

**PLIEGO DE CLÁUSULAS TÉCNICAS PARA LA CONTRATACIÓN DE SERVICIOS DE
“ANÁLISIS PARA LA OBTENCIÓN DEL ESTADO DE SITUACIÓN RESPECTO A
DIFERENTES AGENTES ZONÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL
COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID”**

1. TÍTULO DEL CONTRATO DE SERVICIOS

“ANÁLISIS PARA LA OBTENCIÓN DEL ESTADO DE SITUACIÓN RESPECTO A DIFERENTES AGENTES ZONÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID”

2. OBJETO DEL CONTRATO

El objeto del presente contrato es la toma de muestras de alimentos (huevos de gallina, carne de conejo, carne de cerdo y carne de pollo) para realizar pruebas analíticas de las mismas, y la elaboración de los correspondientes informes sobre los resultados obtenidos frente a los siguientes agentes zoonóticos:

- Estado de situación respecto a *Salmonella* en huevos de gallina.
- Estado de situación respecto a *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina en carne de conejo.
- Estado de situación respecto a *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina y *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC y carbapenemasas, en carne de cerdo
- Estado de situación respecto a *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas en carne de pollo

3. OBJETO Y DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS SERVICIOS

Con el fin de que la información resultante de las actividades directamente vinculadas con el servicio objeto de contratación sea comparable a la obtenida por otros medios, y que pueda contribuir a la elaboración del Informe sobre fuentes y tendencias de agentes zoonóticos y su resistencia antimicrobiana en la Comunidad de Madrid, y que a su vez, en cumplimiento del artículo 10 del Real Decreto 1940/2004^a, pueda ser objeto de incorporación en el Informe anual nacional y en Informe Sumario Comunitario de la Unión Europea, se establecen las siguientes especificaciones técnicas de tipo común:

CONDICIONES GENERALES:

3.1. Realización del muestreo y de los análisis

3.1.1. Lugares de muestreo

El muestreo de huevos de gallina, de carne de conejo, carne de cerdo y carne de pollo se efectuará en establecimientos minoristas de venta al consumidor final, de tipo grandes superficies, minoristas y pequeños comercios tradicionales. Se seleccionarán

^a Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

establecimientos ubicados dentro del territorio de la Comunidad de Madrid, teniendo en cuenta el volumen de comercialización y la variedad de los alimentos a muestrear. A tales efectos, se justificará la representatividad de la distribución de las muestras asignadas a cada uno de los tipos de establecimientos de venta, y se procurará abarcar la mayor variedad posible de alimentos existentes en el mercado en cuanto a procedencia, marca y presentación comercial.

3.1.2. Toma de las muestras, transporte y conservación

La toma de muestras se realizará evitando toda contaminación cruzada. En todas las fases deberán tomarse precauciones para asegurarse de que el equipo utilizado en el muestreo (material estéril), el transporte y el almacenamiento no se contamina con los patógenos investigados. Con carácter general, las carnes muestreadas se conservarán en refrigeración hasta su preparación.

3.1.3. Recepción y preparación de las muestras en el laboratorio

Todas las muestras se recibirán en el laboratorio y se prepararán para su análisis dentro de las 24 horas siguientes a la toma. El personal que manipule las muestras deberá evitar en todas las fases la contaminación cruzada con el entorno inmediato.

3.1.4. Pruebas y métodos analíticos

Cada muestra se someterá a las pruebas analíticas necesarias para la detección y la identificación completa de diferentes agentes zoonóticos, de acuerdo lo descrito en el punto 4 "Actividades y condiciones específicas de los servicios".

Se utilizarán los métodos analíticos establecidos expresamente en la legislación que sea de aplicación; se deberá describir cualquier modificación respecto al método de referencia, y aportar pruebas de su validación frente al mismo.

Se podrán usar métodos analíticos alternativos cuando estén validados con respecto al método de referencia; si se utiliza un método registrado, éste deberá estar certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

En aquellos supuestos en que la normativa no identifique los métodos analíticos de forma expresa, se procederá a la descripción completa del método utilizado y, en su caso, se proporcionará la referencia internacional del mismo.

3.1.5. Laboratorios de análisis

Las pruebas analíticas de identificación, y en su caso, de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas, tendrán lugar en el Laboratorio Nacional de Referencia, establecido por el Real Decreto 1940/2004, o en los Laboratorios Comunitarios de Referencia, establecidos por el Reglamento (CE) nº 882/2004^b, o en Laboratorios de reconocida experiencia y solvencia técnica a nivel nacional, comunitario o internacional.

^b Reglamento (CE)Nº 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales

3.2. Recopilación y comunicación de datos

Durante la prestación del servicio se recogerá toda información pertinente sobre el lugar de muestreo, los alimentos muestreados, los análisis practicados y los resultados obtenidos. Los datos recopilados serán comparables con los obtenidos por otros medios (muestreos reglamentarios/prospectivos en industrias alimentarias, en brotes alimentarios, etc.) para que puedan contribuir a la elaboración del correspondiente informe anual de fuentes y tendencias de agentes zoonóticos y su resistencia antimicrobiana.

A efectos de la declaración de agentes zoonóticos y su resistencia antimicrobiana, los datos se consignarán en los formatos proporcionados por la Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria, y que se ajustarán a los utilizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Se emitirá un informe de ensayo para cada muestra analizada, que incluirá como mínimo, información sobre el muestreo (fecha, municipio y establecimiento), el alimento muestreado (descripción, y en su caso, empresa responsable de la puesta en el mercado, marca comercial y lote) y los análisis practicados (fecha de inicio y de fin, métodos analíticos y resultados).

Se elaborará un informe final de tipo descriptivo sobre las actividades desarrolladas y los resultados obtenidos, desglosado para cada alimento muestreado y los agentes zoonóticos analizados en el mismo.

Cuando se detecte la presencia de un agente zoonótico, los resultados se comunicarán de forma inmediata a la Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria, acompañando el correspondiente informe de ensayo y cualquier otro dato que pueda ser de interés.

Con independencia de estas comunicaciones puntuales ante la presencia de agentes zoonóticos, a la conclusión del servicio se aportarán los datos en los formatos a facilitar por la Subdirección, junto con todos los informes de ensayo de las muestras analizadas y el informe final de actividades y resultados.

4. ACTIVIDADES Y CONDICIONES ESPECÍFICAS DE LOS SERVICIOS

4.1. Estado de situación respecto a *Salmonella* en huevos de gallina

4.1.1. Realización del muestreo y de los análisis

Se tomarán muestras de huevos frescos de gallina envasados, expuestos para la venta en los establecimientos. No se muestrearán los envases con alteraciones visibles (deteriorados, rotos, manchados, etc.). Todos los huevos que compongan una muestra serán totalmente homogéneos, debiendo pertenecer a la misma marca, categoría, tipo y lote.

El plan de muestreo será de "n = 5", donde "n" es el número de unidades que componen una muestra, es decir, cada muestra tomada de un mismo lote estará formada por 5 unidades; a su vez, cada unidad contendrá 12 huevos (ó 10 huevos para las marcas que comercializan huevos por decenas).

Las cáscaras de los 10 ó 12 huevos de cada unidad de muestra se prepararán para la detección de la presencia de *Salmonella* (aislamiento y confirmación).



De acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) nº 2073/2005^c, el aislamiento y la confirmación de los organismos del género *Salmonella* deberán efectuarse según se describe en la norma ISO 6579-2002(E). Los resultados se expresarán como “presencia/ausencia en el peso de las cáscaras procesadas (10 ó 12 huevos)”. Deberá indicarse el método utilizado.

Deberá procederse al serotipado de todas las cepas de *Salmonella* aisladas y confirmadas, empleando para ello el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Deberá indicarse el método utilizado.

Todas las cepas de *Salmonella* se someterán a pruebas de resistencia antimicrobiana; conforme a la Decisión 2013/652/UE de la Comisión Europea^d, los antibiogramas abarcarán al menos los antimicrobianos, los valores de corte epidemiológicos y la gama de concentraciones que se detallan en la siguiente tabla:

Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0,5	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>2	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0,125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0,064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	n.d.	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1 (c)	>2 (c)	0,25-8 (6)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

(c) Datos de EUCAST disponibles para *Salmonella enteritidis*, *tipimurium*, *tipi* y *paratypi*

Nd: No disponible

Se utilizarán los métodos de dilución de acuerdo con los métodos descritos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

4.1.2. Recopilación y comunicación de datos

Se recogerá la información necesaria para establecer la posible correlación entre la presencia de *Salmonella* y factores tales como el lugar de muestreo (tipo, exposición a venta, etc.), el envase (material, limpieza, etc.), la marca comercial, el origen del huevo (número de identificación del centro de embalaje del envase y código de explotación avícola de la

^c Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

^d Decisión de ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (2013/652/UE).

cáscara), grado de limpieza (heces, plumas, etc.) y de integridad (fisuras, grietas, etc.) de la cáscara, tamaño del huevo, sistema de cría de las gallinas, etc.

Los informes de ensayo incluirán el número de identificación del centro de embalaje que figure en el envase y el código de la explotación avícola impreso en la cáscara.

4.2. Estado de situación respecto a *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en carne de conejo

4.2.1. Realización del muestreo y de los análisis

Se muestreará carne de conejo refrigerada, presentada envasada para la venta o despachada a granel a petición del consumidor final. Se excluirán las carnes picadas y los preparados cárnicos.

Se tomará una única muestra por lote, cuyo peso será determinado en función de la cantidad necesaria para el análisis.

Cada muestra será sometida a análisis para detectar e identificar *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

De acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, el aislamiento y la confirmación de los organismos del género *Salmonella* deberán efectuarse según se describe en la norma ISO 6579-2002(E). Los resultados se expresarán como "presencia/ausencia en 25 gramos". Deberá indicarse el método utilizado.

Deberá procederse al serotipado de todas las cepas de *Salmonella* aisladas y confirmadas, empleando para ello el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Deberá indicarse el método utilizado.

Todas las cepas de *Salmonella* se someterán a pruebas de resistencia antimicrobiana; conforme a la Decisión de la Comisión Europea 2013/652/UE, los antibiogramas abarcarán al menos los antimicrobianos, los valores de corte epidemiológicos y la gama de concentraciones que se detallan en la siguiente tabla:

Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0,5	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>2	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0,125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0,064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	n.d.	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1 (c)	>2 (c)	0,25-8 (6)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

- (b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST
 - (c) Datos de EUCAST disponibles para *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *typhi* y *paratyphi*
- Nd: No disponible

Se utilizarán los métodos de dilución de acuerdo con los métodos descritos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

Los análisis para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina se realizarán mediante métodos recomendados por el Laboratorio Comunitario de Referencia o, en su caso, internacionalmente validados, según la Decisión 2008/55/CE^e. Se hará un enriquecimiento selectivo, y los presuntos *Staphylococcus aureus* se identificarán como tales y como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados obtenidos se expresarán como “presencia/ausencia en el peso de muestra analizado”. Los *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina positivos se someterán a un análisis de detección de estafilococo de tipo A (tipificación Spa). En su caso, el aislamiento y la identificación se efectuarán en instalaciones de nivel 3 de seguridad biológica. Deberá indicarse el método utilizado.

4.2.2. Recopilación y comunicación de datos

Se recogerá la información que permita, en su caso, establecer las relaciones respecto a las condiciones higiénico-sanitarias de las manipulaciones a que dichos productos se han sometido y la cuantificación de la carga bacteriana en función del origen de las mismas, mediante el establecimiento de asociaciones respecto al tipo de establecimiento muestreado, tipo de producto, etc.

Los informes de ensayo incluirán, en su caso, el lote y la marca de sanitaria de la carne y/o la marca de identificación del envase (sello oval para carnes producidas en la Unión Europea), la cual permite identificar a la empresa responsable de la elaboración.

4.3. Estado de situación respecto a *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC y carbapenemasas en carnes de cerdo

4.3.1. Realización del muestreo y de los análisis

Se muestreará carne de cerdo refrigerada, presentada envasada para la venta o despachada a granel a petición del consumidor final. Se excluirán las carnes picadas y los preparados cárnicos.

Se tomará una única muestra por lote, cuyo peso será determinado en función de la cantidad necesaria para el análisis.

Cada muestra será sometida a análisis para detectar e identificar *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas.

^e Decisión de la Comisión 2008/55/CE, de 20 de diciembre de 2007, relativa a una ayuda financiera de la Comunidad para un estudio de la prevalencia de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en piaras de cerdos reproductores que se llevará a cabo en los Estados miembros

De acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, el aislamiento y la confirmación de los organismos del género *Salmonella* deberán efectuarse según se describe en la norma ISO 6579-2002. Los resultados se expresarán como “presencia/ausencia en 25 gramos”. Deberá indicarse el método utilizado.

Deberá procederse al serotipado de todas las cepas de *Salmonella* aisladas y confirmadas, empleando para ello el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Deberá indicarse el método utilizado.

Todas las cepas de *Salmonella* se someterán a pruebas de resistencia antimicrobiana; conforme a la Decisión de la Comisión Europea 2013/652/UE, los antibiogramas abarcarán al menos los antimicrobianos, los valores de corte epidemiológicos y la gama de concentraciones que se detallan en la siguiente tabla:

Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0.5	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>2	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0.125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0,064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	n.d.	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1 €	>2 €	0,25-8 (6)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

(c) Datos de EUCAST disponibles para *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *typhi* y *paratyphi*

Nd: No disponible

Se utilizarán los métodos de dilución de acuerdo con los métodos descritos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

Los análisis para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina se realizarán mediante métodos recomendados por el Laboratorio Comunitario de Referencia o, en su caso, internacionalmente validados, según la Decisión 2008/55/CE. Se hará un enriquecimiento selectivo, y los presuntos *Staphylococcus aureus* se identificarán como tales y como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados obtenidos se expresarán como “presencia/ausencia en el peso de muestra analizado”. Los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina positivos se someterán a un análisis de detección de estafilococo de tipo A (tipificación Spa).

En su caso, el aislamiento y la identificación se efectuarán en instalaciones de nivel 3 de seguridad biológica. Deberá indicarse el método utilizado.

Para calcular la proporción de muestras que contienen *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC o carbapenemasas, se aplicará el método siguiente:

Comenzará con un paso de enriquecimiento previo, seguido de siembra en agar de McConkey que contenga una cefalosporina de tercera generación en la concentración selectiva indicada en la versión más reciente del protocolo detallado de normalización del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la resistencia a los antibióticos (National Food Institute, Technical University of Denmark). La especie *Escherichia coli* se identificará según lo descrito en la norma ISO 16649, parte 1 ó 2.

Se someterá a ensayo en paralelo otra placa que inhibe selectivamente el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasas AmpC para facilitar la detección específica de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado.

La detección de microorganismos productores de carbapenemasas se hará mediante un enriquecimiento selectivo previo y posterior siembra selectiva en un medio que contenga carbapenem, según lo indicado en la versión más reciente del protocolo detallado del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la resistencia a los antibióticos.

Una presunta cepa de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, de betalactamasas AmpC o de carbapenemasas obtenida de cada muestra positiva de carne se someterá a antibiograma con el siguiente grupo de antibióticos:

Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0.25	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>0,5	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0.125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0.064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	>64	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1	>2	0,25-8 (6)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

Nd: No disponible

Deberá indicarse el método utilizado, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

Posteriormente se seguirá estudiando conforme a lo indicado en el punto siguiente

Método de caracterización y clasificación adicionales de las cepas de *Escherichia coli* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación o al meropenem

Toda presunta cepa de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, de betalactamasas AmpC o de carbapenemasas identificada mediante la siembra en el medio selectivo antes descrito, así como todas las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas aleatoriamente, que en el ensayo con el primer grupo de antibióticos citados han presentado resistencia a la cefotaxima, la ceftazidima o el meropenem, serán objeto de un nuevo ensayo con un segundo grupo de antibióticos. Figuran en este grupo la cefoxitina, la cefepima y el test de sinergia de clavulanato con cefotaxima y con ceftazidima para detectar la producción de betalactamasas de espectro ampliado y de betalactamasas AmpC. Además, el segundo grupo también contiene imipenem, meropenem y ertapenem para la verificación fenotípica de presuntas productoras de carbapenemasas, según se resume en la siguiente tabla:

Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Cefoxitina	>8	n.d.	0,5-64 (8)
Cefepima	>0,125	>4	0,06-32 (10)
Cefotaxima+ácido clavulánico*	n.d. **	n.d.**	0,06-64 (11)
Ceftazidima+ácido clavulánico	n.d. **	n.d.**	0,125-128 (11)
Meropenem	>0,125	>8	0,03-16 (10)
Temocilina	n.d. **	n.d.**	0,5-64 (8)
Imipenem	>0,5	>8	0,12-16 (8)
Ertapenem	>0,06	>1	0,015-2 (8)
Cefotaxima	>0,25	>2	0,25-64 (9)
Ceftazidima	>0,5	>4	0,25-128 (10)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

Nd: No disponible

* 4 mg/L de ácido clavulánico

** Los valores se compararán con los valores de cefotaxima y ceftazidima y se interpretarán con arreglo a las directrices de CLSI o EUCAST relativas al test de sinergia

En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

El método analítico de referencia para la detección de *Yersinia enterocolitica* es la norma ISO 10273, acorde con las especificaciones técnicas de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009)^f. Los resultados obtenidos se expresarán como "presencia/ausencia en el peso de muestra analizado. En las cepas aisladas y confirmadas, se identificará la especie (p.e. *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*), así como los principales

^f European Food Safety Authority; Technical specifications for harmonised national surveys of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs on request of EFSA. EFSA Journal 2009; 7(11):1374. [23 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1374. Disponible en Internet : www.efsa.europa.eu

serotipos (O:3, O:9, O:5,27) y/o los biotipos (1B, 2, 3, 4, 5) patógenos de *Yersinia enterocolitica*. Deberá indicarse el método utilizado.

4.3.2. Recopilación y comunicación de datos

Se recogerá la información que permita, en su caso, establecer las relaciones respecto a las condiciones higiénico-sanitarias de las manipulaciones a que dichos productos se han sometido y la cuantificación de la carga bacteriana en función del origen de las mismas, mediante el establecimiento de las asociaciones respecto al tipo de establecimiento muestreado, tipo de producto, etc.

Los informes de ensayo incluirán, en su caso, el lote y la marca de sanitaria de la carne y/o la marca de identificación del envase (sello oval para carnes producidas en la Unión Europea), la cual permite identificar a la empresa responsable de la elaboración.

4.4. Estado de situación respecto a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas en carnes de pollo

4.4.1. Realización del muestreo y de los análisis

Se muestreará carne de pollo refrigerada, presentada envasada para la venta o despachada a granel a petición del consumidor final. El objetivo es analizar piel y un fino corte de músculo superficial según lo indicado en el capítulo 3 del anexo I del Reglamento 2073/2005. Para ello se tomarán canales enteras, medias canales o cuartos de canal delanteros con piel. Si el pollo está troceado, se podrán tomar cuellos o pechugas enteras con piel.

No se tomarán muslos, contramuslos, alitas, pechugas enteras sin piel ni filetes de pollo. Se excluirán las carnes picadas y los preparados cárnicos.

Se tomará una única muestra por lote, cuyo peso será determinado en función de la cantidad necesaria para el análisis.

Cada muestra será sometida a análisis para detectar e identificar *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Escherichia coli* productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas.

De acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, el aislamiento y la confirmación de los organismos del género *Salmonella* deberán efectuarse según se describe en la norma ISO 6579-2002€. Los resultados se expresarán como "presencia/ausencia en 25 gramos". Deberá indicarse el método utilizado.

Deberá procederse al serotipado de todas las cepas de *Salmonella* aisladas y confirmadas, empleando para ello el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2073/2005. Deberá indicarse el método utilizado.

Todas las cepas de *Salmonella* se someterán a pruebas de resistencia antimicrobiana; conforme a la Decisión de la Comisión Europea 2013/652/UE, los antibiogramas abarcarán al menos los antimicrobianos, los valores de corte epidemiológicos y la gama de concentraciones que se detallan en la siguiente tabla:



Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0.5	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>2	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0.125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0,064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	n.d.	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1 €	>2 €	0,25-8 (6)

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

(c) Datos de EUCAST disponibles para *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *typhi* y *paratyphi*

Nd: No disponible

Se utilizarán los métodos de dilución de acuerdo con los métodos descritos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

La cuantificación de los organismos del género *Campylobacter* deberá efectuarse según se describe en la norma ISO/TS 10272-2. Los resultados se expresarán en ufc/g, utilizando en paralelo técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

Deberá procederse a la especiación de todas las cepas de *Campylobacter* aisladas y confirmadas, empleando para ello métodos fenotípicos como los descritos en la norma ISO 10272-1:2006 o métodos moleculares publicados, como son las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Deberá indicarse el método utilizado.

Todas las cepas de *Campylobacter* se someterán a pruebas de resistencia antimicrobiana. Conforme a la Decisión 2013/652/UE, los antibiogramas abarcarán al menos los antimicrobianos, los valores de corte epidemiológicos y la gama de concentraciones que se detallan en la siguiente tabla:



Antibiótico	Especie	Umbral interpretativo de resistencia antimicrobiana (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis, el número de pocillos)
		Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Eritromicina	<i>C. jejuni</i>	>4	>4	1-128 (8)
	<i>C. coli</i>	>8	>8	
Ciprofloxacino	<i>C. jejuni</i>	>0,5	>0,5	0,12-16 (8)
	<i>C. coli</i>	>0,5	>0,5	
Tetraciclina	<i>C. jejuni</i>	>1	>2	0,5-64 (8)
	<i>C. coli</i>	>2	>2	
Gentamicina	<i>C. jejuni</i>	>2	nd	0,12-16 (8)
	<i>C. coli</i>	>2	nd	
Ac nalidíxico	<i>C. jejuni</i>	>16	nd	1-64 (7)
	<i>C. coli</i>	>16	nd	
Estreptomina (c)	<i>C. jejuni</i>	>4	nd	0,25-16 (7)
	<i>C. coli</i>	>4	nd	

(a) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

(c) Opcional

Se utilizarán los métodos de dilución de acuerdo con los métodos descritos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) y el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

Para calcular la proporción de muestras que contienen *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC o carbapenemasas, se aplicará el método siguiente:

Comenzará con un paso de enriquecimiento previo, seguido de siembra en agar de McConkey que contenga una cefalosporina de tercera generación en la concentración selectiva indicada en la versión más reciente del protocolo detallado de normalización del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la resistencia a los antibióticos (National Food Institute, Technical University of Denmark). La especie *Escherichia coli* se identificará según lo descrito en la norma ISO 16649, parte 1 ó 2.

Se someterá a ensayo en paralelo otra placa que inhibe selectivamente el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasas AmpC para facilitar la detección específica de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado.

La detección de microorganismos productores de carbapenemasas se hará mediante un enriquecimiento selectivo previo y posterior siembra selectiva en un medio que contenga carbapenem, según lo indicado en la versión más reciente del protocolo detallado del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la resistencia a los antibióticos.

Deberá indicarse el método utilizado, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.

Una presunta cepa de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, de betalactamasas AmpC o de carbapenemasas obtenida de cada muestra positiva de carne se someterá a antibiograma con el siguiente grupo de antibióticos:



Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Ampicilina	>8	>8	1-64 (7)
Cefotaxima	>0.25	>2	0,25-4 (5)
Ceftazidima	>0,5	>4	0,5-8 (5)
Meropenem	>0.125	>8	0,03-16 (10)
Ácido nalidíxico	>16	n.d.	4-128 (6)
Ciprofloxacino	>0.064	>1	0,015-8 (10)
Tetraciclina	>8	n.d.	2-64 (6)
Colistina	>2	>2	1-16 (5)
Gentamicina	>2	>4	0,5-32 (7)
Trimetoprima	>2	>4	0,25-32 (8)
Sulfametoxazol	>64	n.d.	8-1 024 (8)
Cloranfenicol	>16	>8	8-128 (5)
Azitromicina	n.d.	n.d.	2-64 (6)
Tigeciclina	>1	>2	0,25-8 (6)

(c) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(d) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

Nd: No disponible

Posteriormente se seguirá estudiando conforme a lo indicado en el punto siguiente:

Método de caracterización y clasificación adicionales de las cepas de Escherichia coli resistentes a las cefalosporinas de tercera generación o al meropenem

Toda presunta cepa de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado, de betalactamasas AmpC o de carbapenemasas identificada mediante la siembra en el medio selectivo antes descrito, así como todas las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas aleatoriamente, que en el ensayo con el primer grupo de antibióticos citados han presentado resistencia a la cefotaxima, la ceftazidima o el meropenem, serán objeto de un nuevo ensayo con un segundo grupo de antibióticos. Figuran en este grupo la cefoxitina, la cefepima y el test de sinergia de clavulanato con cefotaxima y con ceftazidima para detectar la producción de betalactamasas de espectro ampliado y de betalactamasas AmpC. Además, el segundo grupo también contiene imipenem, meropenem y ertapenem para la verificación fenotípica de presuntas productoras de carbapenemasas.

En cualquier caso, se describirán los métodos empleados, los antibióticos probados, las gamas de concentraciones y los valores límites utilizados, los cuales se ajustarán en su caso, a la última revisión disponible y se acompañarán siempre de la referencia consultada.



Antibiótico	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)		Intervalos de concentración (mg/L) (entre paréntesis el nº de pocillos)
	Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)	
Cefoxitina	>8	n.d.	0,5-64 (8)
Cefepima	>0,125	>4	0,06-32 (10)
Cefotaxima+ácido clavulánico*	n.d. **	n.d.**	0,06-64 (11)
Ceftazidima+ácido clavulánico	n.d. **	n.d.**	0,125-128 (11)
Meropenem	>0,125	>8	0,03-16 (10)
Temocilina	n.d. **	n.d.**	0,5-64 (8)
Imipenem	>0,5	>8	0,12-16 (8)
Ertapenem	>0,06	>1	0,015-2 (8)
Cefotaxima	>0,25	>2	0,25-64 (9)
Ceftazidima	>0,5	>4	0,25-128 (10)

(c) Valores de corte epidemiológico de EUCAST

(d) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST

Nd: No disponible

* 4 mg/L de ácido clavulánico

** Los valores se compararán con los valores de cefotaxima y ceftazidima y se interpretarán con arreglo a las directrices de CLSI o EUCAST relativas al test de sinergia

4.4.2. Recopilación y comunicación de datos

Se recogerá la información que permita, en su caso, establecer las relaciones respecto a las condiciones higiénico-sanitarias de las manipulaciones a que dichos productos se han sometido y la cuantificación de la carga bacteriana en función del origen de las mismas, mediante el establecimiento de las asociaciones respecto al tipo de establecimiento muestreado, tipo de producto, etc.

Los informes de ensayo incluirán, en su caso, el lote y la marca de sanitaria de la carne y/o la marca de identificación del envase (sello oval para carnes producidas en la Unión Europea), la cual permite identificar a la empresa responsable de la elaboración.

4.5. Disponibilidad de instalaciones de alta seguridad biológica

La empresa u organismo licitante proporcionará el correspondiente soporte técnico y científico mediante la disponibilidad permanente para la Consejería de Sanidad de las instalaciones especiales de nivel 3 de seguridad biológica, en aquellos casos en los que el tipo de agente zoonótico o las condiciones de su análisis así lo exijan, o se estime conveniente por la dirección de los trabajos.

5. APORTACIÓN DE RECURSOS

La empresa u organismo adjudicatario correrá a cargo de todos los gastos necesarios correspondientes para la planificación del muestreo, toma de muestras (kilometraje, dietas, adquisición de muestra, material para toma de muestra, para transporte y conservación de



muestras, etc.), pruebas analíticas, destrucción de muestras y cepas, recopilación de datos, emisión de resultados y elaboración de informes.

Dispondrá de recursos humanos suficientes, con la cualificación y la experiencia adecuadas, y de los equipos y la infraestructura necesarios para poder llevar a cabo las actividades con las suficientes garantías de calidad y en el tiempo necesario para que las mismas cumplan el objeto perseguido.

En el caso de los recursos humanos, el personal dependerá exclusivamente del adjudicatario, por cuanto éste tendrá todos los derechos y deberes inherentes a su calidad de patrono y deberá cumplir las obligaciones vigentes en materia laboral, de Seguridad Social, de Seguridad e Higiene en el Trabajo, así como tributarias referidas al propio personal a su cargo. Así mismo, se compromete a la sustitución de los citados trabajadores por otros cualificados en caso de baja por IT, permisos, etc.

6. REMISIÓN DE INFORMACIÓN

La empresa u organismo adjudicatario remitirá a la Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Dirección General de Salud Pública la información derivada de cuantas actividades se realicen, con una periodicidad trimestral y siempre que ésta lo solicite.

7. DIRECCIÓN DE LOS TRABAJOS

Corresponde al titular de la Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria.

Madrid, 3 de abril de 2017
LA SUBDIRECTORA GENERAL DE
HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Fdo.: Emma Sánchez Pérez

CUADRO RESUMEN ORIENTATIVO DEL NÚMERO DE MUESTRAS Y DE PRUEBAS ANALÍTICAS POR TIPO DE AGENTE ZONÓTICO OBJETO DE ANÁLISIS

	Número de muestras *	Número de pruebas analíticas
Salmonella en cáscara de huevos de gallina		
Muestreo en minorista de huevos	140	700
Aislamiento de Salmonella en cáscara de huevos	140	700
Identificación de Salmonella en cáscara de huevos	29	29
Serotipificación de Salmonella en huevos	29	29
Antibiograma de Salmonella en huevos	29	29
Salmonella y Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de conejo		
Muestreo en minorista de carne conejo	75	75
Preparación de la muestra de carne de conejo	75	75
Aislamiento de Salmonella en carne de conejo	75	75
Identificación de Salmonella en carne de conejo	3	3
Serotipificación de Salmonella en carne de conejo	3	3
Antibiograma de Salmonella en carne de conejo	3	3
Aislamiento de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de conejo	75	75
Identificación de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de conejo	6	6
Caracterización de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina spa en carne de conejo	6	6
Antibiograma Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de conejo	6	6
Salmonella, Yersinia, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina y Escherichia coli productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y, betalactamasas AmpC y carbapenemasas en carnes de cerdo		
Muestreo en minorista de carne cerdo	60	60
Preparación de la muestra de carne de cerdo	60	60
Aislamiento Salmonella en carne de cerdo	60	60
Identificación de Salmonella en carne de cerdo	3	3
Serotipificación de Salmonella en carne de cerdo	3	3
Antibiograma de Salmonella en carne de cerdo	3	3
Aislamiento Escherichia coli productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC en carne de cerdo (EURL-AR)	60	60
Aislamiento carbapenemasas en carne de cerdo (EURL-AR)	60	60
Confirmación Escherichia coli productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC (reacción en cadena de la polimerasa) en carne de cerdo	5	5
Confirmación Escherichia coli productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC (panel 1 y 2) en carne de cerdo	5	5
Confirmación carbapenemasas (reacción en cadena de la polimerasa) en carne de cerdo	2	2
Confirmación carbapenemasas (panel 1 y 2) en carne de cerdo	2	2
Aislamiento de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de cerdo	60	60
Identificación de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de cerdo	3	3
Caracterización de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina SPA en carne de cerdo	3	3
Antibiograma Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en carne de cerdo	3	3
Aislamiento de Yersinia en carne de cerdo	60	60



Identificación <i>Yersinia</i> en carne de cerdo	5	5
Biotipo <i>Yersinia</i> en carne de cerdo	5	5
Serotipo <i>Yersinia</i> en carne de cerdo	5	5
<i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Escherichia coli</i> productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas en carnes de pollo		
Muestreo en minorista de carne de pollo	75	75
Preparación de la muestra de carne de pollo	75	75
Aislamiento <i>Salmonella</i> en carne de pollo	75	75
Identificación de <i>Salmonella</i> en carne de pollo	2	2
Serotipificación de <i>Salmonella</i> en carne de pollo	2	2
Antibiograma <i>Salmonella</i> en carne de pollo	2	2
Cuantificación <i>Campylobacter. coli/Campylobacter jejuni</i> por reacción en cadena de la polimerasa en carne de pollo	75	75
Recuento medio cromogénico en carne de pollo	75	75
Identificación <i>Campylobacter</i> carne de pollo recuento	75	75
Aislamiento de <i>Campylobacter</i> Bolton-CCDA en carne de pollo	75	75
Identificación <i>Campylobacter</i> Bolton-CCDA en carne de pollo	15	15
Antibiograma <i>Campylobacter</i> en carne de pollo	15	15
Aislamiento <i>Escherichia coli</i> productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC en carne de pollo (EURL-AR)	75	75
Aislamiento carbapenemasas en carne de pollo (EURL-AR)	75	75
Confirmación <i>Escherichia coli</i> productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC (reacción en cadena de la polimerasa) en carne de pollo	57	57
Confirmación <i>Escherichia coli</i> productor de enzimas betalactamasas de espectro ampliado y betalactamasas AmpC (panel 1 y 2) en carne de pollo	57	57
Confirmación carbapenemasas (reacción en cadena de la polimerasa) en carne de pollo	2	2
Confirmación carbapenemasas (Panel 1 y 2) en carne de pollo	2	2

* El número de muestras con presencia del agente zoonótico que requieren la realización de pruebas analíticas complementarias, se ha estimado en base a la prevalencia y a la experiencia adquirida, teniendo en cuenta que, en caso de que se obtengan resultados diferentes, el prestador del servicio procederá al correspondiente ajuste sin coste añadido.