

ÁREA BIOLÓGICA MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

JORNADAS DE REFERENCIA ANÁLISIS DE ALIMENTOS 19-20 de Junio de 2023



- **María Jesús Zamora Escribano**
Jefe de Servicio de Microbiología Alimentaria
- **Iria Uhía Castro**
Facultativo especialista de Bacteriología Alimentaria
- **Sonia Aguayo Balsas**
Responsable Técnico de Resistencias a antimicrobianos

Programa de las Jornadas de Microbiología Alimentaria

Organización de Ejercicios de Intercomparación

PONENTE: María Jesús Zamora Escribano

Actualización y novedades *Campylobacter*

PONENTE: Iria Uhía Castro

Resistencias antimicrobianas. Tendencias

PONENTE: Sonia Aguayo Balsas

SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA



**Organización de Ejercicios
de Intercomparación en el
Servicio de Microbiología
Alimentaria**

María Jesús Zamora Escribano



Organización de ejercicios de intercomparación en el
Servicio de Microbiología Alimentaria del CNA

POR QUÉ ORGANIZA EL CNA EI



Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos.

Quedan derogados los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º **882/2004** con efectos a partir del 14 de diciembre de 2019.



7.4.2017

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 95/1

I

(Actos legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 15 de marzo de 2017

relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo
(Reglamento sobre controles oficiales)

(Texto pertinente a efectos del EEE)



Artículo 101.1 del Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos

“Los laboratorios nacionales de referencia, en su ámbito de competencia, cuando proceda, organizarán ensayos interlaboratorios comparados o ensayos de aptitud entre los laboratorios oficiales, garantizarán un seguimiento apropiado de dichos ensayos e informarán a las autoridades competentes de los resultados de dichos controles y seguimiento”



Organización de ejercicios de intercomparación en el Servicio de Microbiología Alimentaria del CNA

CUÁL ES EL MÉTODO



MÉTODOS DE CONTROL OFICIAL EXIGIDOS EN EL EI

Métodos utilizados para el muestreo, los análisis, los ensayos y los diagnósticos, Los métodos de muestreo, así como los de análisis, ensayo y diagnóstico de laboratorio, utilizados durante los controles oficiales y otras actividades oficiales cumplirán la normativa de la Unión por la que se establecen dichos métodos o los criterios de funcionamiento de dichos métodos. -Artículo 34 (Obligaciones de los laboratorios oficiales) del Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo-

los métodos disponibles que se ajusten a las normas o los protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos, incluidos los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN), o

los métodos pertinentes desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional;





REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

Todos los métodos utilizados para los análisis utilizados por los laboratorios que realizan los controles oficiales son las **Normas ISO**

REGLAMENTO (CE) no 2015/1375 DE LA COMISIÓN de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas

Todos los métodos para los análisis utilizados por los laboratorios que realizan los controles oficiales son las **Normas ISO**

L 37/106

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

8.2.2019

**REGLAMENTO (UE) 2019/229 DE LA COMISIÓN
de 7 de febrero de 2019**

por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que se refiere a determinados métodos, al criterio de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* en las semillas germinadas y a los criterios de higiene de los procesos y de seguridad alimentaria relativos a los zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para el consumo)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

11.8.2015

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 212/7

**REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2015/1375 DE LA COMISIÓN
de 10 de agosto de 2015**

por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne

(texto codificado)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

MINISTERIO
DE CONSUMOagencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

PROGRAMA 9 SOBRE CONTROL DE ANISAKIS SPP.

Anisakis spp. es un parásito que puede encontrarse en el pescado y en algunos cefalópodos (calamar, pulpo, sepia...) y al ingerir estos alimentos crudos, insuficientemente cocinados o con tratamiento de congelación inadecuado, sus larvas pueden pasar activas al aparato digestivo humano, provocando alteraciones digestivas y reacciones alérgicas.

El objetivo general del programa es reducir los riesgos vinculados a la presencia de *Anisakis spp.* en los alimentos de acuerdo con la legislación vigente.

Para comprobar estos requisitos legales, es necesaria la realización de controles que podrán consistir en:

- Control de parásitos en productos de la pesca con el fin de comprobar que no se encuentran claramente parasitados con larvas de *Anisakis spp.*
- Inspección de los establecimientos alimentarios de productos de la pesca, para verificar la existencia y correcta implantación de planes de control de anisakis por parte de los operadores económicos.
- Inspección de los establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades, y/o que elaboran productos de la pesca destinados para ser consumidos en crudo o insuficientemente cocinados, para comprobar la adecuada comunicación al consumidor final sobre la congelación previa de estos productos.

El control oficial sobre la presencia de *Anisakis spp.* se realiza en establecimientos de productos de la pesca y de comidas preparadas diferenciados, según la naturaleza del control de la siguiente forma:

- En establecimientos alimentarios, distribuidores, elaboradores y venta de pescados y derivados:
 - examen visual macroscópico del pescado fresco para comprobar que no se encuentra parasitado;
 - verificación de los registros de tratamientos de congelación aplicados;
 - análisis para detección de larvas viables, en los casos especificados en la legislación;
 - verificación de la existencia y correcta implantación en planes de control de anisakis por parte de los operadores económicos.



Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025

Programa 10

Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos de agentes zoonóticos alimentarios



Este programa de vigilancia quedaría encuadrado como **otras actividades oficiales (OAO)**, entendiéndose como tal las actividades distintas de los controles oficiales y que se describen en el artículo 2 del *Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.*

**Organización de ejercicios de intercomparación en el
Servicio de Microbiología Alimentaria del CNA**

QUIÉN PARTICIPA

La única lista válida para
convocar los EI del CNA es
RELSA



Organización de ejercicios de intercomparación en el Servicio de Microbiología Alimentaria del CNA

QUIÉN PARTICIPA

Requisitos:

Acreditado para el método

Designado por la/las AC



POR QUÉ PARTICIPA

Artículo 38

Obligaciones de los laboratorios oficiales

1. Cuando los resultados de un análisis, ensayo o diagnóstico efectuado con las muestras tomadas durante control oficiales u otras actividades oficiales indiquen un riesgo para la salud humana, la salud animal, la sanidad vegetal o, por lo que respecta a los OMG y los productos fitosanitarios, también para el medio ambiente, o indiquen la probabilidad de un incumplimiento, los laboratorios oficiales informarán de inmediato a las autoridades competentes que los hayan designado para ese análisis, ensayo o diagnóstico y, en su caso, a los organismos delegados o a las personas físicas en quienes se hayan delegado tareas. No obstante, acuerdos específicos entre las autoridades competentes, los organismos delegados o las personas físicas en quienes se hayan delegado tareas y los laboratorios oficiales podrán especificar que no se requiere que esta información se facilite de inmediato.
2. A petición del laboratorio de referencia de la Unión Europea o del laboratorio nacional de referencia, los laboratorios oficiales participarán en ensayos interlaboratorios comparados o en ensayos de aptitud organizados para los análisis, ensayos o diagnósticos que realicen en su calidad de laboratorios oficiales.
3. A petición de las autoridades competentes, los laboratorios oficiales pondrán a disposición del público los nombres de los métodos utilizados para los análisis, ensayos o diagnósticos en el contexto de los controles oficiales y otras actividades oficiales.



CNA ES LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA EN EL SERVICIO DE MA



1. LR-UE *Campylobacter*



2. LR-UE *Salmonella*



3. LR-UE *E.coli* (VTEC)

4. LR-UE Parásitos



5. LR-UE *Listeria monocytogenes*

6. LR-UE CPS (Enterotoxinas estafilocócicas)

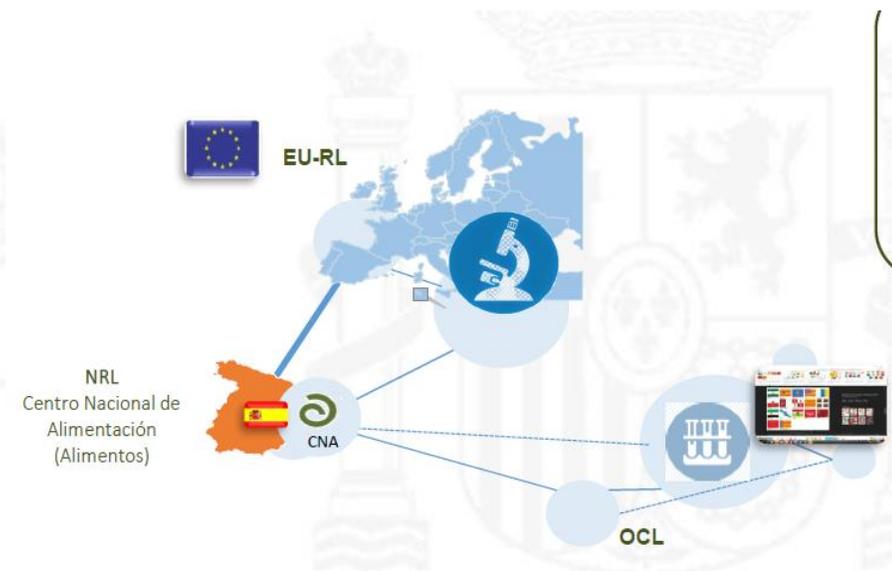


7. LR-UE virus en alimentos



8. LR-UE Resistencias a antimicrobianos

CO



Criterios microbiológicos

Número suficiente laboratorios

Salmonella spp

Resultados satisfactorios 93,8% al 100%

2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2016	2018	2020	2022
47	53	53	49	39	46	43	46	43	41	47	47	53



Listeria monocytogenes

Resultados satisfactorios 91,2% al 100%

2006	2007	2009	2010	2011	2012	2013	2013	2014	2015	2017	2019	2021
42	51	48	34	43	40	40	46	43	35	34	38	46



Listeria monocytogenes

Ejercicios de intercomparación organizados por el CNA.
Detección de *L.monocytogenes*: Norma ISO 11290-1



2006	2007	2009	2010	2011	2012	2013
• 42	• 51	• 48	• 34	• 43	• 40	• 40
• 97%	• 100%	• 99%	• 91,2%	• 97,8%	• 100%	• 90%

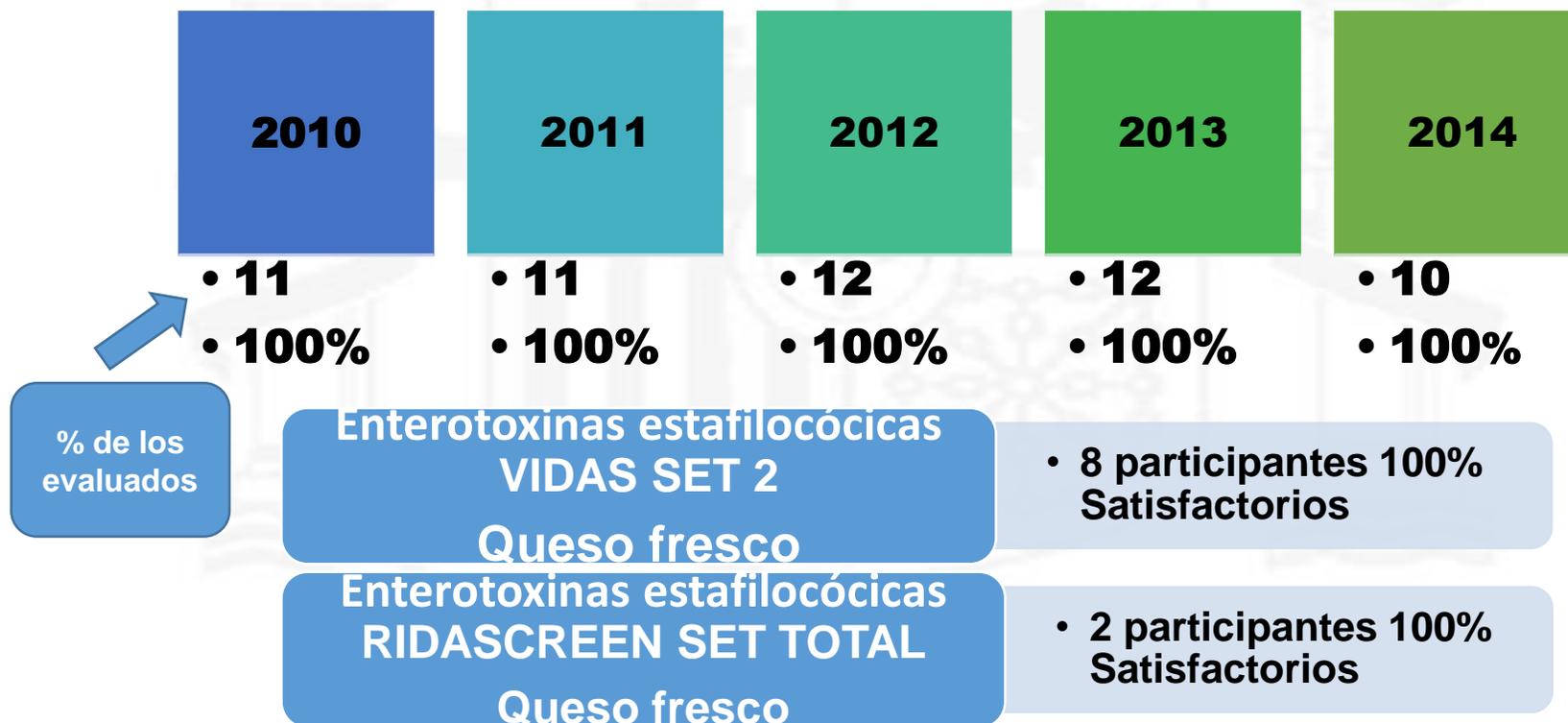
2014

***Listeria monocytogenes*
en producto cárnico**

- 35 participantes 100% Satisfactorios
- 6 laboratorios no evaluados (5 no se ajustan al método solicitado y 1 no envía el cuestionario)

Enterotoxinas estafilocócicas

Ejercicios de intercomparación organizados por el CNA.
Detección de enterotoxinas estafilocócicas método LR UE versión 5
sept 2010 (VIDAS SET 2 ó RIDASCREEN SET TOTAL)



I Ejercicio de aptitud para la detección de *Trichinella* 2010

Participantes

- 24 laboratorios de Control Oficial

Muestras

Carne de cerdo
100 g

- 2 muestras cargadas con 6 larvas
- 2 muestras cargadas con 12 larvas
- 1 muestra negativa

Resultados

- 15 lab resultados cualitativos satisfactorios
- 2 lab con falsos positivos
- 5 lab con falsos negativos
- 2 lab no enviaron resultados

V Ejercicio de aptitud para la detección de *Trichinella* 2014

Participantes

- 29 laboratorios de Control Oficial

Muestras

Carne de cerdo
100 g

- 2 muestras cargadas con 5 larvas
- 2 muestras cargadas con 10 larvas
- 1 muestra negativa

Resultados

- 29 lab resultados cualitativos satisfactorios

I-V Ejercicios de Intercomparación para la detección de larvas de *Trichinella* 2010-2014

	2010	2011	2012	2013	2014
Total participantes	24	24	27	29	29
Resultados satisfactorios	62.5%	83.3%	85.2%	89.7%	100%

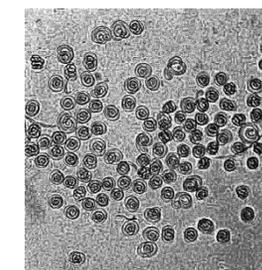
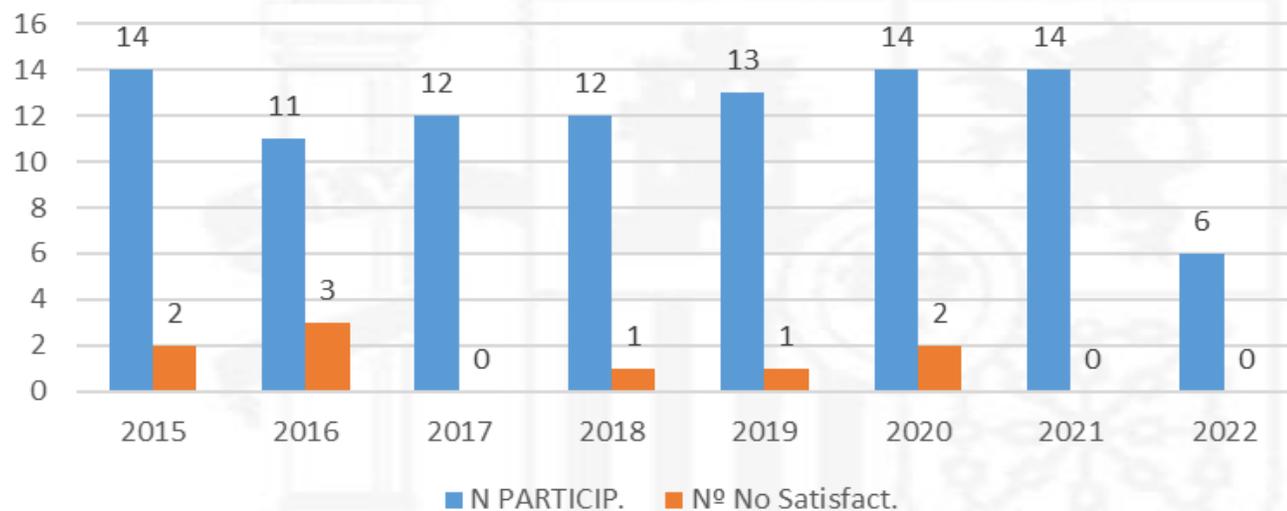


Foto: Rosario Calderón

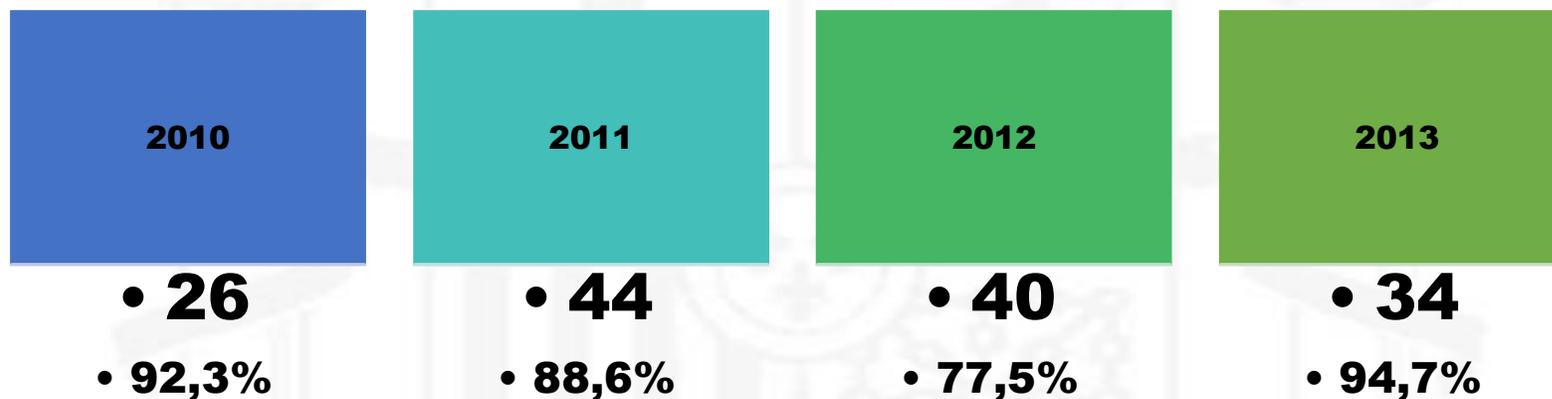
Ejercicios de intercomparación: Detección de *Anisakidae*

Tendencia de participación y resultados en el E.I.
CNA Anisakis



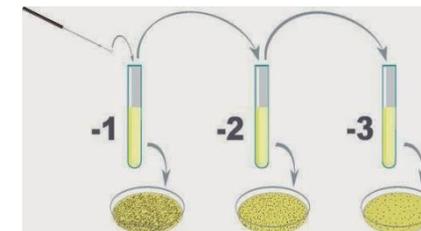
Listeria monocytogenes

Ejercicios de intercomparación organizados por el CNA.
Recuento de *L.monocytogenes*: Norma ISO 11290-2



2014
Listeria monocytogenes
en queso fresco

• 35 participantes 88,2% Satisfactorios
• 2 laboratorios no satisfactorios y 2 laboratorios no evaluados (1 no envía los resultados por la web y 1 no envía el cuestionario)



Listeria monocytogenes y CPS

Ejercicios de intercomparación organizados por el CNA.

Recuento de *L.monocytogenes*: Norma ISO 11290-2

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2018	2020	2022
Nº de participantes	44	40	38	34	40	38	40	42	46
Matriz	Leche desnatada en polvo	Leche desnatada en polvo	Atún al natural	Queso fresco	Gamba pelada	Pescado ahumado	Maíz congelado	Producto cárnico RTE (Salchicha)	Queso de pasta blanda

Recuento de estafilococos coagulasa-positivos 6888 1 y 2

	2008	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2018	2020	2022
Nº de participantes	49	38	43	41	45	39	44	38	38	38	34
Matriz	Leche en polvo	Producto lácteo en polvo	Leche desnatada en polvo	Leche desnatada en polvo	Nata	Queso fresco	Gamba pelada	Natillas	Leche	Camarón	Queso

EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN Recuento de *L. monocytogenes*

	2016	2018	2020	2022 (RELSA)	Desde 2016
Matriz	Pescado ahumado	Maíz congelado	Producto cárnico RTE (Salchicha)	Queso de pasta blanda	
Nº de participantes	38	40	42	46	↑
% SATISFACTORIOS $Z \leq 2$	89,5 %	92,5 %	90,5 %	97,8 %	↑
% CUESTIONABLES $2 < Z \leq 3$	5,3 %	5 %	0 %	0 %	↓
% NO SATISFACTORIOS $ Z > 3$	5,3 %	2,5 %	9,5 %	2,2 %	↓
% NO EVALUADOS	5,3 % (no usan método reglamentario)	0 %	0 %	0 %	↓

DESVIACIONES El Recuento de *L. monocytogenes*

% LAB. CON DESVIACIONES	2016	2018	2020	2022 (RELSA)	
PRUEBAS BQ	56 %	2,5 % (nueva versión ISO: solo obligatorias hemólisis y azúcares)	0 %	0 %	↓
Nº COLONIAS CONFIRMADAS	22 %	30 %	12 %	20 %	↑ del 8 % de 2020 a 2022 (5 % debido a lab. nuevos)
ERROR EN CÁLCULO DEL RECUENTO	28 %	35 %	21 %	33 %	↑ del 12 % de 2020 a 2022 (9 % debido a lab. nuevos)



➤ ORGANIZACIÓN EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN DE TRIQUINA COORDINADOS CON LOS LABORATORIOS SUPERVISORES

Antecedentes. Incidencia de la enfermedad en España

Antecedentes. Marco regulatorio del control de triquina en mataderos

Ensayos intercomparación en laboratorios de análisis

Detección de triquina en animales (España)

Tipo	Muestras analizadas	Muestras positivas	% Positividad
Caballo	22.356	0	0,00%
Jabalí	154.094	460	0,30%
Porcino	54.836.505	3	0,00%
	55.012.955	463	0,001%

Fuente: AESAN-MAPA 2020



Tipo	Muestras analizadas	Muestras positivas	% Positividad
Ganado porcino	53.672.398	13	0,0000%
Jabalíes	171.090	531	0,31%
Solípedos	20.361	0	0,00%
	53.863.849	544	0,001%

En los **jabalíes salvajes**, el porcentaje de positividad fue del 0,07%. El mayor número de animales positivos se detectó en **España (531)** y Polonia (453).

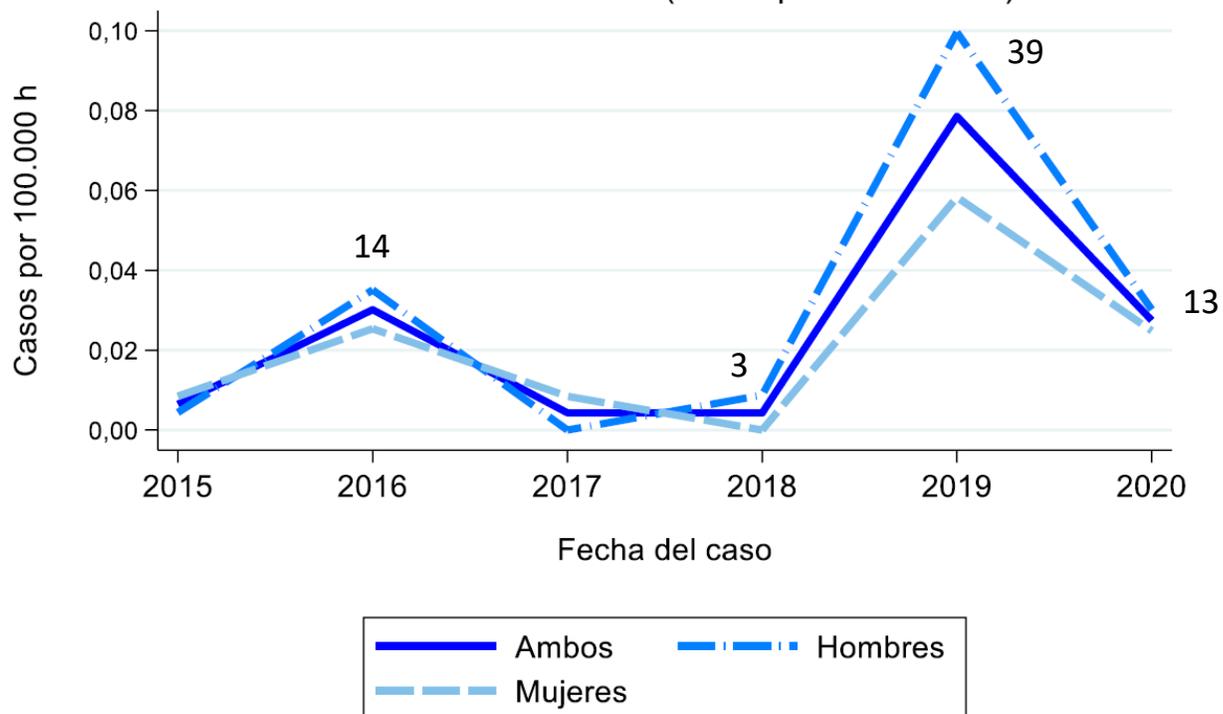
Tabla 7.1

Muestras de animales analizadas en España, en el año 2021

Fuente: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Vigilancia de triquinosis 2015-2020. Tasa de incidencia

Figura 1. Vigilancia de Triquinosis. 2015-2020
Incidencia acumulada (casos por 100.000 h.)



Fuente: Red Nacional de Vigilancia epidemiológica

Reglamento 2017/ 625. Artículo 40

- Excepciones a la acreditación obligatoria de los mataderos que:
 - Exclusivamente analicen triquinas
 - Realicen el análisis por el método de referencia o método equivalente según R 2015/1375 y R 2020/1478
 - Que se encuentren supervisados por la Autoridad competente
 - Que participen regularmente en ensayos de intercomparación

R 2017/625

Procedimiento de
Coordinación para
C.O. de Triquina



Procedimiento para la coordinación del control oficial de triquina

- Responsabilidades para los laboratorios de salud pública (supervisores) y Responsabilidades para el CNA
 - Actividades de control y supervisión sobre los mataderos
 - Ensayos intercomparación organizados conjuntamente
 - Evaluar desviaciones
 - Informe sobre las actividades realizadas

**PROCEDIMIENTO PARA LA COORDINACIÓN DE
LOS LABORATORIOS DESIGNADOS PARA
CONTROL OFICIAL DE TRIQUINA CONFORME
AL REGLAMENTO (UE) 2017/625, RELATIVO A
LOS CONTROLES OFICIALES Y OTRAS
ACTIVIDADES OFICIALES**

PROCEDIMIENTO APROBADO EN COMISIÓN INSTITUCIONAL

DE 19 DE DICIEMBRE DE 2018

El objetivo es **recopilar y evaluar la información** de los ejercicios de intercomparación organizados conjuntamente con los laboratorios supervisores en las diferentes comunidades autónomas, para así cumplir con lo establecido en el Procedimiento de Coordinación para Control Oficial de Triquina.

Realizar un **seguimiento** de los resultados **no satisfactorios** tendrán que adoptar medidas para corregir la desviación detectada en el EI y se realizará un seguimiento que asegure que las acciones correctivas son adecuadas y que han subsanado el problema.

Cuatro (4) convocatorias de ejercicio de intercomparación llevados a cabo en el año 2021, e incluye el resumen del seguimiento de las acciones correctivas fruto de resultados no satisfactorios.

2

Ronda 1: Semana del 22 al 26 de febrero de 2021

Ronda 2: Semana del 24 al 28 de mayo de 2021

Ronda 3: Semana del 4 al 8 de octubre de 2021

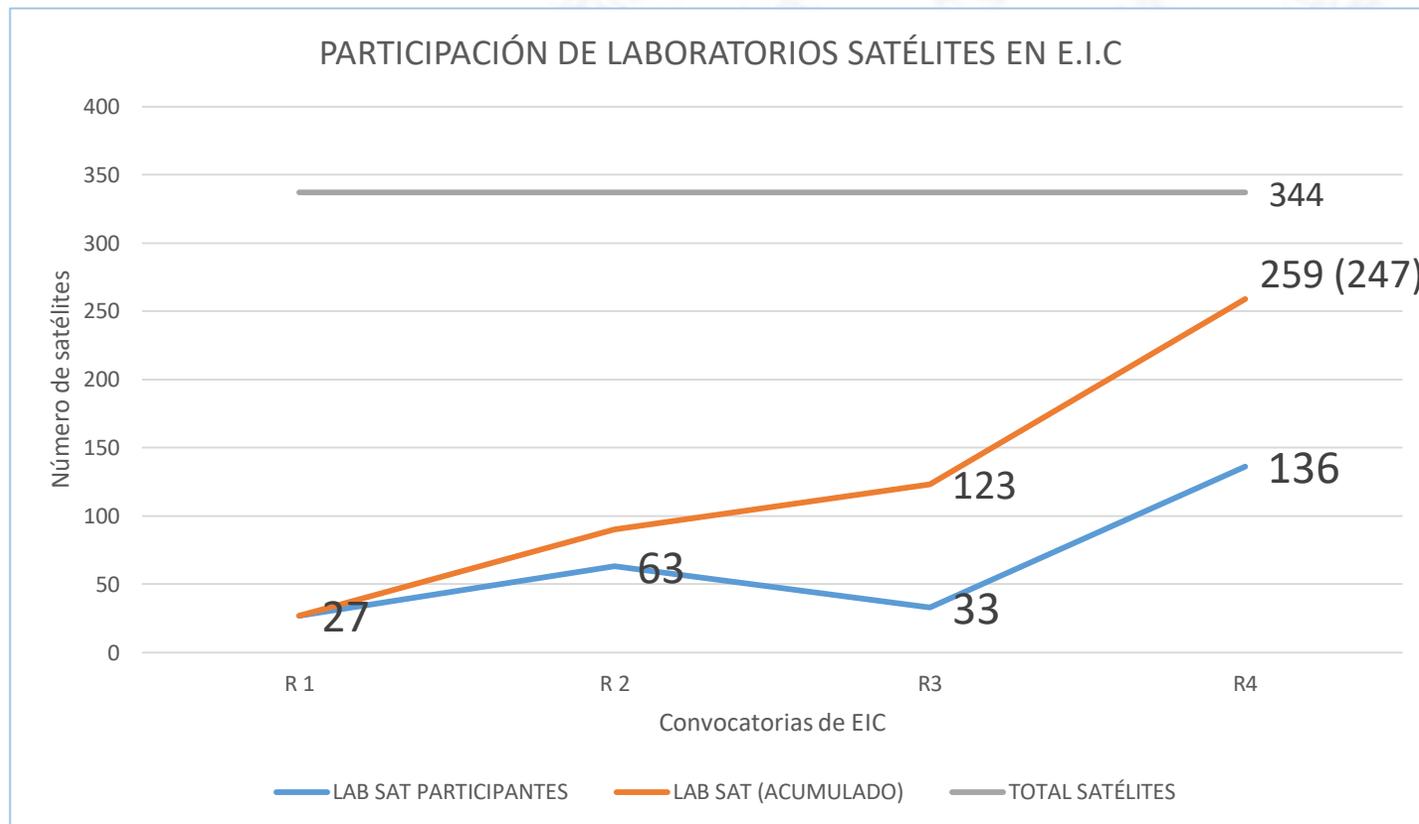
Ronda 4: Semana del 15 al 19 de noviembre de 2021

Total de laboratorios supervisores y su participación en E.I.



Los resultados se han procesado manteniendo la confidencialidad de los laboratorios participantes

1. RESULTADOS DE LOS EIC, 2021



➤ CONCLUSIONES ORGANIZACIÓN EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN



HERRAMIENTA NECESARIA PARA EL CONTROL OFICIAL

Control de los métodos:

- Mejorar la utilización
- Actualización

Fuente fiable de información:

- Garantía

Competencia de la red de laboratorios designados para realizar el control oficial

Avalan los resultados analíticos (AC).



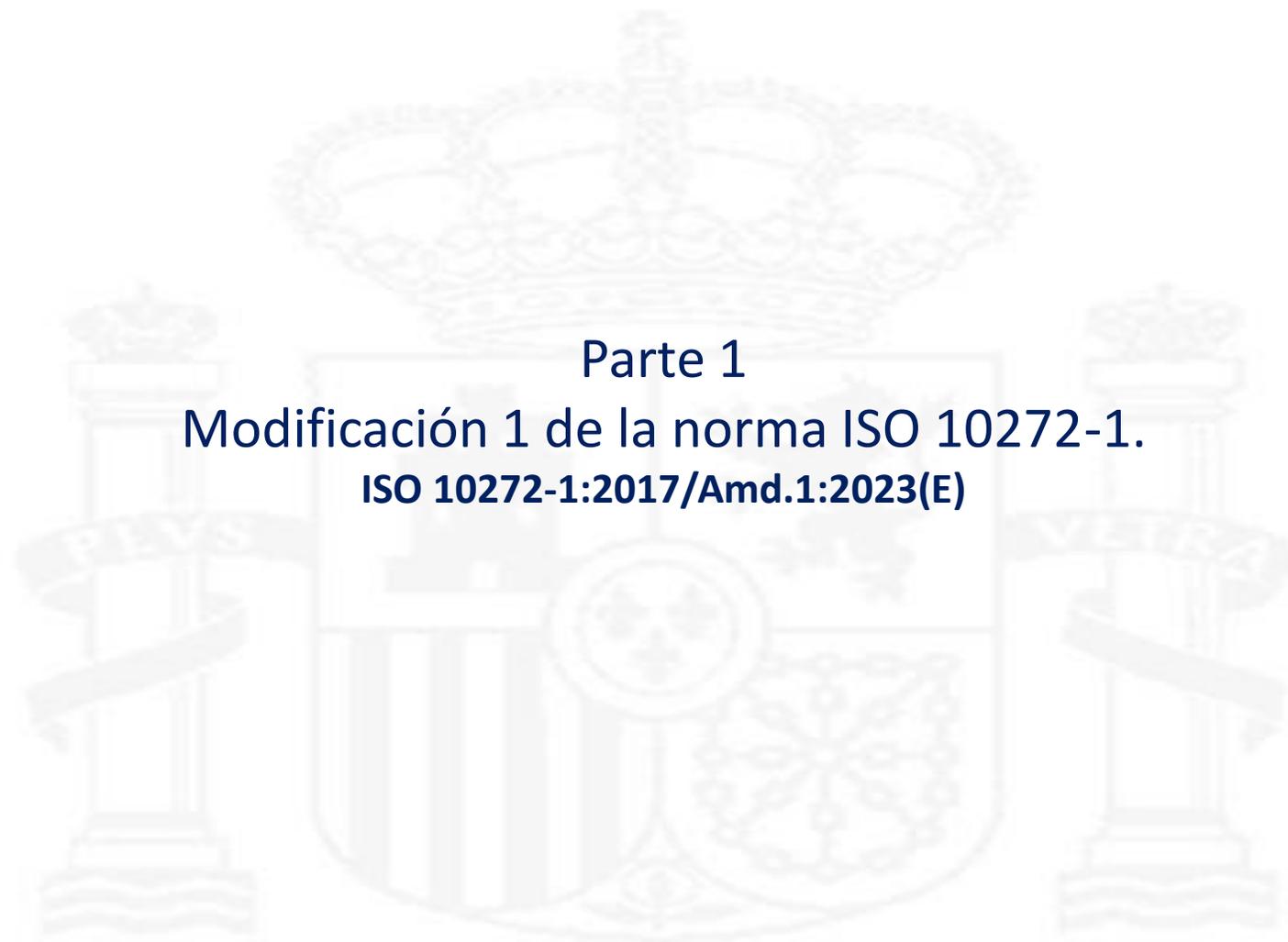


Actualización de la norma ISO 10272-1 de *Campylobacter*

Iria Uhía Castro
Servicio de Microbiología Alimentaria - CNA
AESAN OA

Jornadas de referencia CNA 2023
19 de Junio
Majadahonda

- Parte 1: Modificación 1 de la norma ISO 10272-1.
ISO 10272-1:2017/Amd.1:2023(E) (Enero 2023).
- Mismos cambios (donde procede) en la **ISO 10272-2**: ISO 10272-2:2017/Amd.1:2023(E).
- Parte 2: EIL para validar los nuevos ensayos de PCR: Participación del LNR CNA para *Campylobacter*.



Parte 1
Modificación 1 de la norma ISO 10272-1.
ISO 10272-1:2017/Amd.1:2023(E)

Principales cambios

- Protocolo de detección de la hidrólisis del acetato de indoxilo.
- Composición del medio líquido Preston.
- Cambio en algunas cepas utilizadas en el control del rendimiento de los medios de cultivo.
- Inclusión de un anexo informativo sobre métodos alternativos (Anexo E) y otro anexo informativo sobre los estudios de validación de los mismos (Anexo F).

Cambios menores en el texto

3.1

- Ejemplo de medio selectivo sólido: mCCD agar.
- Nota 3: Medios líquidos donde usualmente crece *Campylobacter*: Bolton y Preston.

4.1

- Nota: Adición de suplemento de crecimiento al medio Preston.

9.5.1

- Nota: Se describen métodos alternativos (PCR) para la confirmación e identificación de especies termotolerantes en los anexos D y E. Estudio interlaboratorio descrito en el anexo F.

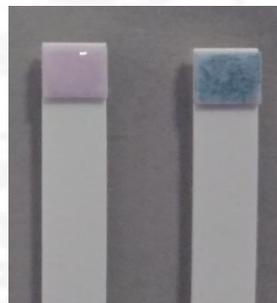
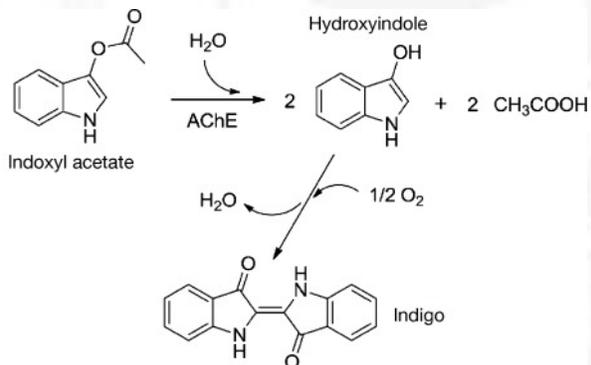
9.6.1

- Métodos alternativos (PCR) para la identificación de especies termotolerantes: ANEXO E.

Detección de la hidrólisis del acetato de indoxilo

9.6.4

- Si el resultado no es evidente tras 10 minutos, esperar hasta 20 minutos más.



Características bioquímicas de las especies de *Campylobacter*

9.6.5

Tabla 2

Characteristic	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i> ^b	<i>C. upsaliensis</i> ^b
Catalase (9.6.2)	+	+	+	- or weak
Hydrolysis of hippurate (9.6.3)	+ ^a	-	-	-
Indoxyl acetate (9.6.4)	+	+	-	+ ^c

Key
+ = positive
- = negative
^a Some hippurate-negative *C. jejuni* strains have been reported.
^b The same characteristics can appear also for other *Campylobacter* spp.
^c Indoxyl acetate negative *C. upsaliensis* strains have been reported.

Composición del caldo Preston

Anexo B (normativo)

B.3.1: Ajuste de volumen del medio básico

B.3 Preston broth

B.3.1 Basic medium

B.3.1.1 Composition

Enzymatic digest of animal tissues	10,0 g
Peptone	10,0 g
Sodium chloride	(CAS Registry Number ^{®a} 7647-14-5) 5,0 g
Water	940 ml

Antes: 945 ml

Nuevo apartado B.3.4: Composición del suplemento de crecimiento y modo de preparación.

Composición del caldo Preston

Anexo B (normativo)

B.3.5: Nueva composición del medio completo.

B.3.5 Complete medium

B.3.5.1 Composition

Basic medium (B.3.1)	940 ml	Antes: 945 ml
Sterile lysed horse blood (B.3.2)	50 ml	
Antibiotic solution (B.3.3)	5 ml	
Growth supplement (B.3.4)	5 ml	

B.3.5.2: Preparación del caldo Preston: inclusión del suplemento y cambio en el orden de adición de los constituyentes:

antibióticos → suplemento de crecimiento → sangre lisada

Composición del caldo Preston

Anexo C (informativo)

- NOTA: Para los estudios de validación del método se recogieron datos del caldo Preston **sin y con suplemento**. Por lo tanto, las características de rendimiento se consideran todavía válidas y no se requiere una nueva verificación.



Miriam Koene, Wageningen U.

Cambio de cepas para el control del rendimiento de medios de cultivo

Anexo B (normativo)

B. 11. Tabla B.1

Medium	Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers ^a	Method of control	Criteria ^b
Bolton broth	Productivity		<i>Campylobacter jejuni</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00032 or 00034		
			<i>Campylobacter coli</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00004 or 00072		
			<i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00032 or 00034		
	Selectivity		<i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00032 or 00034		< 10 colonies on TSA

Proteus mirabilis ➡ *Staphylococcus aureus*

Cambio de cepas para el control del rendimiento de medios de cultivo

Anexo B (normativo)

B. 11. Tabla B.1

Medium	Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers ^a
Preston broth	Productivity		<i>Campylobacter jejuni</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c	
			+ <i>Staphylococcus aureus</i> ^e	00032 or 00034
			<i>Campylobacter coli</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c	00004 or 00072
	+ <i>Staphylococcus aureus</i> ^e		00032 or 00034	
	Selectivity		<i>Escherichia coli</i> ^c <i>Staphylococcus aureus</i> ^e	00032 or 00034

Proteus mirabilis ➡ *Staphylococcus aureus*

Cambio de función medio CBA: Productividad → Confirmación

Anexo B (normativo)

B. 11. Tabla B.1

Medium	Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers ^a
mCCD agar	Productivity		<i>Campylobacter coli</i> ^c	00004 or 00072
	Selectivity		<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00032 or 00034
Columbia blood agar	Confirmation		<i>Campylobacter jejuni</i> ^d or <i>Campylobacter coli</i> ^d	00004 or 00072

Nuevos anexos

Anexo D (informativo)

Ensayo de PCR múltiple en tiempo real para la confirmación de *Campylobacter* spp. termotolerantes.

- Amplificación de un fragmento del gen **ARNr 16S** → **confirma** la presencia de *Campylobacter* spp. termotolerantes (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) pero **no identifica la especie**.

Nuevos anexos

Anexo E (informativo)

Métodos de PCR para la confirmación e identificación molecular de *Campylobacter* spp. termotolerantes.

- **E.2** Ensayo de **PCR múltiplex basado en gel** para la **confirmación e identificación** molecular de *Campylobacter* spp. termotolerantes.
 - *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*.
- **E.3** Ensayo de **PCR múltiplex en tiempo real** para la **confirmación e identificación** molecular de *Campylobacter* spp. termotolerantes.
 - *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

Nuevos anexos

Anexo F (informativo)

Estudios de validación de los métodos y características de rendimiento.

- **F.1** Estudio interlaboratorio para el ensayo de **PCR múltiplex en tiempo real** para la **confirmación** de *Campylobacter* spp. termotolerantes (Anexo D).
- **F.2** Estudio interlaboratorio para el ensayo ensayo de **PCR múltiplex basado en gel** para la **confirmación e identificación** molecular de *Campylobacter* spp. termotolerantes (Anexo E.2).
- **F.3** Estudio interlaboratorio para el ensayo ensayo de **PCR múltiplex en tiempo real** para la **confirmación e identificación** molecular de *Campylobacter* spp. termotolerantes (Anexo E.3).



Conclusiones modificación 1 ISO 10272

- Los cambios son menores y no requieren una nueva verificación del método por parte de los laboratorios.
- Se trabaja hacia la armonización de las normas y una mayor flexibilidad de los criterios en el laboratorio.
- Incluyen la validación de métodos moleculares para la identificación de *Campylobacter*.



Parte 2

EIL para validar los nuevos ensayos de PCR:
Participación del LNR CNA para *Campylobacter*

Interlaboratory study: PCR for confirmation and/or identification of Campylobacter spp.

CEN/TC 463/WG3 *Campylobacter* (Mayo- Junio 2021). 3 Métodos de PCR a evaluar.

- Confirmación de *Campylobacter* termotolerantes

ANEXO D

➤ PCR 1 - PCR en tiempo real: *C. spp* termotolerantes (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*).

- Identificación de *Campylobacter* termotolerantes

ANEXO E.2

➤ PCR 2 - PCR convencional: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*.

ANEXO E.3

➤ PCR 3 - PCR en tiempo real: *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

Participación CNA

Muestras incluidas en el EIL (desconocidas para los participantes):

- PCR 1: 16 cepas diana (*jejuni/coli/lari*) + 8 cepas no diana = **24 cepas.**
- PCR 2 y PCR 3: 16 *C. jejuni*, 16 *C. coli*, 8 *C. lari*, 2 *C. upsaliensis* (PCR 2) + 8 cepas no diana = **50 cepas.**

Cepas no diana

Campylobacter hyointestinalis (2)

Campylobacter lanienae

Campylobacter helveticus

Escherichia coli

Acinetobacter baumannii

Candida rugosa

Pseudomonas aeruginosa

Todas las cepas se debían analizar adicionalmente siguiendo el método de referencia descrito en los puntos 9.5 y 9.6 de la ISO 10272-1.

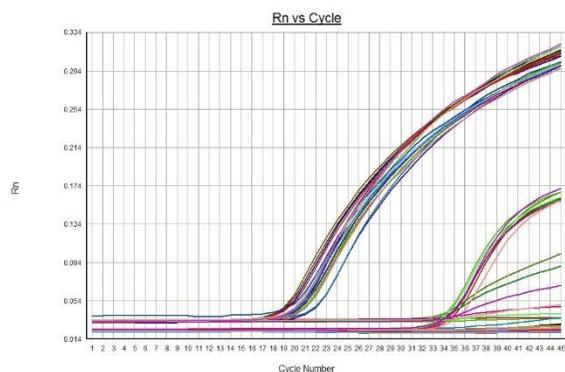
Esquema del protocolo:



EIL- Resultados CNA

PCR 1

- Un par de cebadores + sonda comunes para *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* (Jos-F, Jos-R, Jos-P) (LRUE).
- Un par de cebadores + sonda para el control interno de amplificación (IAC) (LRUE).
- Reactivos PCR: ADN polimerasa, tampón, MgCl₂, dNTPs (LRUE).
- ADN.
- Termociclador: Applied Biosystems.



- **Resultados CNA:** 16 muestras positivas.
- **Cepas diana reales:** 6 *C. jejuni*, 6 *C. coli*, 4 *C. lari*.

Resultados
correctos

EIL- Resultados CNA

PCR 3

- Cebadores + sonda para *C. jejuni* (mapA-fw, mapA-re, mapA), *C. coli* (ceuE-fw, ceuE-re, ceuE), *C. lari* (gyrA1-fw1, gyrA1-fw2, gyrA1-re1, gyrA1-re2, gyrA1) (LRUE).
- Un par de cebadores + sonda IAC (LRUE).
- Reactivos PCR: ADN polimerasa, tampón, MgCl₂, dNTPs (LRUE).
- ADN.
- Termociclador: Applied Biosystems.

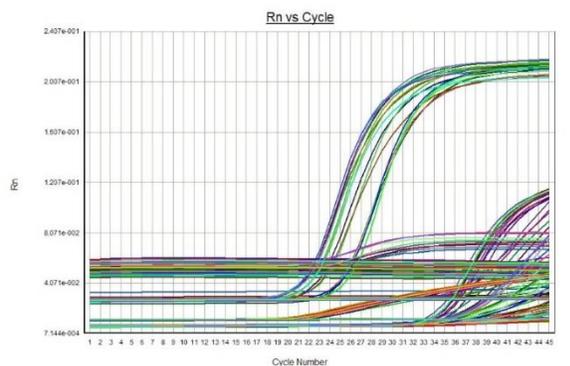


➤ Sólo amplificaron 12 muestras con estas condiciones.

EIL- Resultados CNA

PCR 3 - Repetición

- Kit de polimerasa en uso en nuestro laboratorio (y también sugerido por el LRUE):



➤ Amplifican 41 muestras.

- **Resultados CNA:** 16 *C. jejuni*, 16 *C. coli*, 9 *C. lari*.
- **Cepas diana reales:** 16 *C. jejuni*, 16 *C. coli*, 8 *C. lari*.

1 falso positivo, 1 *C. upsaliensis* identificada como *C. lari* (Cq: 36; demás muestras +: Cq < 30).

↓
Bien identificada con el método de referencia.

EIL- Resultados CNA

Método de referencia

- *C. helveticus* identificada como *C. upsaliensis* de acuerdo con las pruebas bioquímicas y de crecimiento. Las PCR 1 y 3 no permiten identificar *C. upsaliensis*.
- *C. hyointestinalis* y *C. lanienae*: mismas características que *C. lari* en las pruebas bioquímicas y de crecimiento → en desacuerdo con los resultados de las PCR 1 y 3.

Conclusiones EIL - CNA

PCR 1

- Resultados satisfactorios comparables a los de referencia.

PCR 3

- Posiblemente más sensible a los reactivos de PCR utilizados.
- Resultados satisfactorios comparables a los de referencia; sólo un falso positivo.

Método de referencia

- Riesgo de identificación errónea de algunas especies de *Campylobacter* con las mismas características bioquímicas y de crecimiento que las especies termotolerantes más relevantes.

Resultados globales EIL

International Journal of Food Microbiology 388 (2023) 110064



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



Validation of PCR methods for confirmation and species identification of thermotolerant *Campylobacter* as part of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.

Sevinc Ferrari^a, Ásgeir Ástvaldsson^a, Therese Jernberg^a, Kerstin Stingl^b, Ute Messelhäuber^c, Hanna Skarin^{a,*}

5. Conclusion

This article describes the outline and results of the full validation of three PCR methods in comparison with the reference method for confirmation and species identification of thermotolerant *Campylobacter* spp. All three PCR methods were concluded to be suitable for molecular identification and/or confirmation of thermotolerant *Campylobacter* spp. *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*. The methods and a summary of validation data have been included in Amendment 1 of each part of ISO 10272:2017 (Anonymous, 2022a, b).



Muchas gracias

Participación en el EIL:

Ana Dueñas Velarde

Isabel Elías Vinuesa

Jesús González Pizarro

Mercedes Klett Mingo

Teresa Rodríguez Torrecilla

Ana Sisó Nadal



*Resistencias antimicrobianas en alimentos,
tendencias en España.*

Sonia M^a Aguayo
Unidad de Resistencias Antimicrobianas
CNA

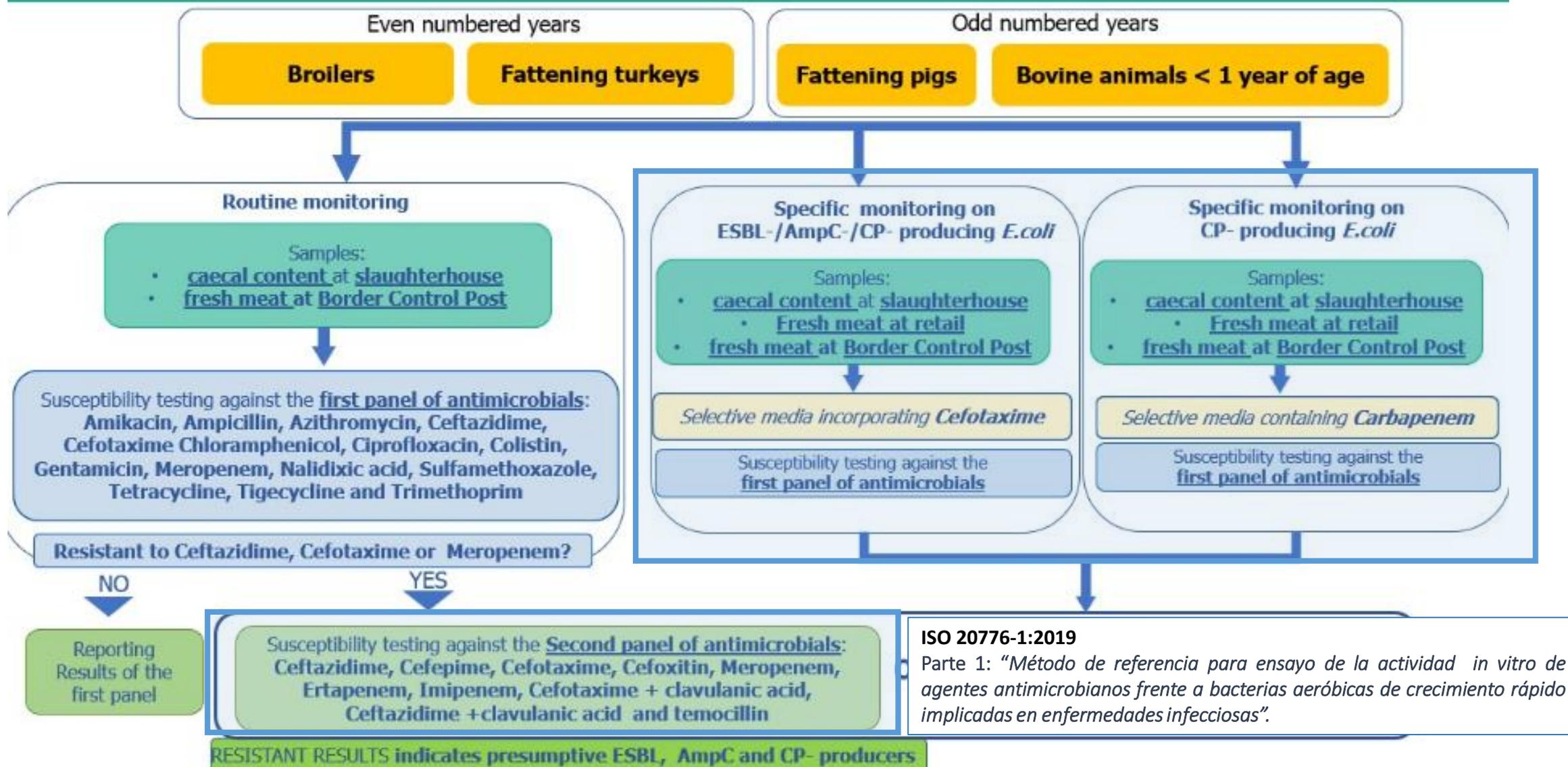


Proporcionar DATOS fiables y suficientes para llevar a cabo una evaluación del riesgo para evaluar la aprobación de intervenciones diana

Identificación de comportamientos de resistencia emergentes o específicos

Tendencias temporales en la ocurrencia y distribución de las resistencias

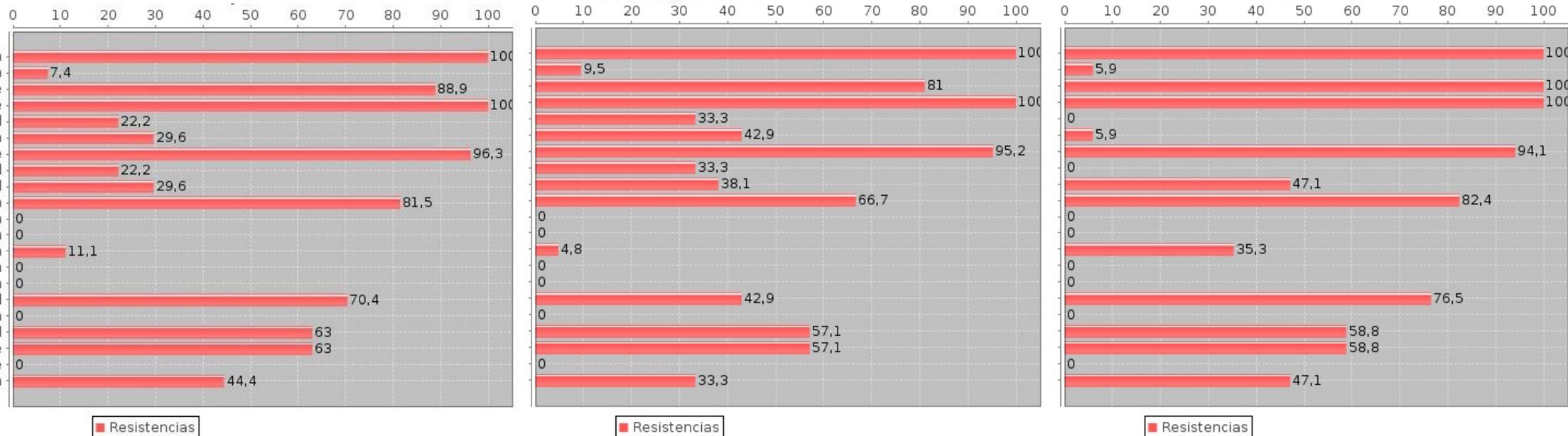
Desarrollo y difusión de las resistencias

Indicator *E.coli*



PORCENTAJE DE RESISTENCIAS

Antibióticos



VACUNO

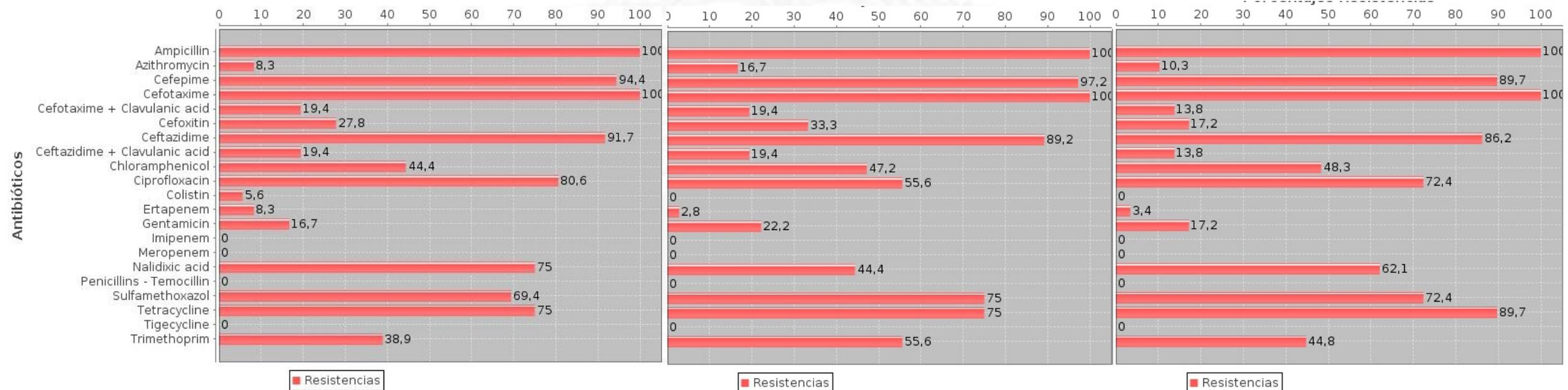
2015

2017

2019



PORCENTAJE DE RESISTENCIAS



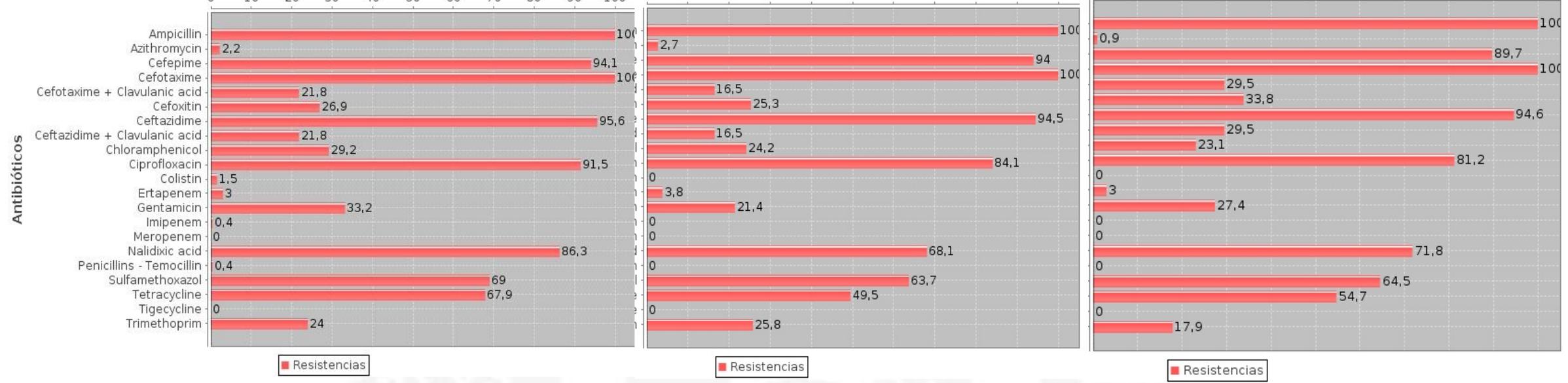
CERDO

2015

2017

2019

PORCENTAJE DE RESISTENCIAS



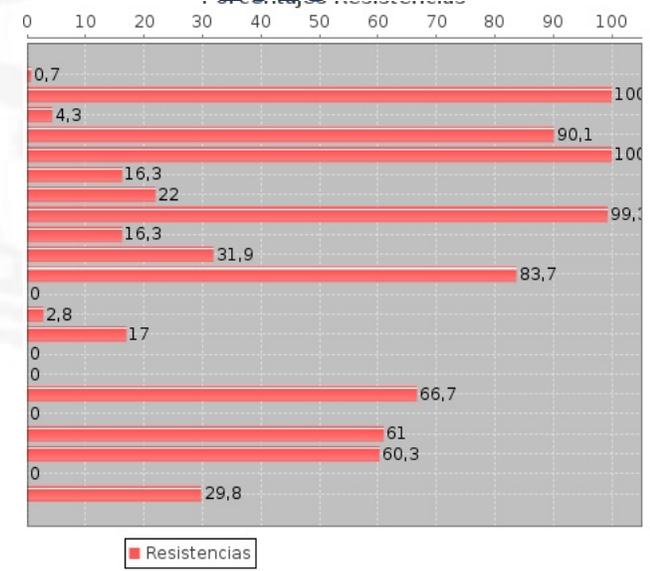
POLLO

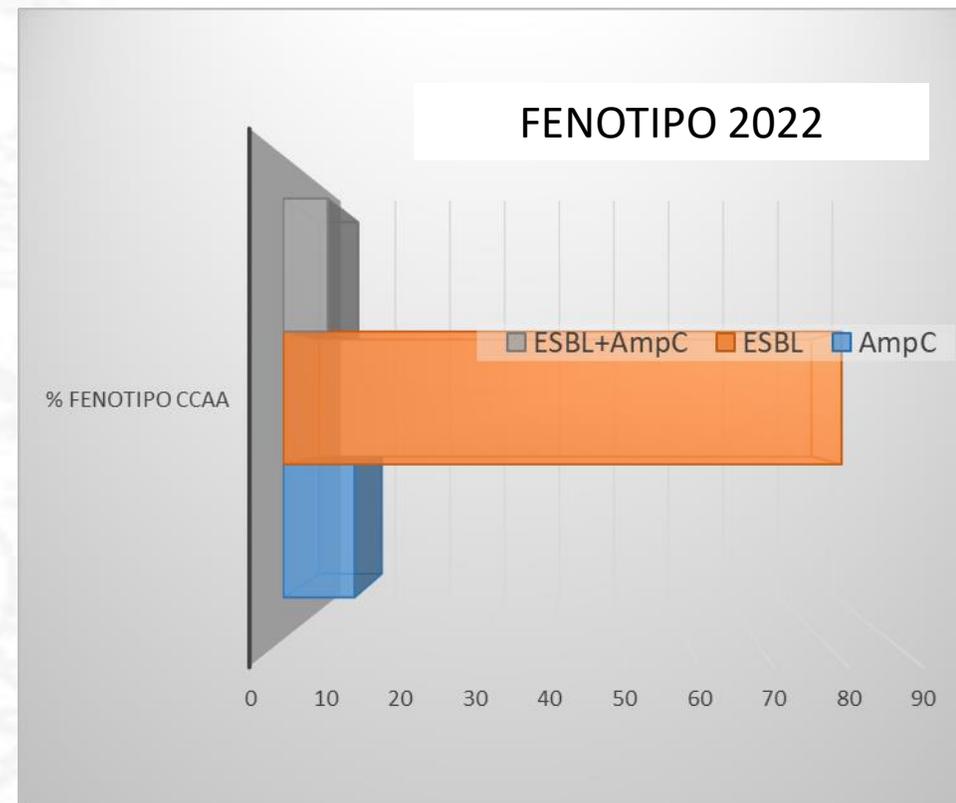
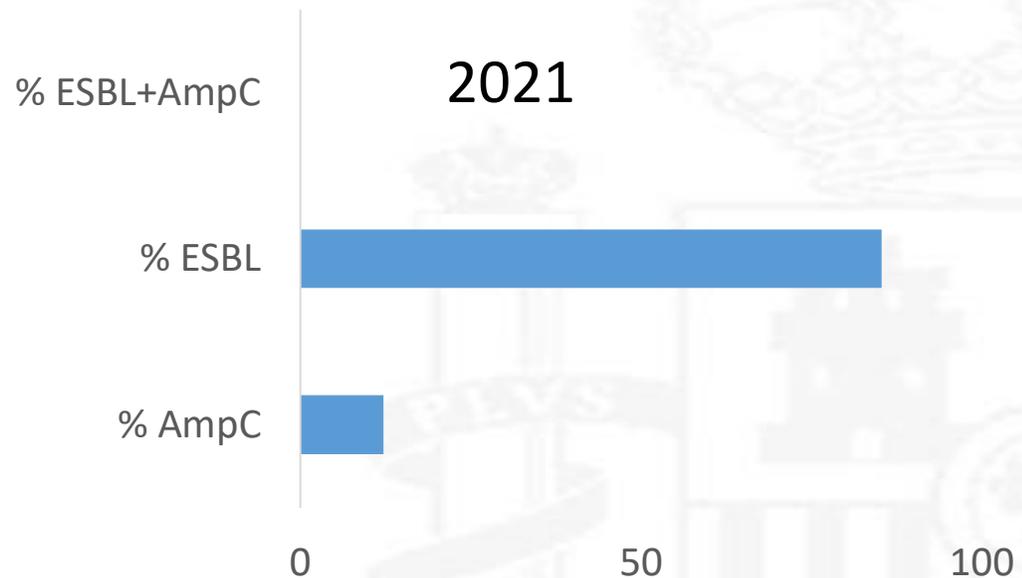
2016

2020

2018

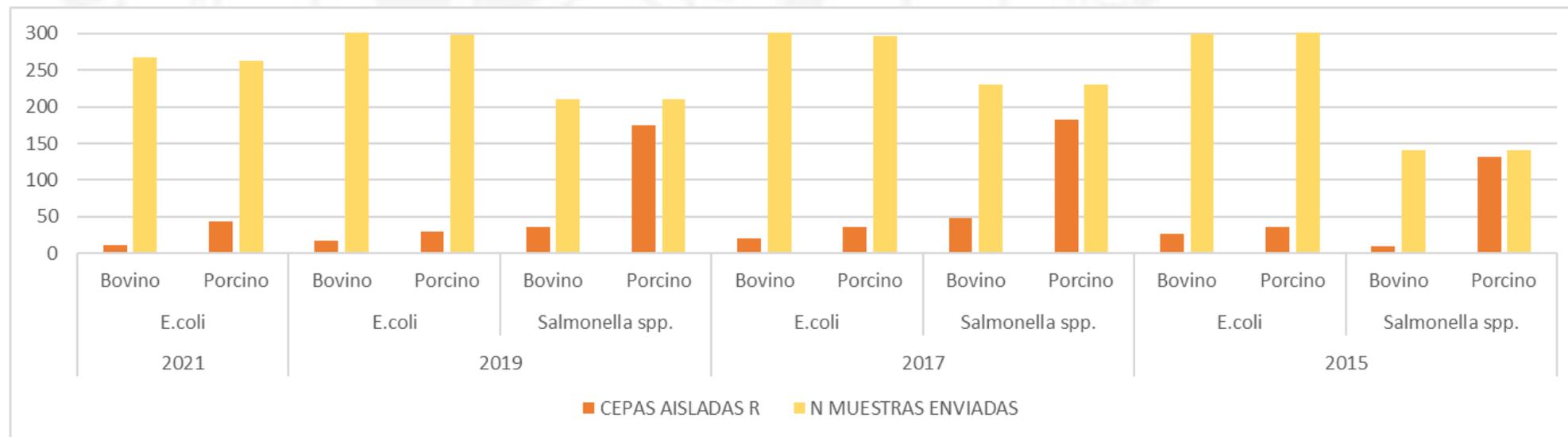
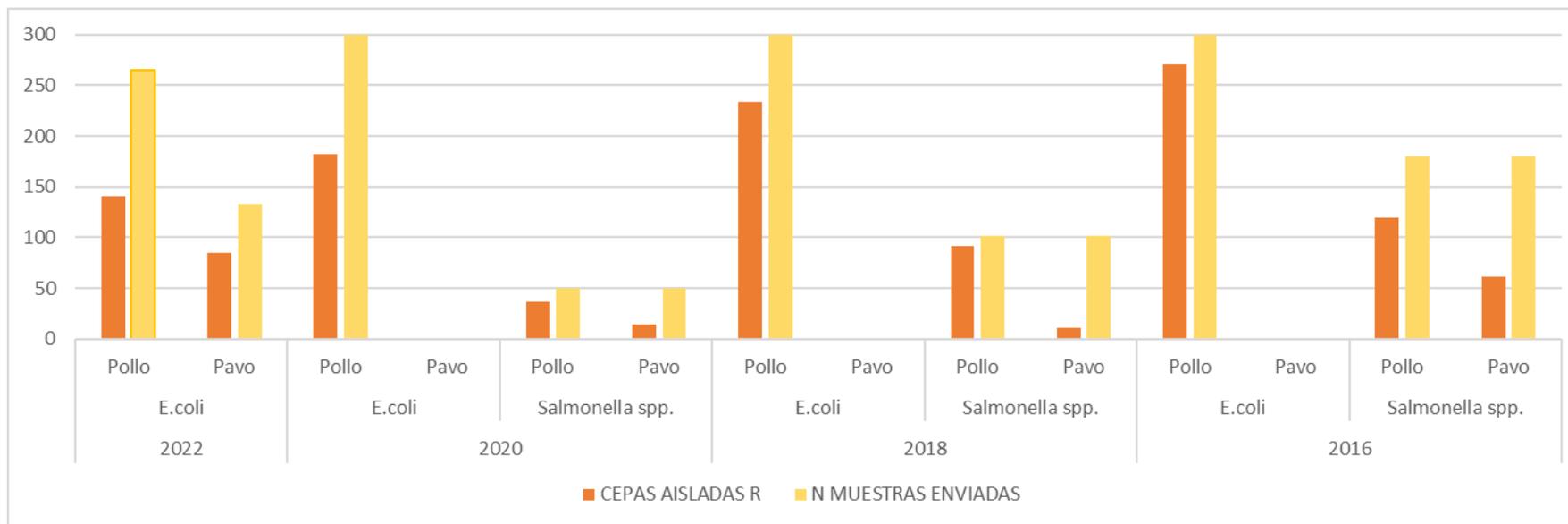
2022







MUESTRAS ANALIZADAS 2015 - 2022





SCIENTIFIC REPORT

APPROVED: 31 January 2020

doi: 10.2903/j.efsa.2020.6007

The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control



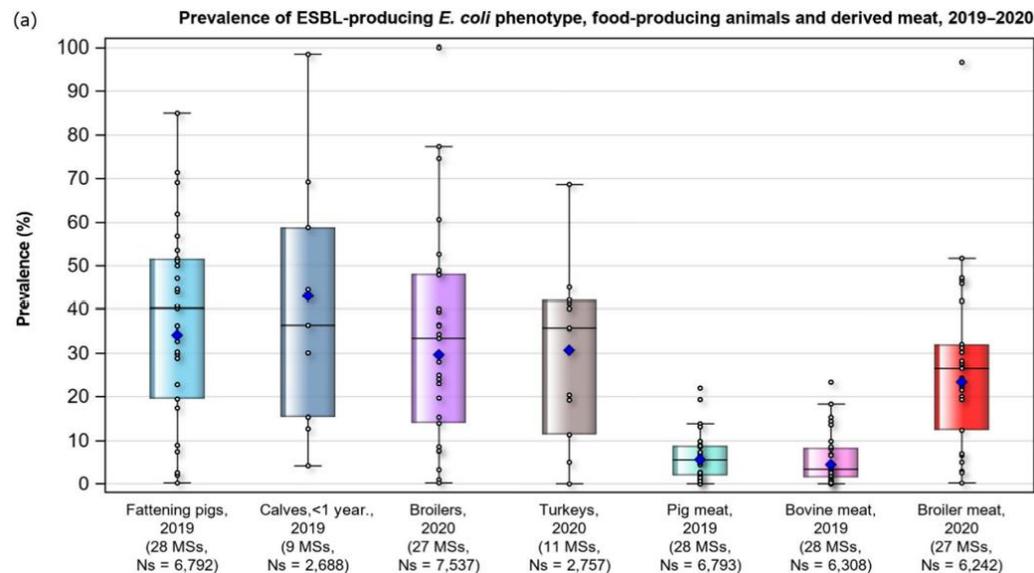
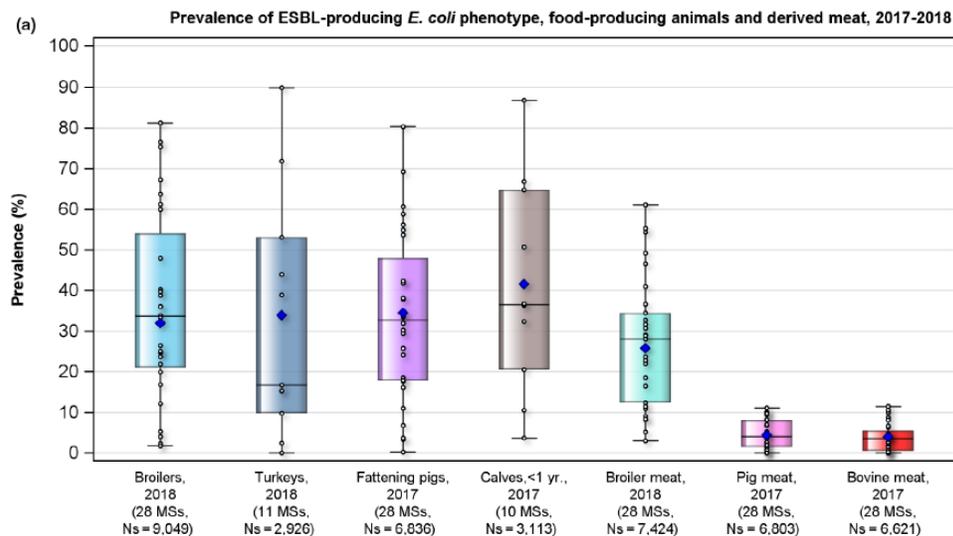
SCIENTIFIC REPORT

APPROVED: 1 March 2022

doi: 10.2903/j.efsa.2022.7209

The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control





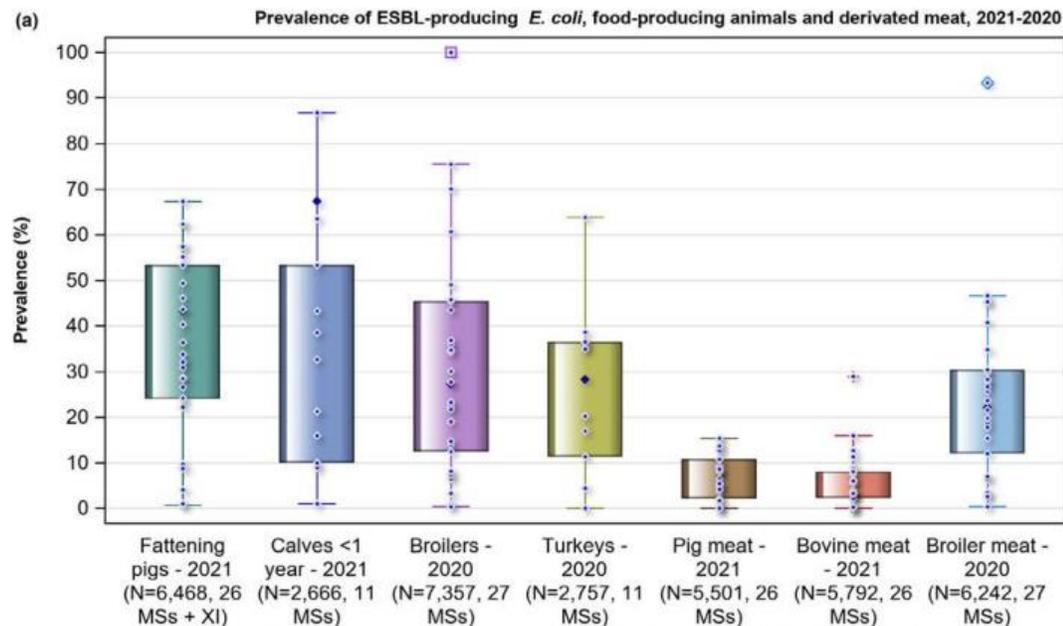
SCIENTIFIC REPORT



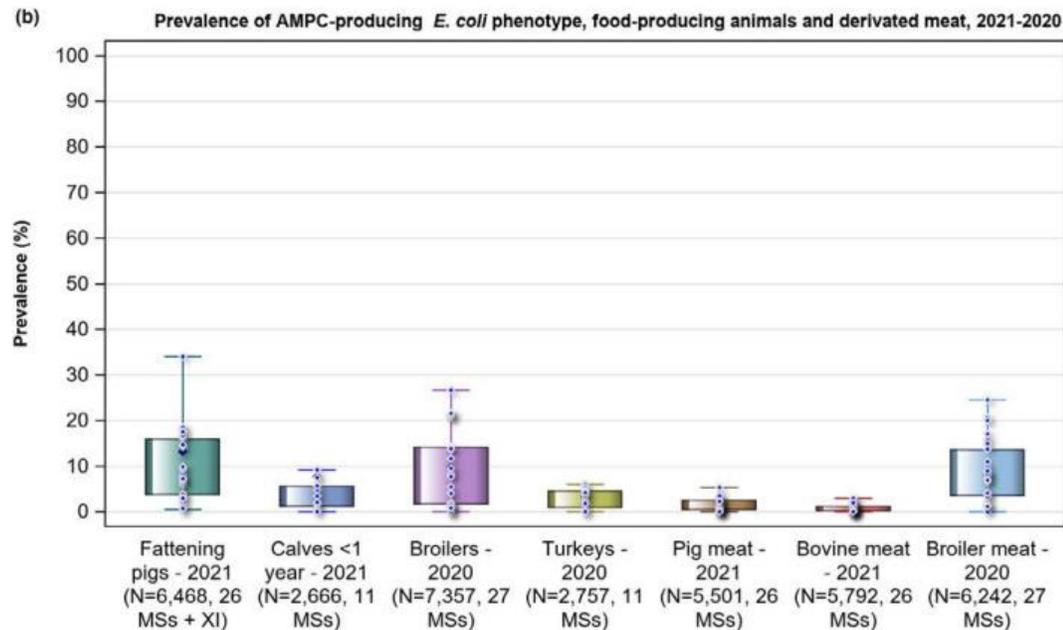
APPROVED: 31 January 2023
doi: 10.2903/j.efsa.2023.7867

The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021

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



Genotypic data was added to phenotypic data for Germany and Italy (Pigs, Calves, Pig meat and Bovine meat), Czechia (Pigs, Pig meat and Bovine meat) and Finland (Pigs)



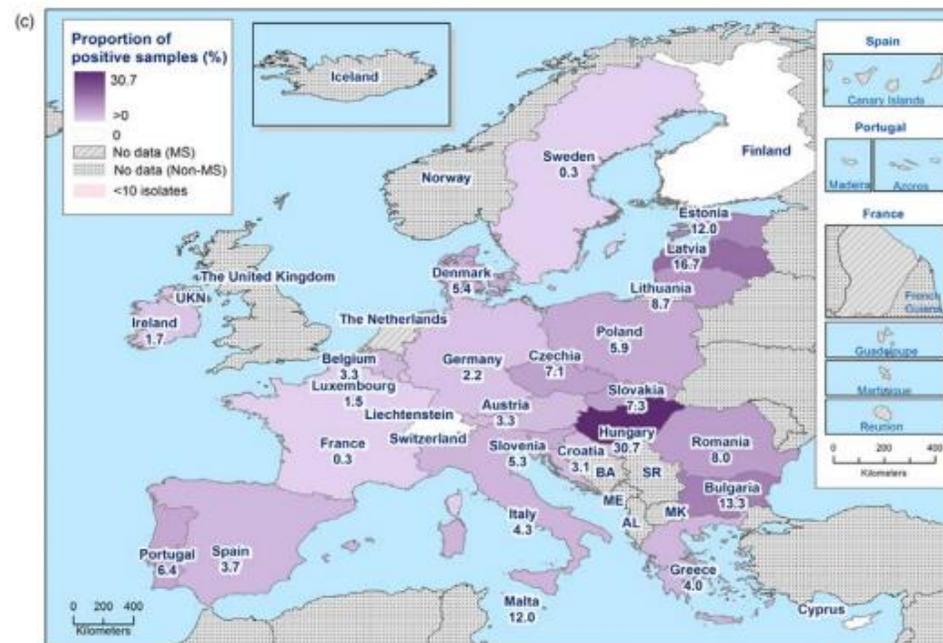
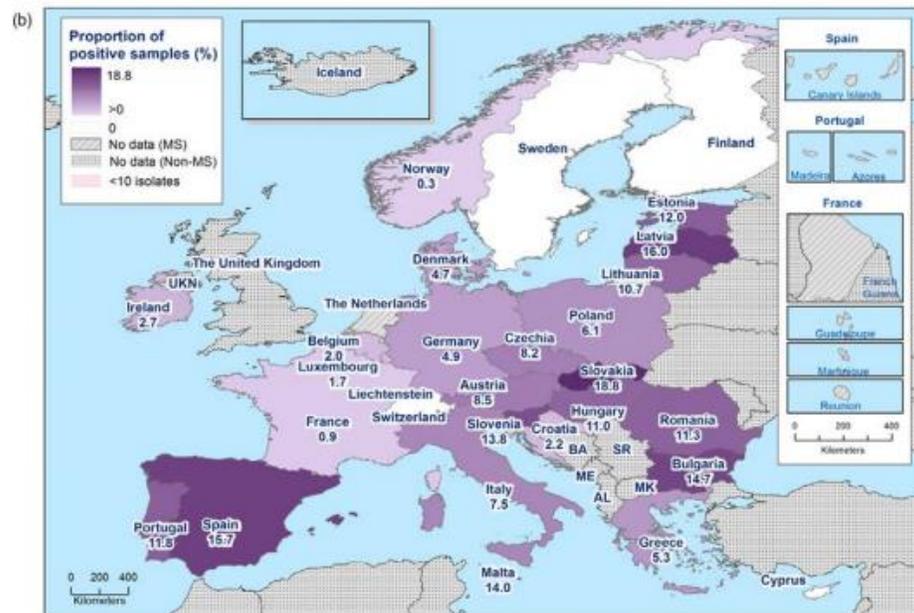
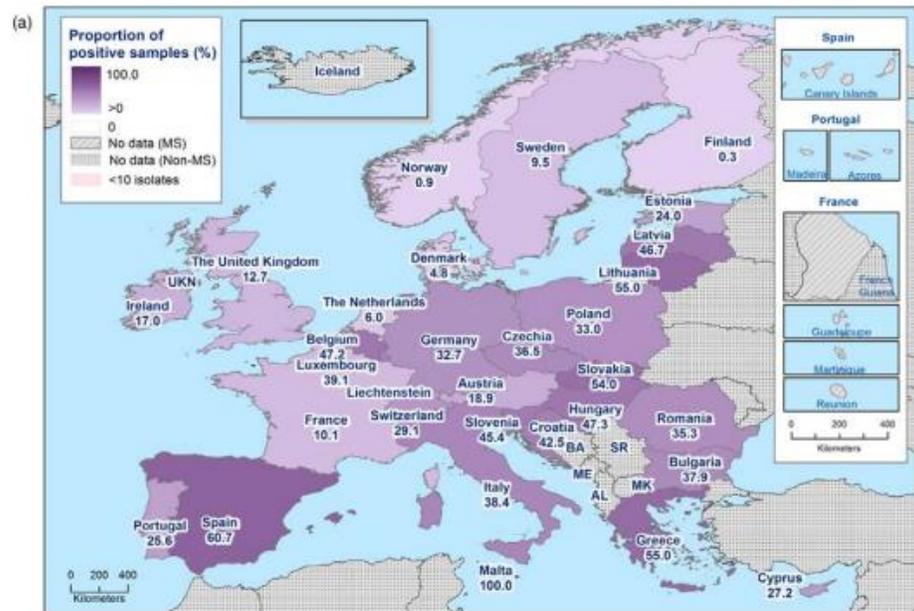
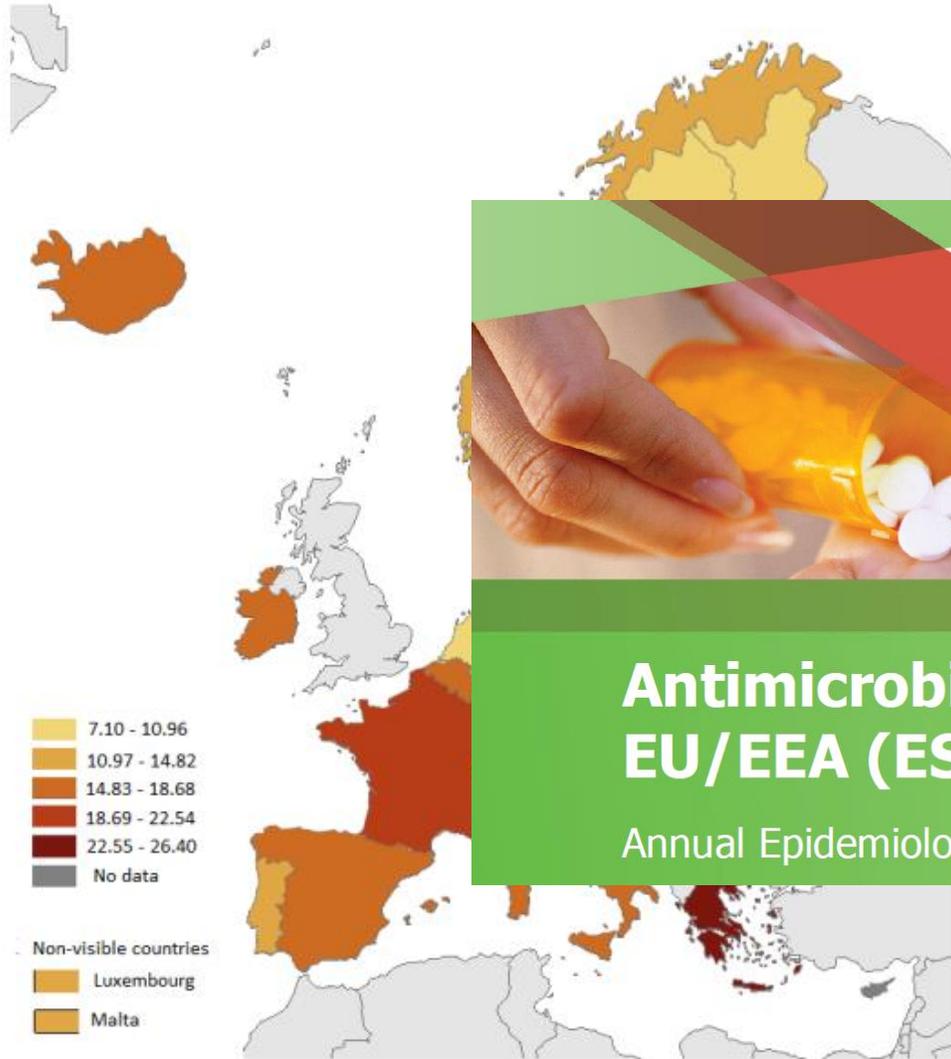


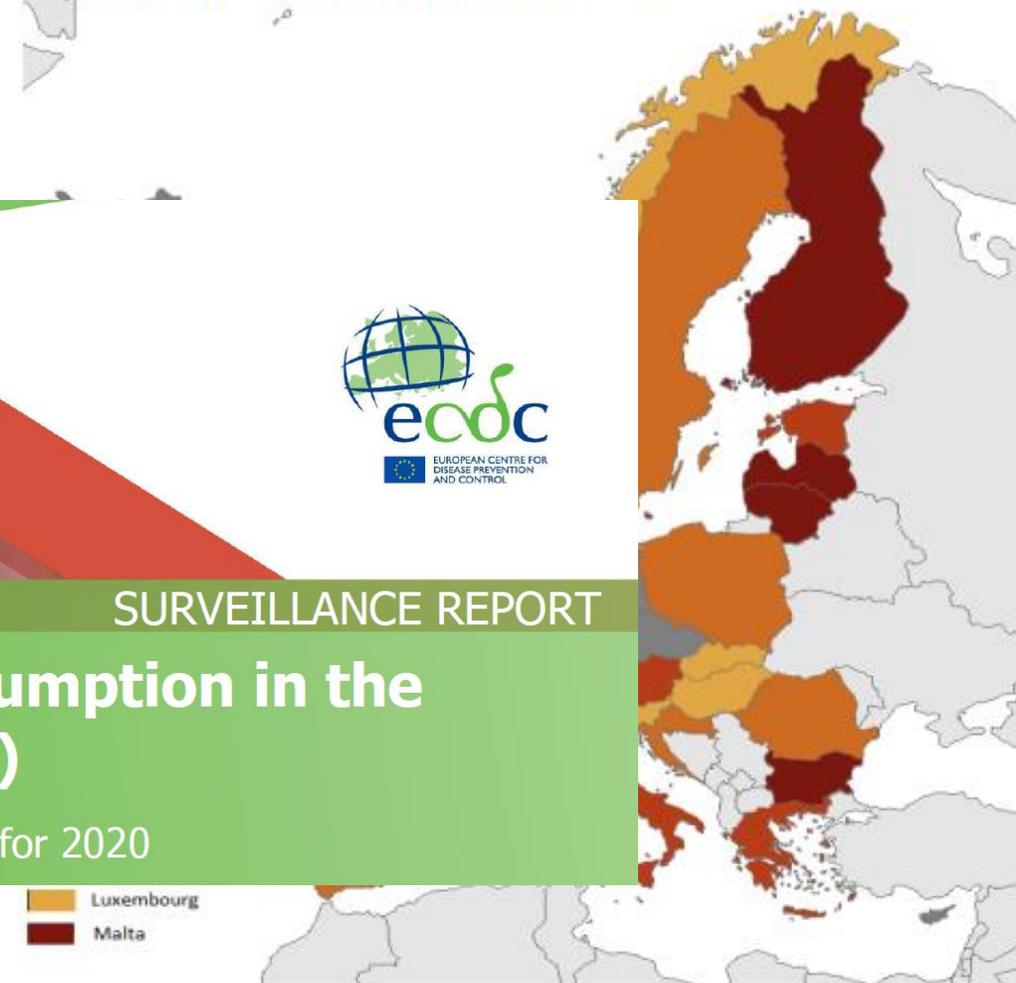
Figure 42: Spatial distribution of the prevalence of presumptive ESBL and/or AmpC-producing *E. coli* from (a) meat from broilers in 2020, (b) meat from pigs in 2021 and (c) meat from bovines in 2021, EU MSs and non-MSs, 2020/2021

Figure 1. Community consumption of antibacterials for systemic use (ATC group J01), by country, EU/EEA countries, 2020 (expressed as DDD per 1 000 inhabitants per day)



Consumption of major sub-groups of antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community in 2020 is presented in Table 2 and Figure 3. Among the 27 countries reporting community data, penicillins (ATC group J01C) were the most frequently used antibacterials in all but two countries (Bulgaria and Slovakia), where macrolides, lincosamides and streptogramins (ATC group J01F) were the most frequently used. The proportion of other antibacterial groups varied more widely among countries. For example, other beta-lactams (ATC group J01D) ranged from 0.2% in Denmark to 25% in Slovakia; macrolides, lincosamides and streptogramins (ATC group J01F) ranged from 4% in Finland to 28% in Bulgaria, and quinolones (ATC group J01M), from 2% in Ireland and Norway to 16% in Bulgaria.

Figure 3. Hospital sector consumption of antibacterials for systemic use (ATC group J01), EU/EEA countries, 2020 (expressed as DDD per 1 000 inhabitants per day)



Finland: data include consumption in remote primary healthcare centres and nursing homes.

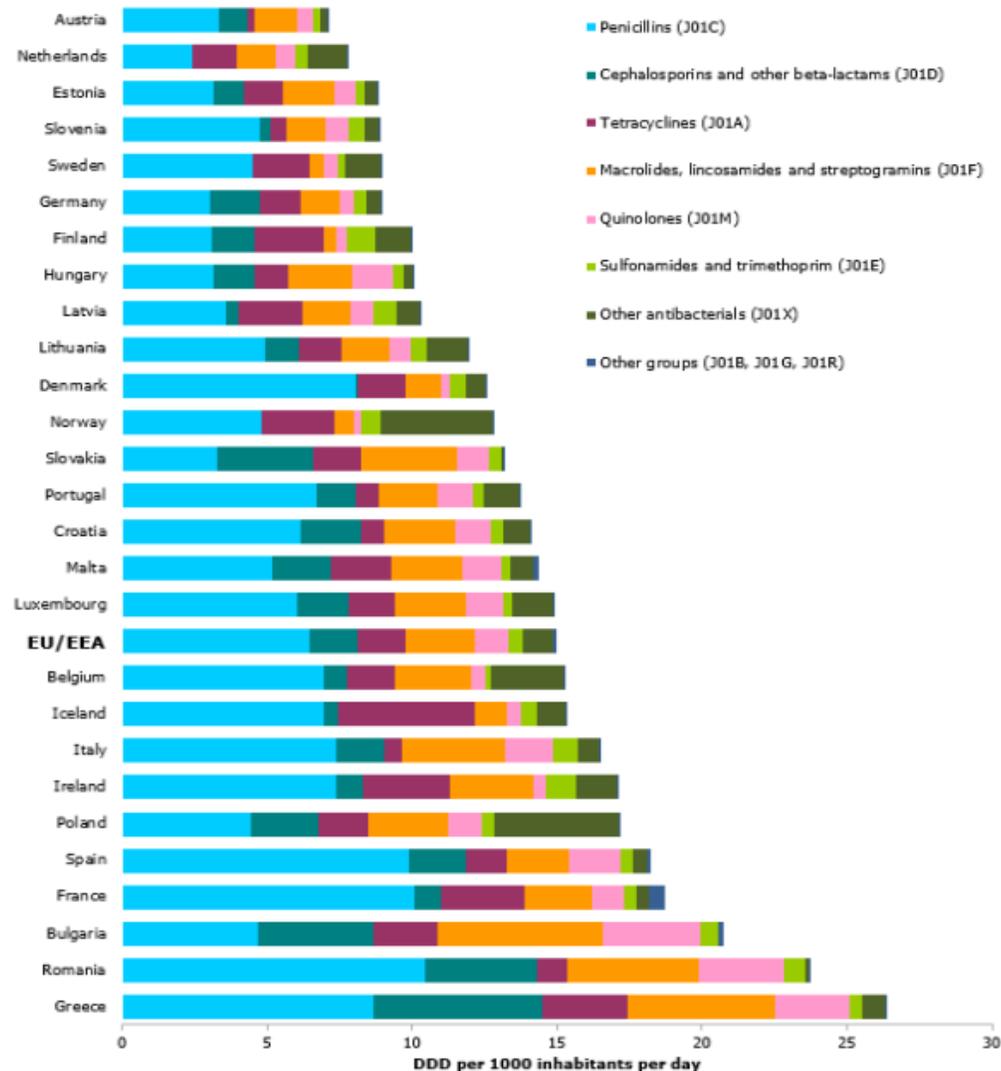
Consumption of major sub-groups of antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the hospital sector in 2020 is presented in Table 5 and Figures 5 and 6. Substantial variations were reported across countries: the percentage of penicillins (ATC group J01C) consumed out of total consumption of antibacterials for systemic use ranged from 7% (Bulgaria) to 56% (Denmark and Sweden). For cephalosporins and other beta-lactams (ATC group J01D, including carbapenems), this proportion ranged from 11% (Malta and Sweden) to 51% (Bulgaria). For macrolides, lincosamides and streptogramins (ATC group J01F), it ranged from 4% (Lithuania) to 16% (Hungary and Italy), and for quinolones (ATC group J01M) from 3% (Norway) to 17% (Bulgaria).

SURVEILLANCE REPORT

Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net)

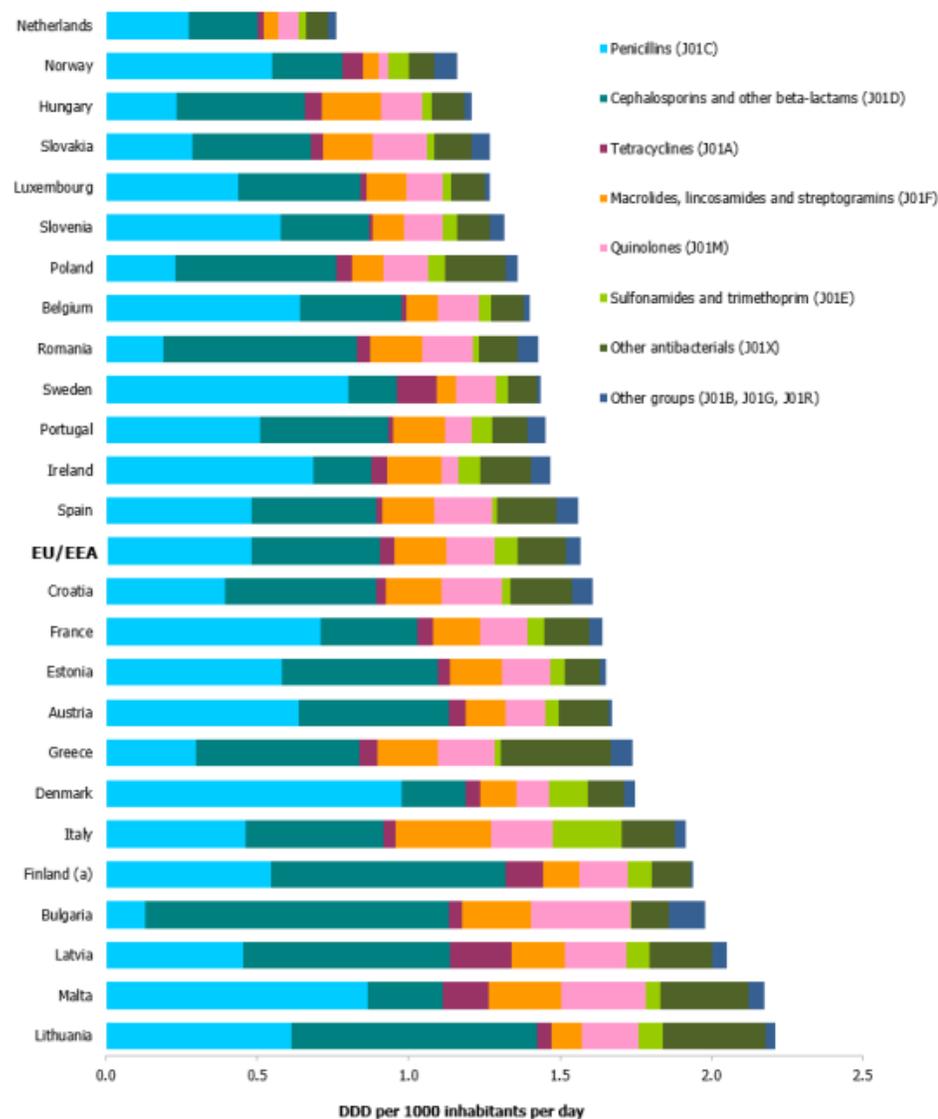
Annual Epidemiological Report for 2020

Figure 2. Community consumption of antibacterials for systemic use (ATC group J01) at ATC group level 3, by country, EU/EEA, 2020 (expressed as DDD per 1 000 inhabitants per day)



EU/EEA refers to the corresponding population-weighted mean consumption based on the reported community data for 2020 (27 countries).

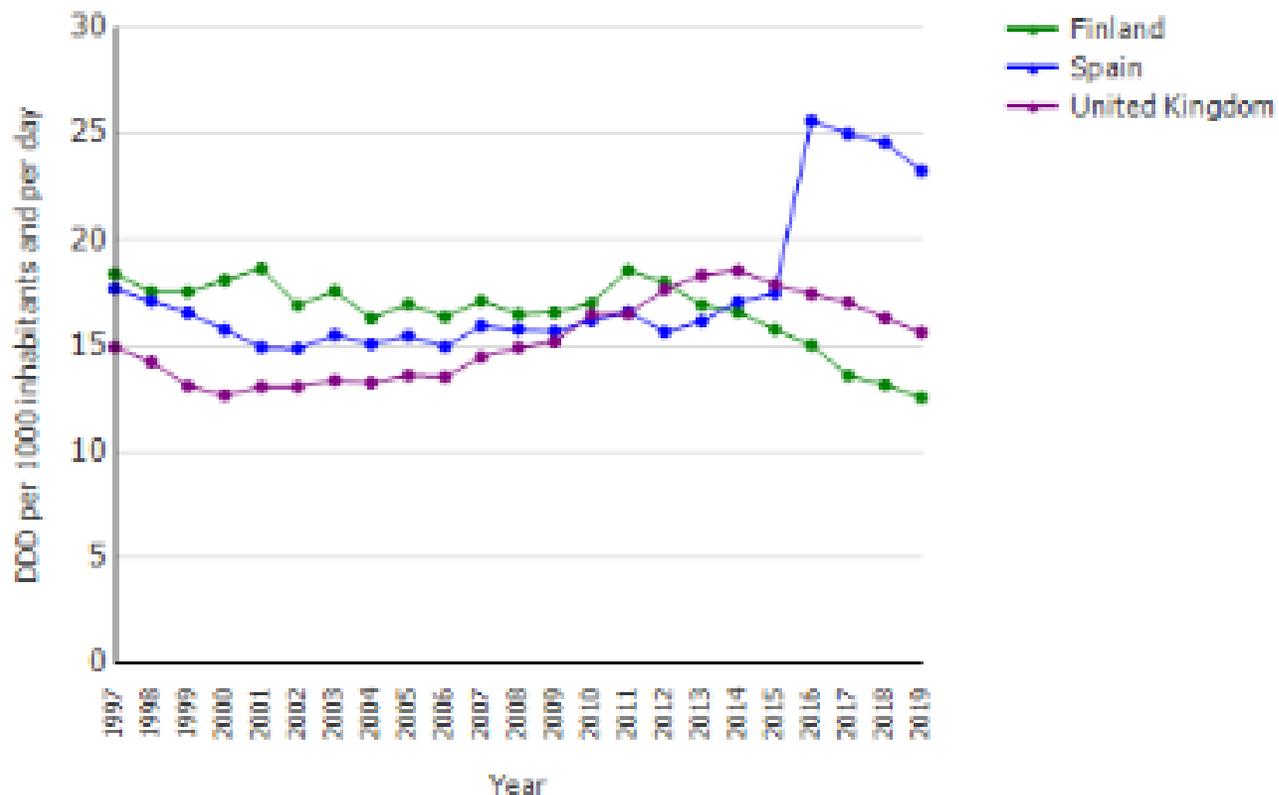
Figure 4. Hospital sector consumption of antibacterials for systemic use (ATC group J01), by country and ATC group, EU/EEA, 2020 (expressed as DDD per 1 000 inhabitants per day)



(a) Finland: data include consumption in remote primary healthcare centres and nursing homes.

EU/EEA refers to the corresponding population-weighted mean consumption based on countries that provided hospital sector data for 2020 (25 countries).

Trend of the consumption of antimicrobials in ATC group J01 (antibacterials for systemic use) in the community (primary care sector) in Spain, United Kingdom and Finland from 1997 to 2019





European Centre for Disease Prevention and Control

An agency of the European Union



Infectious disease topics ▾

Data ▾

Analysis and guidance ▾

Training and tools ▾

About ECDC ▾

Home > About ECDC > Media centre > Use of antibiotics in animals is decreasing

← Media centre

Use of antibiotics in animals is decreasing

Press release

30 Jun 2021



Translate this page

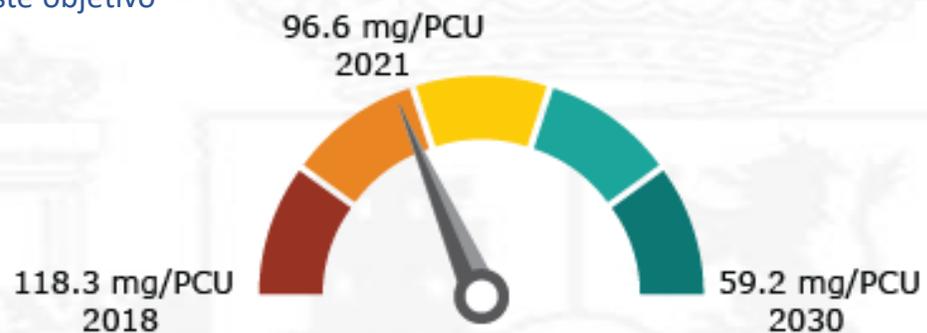
Use of antibiotics has decreased and is now lower in food-producing animals than in humans, says the latest report published by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), the European Food Safety Authority (EFSA), and the European Medicines Agency (EMA).

Taking a One Health approach, the report from the three EU agencies presents data on antibiotic consumption and development of antimicrobial resistance (AMR) in Europe for 2016-2018.

The significant fall in antibiotic use in food-producing animals suggests that the measures taken at country level to reduce use are proving to be effective. Use of a class of antibiotics called polymyxins, which includes colistin,



- La nueva estrategia europea tiene como objetivo alcanzar una reducción del 50% en el total de las ventas de antimicrobianos para animales de granja y acuicultura para el 2030 con respecto al 2018.
- En el 2021 ya se consiguió un tercio de este objetivo



miligramo de sustancia activa vendida por Unidad de Corrección de la Población (mg / PCU).



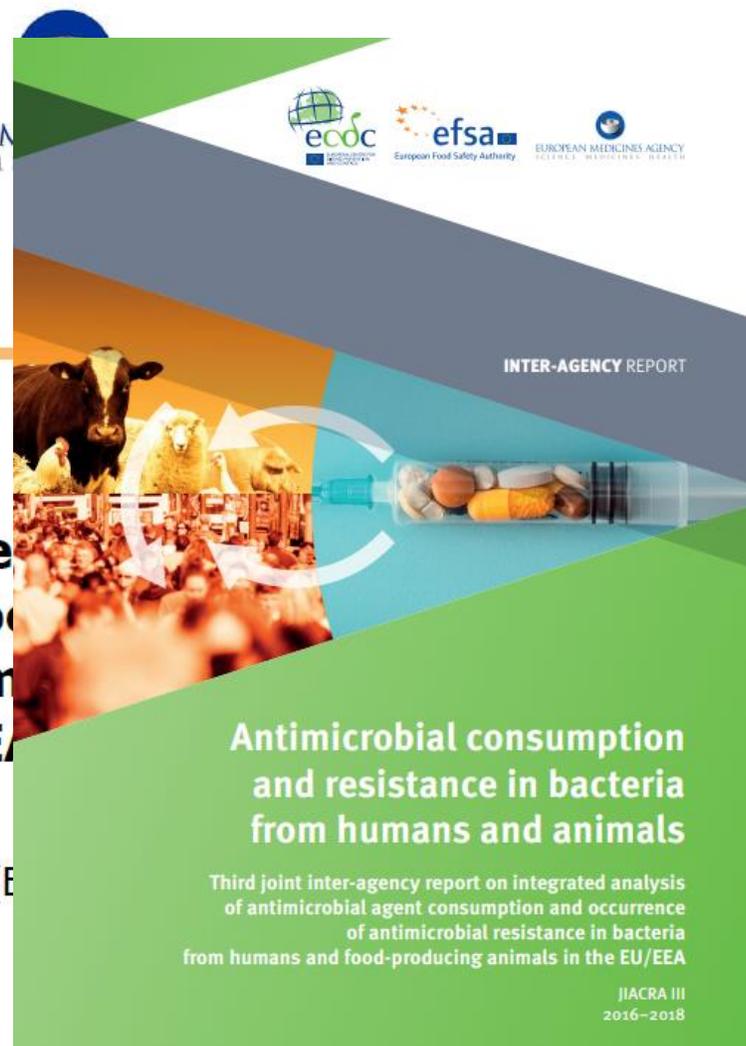
EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE & INNOVATION

SCIENTIFIC REPORT

APPROVED : 11 June 2021 doi:10.2903/j.efsa.2021.6712

Third joint inter-agency report on integrated consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA JIACRA III 2016-2018

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC),
European Food Safety Authority (EFSA) and
European Medicines Agency (EMA)

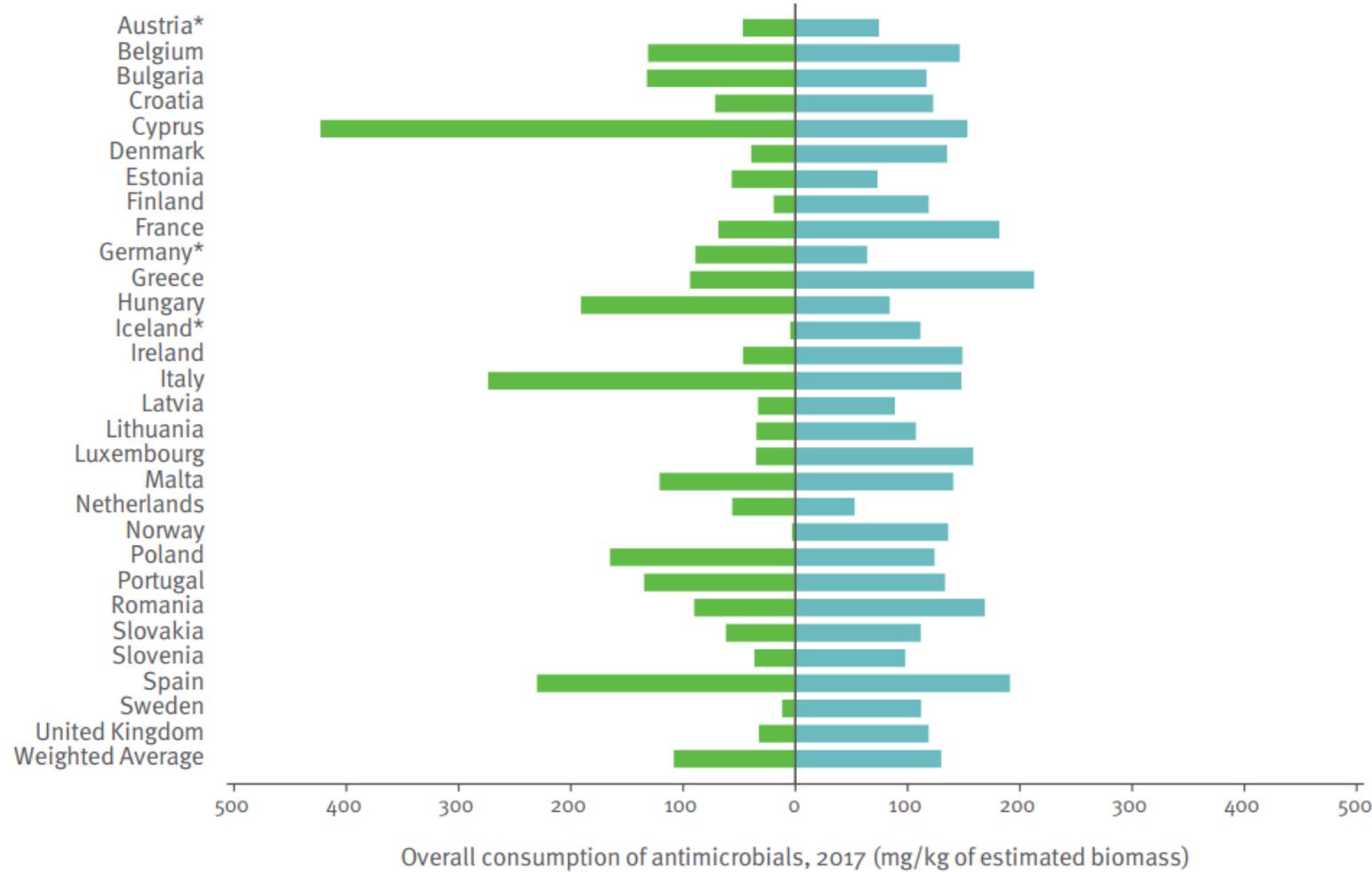




- El uso de antimicrobianos ha descendido en general: uso humano y uso veterinario
 - Se evidencian diferencias importantes en el uso de antimicrobianos: país / clase de antimicrobiano / Uso (medicina humana o en clínica veterinaria)
 - Las clases de las aminopenicilinas, las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y las quinolonas (fluoroquinolonas y otras quinolonas) son más utilizados en humanos que en animales productores de alimentos**, mientras que las polimixinas (incluyendo colistina) y las tetraciclinas se utilizan más en clínica veterinaria;
 - El uso de antimicrobianos carbapenems, **cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y las quinolonas (fluoroquinolonas y otras quinolonas) en humanos se asocia con la resistencia a estos antibióticos en infecciones producidas por *Ecoli* en humanos.**
 - También se ha visto que existe una relación entre el consumo de AB en animales y la existencia de resistencias antimicrobianas en bacterias presentes en animales de producción
- Los resultados que se presentan en este informe conjunto sugieren que las medidas para reducir el consume de antimicrobianos tomadas a nivel de los estados miembros han sido efectivas.**



Figure 6: Comparison of biomass-corrected consumption of antimicrobials (milligrams per kilogram estimated biomass) in humans (a) and food-producing animals (b) by country, in 29 EU/EEA countries for which data were available both for humans and food-producing animals, 2017

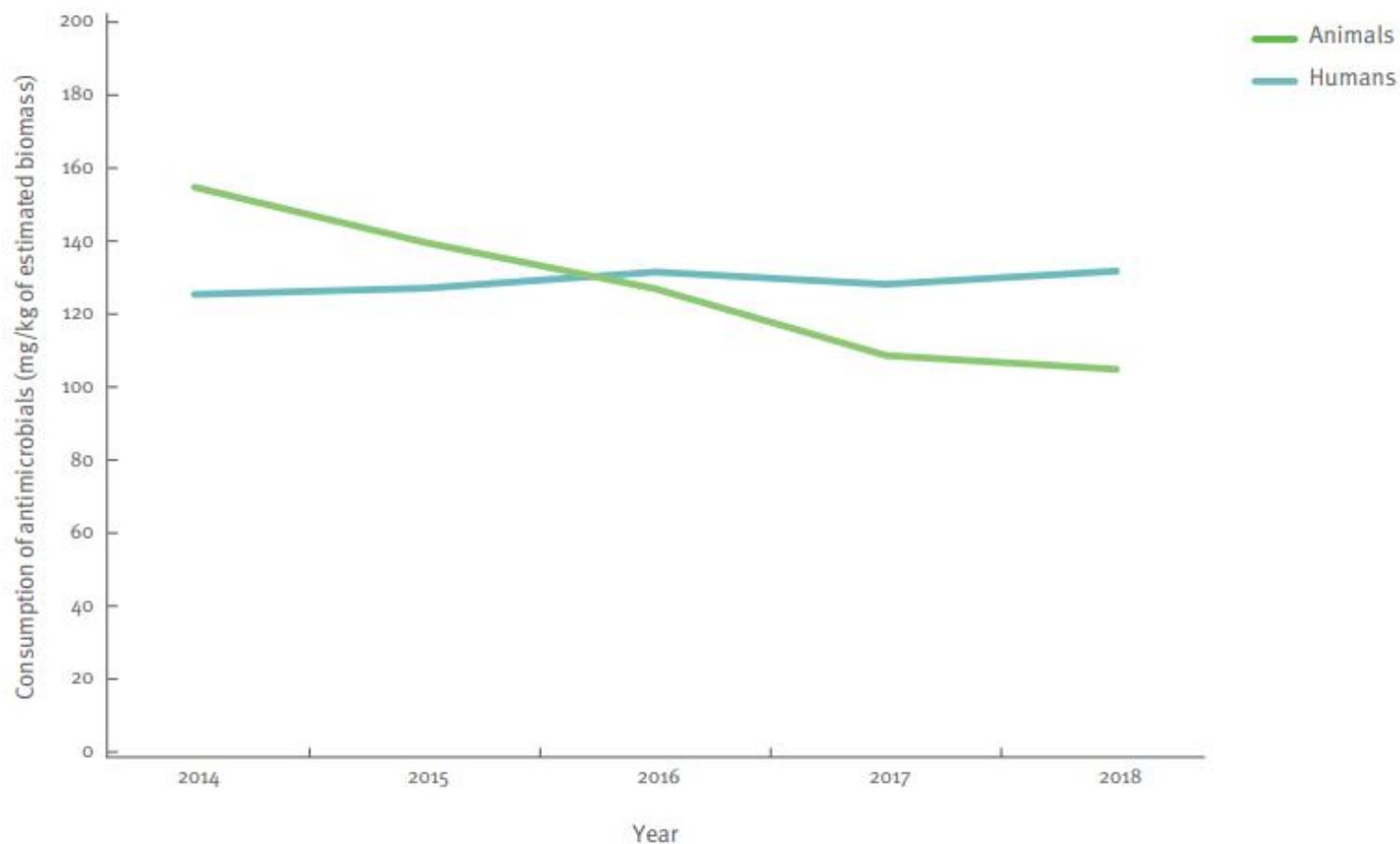


Asterisk (*) denotes that only community consumption was provided for human medicine. The population-weighted mean proportion (%) of hospital sector AMC out of the 2017 total national AMC for EU/EEA countries that provided data for both sectors is 15%.

Notes: 1) The estimates presented are crude and must be interpreted with caution. For limitations hampering comparison of antimicrobial consumption in humans and food-producing animals, see Section 15.1. The weighted mean figure represents the population-weighted mean of data from those countries included.

(a): ATC J01 Antibacterials for systemic use.

Figure III: Population-weighted mean of the total consumption of antimicrobials in humans^(a) and food-producing animals^(b) in 27 EU/EEA countries^(c) for which data were available for both humans and food-producing animals, for 2014–2018



(a) For humans: ATC J01 Antibacterials for systemic use.

(b) For food-producing animals: ATCvet QA07AA, QA07AB, QG01AA, QG01AE, QG01BA, QG01BE, QG51AA, QG51AG, QJ01, QJ51, QP51AG

(c) AT, BE, BG, CY, DE, DK, EE, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, UK.



- La prevalencia varía en función del tiempo y de la especie (matriz)
- La prevalencia ha ido disminuyendo a lo largo de los años del estudio europeo
- El % mayoritario de fenotipo es ESBL > AmpC
- Coincide la tendencia en España con la del conjunto de países de la UE
- Se observa una relación entre el consumo de AB en animals y en humanos y la existencia de resistencias antimicrobianas en infecciones bacterianas en ambos casos
- Las medidas para reducir el consumo de antimicrobianos desarrolladas por los estados miembros han sido efectivas:
 - El uso de antimicrobianos ha descendido en general tanto para uso humano como para uso veterinario



CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN

GRACIAS POR SU ATENCIÓN