CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA PRODUCCIÓN PRIMARIA AGRÍCOLA

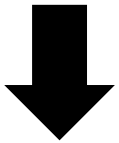
Interpretación de resultados de análisis microbiológicos
Preparación de las muestras para envío a laboratorio

Dra. Alexandra Herrera Estévez
Responsable de la Unidad de Microbiología LSA-CETAL

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

CETAL

Higiene de la Producción Primaria Agrícola



ASPECTOS MICROBIÓLOGICOS

IMPORTANCIA

Alemania (2011)

3.816 casos

- 845 (22%) SUH → 36 fallecidos (4,2%)
- 2.971 gastroenteritis → 18 fallecidos (0,6%)

En total perdieron la vida 54 personas

E. coli productor de verotoxina VT2, enteroagregativo y del serotipo O104:H4

La "Crisis del pepino"

La senadora de Sanidad de Hamburgo, la socialista Cornelia Prüfer-Storks, admite que los pepinos españoles no tienen la bacteria E.coli

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

CETAL

EL RIESGO DE QUE VUELVA A OCURRIR, Y EN NUESTRO PAÍS… ¿ES REAL?

RAZÓN Nº1

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

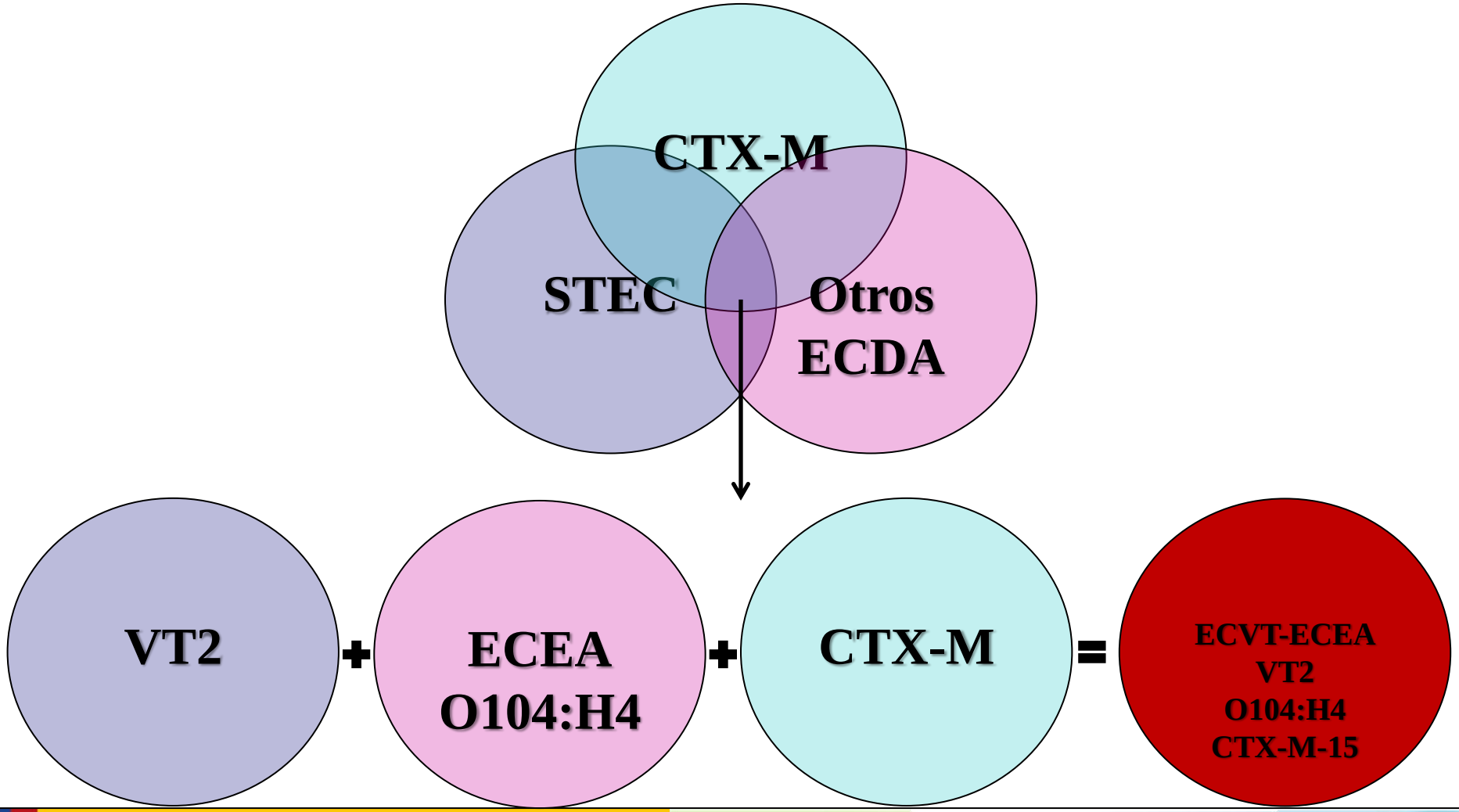
CETAL

RAZÓN Nº2

Cambio de patrón en la alimentación

RAZÓN Nº3

DEMOSTRADA LA COEXISTENCIA DE CEPAS y GENES DE VIRULENCIA DIFERENTES EN EL MISMO ALIMENTO



Brotes por ECVT O157 y no O157 a nivel mundial (≥100casos)

Año	Nº de casos	SUH	Muertes	Vía de transmisión	País	Cepa	Referencia
1996	12.680	121	12	Brotes de Rábano	Japón	O157:H7	Michino *et al*. 1999; Fukushima *et al*. 1999; Yamasaki *et al*. 1997
2011	3.816	845	54	Semillas/brotes de fenogreco	Alemania Francia	O104:H4	Blanco, 2012
2000	2.300	27	7	Agua de bebida	Canada	O157:H7	Hrudey *et al*. 2003
2012	1.642	-	-	Rábano, (kimchi)	Corea	O169	Hu *et al*. 2013
1999	>1.000	11	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Charatan, 1999
2000	788	4	1	Carne de vacuno, contaminación cruzada con otros alimentos (Sizzler)	EE.UU.	O157:H7	Archer, personal communication
1992-1993	>700	37	3	Hamburguer (Jack in the Box)	EE.UU.	O157:H7	Bell *et al*. 1994; Brandt *et al*. 1994; Davis, 1994;Tuttle *et al*. 1999
1995	633	2	0	Agua de grifo	Escocia	O157:H7	Jones *et al*. 1996
1991	521	22	2	Carne picada	Canada	O157:H7	Orr *et al*. 1994
1996-1997	512		17	Carne	Escocia	O157:H7	Cowden *et al*. 2001
1996	503	34	20	Carne	Escocia	O157:H7	Pennington, 1998
2008	341	25	1	Comida de restaurante	EE.UU.	O111:HNM	Oklahoma State Dept of Health, 2009
1997	332	1	0	Comida de restaurante	Reino Unido	O157:H7	Anónimo, 1997
1999	329			Carne de vacuno	EE.UU.	O157:H7	Depto. de Salud de Illinois, 1999
1990	243	2	4	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Swerdlow *et atl*. 1992
1991	234			Desconocido	Japón	O111:H-	Banatvala *et al*. 1996
2004	213			Sidra no pasteurizada	EE.UU.	O111	Vojdani *et al*. 2008
2000	>200	6	0	Salchichas (Catering de un colegio)	España	O157:H7	Muniesa *et al*. 2003
2011	181	-	0	Carne cruda	Japón	O111	National Institute of Infectius Diseases, Japan
1999	159			Animales-Zoo	Canada	O157:H7	Warshawsky *et al*. 2002
2005	157	2	1	Carne	Reino Unido	O157:H7	Salmon, 2005
1998	157	4		Agua de grifo	EE.UU.	O157:H7	Olsen *et al*. 2002
1999	143	6	0	Salami	Canada	O157:H7	MacDonald *et al*. 2004
2007	135	-	0	Queso pasteurizado	EE.UU.	O26	CDC, 2013a
1996	131	0	0	Ensaladas	Japón	O118:H2	Hashimoto *et al*. 1999
1999	127	14	2	Agua de pozo	EE.UU.	O157:H7	Novello, 1999; New York State, Dept of Health, 2000
2005	120	7	0	Lechuga	Suecia	O157:H7	Söderström *et al*. 2005
1999	114	3		Leche pasteurizada	Reino Unido	O157:H7	Goh *et al*. 2002
1995-1996	110	29	0	Desconocido	Suecia	O157:H7	Ziese *et al*. 1996
2002	109	0	2	Ensaladas	Canada	O157:H7	Bolduc *et al*. 2004
1997	108	4	0	Brotes de alfalfa	EE.UU.	O157:H7	Como-Sabetti *et al*. 1997
2004	108	15		Animales-Zoo	EE.UU.	O157:H7	Davies *et al*. 2005
2004	107	0	0	Carne	Japón	O111:HNM	Kato *et al*. 2005
2000	102			Agua de bebida	EE.UU.	O111	Lee *et al*. 2002
2000	102			Agua de riego	EE.UU.	O157:H7	Lee *et al*. 2002
1994	>100	9	1	Leche pasteurizada	Escocia	O157:H7	Upton *et al*. 1994
1984	100		0	Desconocido	Japón	O145:H-	Johnson *et al*. 1996

PRODUCTO VEGETAL

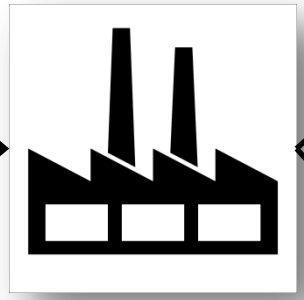
A. Herrera, 2015

ESCALA DE RIESGO

VENTA DIRECTA

Probabilidad de entrada del patógeno en la cadena alimentaria

PRODUCTO



PRODUCTO ELABORADO **SIN** TTO. TÉRMICO

PRODUCTO ELABORADO **CON** TTO. TÉRMICO

VENTA NO DIRECTA

IMPORTANCIA

IMPORTANCIA

1. PREVENCIÓN

2. Estar PREPARADOS para enfrentarnos a una crisis

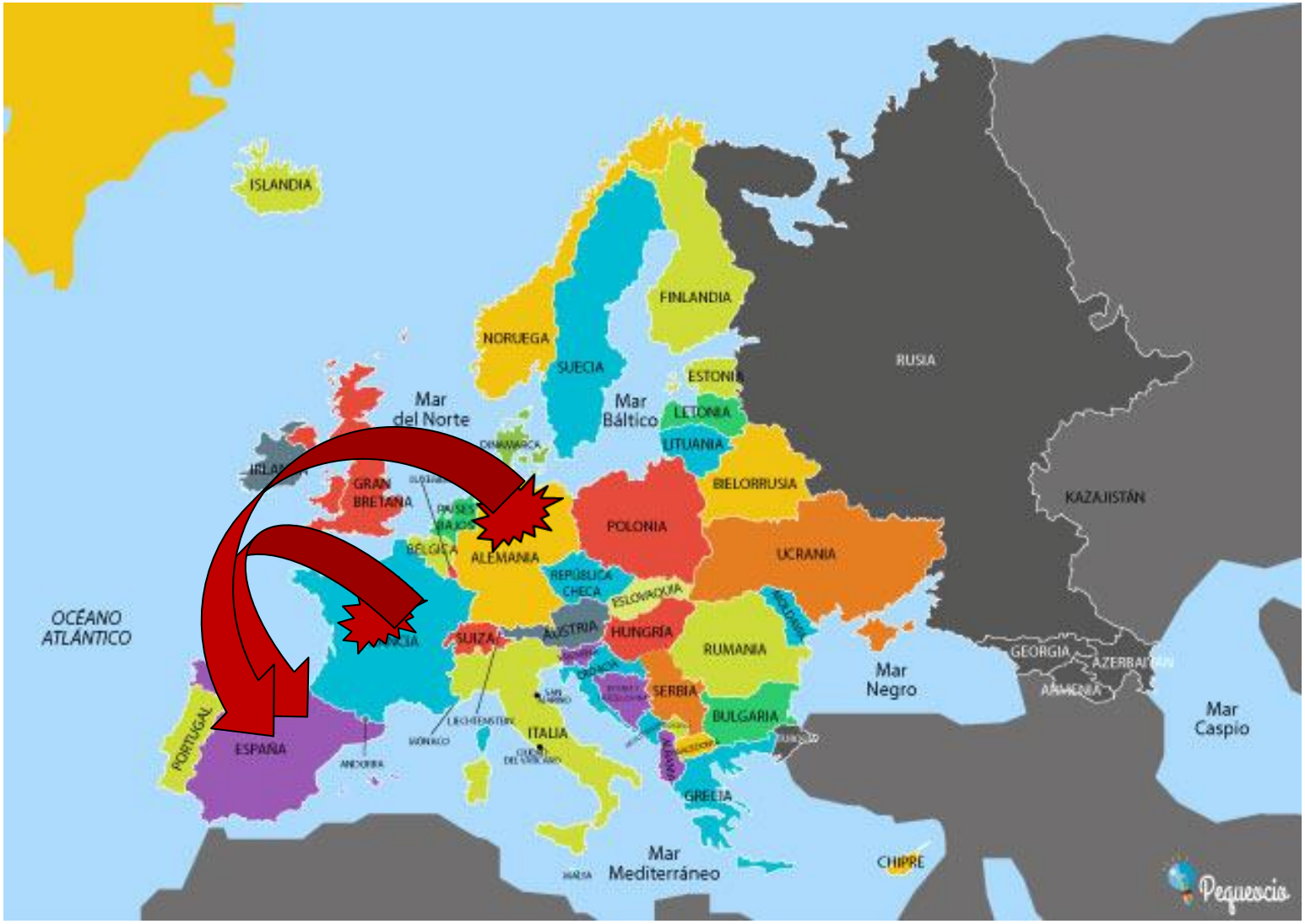
↓

Información constante y actualizada sobre el estado y la calidad higiénica sanitaria de nuestros productos agrícolas

↓

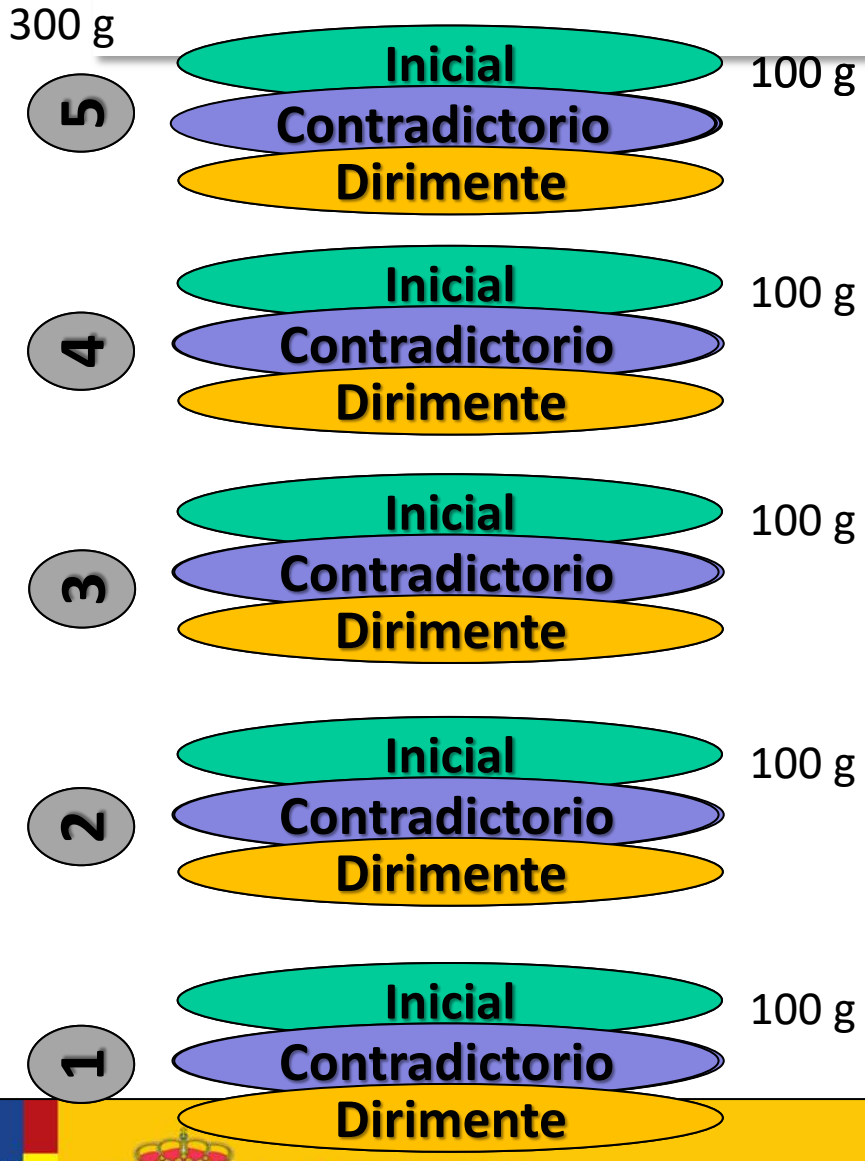
CEPAS

RECALL

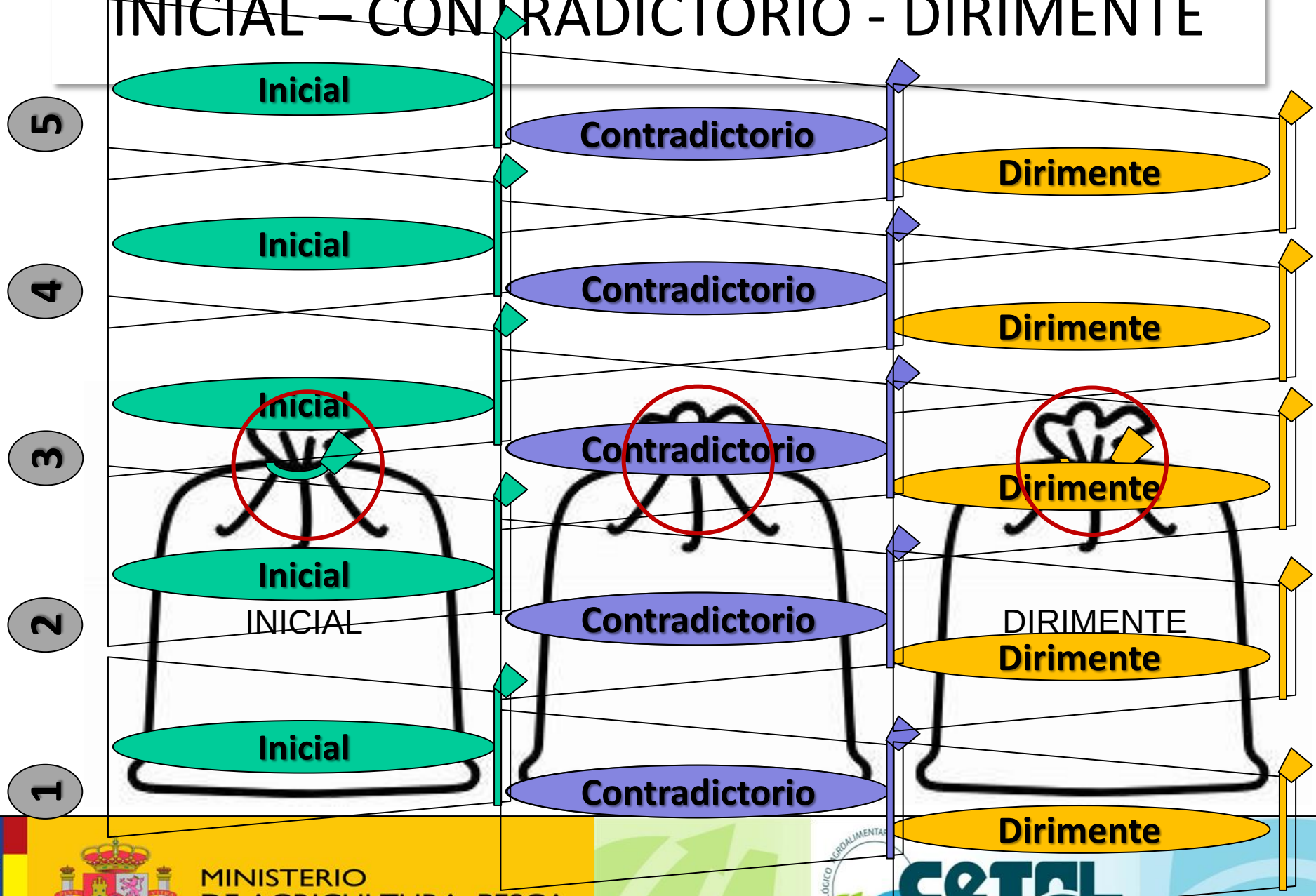

ISLANDIA
NORUEGA
SUECIA
FINLANDIA
RUSIA
ESTONIA
LETONIA
LITUANIA
Mar del Norte
Mar Báltico
DINAMARCA
IRLANDA
GRAN BRETAÑA
PAISES BAJOS
BELGICA
ALEMANIA
BIELORRUSIA
POLONIA
UCRANIA
KAZAJISTÁN
REPÚBLICA CHECA
ESLOVAQUIA
AUSTRIA
HUNGRIA
MOLDAVIA
RUMANIA
SUIZA
GEORGIA
AZERBAIYÁN
ARMENIA
Mar Negro
Mar Caspio
OCÉANO ATLÁNTICO
SERBIA
BULGARIA
PORTUGAL
ESPAÑA
ANDORRA
MONACO
LIECHTENSTEIN
ITALIA
GRECIA
TURQUIA
Mar Mediterráneo
CHIPRE
Pequescia

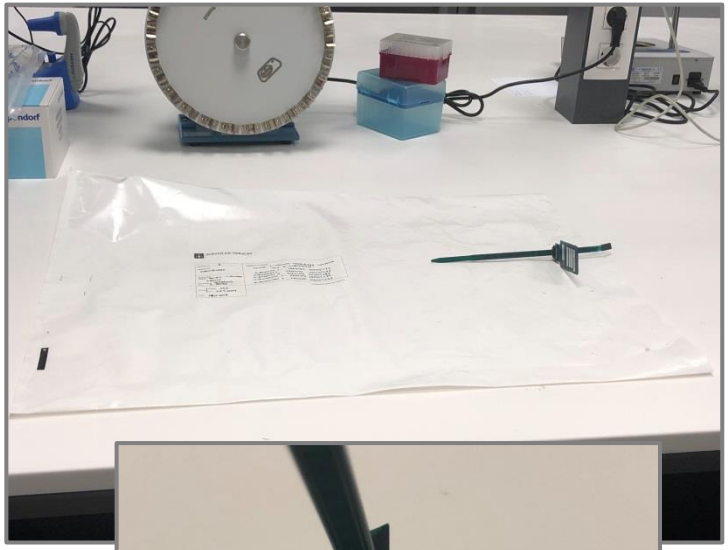
Preparación de las muestras para envío a laboratorio

INICIAL – CONTRADICTORIO - DIRIMENTE



INICIAL – CONTRADICTORIO - DIRIMENTE

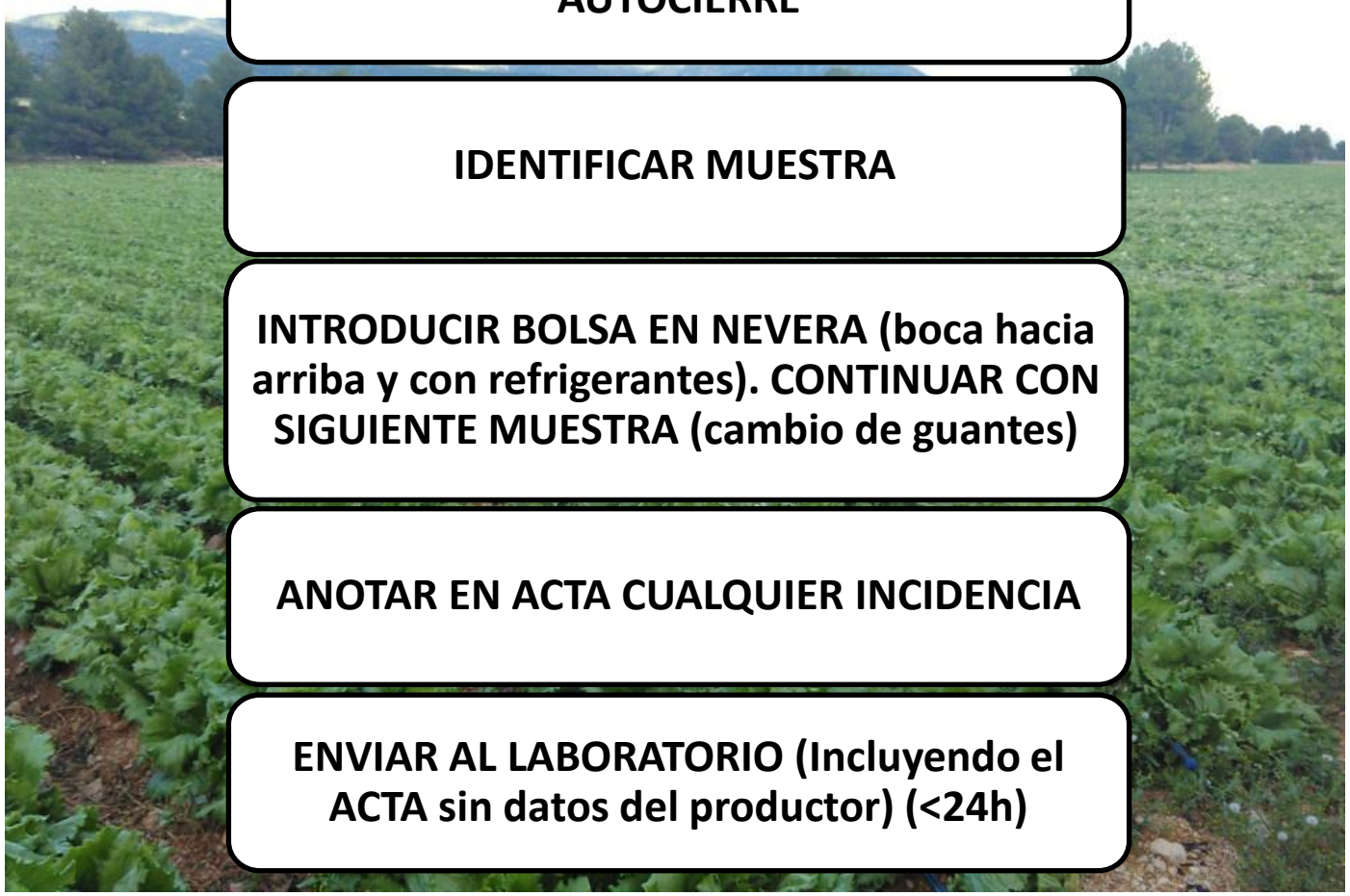




EJEMPLAR

SUB-MUESTRAS

ENVÍO AL LABORATORIO



INTRODUCIR EN BOLSA ESTERIL CON AUTOCIERRE

IDENTIFICAR MUESTRA

INTRODUCIR BOLSA EN NEVERA (boca hacia arriba y con refrigerantes). CONTINUAR CON SIGUIENTE MUESTRA (cambio de guantes)

ANOTAR EN ACTA CUALQUIER INCIDENCIA

ENVIAR AL LABORATORIO (Incluyendo el ACTA sin datos del productor) (<24h)

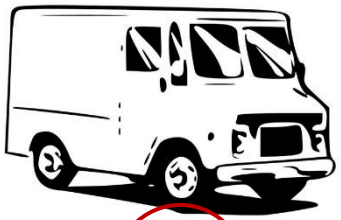
ENVÍO AL LABORATORIO

NEVERAS

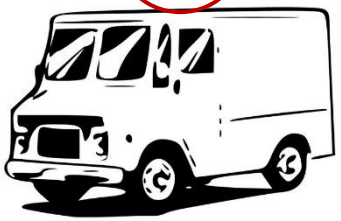
REFRIGERACIÓN
(2-8 ºC)

OJO EN VERANO

CADENA DE FRÍO

CAMPO → **CCAA** → 

ALMACÉN

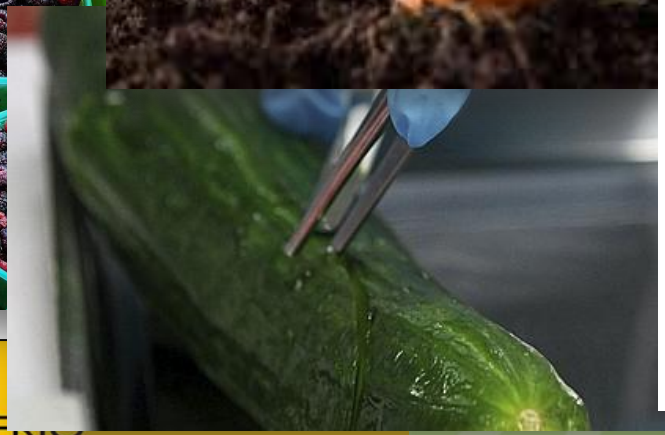


Laboratorio ←

2ºC - 8ºC

<24h

MUESTREO-PRODUCTO VEGETAL



MUESTREO-BROTES

ECVT y *Salmonella*

+48 horas del inicio de la germinación (En germinación)

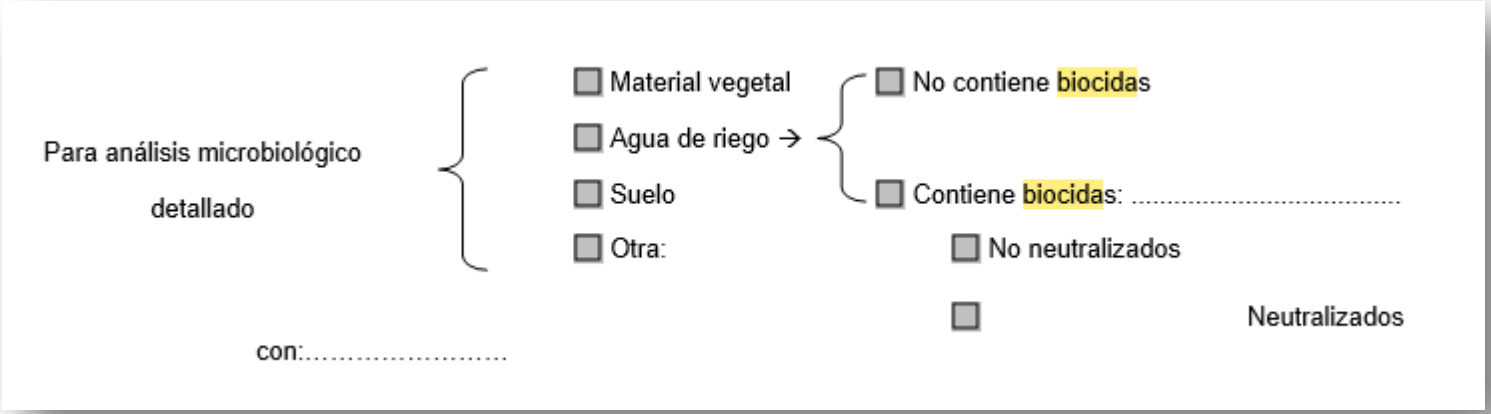
MUESTREO-BROTES

Listeria m.

Producto terminado

MUESTREO-AGUA

BIOCIDAS

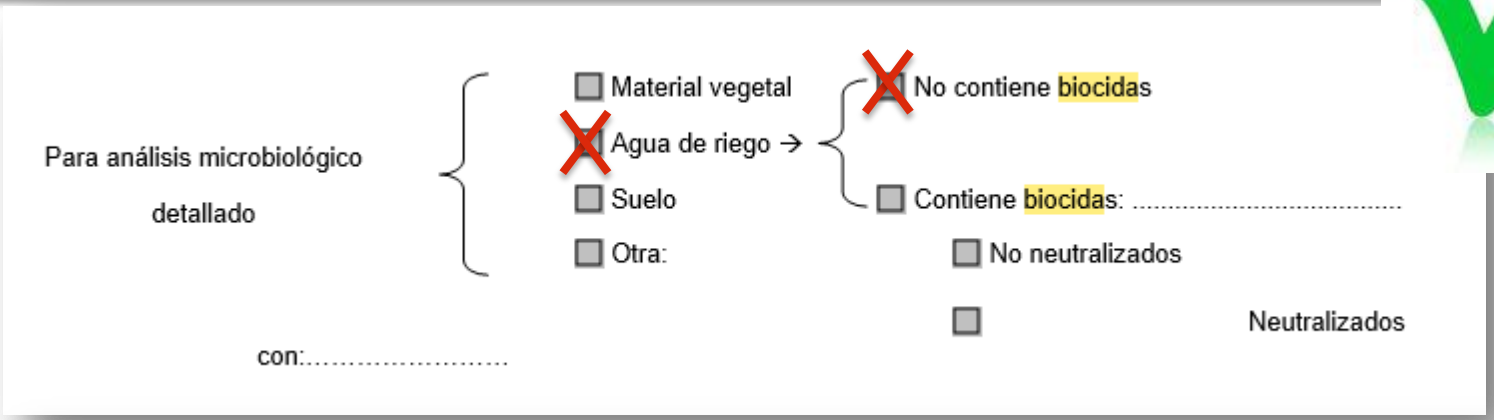


MAPAMA - ANEXO III MODELO ACTA TOMA DE MUESTRAS
PNT EXPLOTACIONES 2018

Neutralización Cl → **Tiosulfato sódico**

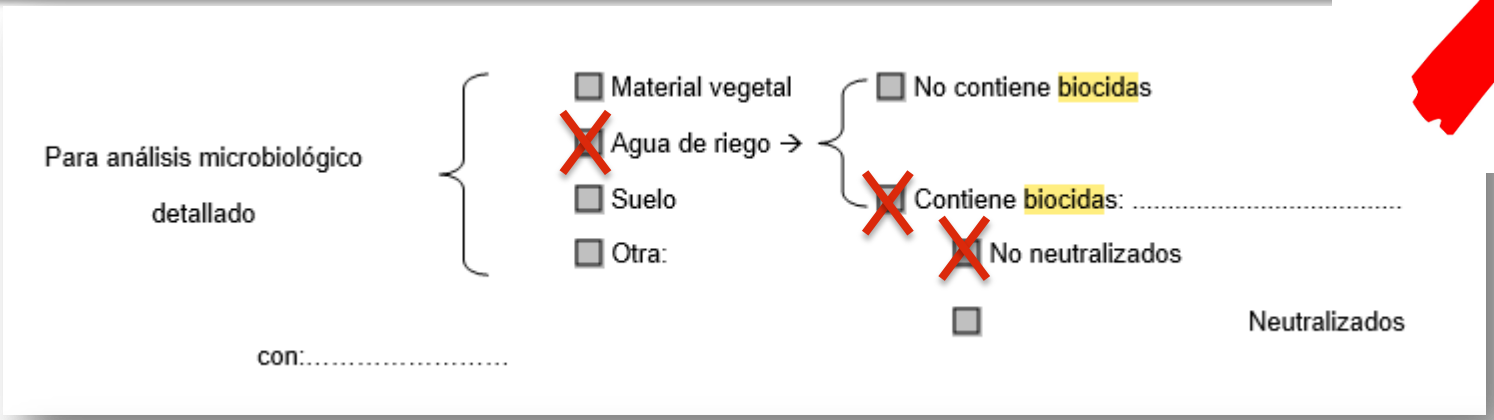
MUESTREO-AGUA

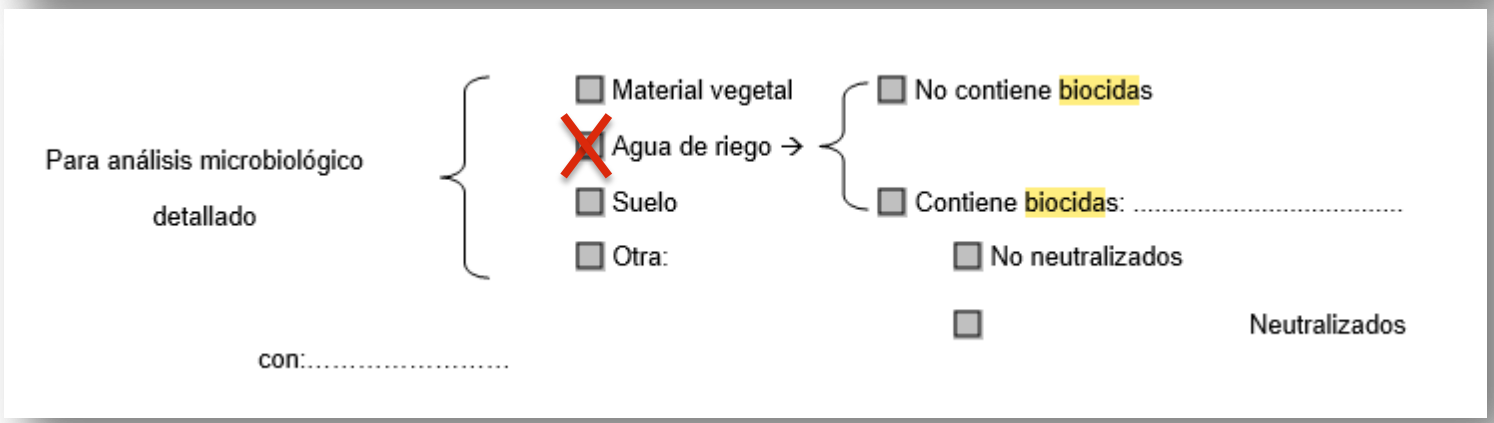
¿Cómo tiene que llegar el ACTA?



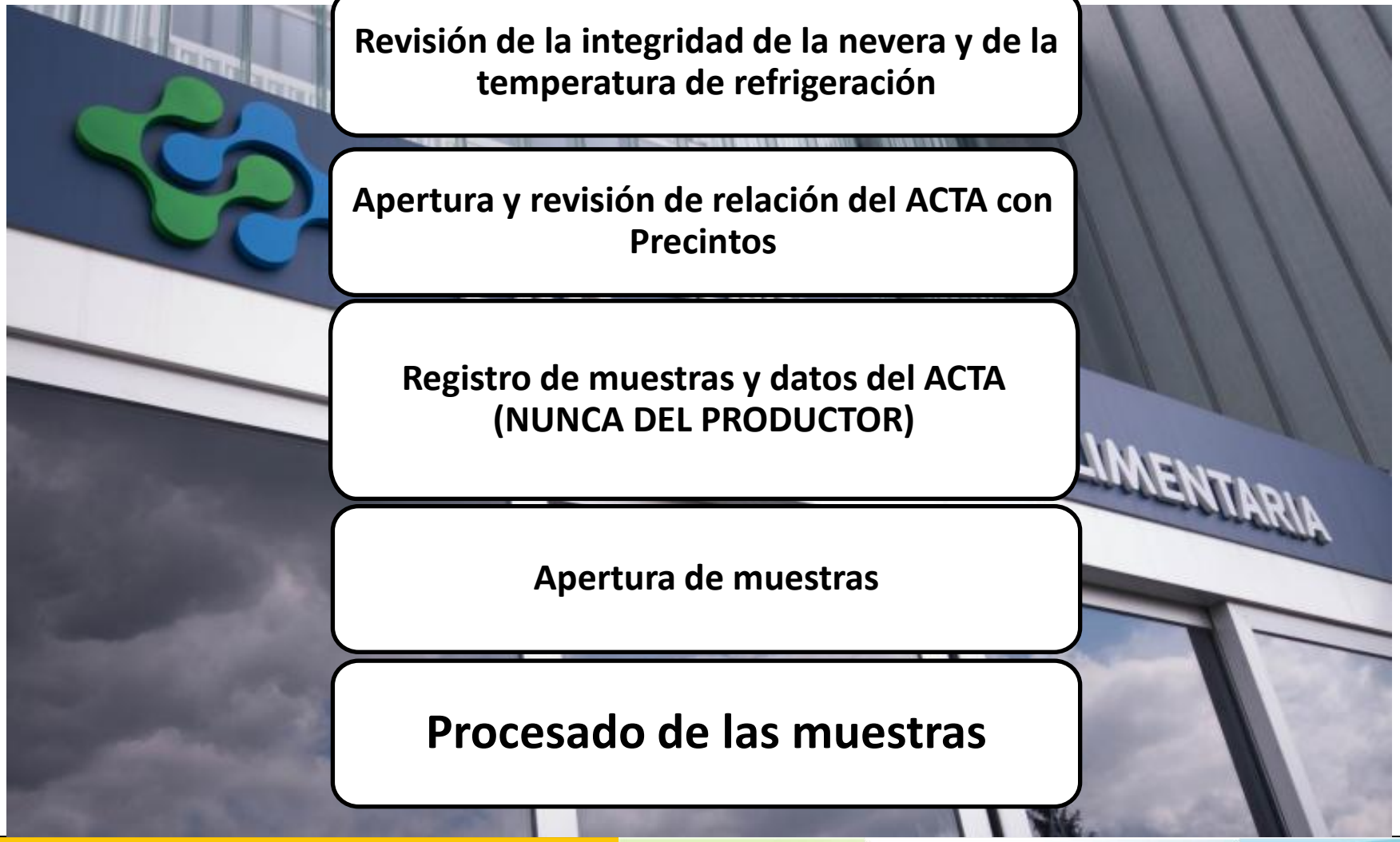
MUESTREO-AGUA

¿Cómo tiene que llegar el ACTA?





RECEPCIÓN EN LABORATORIO



Revisión de la integridad de la nevera y de la temperatura de refrigeración

Apertura y revisión de relación del ACTA con Precintos

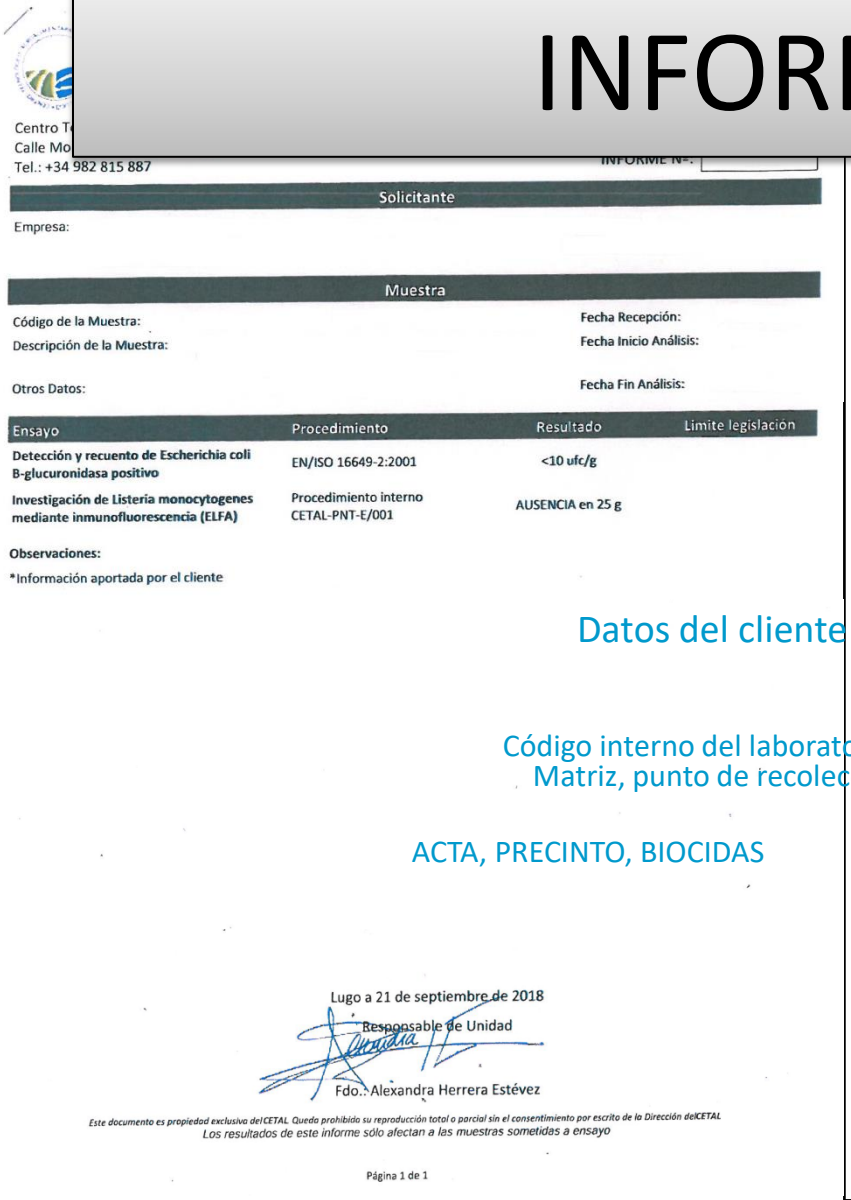
Registro de muestras y datos del ACTA (NUNCA DEL PRODUCTOR)

Apertura de muestras

Procesado de las muestras

Interpretación de resultados de análisis microbiológicos

INFORME-DATOS



Centro T
Calle Mo
Tel.: +34 982 815 887

INFORME Nº:

Solicitante

Empresa:

Muestra

Código de la Muestra:
Descripción de la Muestra:
Otros Datos:

Fecha Recepción:
Fecha Inicio Análisis:
Fecha Fin Análisis:

Ensayo	Procedimiento	Resultado	Limite legislación
Detección y recuento de Escherichia coli B-glucuronidasa positivo	EN/ISO 16649-2:2001	<10 ufc/g	
Investigación de Listeria monocytogenes mediante inmunofluorescencia (ELFA)	Procedimiento interno CETAL-PNT-E/001	AUSENCIA en 25 g	

Observaciones:

*Información aportada por el cliente

Lugo a 21 de septiembre de 2018

Responsable de Unidad

Fdo.: Alexandra Herrera Estévez

Este documento es propiedad exclusiva del CETAL. Queda prohibido su reproducción total o parcial sin el consentimiento por escrito de la Dirección del CETAL
Los resultados de este informe sólo afectan a las muestras sometidas a ensayo

Página 1 de 1

→ Sello ENAC y número de acreditación

→ Número interno de informe

Datos del cliente (Nombre, contacto, etc.)

Código interno del laboratorio/Código original
Matriz, punto de recolección

ACTA, PRECINTO, BIOCIDAS

CETAL = Inmediatamente

Fecha fin del último análisis

INFORME DE ENSAYO

ENAC ENSAYOS Nº 1268/LE2408

Centro Tecnológico Agroalimentario de Lugo
Calle Montirón 154, 27002 Lugo
Tel.: +34 982 815 887

INFORME Nº: **2207**

Solicitante

Empresa: **CCAA CATALUÑA.DEP.D'AGRICULTURA,RAMADERIA,PESCA I**
Avda. Rovira Roure, 191
25198 Lleida (Lleida)

Contacto: Carles Chico Clua
cchico@gencat.cat

Muestra

Código de la Muestra: **18/00609**

Cód. Externo: **EAI/LL/33/49/18/I1**

Descripción de la Muestra: **CONTROL OFICIAL, Melocotón (Paraguayo). *Producto recolectado, en cámara, listo para consumo** *

Otros Datos: **ACTA: EAI/LL/33/49/18/I, PRECINTO: 000623**

Fecha Recepción: **19/09/2018**

Fecha Inicio Análisis: **19/09/2018**

Fecha Fin Análisis: **21/09/2018**

Ensayo	Procedimiento	Resultado	Limite legislación
Detección y recuento de Escherichia coli B-glucuronidasa positivo	EN/ISO 16649-2:2001	<10 ufc/g	
Investigación de Listeria monocytogenes mediante inmunofluorescencia (ELFA)	Procedimiento interno CETAL-PNT-E/001	AUSENCIA en 25 g	

Observaciones:

*Información aportada por el cliente

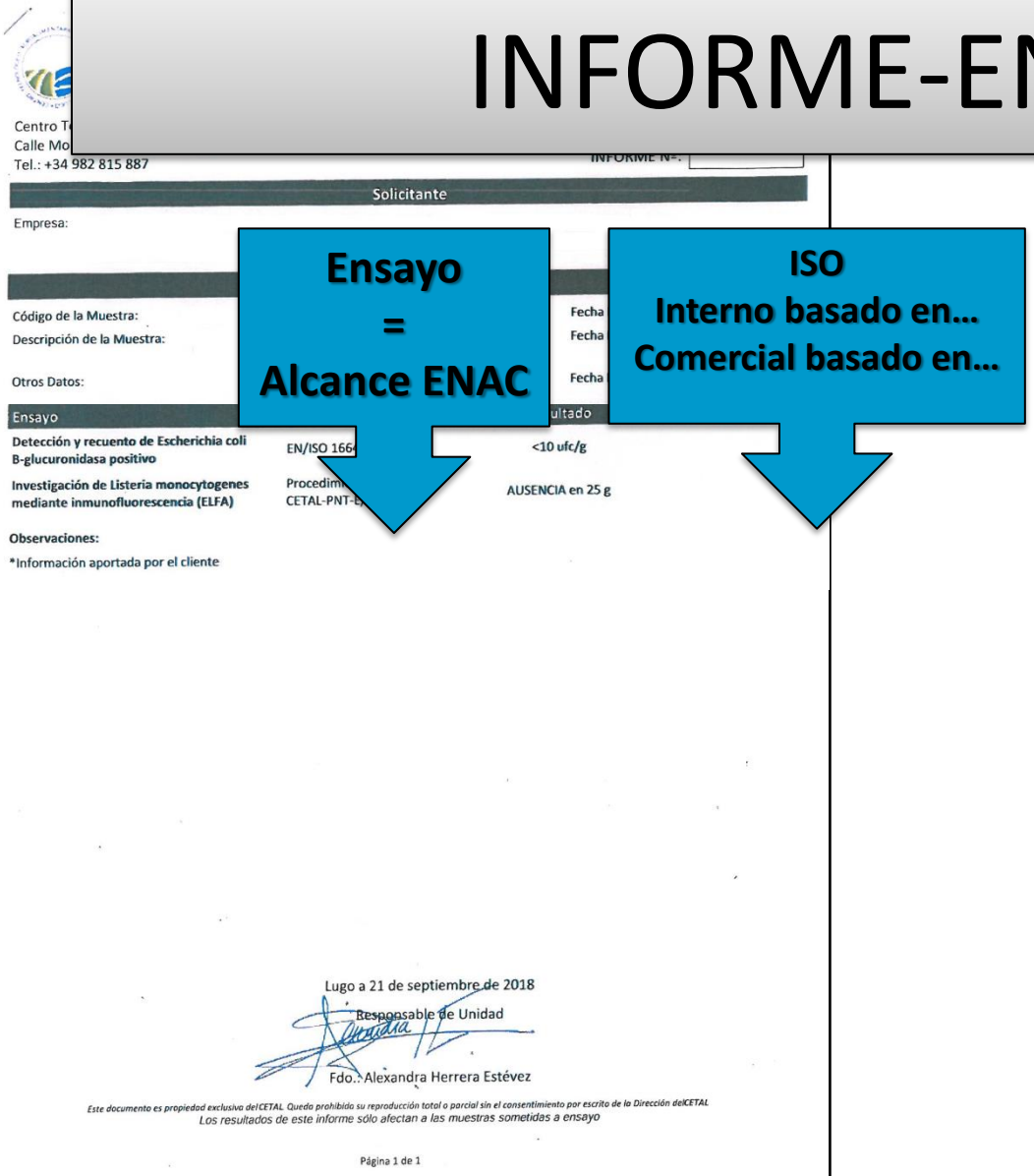
Lugo a 21 de septiembre de 2018

Responsable de Unidad

Fdo.: Alexandra Herrera Estévez

Este documento es propiedad exclusiva del CETAL. Queda prohibida su reproducción total o parcial sin el consentimiento por escrito de la Dirección del CETAL
Los resultados de este informe sólo afectan a las muestras sometidas a ensayo

INFORME-ENSAYOS



Centro T
Calle Mo
Tel.: +34 982 815 887

INFORME Nº:

Solicitante

Empresa:

Código de la Muestra:
Descripción de la Muestra:
Otros Datos:

Fecha
Fecha
Fecha

Ensayo		ultado
Detección y recuento de Escherichia coli B-glucuronidasa positivo	EN/ISO 166	<10 ufc/g
Investigación de Listeria monocytogenes mediante inmunofluorescencia (ELFA)	Procedim CETAL-PNT-E	AUSENCIA en 25 g

Observaciones:

*Información aportada por el cliente

Lugo a 21 de septiembre de 2018

Responsable de Unidad

Fdo.: Alexandra Herrera Estévez

Este documento es propiedad exclusiva del CETAL. Queda prohibida su reproducción total o parcial sin el consentimiento por escrito de la Dirección del CETAL
Los resultados de este informe sólo afectan a las muestras sometidas a ensayo

Página 1 de 1

Ensayo = Alcance ENAC

ISO
Interno basado en…
Comercial basado en…

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

CETAL CENTRO TECNOLÓGICO AGROALIMENTARIO LUGO

Equivalencia de procedimientos

Parámetro	Norma de referencia
ECVT/STEC	CEN/ISO TS 13136
Salmonella spp.	EN/ISO 6579
Listeria monocytogenes	EN/ISO 11290
E. coli β-glucoronidasa positiva	ISO 16649

Procedimiento interno/Método comercial → VALIDACIÓN por el fabricante o el laboratorio según EN/ISO 16140 → Según el método de referencia → Certificado por una entidad reconocida de normalización (AFNOR)

INFORME DE VALIDACIÓN
«Los resultados de ésta validación concluyen que el método alternativo aporta garantías equivalentes al método de referencia»

INFORME-VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

Centro T
Calle Mo
Tel.: +34

Empresa:

Muestra

Código de la Muestra:
Descripción de la Muestra:
Otros Datos:

Fecha Recepción:
Fecha Inicio Análisis:
Fecha Fin Análisis:

Ensayo	Procedimiento	Resultado	Limite legislación
Detección y recuento de Escherichia coli B-glucuronidasa positivo	EN/ISO 16649-2:2001	<10 ufc/g	
Investigación de Listeria monocytogenes mediante inmunofluorescencia (ELFA)	Procedimiento interno CETAL-PNT-E/001	AUSENCIA en 25 g	

Observaciones:

*Información aportada por el cliente

Lugo a 21 de septiembre de 2018

Responsable de Unidad

Fdo.: Alexandra Herrera Estévez

Este documento es propiedad exclusiva del CETAL. Queda prohibido su reproducción total o parcial sin el consentimiento por escrito de la Dirección del CETAL

Los resultados de este informe sólo afectan a las muestras sometidas a ensayo

Firma y Fecha de emisión del informe

Letra pequeña

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

CETAL CENTRO TECNOLÓGICO AGROALIMENTARIO LUGO

INFORME-RESULTADOS

Centro T
Calle Mo
Tel.: +34 982 815 887

INFORME Nº:

Solicitante

Empresa:

Muestra

Código de la Muestra:
Descripción de la Muestra:
Otros Datos:

Fecha Recepción:
Fecha Inicio Análisis:
Fecha Fin Análisis:

Ensayo	Procedimiento	Resultado	Limite legislación
Detección y recuento de Escherichia coli B-glucuronidasa positivo	EN/ISO 16649-2:2001	<10 ufc/g	
Investigación de Listeria monocytogenes mediante inmunofluorescencia (ELFA)	Procedimiento interno CETAL-PNT-E/001	AUSENCIA en 25 g	

Observaciones:

*Información aportada por el cliente

Lugo a 21 de septiembre de 2018

Responsable de Unidad

Fdo.: Alexandra Herrera Estévez

Este documento es propiedad exclusiva del CETAL. Queda prohibida su reproducción total o parcial sin el consentimiento por escrito de la Dirección del CETAL

Los resultados de este informe sólo afectan a las muestras sometidas a ensayo

RESULTADOS

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

CETAL CENTRO TECNOLÓGICO AGROALIMENTARIO LUGO

PARÁMETROS

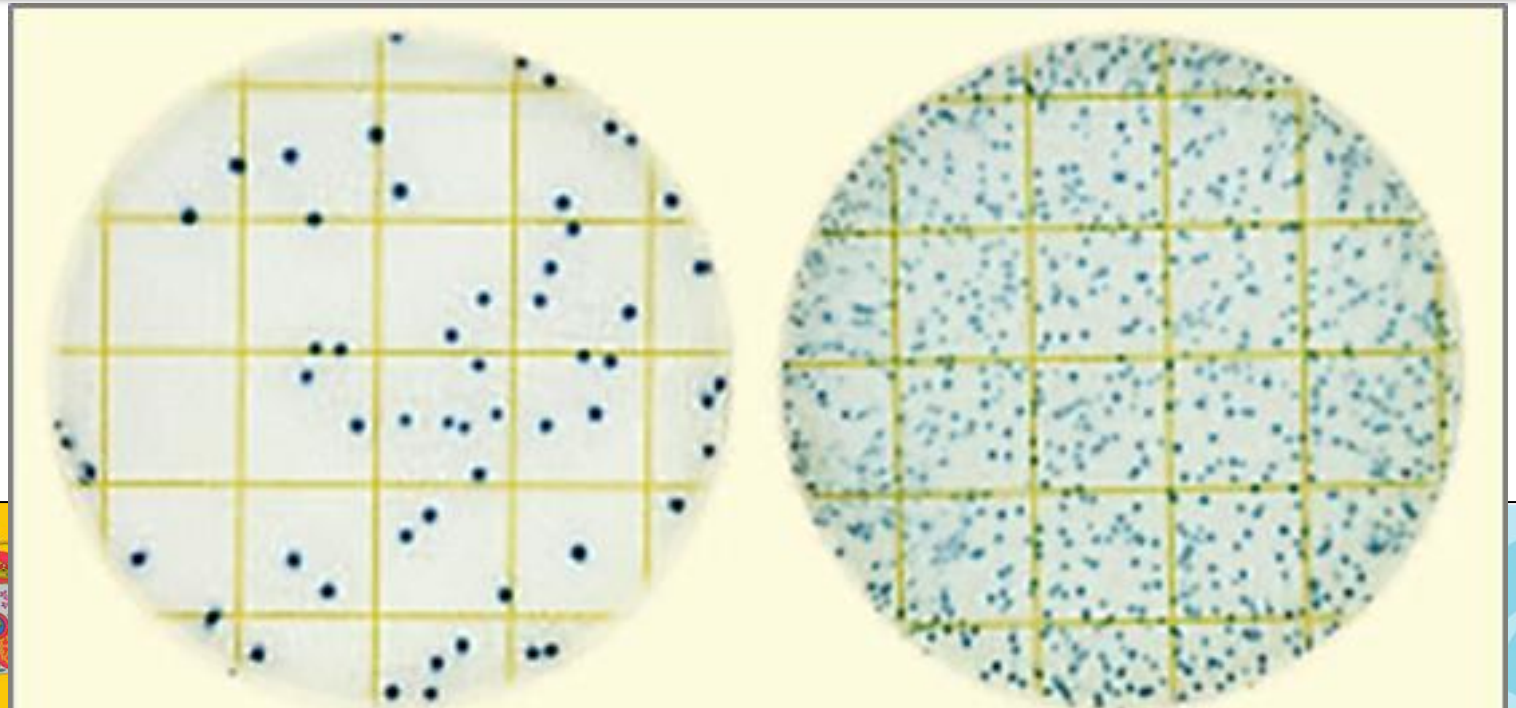
Escherichia coli β-glucoronidasa positivo (*E. coli* no patogénico)	→	RECUENTO	→	Porción de muestra (25 g /100 ml)
Salmonella spp.	→	PRESENCIA/AUSENCIA	→	Porción de muestra (25 g/100 ml)
STEC	→	PRESENCIA/AUSENCIA	→	Porción de muestra (25 g/100 ml)
L. monocytogenes	→	RECUENTO	→	Porción de muestra (25 g/100 ml)

Escherichia coli "no patogénico"

MICROORGANISMO INDICADOR

Su presencia en un alimento indica la posible presencia simultánea de **microorganismos** patógenos ecológicamente relacionados.

Presencia: posible presencia de patógenos de procedencia entérica (entre ellos, *Salmonella*) en el agua y los alimentos.



Escherichia coli β-glucoronidasa positivo (*E. coli* no patogénico)

AUSENCIA DE CRECIMIENTO	< XX ufc/ g (XX en función de la dilución)
CRECIMIENTO	XX ufc / g (XX en función de la dilución)

NUNCA
CERO ufc/g

¿POR QUÉ?

25 g

225 ml

1/10

Ausencia de crecimiento <10 ufc de *E. coli*/gr de alimento

¿POR QUÉ?

100 ml

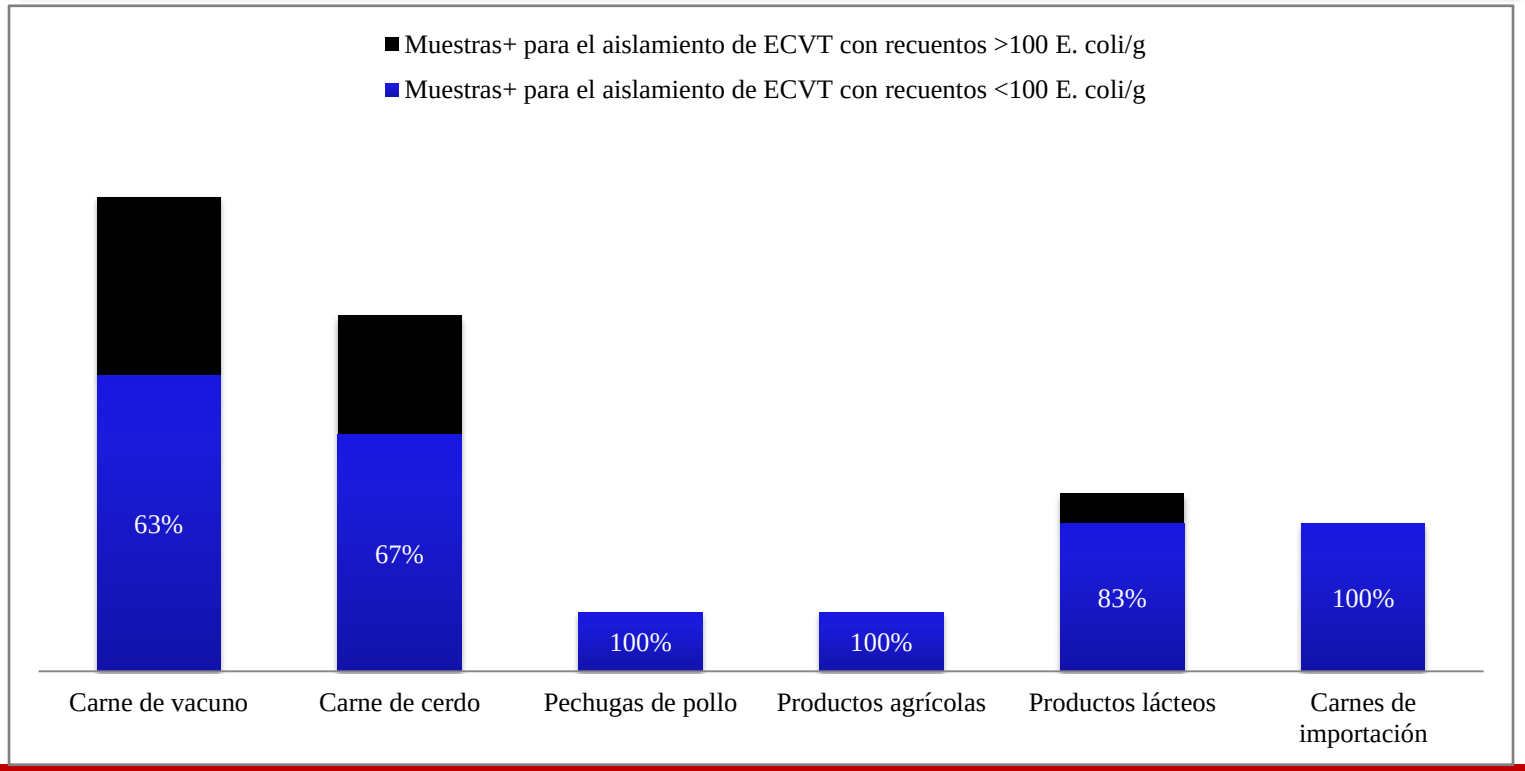
Sin diluir

Ausencia de crecimiento <1 ufc de *E. coli*/100 ml de agua

PREGUNTA…

NO

ADEMÁS…



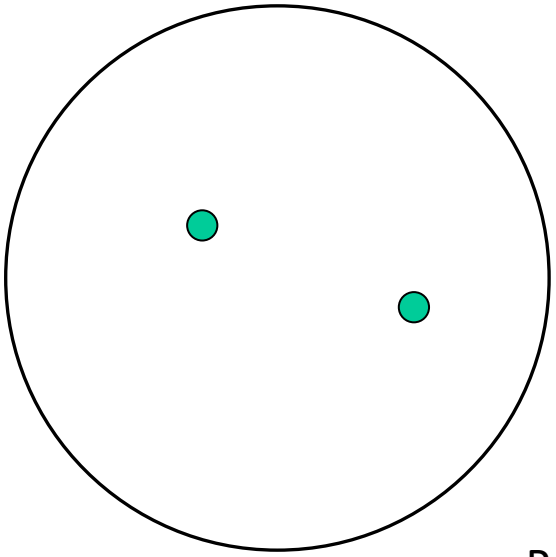
A. HERRERA 2015: “La mayoría de las muestras cárnicas y productos vegetales portadoras de ECVT presentaron recuentos aceptables (<100 ufc/g), de acuerdo con la legislación (Reglamento CE Nº 2073/2005, y posteriores modificaciones)”

POR LO TANTO…

"Recuentos bajos de *E. coli* por gramo **no** aseguran la AUSENCIA de cepas patógenas. La mayoría de las muestras cárnicas y productos vegetales portadoras de algún patotipo de *E. coli* diarreagénico presentaron recuentos aceptables (<100 ufc/g), de acuerdo con la legislación (Reglamento CE Nº 2073/2005, y posteriores modificaciones)"

A. Herrera, 2015

RECUENTOS
Expresión de resultados (ISO)

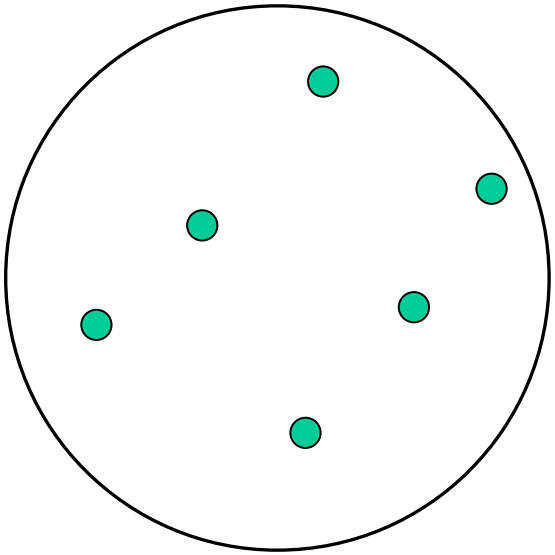


Entre 1-3 colonias → Microorganismo presente a un nivel inferior a 4/d

Presente a un nivel inferior a 40 ufc/g → 10^{-1}

Presente a un nivel inferior a 400 ufc/g → 10^{-2}

RECUENTOS
Expresión de resultados (ISO)

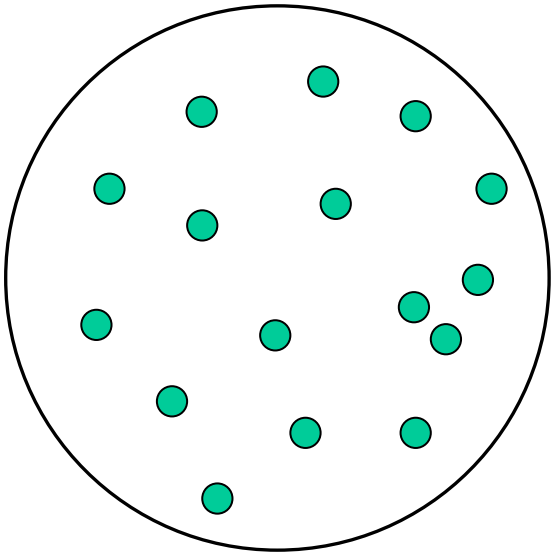


Entre 4-9 colonias → NE= Número estimado

Número estimado 60 ufc/g → 10^{-1}

Número estimado 600 ufc/g → 10^{-2}

RECUENTOS
Expresión de resultados (ISO)



>9 colonias → Nº de colonias * factor de dilución

1,5E+02 (150 ufc/g) → 10^{-1}

1,5E+03 (1500 ufc/g) → 10^{-2}

L. monocytogenes

AUSENCIA DE CRECIMIENTO

< XX/ g (XX en función de la dilución)

CRECIMIENTO → CONFIRMACIÓN

XX/ g (XX en función de la dilución)

IMPORTANTE LA CONCENTRACIÓN (>100 ufc/g)

Salmonella spp.

NEGATIVO

Ausencia del patógeno en la porción de muestra analizada

POSITIVO → CONFIRMACIÓN

Presencia del patógeno en la porción de muestra analizada

STEC

NEGATIVO (a las toxinas) Ausencia del patógeno en la porción de muestra analizada

POSITIVO (a las toxinas) Presencia del patógeno en la porción de muestra analizada

VT1 y/o VT2	*eae*	Serogrupos O157, O26, O111, O103 y O145

No se ha conseguido aislar la cepa

- PRESENCIA PRESUNTIVA de STEC en la porción analizada
- PRESENCIA PRESUNTIVA de STEC potencialmente patógeno para humanos en 25 g o 25 ml la porción analizada
- PRESENCIA PRESUNTIVA de STEC altamente patógeno para humanos en la porción analizada

STEC

NEGATIVO (a las toxinas) Ausencia del patógeno en la porción de muestra analizada

POSITIVO (a las toxinas) Presencia del patógeno en la porción de muestra analizada

VT1 y/o VT2	*eae*	Serogrupos O157, O26, O111, O103 y O145

Si se ha conseguido aislar la cepa

- PRESENCIA de STEC en la porción analizada
- PRESENCIA de STEC potencialmente patógeno para humanos en la porción analizada
- PRESENCIA de STEC altamente patógeno para humanos la porción analizada

Ante la duda….

Laboratorio de Control Oficial

Laboratorio Nacional de Referencia-LSA-CETAL

+34 982815887 - Ext. 111

GRACIAS…

Alexandra Herrera
aherrera@cetal.es
+34 982815887 - Ext. 111

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN