monocytogenes](#)

Category

[Click here to select the matrix](#)

Raw milk and dairy products

Category	Type	Matrix	Sr	Source
Raw milk and dairy products	Raw milks or fermented/acidified non-heated products	Raw milk (sampling from transport tank)	0,06	2021-2022 EURLs study
Raw milk and dairy products	Raw milk-based products with high fat content and/or high background flora	Hard cheese Arseniko Naxou	0,06	2021-2022 EURLs study
Raw milk and dairy products	Raw milk-based products with high fat content and/or high background flora	Soft cheese - Camembert de Normandie	0,14	2021-2022 EURLs study
Heat-processed milk and dairy products	Pasteurized dairy products	Semi hard (unripened cheese)	0,18	2021-2022 EURLs study
Heat-processed milk and dairy	Pasteurized dairy products	Feta	0,1	2021-2022 EURLs study

[User guide of matrix uncertainty](#)

[How to provide additional data](#)



Funded by the European Union. Views and opinions expressed are however those of the authors only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Health and Digital Executive Agency.



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN



EURL CPS
European Union Reference Laboratory for
Coagulase Positive Staphylococci
<http://eur-lex.europa.eu/lex/lex.asp?lang=es&id=123456789>



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes
<http://eur-lex.europa.eu/lex/lex.asp?lang=es&id=123456789>

Matrix uncertainty EURL database

EURLs [Campylobacter](#) - [Coagulase+ Staphylococci](#) - [L. monocytogenes](#)

Category

[Click here to select the matrix](#)

Raw milk and dairy products

Type

Raw milks or fermented/acidified non-heated products

Matrix

Raw milk (sampling from transport tank)

Sr (log CFU/mL)

0,06

Source

2021-2022 EURLs study

[Go to MaU EURLs webpage](#)

[User guide of matrix uncertainty](#)

[How to provide additional data](#)



Funded by
the European Union



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

PUBLICACIÓN DEL DOCUMENTO “QUESTIONS AND ANSWERS”

- Documento elaborado por los tres LR-UEs y publicado en Marzo 2024.
- Lista de preguntas y respuestas recogidas por los LR-UEs con el objeto de ayudar en la implementación de la Norma ISO 19036.
- Enviado por el CNA a los LCOs el 12 de abril de 2024 con la Comunicación N° 730.



Implementation of the Standard EN ISO 19036 for the estimation of measurement uncertainty associated with the enumeration of *Campylobacter*, coagulase positive staphylococci and *Listeria monocytogenes* in the food chain

Questions and Answers

Version 1 - 01/03/2024

3) Mejora de la etapa de pre-enriquecimiento para la detección de *L.monocytogenes* (ISO 11290-1)

- ISO/TC 34/SC 9 WG 32 (*L.monocytogenes* y *Listeria* spp.).
- Grupo de trabajo del LR-UE/LNRs para trabajar en una posible mejora del paso de pre-enriquecimiento de la ISO 11290-1.
- Selección de diferentes caldos alternativos para una posible sustitución del caldo de enriquecimiento primario actual (Half-Fraser).
- Dos aspectos importantes a tener en cuenta:
 - Armonización de los métodos de referencia.
 - Importancia de la presencia de otras especies de *Listeria* como indicadoras de la presencia de *L.monocytogenes*.

DIFERENTES CALDOS ALTERNATIVOS SELECCIONADOS:

1) Caldos procedentes de métodos de referencia:

- BLEB (Método FDA BAM)
- UVM1 (Método MFLP-01)

2) Caldos comerciales propuestos por proveedores:

- LESS + (Neogen)
- LSB (Bio-Rad)
- 24LEB (ThermoFisher)

3) Modificaciones del caldo Half-Fraser:

- Dupont (2010) y Bannenberg et al. (2021)



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

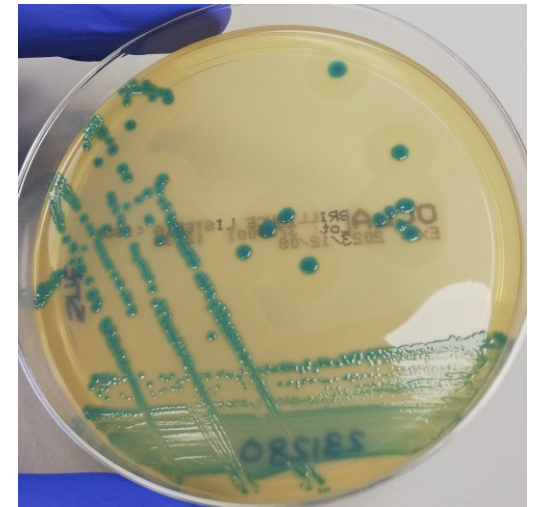


agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

- Pre-estudio con muestras natural y artificialmente contaminadas.
- Participantes podían realizar el análisis con alguno de los caldos alternativos, no era obligatorio participar con todos los caldos.
- Método ISO en paralelo.
- Análisis hasta febrero 2024.
- Determinación del LOD relativo con los datos obtenidos.
- Estudio interlaboratorio de validación en 2025.



3) Mejora de la sensibilidad del recuento de *L.monocytogenes* a niveles bajos de contaminación (ISO 11290-2)

- Importancia de la mejora de las técnicas de recuento de *L.monocytogenes*.
- Esencial para proporcionar datos fiables: epidemiología, evaluación del riesgo, análisis de rutina o programas de vigilancia en plantas de procesado.
- Alimentos habitualmente contaminados a niveles bajos.
- Gran desafío determinar estos niveles: Límite cuantificación ISO 11290-2 es 10 ufc/g.

Proyecto LR-UE/LNRs para
mejorar de la sensibilidad del
recuento de *L.monocytogenes*

Dos métodos a estudiar
basados en el método ISO

French Sectorial Standard NF
V 45-009

Método LNR de Noruega

Comparación con el método
ISO 11290-2

8 Laboratorios Nacionales de
Referencia participantes



Centro
Nacional de
Alimentación



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN



ESTUDIO PARA LA MEJORA DEL RECuento DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* A NIVELES BAJOS DE CONTAMINACIÓN

JORNADAS DE REFERENCIA CNA
4 y 5 JUNIO 2024

M^a Teresa Rodríguez Torrecilla
Responsable de la Unidad de Bacteriología Alimentaria
Servicio de Microbiología Alimentaria I (MA)

Métodos a estudio

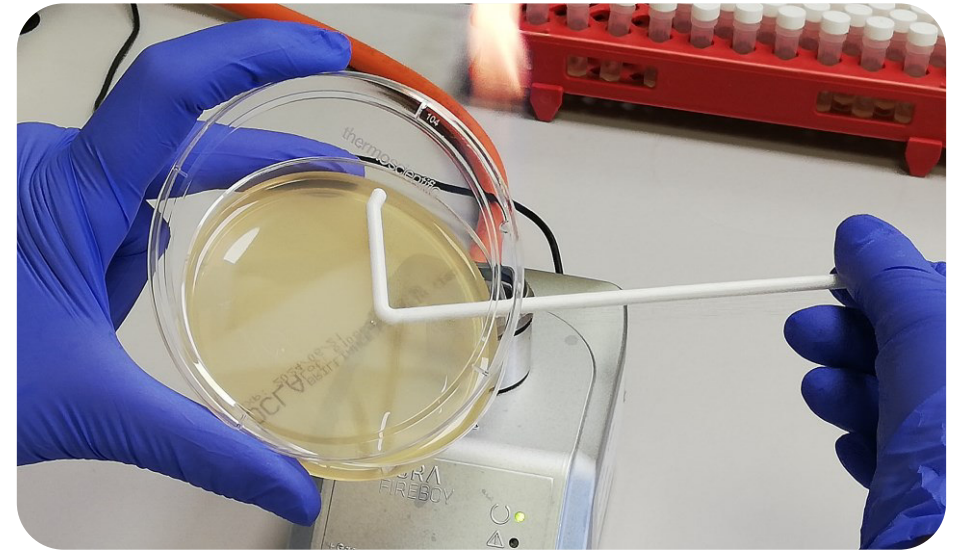
1) FRENCH SECTORIAL STANDARD NF V45-009:

- ✓ Desarrollado por el sector de pescados ahumados de Francia.
- ✓ Basado en la ISO 11290-2.
- ✓ 10 ml de la dilución 1/10 mediante siembra en profundidad en placas de 140 mm de ALOA.
- ✓ LOQ: 1 ufc/g.



2) MÉTODO DEL LNR DE NORUEGA:

- ✓ Desarrollado por el LNR de Noruega y usado en proyectos de investigación.
- ✓ Basado en la ISO 11290-2.
- ✓ 2 ml de una dilución 1/2 mediante siembra por extensión en 2 placas de 140 mm o 6 placas de 90 mm de ALOA.
- ✓ LOQ: 1 ufc/g.



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



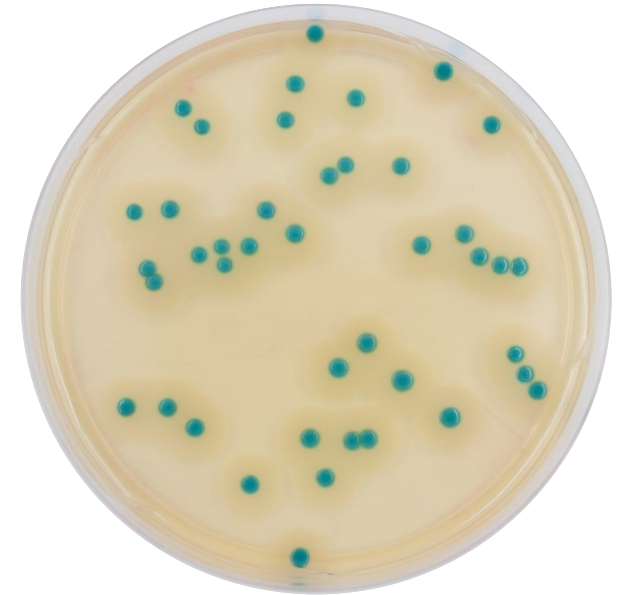
agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

3) MÉTODO ISO 11290-2:

- ✓ Comparación de los dos métodos a estudio con la ISO.
- ✓ 1 ml de la dilución 1/10 mediante siembra por extensión en 1 placa de 140 mm o 3 placas de 90 mm de ALOA.
- ✓ LOQ: 10 ufc/g.



Dos análisis por duplicado de cada método



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



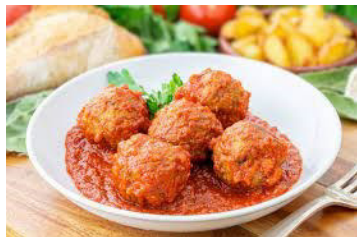
50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

PARTICIPACIÓN DEL CNA

- 10 muestras de 10 matrices diferentes
- ISO 11290-1 para verificar la ausencia de *L.monocytogenes* previamente
- Muestras contaminadas artificialmente
- Cepas aisladas en las mismas matrices
- Dos analistas (5 muestras/analista)
- Análisis realizados entre agosto y noviembre de 2023



Matrices



Albóndigas



Helado



Horchata



Brócoli congelado



Ensaladilla rusa



Queso



Longaniza



Pimientos congelados



Salchichón



Sandía



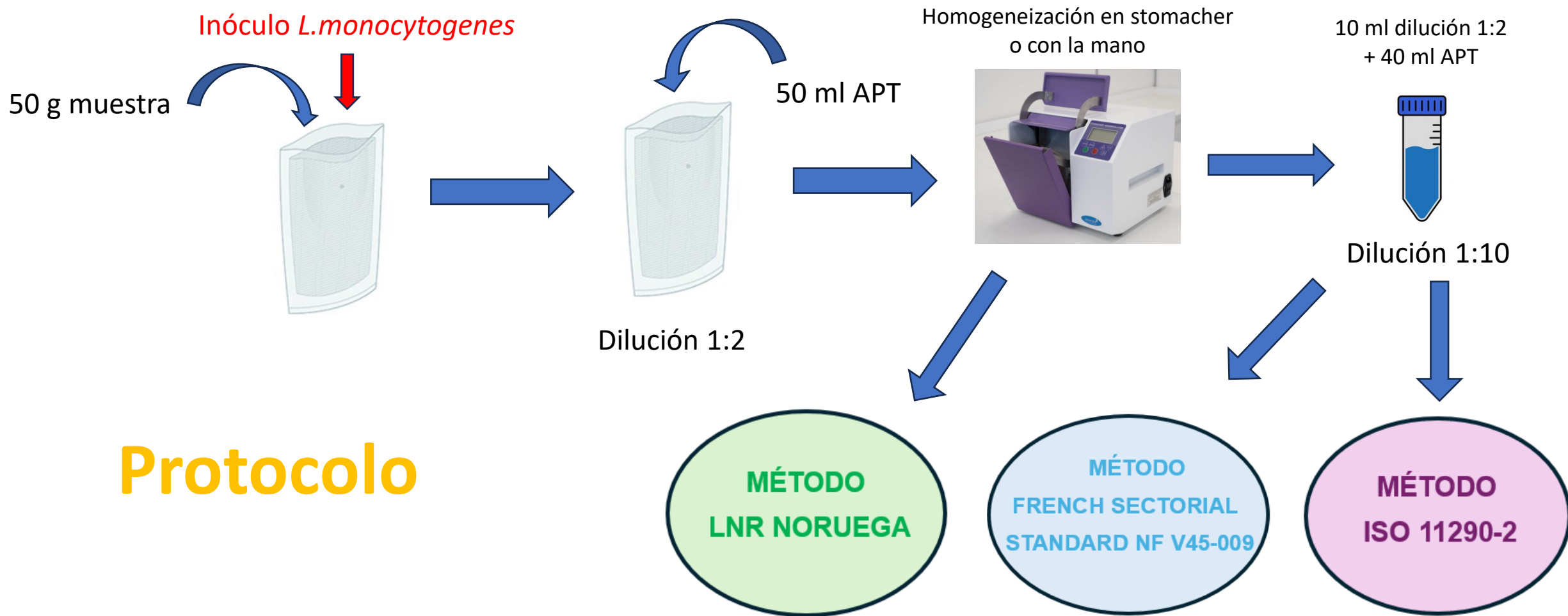
MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Cepas usadas para la contaminación artificial

- Cepas de *L.monocytogenes* aisladas en las mismas matrices analizadas en el estudio (2016 - 2019)
- Serotipos:
 - 3 cepas de *L.monocytogenes* 1/2a (horchata, sandía y albóndigas)
 - 4 cepas de *L.monocytogenes* 1/2c (longaniza, ensaladilla, salchichón y helado)
 - 1 cepa de *L.monocytogenes* 4b/4e (queso)
 - 2 cepas de serotipo desconocido (brócoli y pimientos congelados)



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

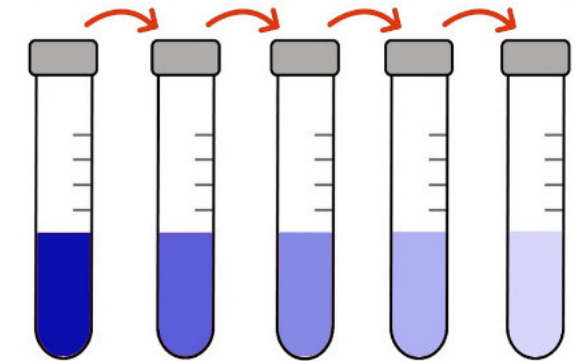


50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Niveles de contaminación

Matriz	Nivel de contaminación
Horchata	75 <u>ufc/ml</u>
Sandía	31 <u>ufc/g</u>
Longaniza	29 <u>ufc/g</u>
Ensaladilla rusa	15,6 <u>ufc/g</u> ↓ Nivel más bajo
Brócoli congelado	19,2 <u>ufc/g</u>
Queso	16 <u>ufc/g</u>
Pimientos congelados	25,2 <u>ufc/g</u>
Salchichón	78 <u>ufc/g</u> ↑ Nivel más alto
Albóndigas	32,4 <u>ufc/g</u>
Helado	60 <u>ufc/g</u>

Rango del protocolo
1 - 100 ufc/g



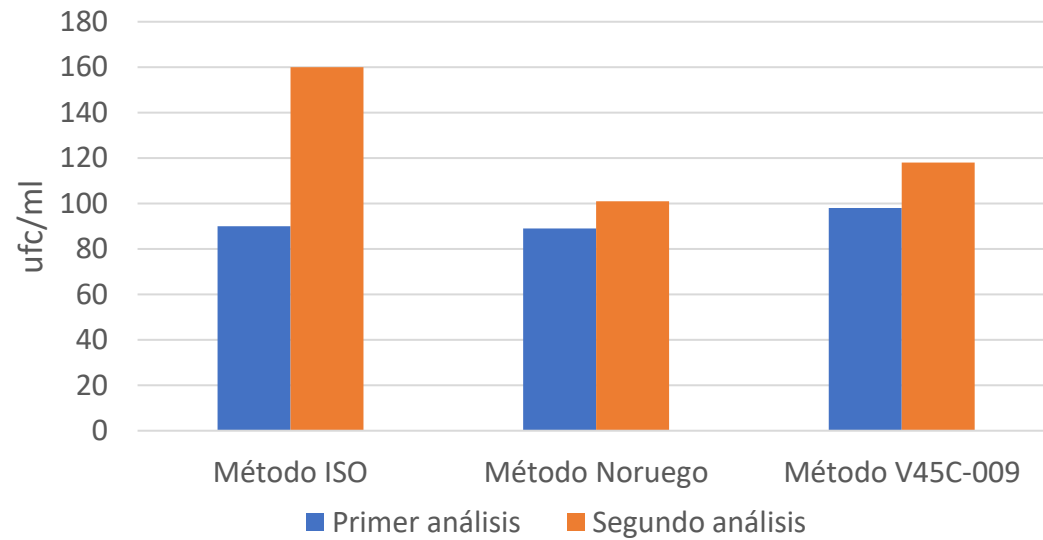
MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



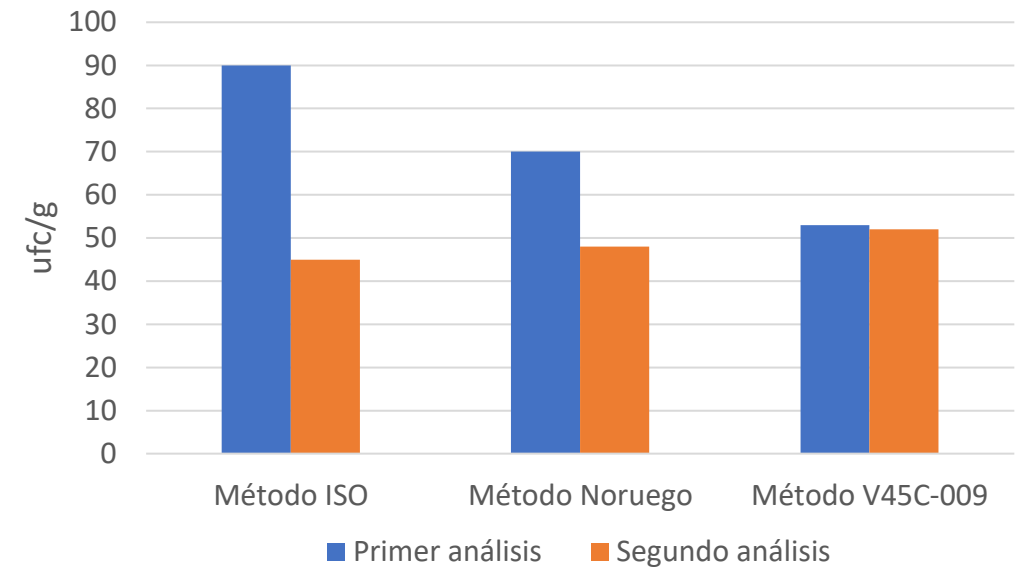
50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Resultados

Horchata



Sandía

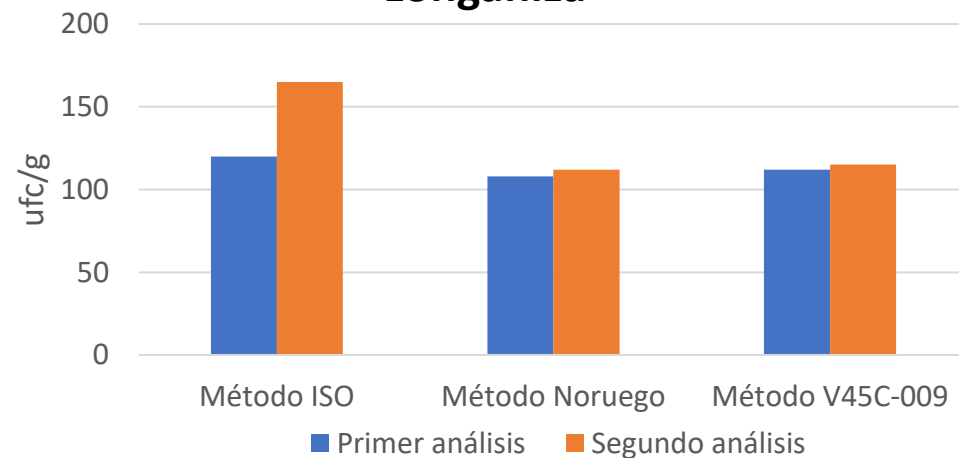


MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

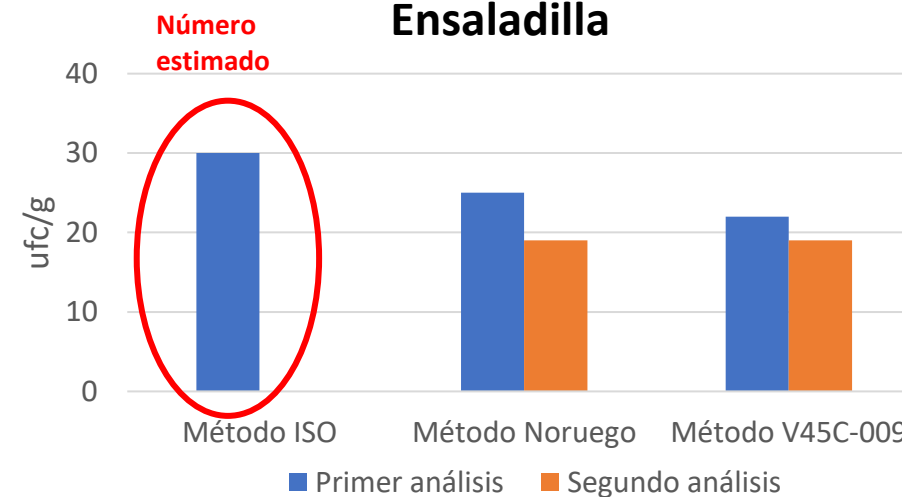


50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

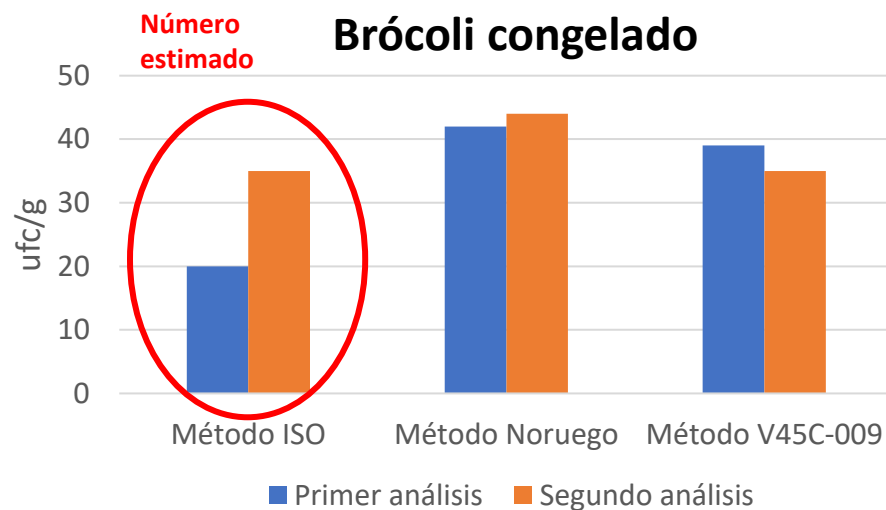
Longaniza



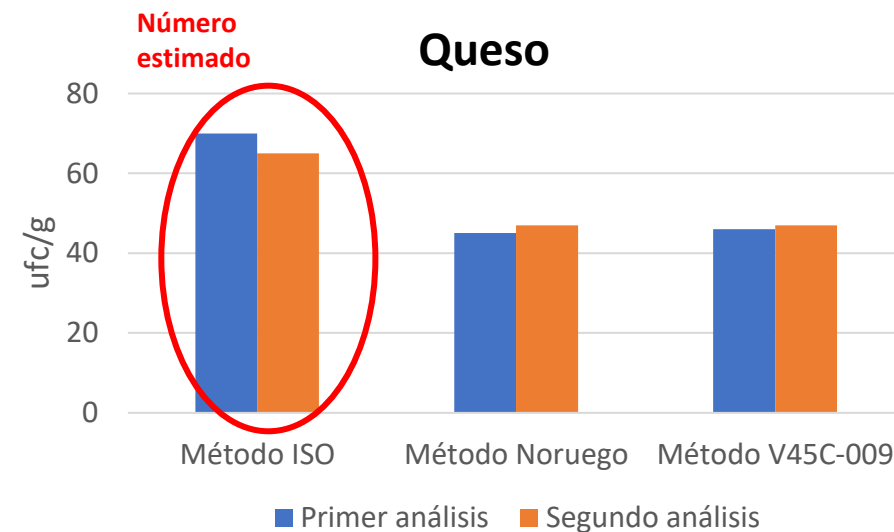
Ensaladilla



Brócoli congelado



Queso

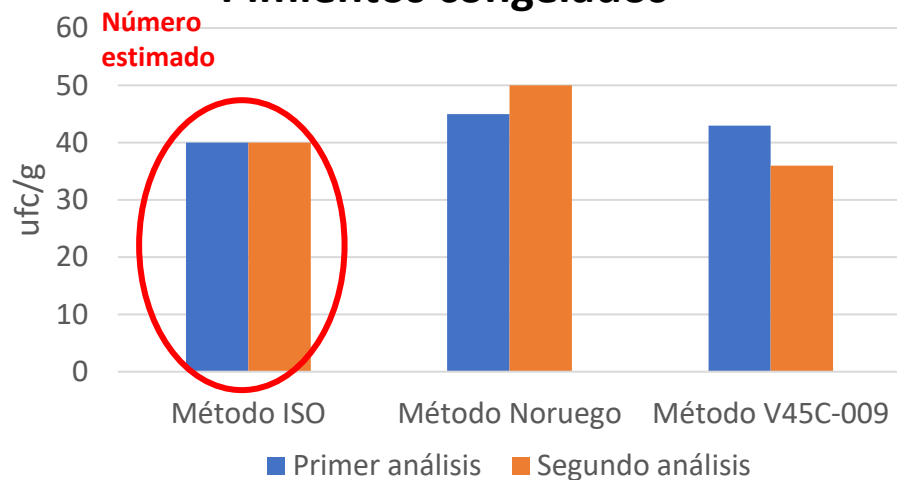


MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

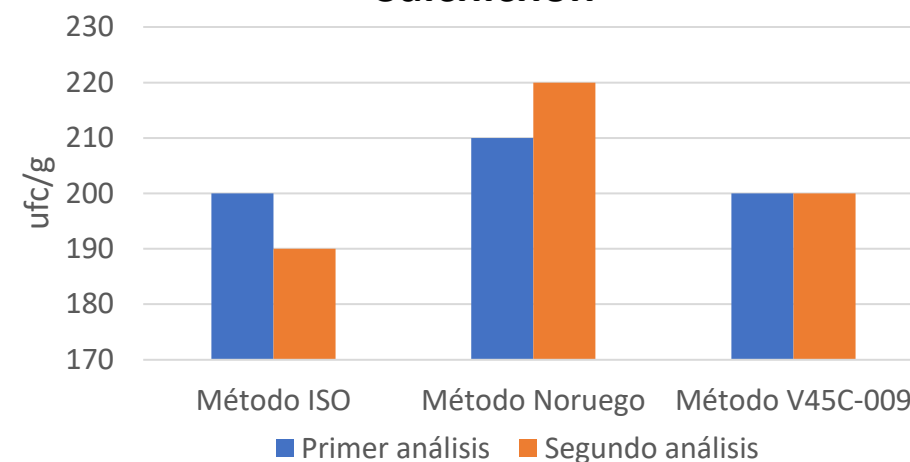


50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

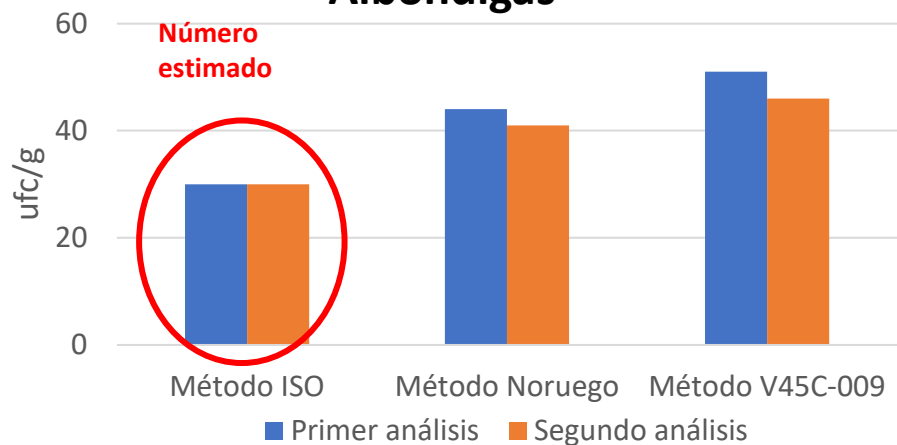
Pimientos congelados



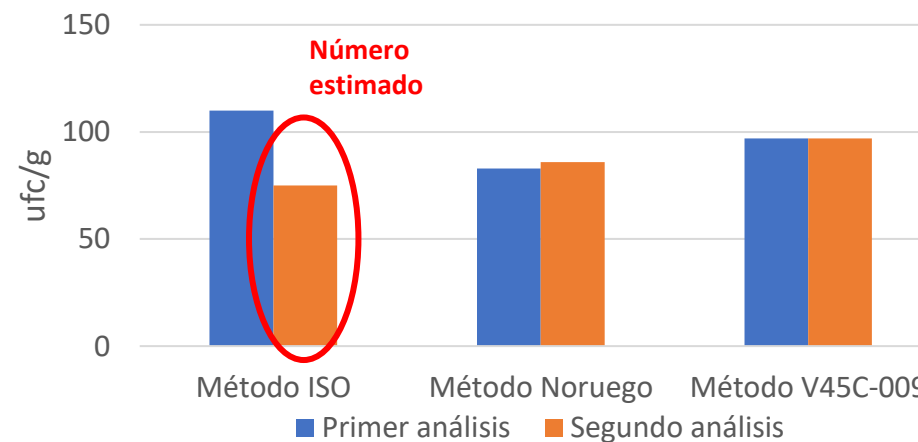
Salchichón



Albóndigas



Helado



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Tabla resumen

Matriz	RESULTADOS (ufc/g o ml)								
	Método ISO			Método LNR Noruega			Método V45C-009		
	1 ^{er} Análisis	2 ^o Análisis	Media	1 ^{er} Análisis	2 ^o Análisis	Media	1 ^{er} Análisis	2 ^o Análisis	Media
Horchata	90	160	125	89	101	95	98	118	108
Sandía	90	45	67,5	70	48	59	53	52	52,5
Longaniza	120	165	142,5	108	112	110	112	115	113,5
Ensaladilla	30 (NE)	< 10	15	25	19	22	22	19	20,5
Brócoli congelado	20 (NE)	35 (NE)	27,5	42	44	43	39	35	37
Queso	70 (NE)	65 (NE)	67,5	45	47	46	46	47	46,5
Pimientos congelados	40 (NE)	40 (NE)	40	45	50	47,5	43	36	39,5
Salchichón	200	190	195	210	220	215	200	200	200
Albóndigas	30 (NE)	30 (NE)	30	44	41	42,5	51	46	48,5
Helado	110	75 (NE)	92,5	97	97	97	83	86	84,5



Conclusiones del CNA

- Buena recuperación con los métodos del LNR de Noruega (mejor recuperación en 5 muestras) y método ISO (mejor recuperación en 4 muestras)

Problemas:

➤ Método ISO:

- Se obtuvo un resultado de Número Estimado en 6/10 muestras (menor volumen inoculado, menor número de colonias en la placa, menor precisión)
- Menor repetibilidad entre análisis en algunas muestras.

➤ Método LNR Noruega:

- Problemas para preparar la dilución $\frac{1}{2}$ con productos grasos (longaniza, ensaladilla, salchichón, queso...). El producto absorbió casi todo el diluyente.

➤ Método French Sectorial Standard V45C-009:

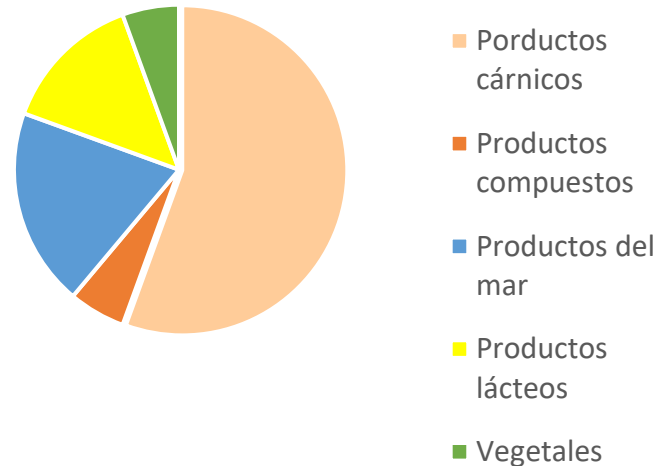
- Dificultad para contar colonias cuando había alrededor de 100 colonias/placa (colonias en diferentes capas del agar).
- Peor recuperación.



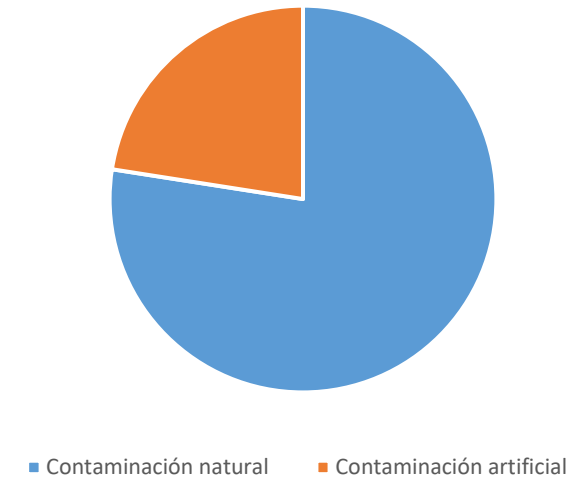
RESULTADOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO

- 71 muestras analizadas entre los LNRs participantes y el LR-UE
- Artificial o naturalmente contaminadas

Porporción de categorías de alimentos (n=71)



Tipo de contaminación



PROBLEMAS MÉTODO V45C-009

- El LR-UE informó de resultados no legibles en todas las categorías de alimentos debido al halo no visible y la flora acompañante invasiva.
- Adaptado a su alcance (pescados ahumados) pero no se puede aplicar como método horizontal.
- Siembra en profundidad: requiere un material especial (baños de agua) y la adición manual de suplementos selectivos peligrosos.
- Método más complejo que las técnicas de siembra por extensión.

Análisis de los datos

- Linealidad: software Systat.
 - ✓ Regresión lineal correcta de los métodos Noruego y V45C-009 comparados con el método ISO, pero mejor para el método Noruego.
- Diagramas de Bland-Altman: resultados correctos para ambos métodos alternativos, pero mejores para el método Noruego.
- Repetibilidad: conforme a la ISO 5725-2 usando software Prolab.
 - ✓ Resultados correctos y buen rendimiento incluso a niveles muy bajos



Conclusiones del LR-UE y siguientes pasos

- Resultados del método Noruego similares a los de la Norma ISO.
- Método French Sectorial Standard NF V45C-009 peores resultados tanto en practicabilidad, linealidad y resultados Bland Altman

Eliminación del método V45C-009 del estudio

- Evaluación del método Noruego y presentación de los resultados al ISO TC/34 SC/9 WG 32 para consulta antes de continuar con más ensayos.
- Si el WG 32 lo aprueba se realizará un estudio de perfil de precisión basado en la ISO 16140-2

Si resultados satisfactorios, posibilidad de incluirlo en el protocolo ISO para mejorar la sensibilidad del recuento para casos de números bajos

AGRADECIMIENTO A LOS LCOs

Gran colaboración de nuestra red de LCOs con el envío de muestras naturalmente contaminadas con *L.monocytogenes* al LR-UE

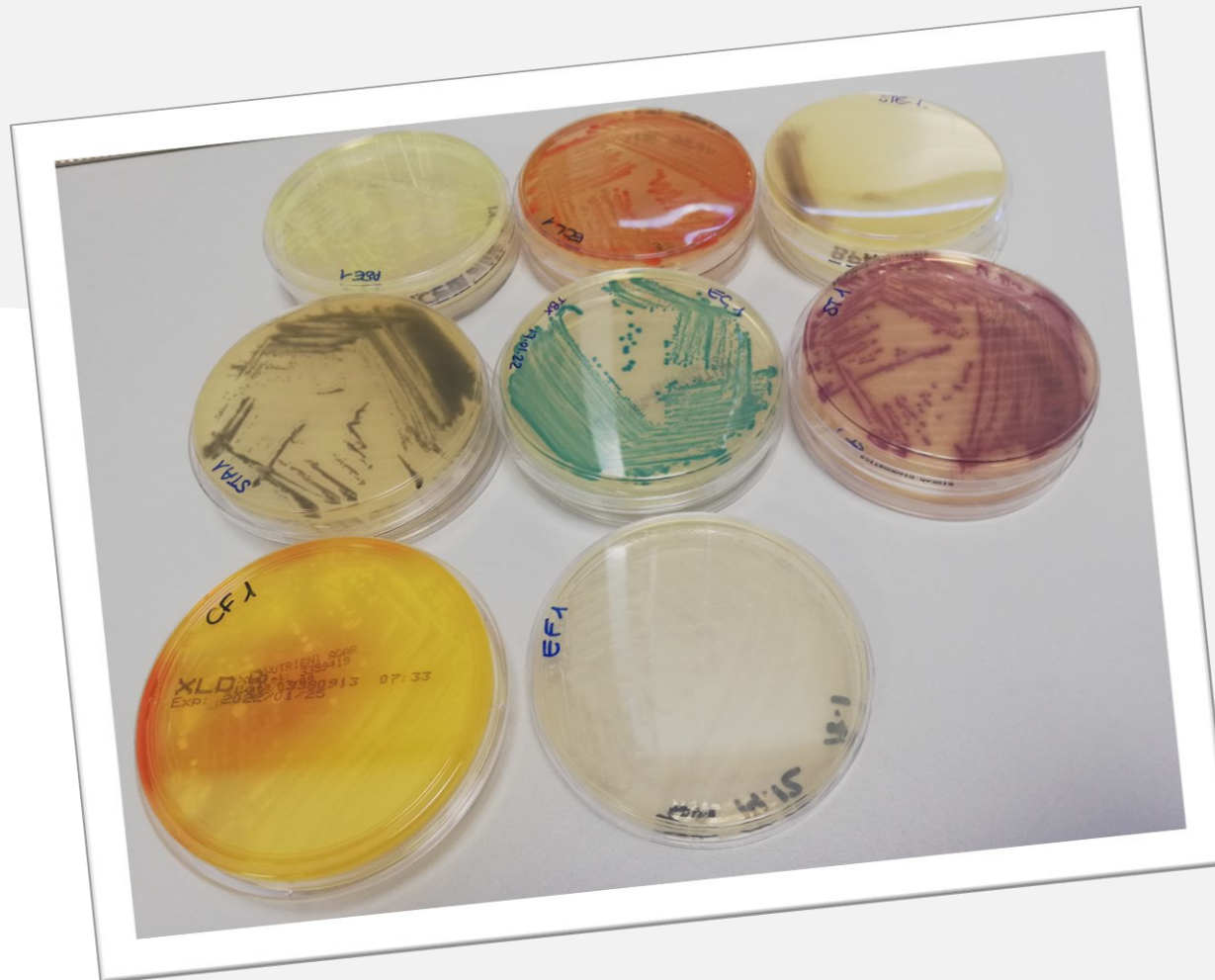
29 MUESTRAS ENVIADAS



MUY IMPORTANTES PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE MEJORA DE LA ETAPA DE ENRIQUECIMIENTO (ISO 11290-1) Y DE MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DEL RECuento (ISO 11290-2)



MUCHAS GRACIAS



50

50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

*Cuidando de ti
desde el laboratorio*



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación