

# La importància de les anàlisis i la interpretació dels resultats en el control dels microorganismes patògens en els aliments. El cas de *Listeria monocytogenes*

## *The importance of the analysis and interpretation of results in the control of pathogenic microorganisms in foods. The case of *Listeria monocytogenes**

### ALEJANDRA MORENO-TORRES MOLINA

Treball de fi de grau (TFG) en veterinària. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Campus Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra (Barcelona).



### CAROLINA RIPOLLES-AVILA

Professora associada de l'Àrea de Nutrició i Bromatologia. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Campus UAB, Bellaterra (Barcelona).



### JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ

Catedràtic de l'Àrea de Nutrició i Bromatologia. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Campus UAB, Bellaterra (Barcelona).



**RESUM:** Aquest article se centra en el problema freqüent de l'anàlisi i la interpretació de resultats per a la detecció de patògens en les indústries alimentàries, posant com a exemple *Listeria monocytogenes*, com un model que pot ser extrapolat a altres microorganismes. Amb aquest objectiu s'explica la situació actual amb relació a la seguretat alimentària, tot centrant-se en la contaminació de les superfícies, un problema de primer ordre, especialment després d'avaluar el brot ocorregut a Sevilla l'estiu de 2019, relacionat amb *L. monocytogenes*, com a exemple d'altres casos que es poden estar donant avui en dia al nostre país. Per abordar el problema de l'anàlisi i la interpretació dels resultats analítics a les empreses alimentàries, el mostreig es considera la base de la interpretació, i es diferencia entre mesures quantitatives i qualitatives. En tot moment es pretén donar un estudi estadístic senzill, aportant exemples que permetin ajudar en la presa de decisions d'una empresa alimentària preocupada per la seguretat dels productes que elabora i que vulgui obtenir un bon rendiment dels costos analítics. Es tracten conceptes com *mostreig* i *estadística descriptiva*, la dife-

**ABSTRACT:** *This paper focuses on the frequent problem of analysis and interpretation of results in the detection of pathogens in the food industries, using the case of *Listeria monocytogenes* as a model that can be extrapolated to other microorganisms. To this end, we deal with the current situation of food safety, discussing surface contamination, which represents a first-rate problem in the food industry. Specifically, the outbreak of infection in Seville in the summer of 2019, caused by *L. monocytogenes* contamination, may be taken as an example of similar situations that may be happening in our country today. Sampling is considered the basis of interpretation, differentiating between quantitative and qualitative measures. At all times it is sought to establish a simple statistical approach, providing examples that may contribute to the understanding of the situation. This is of help in the decision-making process of any food-processing company which is concerned about the safety of its products, and which seeks to obtain a good yield from its analytical costs. We cover concepts such as sampling, descriptive statistics, the*

rència de concepte entre *mesures independents* i *mesures repetides*, així com la importància de l'objectiu de seguretat alimentària (FSO, de l'anglès *food safety objective*) i la interpretació de la freqüència en què es presenta un patògen, en funció de la mida de la mostra i l'històric de resultats. Amb aquesta informació és d'esperar que es pugui ajudar la indústria i que es faciliti la presa de decisions.

**PARAULES CLAU:** *Listeria monocytogenes*, control de microorganismes, interpretació de resultats, estadística descriptiva, patògens, seguretat alimentària.

*difference in concept between isolated and repeated measures, as well as the importance of the food safety objective (FSO) and the interpretation of the frequency of occurrence of a pathogen, depending on the sample size and the record of results. With this information, it is hoped that industry may be assisted and that the decision-making process may be facilitated.*

**KEYWORDS:** *Listeria monocytogenes, microorganism control, interpretation of results, descriptive statistics, pathogens, food safety.*

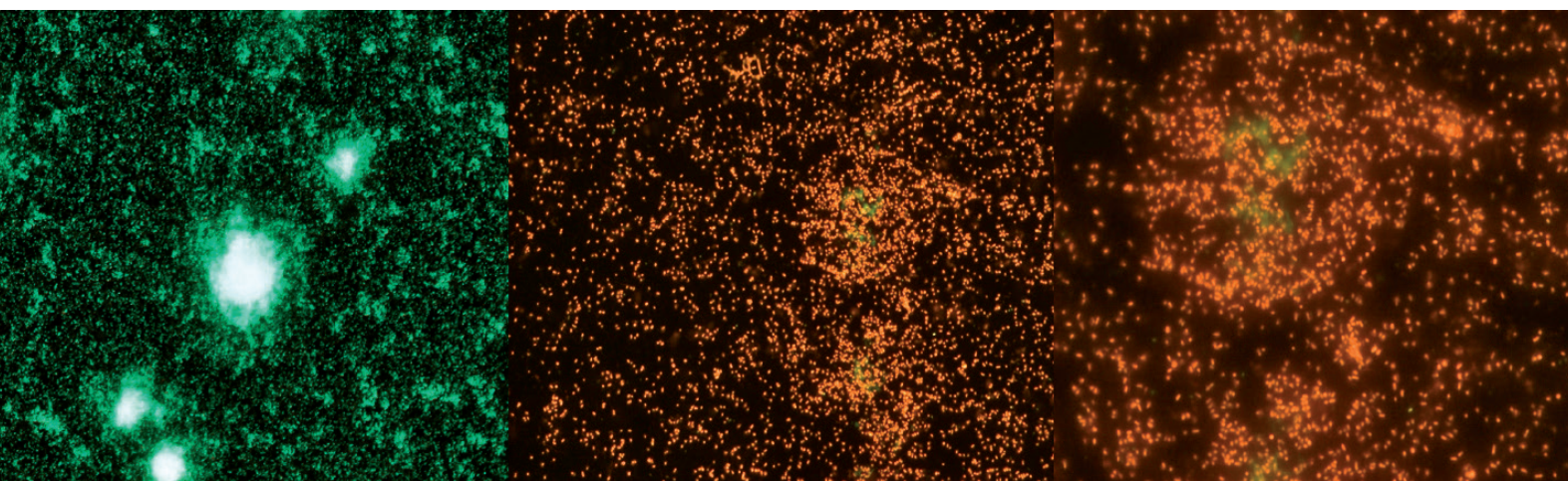


Figura 1. Evolució d'un biofilm de *Listeria monocytogenes* amb una neteja insuficient.

## INTRODUCCIÓ

S'estima que la població mundial s'acostarà als deu mil milions de persones l'any 2050, el que indubtablement suposarà un augment significatiu en la demanda d'aliments (United Nations, 2017). La capacitat per satisfer aquesta demanda implicarà, sens dubte, un increment en la producció d'aliments, amb els problemes que això suposa. Entre els reptes que es plantegen clarament el primer és la quantitat d'aliments que es necessitaran, però, a més, hauran de ser de fàcil accés, nutritius i segurs. Qualsevol error en el sistema suposarà que amplis grups de població passin gana o pateixin malalties per mancances o per contaminació i no és fins que s'han cobert les necessitats alimentàries bàsiques que els consumidors es preocupen de la seguretat i la qualitat dels aliments. Per això, els sectors alimentaris públics i privats han hagut de desenvolupar una gran varietat d'estàndards de seguretat i qualitat (Kotsanopoulos i Arvanitoyannis, 2017; Trienekens i Zuurbier, 2008).

La seguretat alimentària és un dels més grans desafiaments a què s'enfronta la comercialització d'aliments a causa, en gran manera, del risc de transmissió de malalties d'origen alimentari. Aquest és un dels problemes de salut que generen més alarma en els països desenvolupats i un dels motius de pèrdues econòmiques en les empreses alimentàries (González-Rivas *et al.*, 2018). De fet, si no hi ha un sistema de vigilància adequat per al seu control, les malalties causades pel consum d'aliments poden suposar un elevat nombre de consumidors afectats (Todd *et al.*, 2007).

Davant de tot això, la vigilància es duu a terme sobre la base de l'avaluació de risc que realitzen les diferents administracions públiques. El resultat evident és la publicació de la legislació, d'aplicació a cada país, que normalment és diferent en funció dels criteris que s'estableixen. El primer inconvenient, per a qualsevol empresa que vulgui vendre els seus productes a diferents països, és que la legislació és variable i requereix dedicar temps a

entendre quin objectiu cal assolir, segons un criteri diferent i fins i tot canviant.

No obstant això, en molts casos es donen errors importants d'interpretació, de saber si un lot és acceptable o no, ja que no s'acaba d'entendre que l'objectiu no pot ser només complir la llei, sinó fer una anàlisi científica del problema, que porti a poder concloure si un lot concret és segur o no (NMKL, 2014). En aquest article ens proposem donar una mica de llum a aquest problema i per fer-ho prenem com a exemple *L. monocytogenes*, encara que l'estudi podria ser aplicat de manera similar a qualsevol patògen.

## SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA

Els sistemes nacionals, els mètodes de diagnòstic i les notificacions oficials varien considerablement entre països. Als països desenvolupats el percentatge de casos registrats per les autoritats de salut és molt petit, en comparació amb el nombre real de casos entre la població, el que indica que la incidència real de malalties transmeses pels aliments és més gran que la declarada (Arendt *et al.*, 2013). Això ens fa veure que, en realitat, es declaren els casos de certa gravetat i queden ocults aquells que no suposen acudir a un centre sanitari públic.

L'informe de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA, de l'anglès European Food Safety Authority) i el Centre Europeu per a la Prevenció i el Control de Malalties (ECDC, de l'anglès European Center for Disease Prevention and Control) indicava que, l'any 2018, d'un total de 359.692 casos de malalties transmeses per aliments a la Unió Europea (UE), 41.203 persones van ser hospitalitzades i 572 van morir (EFSA-ECDC, 2019). Per tant, hi ha aproximadament un cas de malalties transmeses per aliments per any per cada 1.390 habitants. En aquests casos, una de cada 12.135 persones és hospitalitzada i una de cada milió mor. Segons aquest informe, els agents biològics que participen principalment en les malalties transmeses pels aliments són *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga (STEC, de l'anglès *Shiga-toxin producing Escherichia coli*) i *Yersinia enterocolitica*. Aquests microorganismes representen, respectivament, el 68,55 %, el 25,54 %, el 2,27 % i l'1,86 % del total de casos descrits. Segons aquesta publicació, *L. monocytogenes* és l'únic patògen transmès per aliments amb casos creixents en els últims sis anys, amb una taxa de mortalitat de fins al 15,6 % (EFSA-ECDC, 2019). Per tant, els controls que s'han establert a Europa durant el segle XXI han permès una reducció significativa de les malalties de transmissió alimentària, excepte per a *L. monocytogenes*,

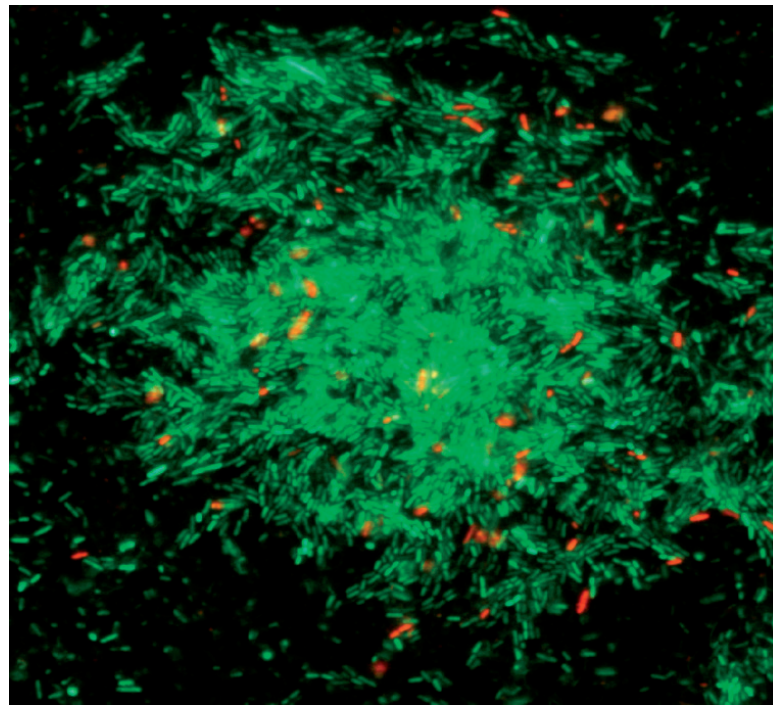


Figura 2. Biofilm de *Listeria monocytogenes*.

fruit del consum d'aliments contaminats en origen o per males manipulacions (Boelaert *et al.*, 2016).

Els productes alimentaris es poden contaminar fàcilment a través de superfícies no higièniques, per un mal maneig o per un processament inadequat dels aliments (Barjaktarović-Labović *et al.*, 2018). Aquests productes es poden comercialitzar posteriorment si no se sotmeten a un control adequat, el que podria conduir a un brot de toxi-infecció alimentària. Segons el sistema d'alerta ràpida per a aliments i pinsos (RASFF, de l'anglès *rapid alert system for food and feed*), en comparar les notificacions rebudes el 2017 amb les xifres de l'any anterior, el nombre de notificacions originals (nous perills, incloses alertes, notificacions informatives i rebutjos de fronteres) va augmentar un 22 %; el de notificacions de seguiment, un 24 %, i el d'alertes, un 11 % (EC, 2018). Aquestes dades són particularment preocupants, atès que el sistema de control aplicat en la indústria alimentària actua com a sistema de prevenció, evita la contaminació del producte i en detecta els errors. En l'actualitat, la indústria fa un estudi lineal, és a dir, mostra a mostra i lot a lot, i considera sempre que es tracta de mesures independents, el que no li permet relacionar tot el que passa durant la producció. De fet, no s'entén el mostreig, ni la interpretació global dels resultats analítics. Si a això hi sumem que les empreses petites realitzen una presa de mostra puntual, amb un escàs nombre de mostres, podem entendre que aquestes anàlisis acaben tenint una importància escassa.

## IMPORTÀNCIA DE L'APPCC

La implementació del sistema d'anàlisi de perills i punts de control crítics (APPCC) és un requisit legal sumament important dirigit a la prevenció de brots transmesos per aliments (Chaves *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2019). Aquest és un sistema de prevenció basat en l'anàlisi dels punts en què pot aparèixer un patogen, la identificació del perquè i la implantació de mesures preventives que impedeixin la contaminació del producte (FAO, 1997). No obstant això, no considera la possible contaminació a partir de proveïdors, aigua, etc. Per això, es fa essencial que prèviament es dissenyin i revisin correctament els prerequisits del sistema. Com que és un sistema de prevenció, part de la seva eficàcia es basa en l'obtenció de resultats analítics, i ja que es tracta d'elaboracions elevades de productes, amb diverses tecnologies aplicades, és essencial tenir plans de mostreig sòlids i mètodes adequats per detectar patògens (Zwietering, Ross i Gorris, 2014). Gràcies a la legislació comunitària, des de l'any 2005 es recomanen les normes ISO com a mètodes de referència a la UE (Reglament 2073/2005). En aquest Reglament es considera que cal prendre cinc mostres per acceptar o rebutjar un lot, i es dona per fet que les empreses i els inspectors aplicaran una anàlisi estadística a aquest límit. Més lluny de la realitat, les anàlisis són molt variables i les interpretacions més imaginàries que reals en alguns casos.

El sistema que s'ha mostrat més eficaç ha sigut l'aplicació de l'APPCC, sobretot per la certitud que ens aporten les evidències epidemiològiques ja descrites. En els orígens de la implantació del sistema, quan els nivells de contaminació dels aliments produïts a una empresa són elevats, la seva introducció és relativament senzilla, ja que l'anàlisi d'un nombre relativament baix de mostres pot donar una idea dels nivells de contaminació reals d'una planta. Però això no és així quan, després de la implantació d'unes correctes mesures d'higiene, s'aconsegueix una reducció significativa de la presència dels patògens. En aquests casos, l'enfocament tradicional del sistema no funciona de la mateixa manera.

Només cal, com a exemple, la idea generalitzada que la relació entre la presència i la detecció d'un microorganisme en una mostra es manté en una proporció constant o en una equivalència 1:1. Què vol dir això? Que si tenim un lot en què de cinc mostres es detecta una presència d'un patogen, en repetir l'anàlisi d'unes altres cinc mostres, s'ha de trobar obligatòriament una mostra positiva. O més encara, que en repetir l'anàlisi de la mostra positiva, hi ha d'haver la presència del patogen o si no s'interpreta com un error de laboratori. La realitat és que

la interpretació no és del tot correcta. De fet, això no és així en tots els casos i depèn de la freqüència de presentació del microorganisme analitzat en el producte acabat. En aquest cas, els conceptes clàssics d'interpretació del sistema APPCC no funcionen i requereixen entendre quina és la situació real i com afrontar els reptes que tindrem en seguretat alimentària, considerant un entorn amb una baixa o molt baixa presència de patògens en els aliments.

Curiosament, aquest fet està recollit en la legislació vigent. Així, el Reglament 2073/2005 sobre criteris microbiològics en productes alimentaris ja recollia que perquè un lot fos acceptat per a consum humà havia de complir els criteris assenyalats en la norma després d'anàlitzar cinc mostres, no havent detectat, per exemple, cap presència. Aquest mateix fet s'ha anat recollint en la resta de les normes relacionades, com el Reglament (UE) 365/2010 o el Reial decret 135/2010, que modifiquen aquests criteris. En cap cas es recull la possibilitat d'aconseguir la completa absència de patògens en els aliments, ja que no és possible tècnicament, perquè no existeix el risc zero. Una altra qüestió és poder arribar a assolir un risc tècnic proper a zero. Això només s'aconseguirà quan la presència d'un patogen sigui tan reduïda que no en sigui possible la detecció amb les tècniques actuals.

Per a això, és important entendre la importància del mostreig i la seva integració en el sistema APPCC, i recollir els resultats històrics de les anàlisis de laboratori amb la finalitat de crear alertes que ens permetin actuar quan estiguem davant d'una situació crítica i no quan no sigui necessari.

## MOSTREIG

### Tipus

Sovint, a l'hora de realitzar el mostreig, hi ha molts errors que condueixen a males decisions administratives. Entre els errors més comuns hi ha el de fer servir un nombre de mostres menor al que es requereix, que no siguin representatives (no aleatòries, per exemple), un mal etiquetatge o un emmagatzematge inadequat o no d'acord amb la legislació (NMKL, 2014). De fet, cada classe d'aliment és diferent, no sempre és homogeni i el tipus d'anàlisi pot ser també diferent, per tant, el pla de mostreig ha d'adaptar-se a les necessitats que tinguem.

Hi ha dos grans tipus diferents de plans de mostreig: per atributs i per variables. Per als exàmens microbiològics tradicionalment s'han utilitzat els plans per atributs de dues o tres classes; en canvi, per als exàmens físics i químics s'utilitzen tots dos, per atributs i per variables. No obstant això, els sistemes de mostreig s'hauran de modificar quan els nivells acceptables pugin ser quantificats, com és el cas de *L. monocytogenes* o, més recentment, el de *Campylobacter* spp.

- **Pla de mostreig per atributs:** són aplicables per a determinacions qualitatives (en el cas de patògens amb la possibilitat d'absència/presència). Les unitats es classifiquen segons les característiques de seguretat del producte.
- **Pla de mostreig per variables:** es mesuren les concentracions dels paràmetres d'interès, així podem saber si està dins de certs límits.

Com podem saber si triar un pla per atributs o per variables? Inicialment, els plans per atributs són més fàcils de dur a terme, ja que la presa de decisions és aparentment més senzilla. Si hi ha presència d'un patògen, el producte és rebutjat; si no se'n detecta presència, el lot és acceptat. Inicialment, per tant, sembla molt senzill a l'inici i en un entorn amb una elevada càrrega de patògens. Això canvia, com veurem més endavant, en un entorn aparentment controlat.

En el pla de mostreig per variables es poden utilitzar mostres de mida petita i treballar en funció del càlcul de la mitjana i la desviació típica, la qual cosa ajuda a la presa de decisions. El problema actual és que, freqüentment, l'anàlisi estadística no és utilitzada, la qual cosa implica una presa de decisions que en alguns casos pot ser inadequada.

Com a conseqüència del pla de mostreig, es defineixen les classes de mostreig: dues o tres classes.

Als plans de mostreig de dues classes, les mostres es divideixen en dues categories: *acceptable* i *no acceptable*. Tenim les quantitats següents:  $n$  (nombre de mostres),  $c$  (nombre de mostres defectuoses possibles que sol ser 0) i  $m$  (valor límit que no han de superar les mostres). Si un paràmetre suposa risc per al consumidor, el pla de mostreig serà molt més rigorós; normalment, el rigor regeix el nombre de mostres. Aquest és el sistema elegit per la legislació europea. Per exemple, si una determinació està adreçada a la població general, normalment el nom-

bre de mostres és cinc. Però si la població pot tenir un risc més gran (per exemple, nadons) el nombre de mostres s'incrementa a deu o trenta. D'aquesta manera, s'entén que si exigim un mostreig més elevat, el producte és més segur.

Els plans de mostreig de tres classes són diferents. En aquest cas tenim tres categories: *acceptable*, *dubtós* i *no acceptable*. En aquesta classe tenim un límit inferior ( $m$ ) i un límit superior ( $M$ ) i és aplicat als perills quantificables.

## El cas de *Listeria monocytogenes*

Si ens centrem en el cas de *L. monocytogenes*, la normativa europea és clara en la diferenciació entre aquells casos en què el patògen no pot créixer en els aliments, respecte a aquells en els quals el patògen sí que hi pot créixer. En el primer supòsit es demana l'absència del patògen en cinc mostres en el moment d'elaborar un aliment (pla de mostreig per atributs amb dos classes). No obstant això, s'accepta la presència de menys de 100 UFC/g en acabar la vida comercial (pla de mostreig per variables amb tres classes).

Si ens aturem a pensar aquest criteri, hem d'entendre com això és possible. Segons els criteris clàssics, si hi ha absència, el microorganisme no pot estar present, per aquella idea comentada de la relació 1:1 entre els diferents lots de mostra. Si això fos així, com pot haver presència d'un patògen en un lot on hem detectat absència? Perquè podem tenir absència en cinc mostres però presència en 1 de 10, o 1 de 100, o 1 de 1.000. Només que en un lot de 20.000 kg de producte hi hagués una sola cèl·lula de *L. monocytogenes*, aquesta es podria multiplicar fins a milers de milions d'individus idèntics si es produeixen les condicions adequades, com pot ser el trencament de la cadena de fred. Per tant, és possible, les autoritats sanitàries europees el van identificar, havent mantingut totes aquelles condicions que limiten el creixement del patògen. Ara bé, tot i això, van considerar un nivell de risc acceptable que en cinc mostres d'un lot cap tingués presència, però no hi ha opinió sobre si la presència fora de 1 en 100 mostres. En aquest cas el lot seria acceptable.

Si ens fixem en el que passa en aquells productes en què *L. monocytogenes* no pot créixer, el límit legal s'ajusta a 100 UFC/g en cinc mostres des del principi a la fi de la vida comercial. En conseqüència, el risc no està lligat només a la presència, sinó a un nombre concret de microorganismes. En aquest punt és on hem de reprendre els nostres conceptes d'estadística bàsica, ja que el con-

cepte real és la freqüència estadística. En aquests casos, el problema rau en el fet que només som capaços d'obtenir resultats d'una part de la població que analitzem, i no els obtenim sempre amb la mateixa proporció, sinó amb una freqüència determinada que, normalment, no coneixem perquè no la busquem.

## INTERPRETACIÓ DEL PLA DE MOSTREIG PER VARIABLES AMB TRES CLASSES PER A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

La interpretació per aquest tipus de pla és més senzilla, ja que el criteri marcat pel Reglament 2073/2005 és de 100 UFC/g, que traduït a logaritmes serien 2 log (UFC/g). Literalment, la legislació indica els paràmetres següents:

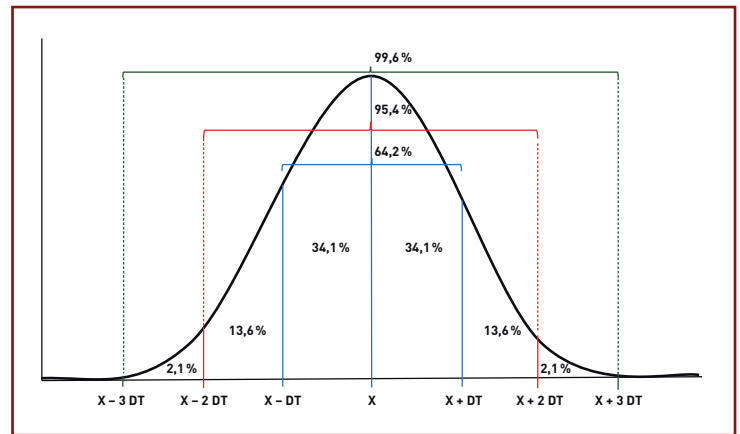
$$n = 5,$$

$$c = 0,$$

$$m = M = 100 \text{ UFC/g}$$

Per tant, el pla de mostreig suposa prendre, de forma aleatòria, cinc mostres i analitzar-les segons la norma UNE-EN ISO 11290-2:2018 (UNE, 2018). No obstant això, ni la legislació ni la norma ens parlen de la interpretació estadística que cal fer dels resultats, ja que se suposa que ja ho hem de saber, per a això s'estudia estadística en els primers cursos de qualsevol grau de les carreres científiques. El problema és que, tot i tenir coneixements estadístics, no solem aplicar-los i podem deixar en el mercat productes que no compleixen la legislació, creient erròniament que sí que ho fan. La legislació ens indica un nombre de mostres que cal analitzar i un màxim acceptable de mostres amb presència de patògen, però hem de reprendre els nostres coneixements sobre població normal, càlcul de mitjana, desviació típica i la seva interpretació corresponent.

Una distribució normal, com es veu en el gràfic 1, és aquella que, de manera resumida, agrupa de forma homogènia la població analitzada, en percentatges concrets, en funció de la mitjana i sumant o restant diverses vegades la desviació típica (DT). Per tant, si volem conèixer si una mostra, representativa de la població, compleix o no un criteri, cal calcular la mitjana i, posteriorment, sumar i restar una, dues o tres vegades la desviació típica. En el cas de les anàlisis realitzades en mostres d'aliments, assumim que segueixen sempre una distribució normal.



Gràfic 1. Esquema d'una distribució normal (elaboració pròpia).

D'acord amb el gràfic 1, el valor de la mitjana, sumant i restant un cop la desviació típica, englobaria el 64,2% de la població; sumant i restant dues vegades la desviació típica, englobaria el 95,4% de la població, i el 99,6% en sumar i restar tres vegades el valor. Per tant, per poder definir la situació, respecte a l'acceptació o el rebuig d'un lot d'un producte (població), en funció de l'estimació que suposa analitzar cinc mostres (mostreig), cal calcular la mitjana i la desviació típica obtinguda pel recompte corresponent i emetre un judici en funció d'una valoració estadística.

Així, a la taula 1 es poden veure tres casos diferents, amb sèries de tres mostres, que presenten diversos valors, amb diferents desviacions. Si no tenim en compte una valoració estadística dels resultats, considerariem situacions diferents de les que probablement acabarem adoptant.

Taula 1. Resultats d'anàlisis microbiològiques de mostres per a la presa de decisions respecte a l'acceptació o el rebuig d'un lot (elaboració pròpia)

NÚMERO DE MOSTRA	RECOMPTE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN UFC/G		
	MOSTREIG 1	MOSTREIG 2	MOSTREIG 3
1	1	99	0
2	0	99	10
3	0	99	5
4	0	99	25
5	99	99	40
Mitjana	20,0	99,0	16,0
DT	44,2	0,0	16,4
X + 1 DT	64,2	99,0	32,4
X + 2 DT	108,3	99,0	48,7
X + 3 DT	152,5	99,0	65,1

Com es pot apreciar a la taula 1, en el primer mostreig, els resultats ens podrien fer pensar que el lot és acceptable, ja que cap mostra supera els 100 UFC/g. No obstant això, aquesta conclusió no és correcta. En analitzar els resultats, podem veure com la mitjana obtinguda era de 20 UFC/g, un valor clarament acceptable, però la desviació era molt elevada (44,2%), ja que els resultats oscil·laven entre 0 i 99 UFC/g. Per això, si volem valorar el lot amb seguretat (99,6%), trobaríem que el valor màxim és superior al límit de 100 UFC/g marcat per la legislació i, com a conseqüència, el lot no és correcte i no hauria de ser comercialitzat. Per contra, el segon mostreig, amb una mitjana de 99,0 UFC/g seria acceptable, ja que com que no hi ha desviació respecte de la mitjana podria ser acceptat, d'acord amb la legislació vigent. En l'últim mostreig, els valors oscil·len entre 0 i 40 UFC/g, amb una desviació típica similar a la mitjana, i el resultat seria igualment acceptable.

Aquesta interpretació dels resultats no només ha de servir per determinar la seguretat d'un lot, sinó que ha de permetre considerar on s'està produint el problema en el procés productiu, per tal d'instaurar mesures de millora. D'una banda, cal valorar el valor mitjà de contaminació per *L. monocytogenes*. Un valor mitjà alt indica una contaminació important a l'empresa. Com més es pugui controlar en tot el procés productiu, més reduïda serà aquesta mitjana. D'altra banda, el que realment ha de preocupar és la desviació que s'obté. Quan la desviació és molt estreta, normalment pot indicar que el procés de producció és molt homogeni, ja que la contaminació procedeix, fonamentalment, d'òrgens primaris, és a dir, dels proveïdors de matèries primeres o de la mateixa instal·lació. Aquesta contaminació és bàsicament la mateixa sempre. En aquest cas sol ser més fàcil trobar l'origen. Un cop controlat, es podrà reduir normalment la contaminació mitjana del producte final.

Quan el problema és que la desviació és molt important, ens indica que hi pot haver múltiples orígens que no estan controlats. En aquest cas, la solució pot ser més complexa, ja que serà necessari ampliar l'estudi a la totalitat de la instal·lació. El primer pas és revisar els requisits de seguretat alimentària i començar sempre pels proveïdors de producte, per identificar si és un problema d'un proveïdor en particular. Posteriorment, caldrà revisar la qualitat de l'aigua, el control de la temperatura, els procediments de neteja i desinfecció, i la formació del personal. Un cop controlades les desviacions, la desviació típica s'anirà reduint, en funció de la identificació de l'origen del problema i de la seva eficàcia.

Així mateix, si s'augmenta la mida de la mostra, el que s'aconsegueix són uns valors més precisos de la mitjana

i de la seva desviació, amb uns valors més representatius de la població que s'ha de valorar.

Pel que fa a la interpretació que hem de fer del límit legal, com s'indica a l'inici d'aquest apartat, el límit legal està situat en 100 UFC/g. Com a primer criteri, aquest valor es constitueix en l'FSO, que s'ha de verificar en cada lot. Per això, quan valorem un lot, el primer que hem de considerar és la mitjana, tenint en compte que aquesta no pot superar el límit legal o FSO. Si el valor d'aquesta el supera, el lot és rebutjable. Si la mitjana és inferior, no pot ser acceptat sense verificar primer el valor de la mitjana més el de la desviació típica. El valor que s'hauria de considerar hauria de ser el de tres desviacions típiques, ja que és el que ens garanteix una major seguretat de producte. Per això, si el valor de la suma de la mitjana més tres vegades la desviació típica supera l'FSO, llavors no s'accepta el lot i s'ha de retirar del consum. Només el compliment de les dues condicions ens garanteix un producte segur.

## IMPORTÀNCIA DEL CRITERI DE L'ADMINISTRACIÓ COMPETENT PER AL MOSTREIG PER ATRIBUTS

Segons s'ha descrit prèviament, quan el mostreig suposa una anàlisi qualitativa, amb les possibilitats de detectar presència o no d'un patògen en una mostra d'aliment, es realitza un mostreig per atributs, de dues classes. Per a la majoria dels operadors econòmics, això suposa que el nombre de cinc mostres és un valor objectiu, que implica un sobrepreu en el procés productiu. D'acord amb els criteris establerts, en realitat, l'acceptació o el rebuig d'un lot no depèn només dels criteris establerts directament per la legislació, sinó també dels criteris d'inspecció publicats per les autoritats sanitàries competents. Si ens fixem en el cas d'Espanya, l'autoritat competent és la comunitat autònoma corresponent. Actualment, les comunitats autònomes apliquen el mostreig següent:

- cinc mostres per a l'anàlisi inicial del lot,
- cinc mostres per a l'anàlisi contradictòria, en el cas de tenir un resultat que requereixi una verificació, i
- cinc mostres per a l'anàlisi diriment, si el resultat de l'anàlisi contradictòria no coincideix amb el resultat de l'anàlisi inicial i sempre que no hi hagi acord entre les parts en litigi.

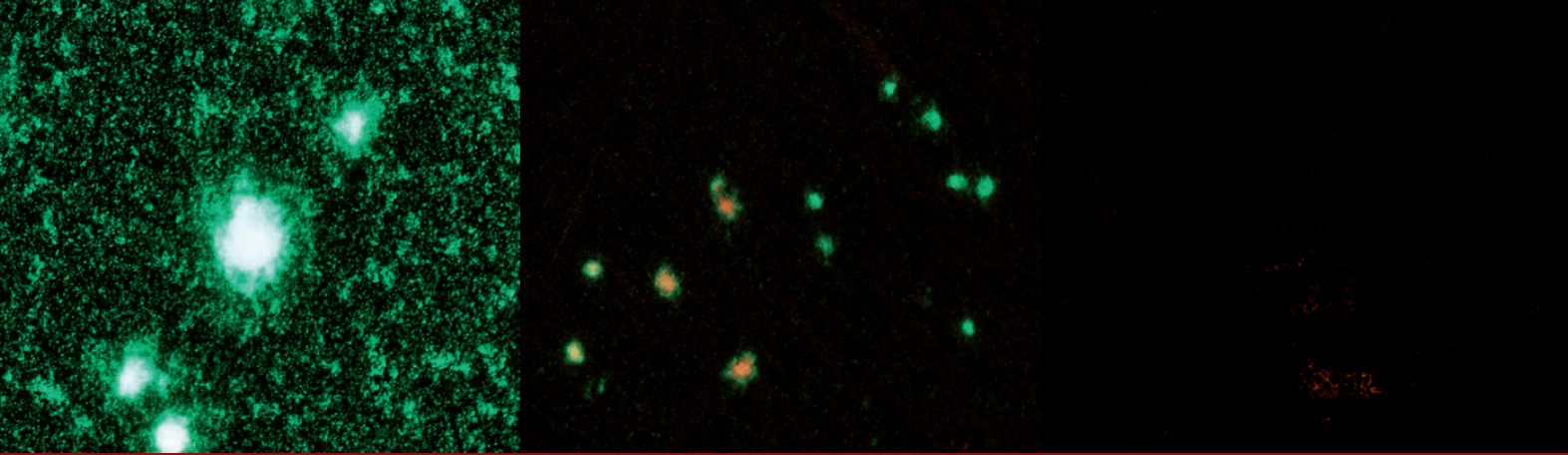


Figura 3. Evolució correcta d'un biofilm de *Listeria monocytogenes* amb una bona neteja.

En conseqüència, aquest criteri no considera que un lot és acceptable quan té cinc absències en cinc mostres analitzades, sinó que requereix una confirmació dels resultats de presència. Aquesta confirmació implica un criteri ampliat, respecte als mers requisits legals. Per tant, si es pot arribar fins a un total de quinze mostres per confirmar un lot no conforme, amb la legislació vigent aquest mateix lot seria acceptable si tingués una mostra amb presència de *L. monocytogenes* respecte a un total de quinze. En alguns casos, fins i tot es podrien acceptar lots amb dues presències de quinze, tot i que el risc és clarament més gran i fa que la probabilitat de ser detectada una mostra contaminada en una anàlisi diriment sigui elevada.

Tota aquesta discussió es deu al fet que una detecció en l'anàlisi inicial portaria a una anàlisi contradictòria i que la no detecció en aquesta anàlisi portaria a una anàlisi diriment. Si, finalment, en aquesta última anàlisi, s'obté absència del patògen en les cinc mostres, el lot seria acceptable i no hi hauria sanció. La sanció implica el no compliment de la llei, però la posada en el mercat, després d'una inspecció, implica igualment el compliment de la llei. En conseqüència, per a la posada en el mercat de productes alimentaris segurs, sempre que es detecti menys d'una presència en quinze mostres, es confirmarà el compliment de la llei.

Això ens porta a diverses conclusions. La primera és que el nombre objectiu de mostres que ha d'avaluar una empresa alimentària no és de cinc, sinó que ha de ser de quinze, i cal garantir que, com a màxim, només es detecti una presència del patògen. La segona és que el criteri de l'Administració, en la presa oficial de mostres, fixa directament el nivell de seguretat i de mostreig, com a norma per a l'acceptació o el rebuig d'un lot i, per tant, fixa el que significa complir la llei i la posada en el mercat d'un lot segur. Conseqüentment, es defineixi l'avaluació del risc.

Aquest criteri pot ser diferent, en funció de la comunitat autònoma o del país, cosa que, al mateix temps, no només

afecta la seguretat dels consumidors, sinó que suposa diferents costos per a les empreses implicades. Sempre que no hi hagi un criteri harmonitzat, es produirà un problema afegit als operadors econòmics que exporten els seus productes a altres països, fins i tot dins de la UE.

De la mateixa manera que les empreses han de considerar aquest criteri en l'aplicació dels seus controls de qualitat, els inspectors han de ser conscients d'aquesta situació, per tal d'aprofundir en la correcta interpretació dels resultats i en l'obligatorietat que els mateixos empresaris siguin capaços d'interpretar-ne els resultats, tant si es tracta de grans o petites empreses.

## APLICACIÓ EN L'ENTORN EMPRESARIAL. DE LA DETECCIÓ DEL PERILL AL PERILL ESPERABLE

En aquest context, és important que les empreses alimentàries entenguin aquesta situació en l'àmbit de la direcció, per poder comprendre com els afecta en termes de competitivitat, de responsabilitat i de risc.

En primer lloc, s'han d'introduir un parell de termes bàsics d'estadística, que considerem essencials per entendre l'estratègia que s'ha de seguir. Per això, hem de considerar si les anàlisis que es realitzen a les empreses estan sent avaluades com a **mesures independents** o com a **mesures repetides**. Segons el criteri clàssic, les anàlisis dels aliments produïts a les empreses alimentàries són mesures independents, ja que se separen clarament els lots entre si (Halbach Røssvoll *et al.*, 2013). Si hem de definir *lot*, podríem dir que és aquella unitat de producció que s'ha elaborat de forma homogènia: amb les mateixes matèries primeres, el mateix personal, a la mateixa planta, etc. L'única condició és que, com a mínim, hi ha d'haver un lot diari. Això ens porta a considerar que primer es produeix i, després de netejar i desinfectar, la planta, en termes d'higiene, està com el primer dia.



Això és bàsicament fals. Cada vegada que es treballa hi ha un moviment de microorganismes, aquests poden trobar condicions favorables per al seu creixement (aigua, nutrients, temperatura i temps), de manera que trigaran més o menys temps a créixer. Això ens porta al fet que com més prolongats són els torns de treball i més humitat es generi, el risc microbiològic augmenta.

D'altra banda, si els microorganismes creixen en una planta és freqüent que es formin biofilms, estructures complexes que en permeten la supervivència, que fan que resistixin la neteja, la desinfecció, l'acció tèrmica, la dessecació o la radiació ultraviolada (Ripolles-Avila *et al.*, 2019a, 2019b). Un biofilm madur pot contenir més de mil milions de bacteris per centímetre quadrat, en un espai més reduït que el cap d'una agulla. En conseqüència, és gairebé impossible de detectar. Només que una unitat de pocs grams de producte sigui capaç d'arrossegar una desena part d'un biofilm madur, s'enduria més de cent milions de bacteris. Això no passarà ocasionalment, sinó que el biofilm creixerà, s'anirà expandint per la planta i el que en un primer moment afectava uns pocs quilos de producte, podrà passar a afectar-ne tones (Ripolles-Avila *et al.*, 2019b). Per tant, el que passa un dia no és independent d'un altre i no podem considerar que no hi hagi connexió. Això ens ha de portar a entendre l'anàlisi de les mostres com a mesura repetida d'una mateixa realitat. Conceptualment les conseqüències en la interpretació de les anàlisis són molt diferents, però una correcta interpretació de les dades pot ajudar a integrar la informació obtinguda al llarg del temps.

Davant d'aquesta situació, què passarà si s'arriba a tenir un nivell de contaminació, amb un clar incompliment de la llei? Amb una mostra de cada cinc mostres analitzades amb presència de *L. monocytogenes*, si s'analitza una mostra al dia, es veurà la contaminació una vegada a la setmana (cinc mostres entre el dilluns i el divendres), però si s'analitzen cinc mostres al dia, es veurà cada dia? Aquest és un concepte senzill, però si l'empresa analitza una mostra a la setmana, només ho veurà un cop al mes, quan ja tota la producció no està complint la normativa vigent. Aquesta va ser la situació de partida del gran brot associat a l'empresa Magrudis a Sevilla, l'estiu de 2019. Quina en seria la conclusió? El producte és potencialment perillós, perquè no estem complint els criteris de seguretat marcats per les autoritats sanitàries, però no en som conscients, perquè no sabem interpretar ni la normativa ni els resultats de les anàlisis realitzades.

D'altra banda, si s'apliquen mesures correctes d'higiene i s'aconsegueix controlar i eliminar els biofilms, es posarà de manifest com ràpidament aquest nivell de contaminació és dràsticament reduït. No obstant això, com més petit és el nivell de contaminació, més complicat és detectar-lo. D'aquesta manera, si s'arriba a localitzar el problema principal a la planta i es controla de forma efectiva, es podria passar de detectar una presència en cinc mostres a tenir uns nivells de contaminació inferiors a una presència per cada cent mostres analitzades. En aquests casos, el problema arriba a ser inabastable. Per això, la detecció dependrà del nivell de mostreig i la seva verificació s'ha de posar de manifest al llarg del temps, sempre considerant les anàlisis com a mesures repetides d'una mateixa situació. Així, si es prenen cinc mostres a la setmana, el nivell de contaminació es posarà en evidència al cap de vint setmanes. En aquest temps s'analitzarien cent mostres i, en aquest cas, seria esperable una mostra amb presència detectada del patogen. Per tant, passariem de l'objectiu de detectar un perill a considerar-lo un perill esperable.

En aquest cas, el dubte seria què fer davant la detecció d'aquesta presència, de nou es plantejaria si aquesta detecció suposa la destrucció o no del lot, o si aquest es pot posar en el mercat.

Per a aquesta pregunta no hi ha una resposta fàcil, ja que dependrà dels criteris prèviament marcats per l'empresa. En realitat, la resposta ens l'ha de donar l'FSO marcat prèviament. Com s'ha assenyalat, la legislació vigent ens pot indicar que hi ha d'haver absència del patogen en cinc mostres analitzades. Prèviament, per garantir la seguretat del producte, l'empresa ha pogut fixar el seu FSO en una presència màxima en quinze mostres. Si aquest és el cas, l'empresa hauria de repetir deu mostres més. Si en cap d'elles es detectés la presència de *L. monocytogenes*, llavors el lot podria ser acceptable. Per contra, si es detectés només una mostra més amb presència del patogen el lot seria rebutjable. Aquest sistema permet ajudar a la presa de decisions de l'empresa, en funció dels resultats analítics.

Un dels problemes que es poden plantejar, si s'aconsegueix un control efectiu, és que després d'un temps sense detectar la presència del patogen, es consideri que el problema va ser una crisi puntual i està completament superat. Sense fixar un FSO i sense un seguiment al llarg del temps, tornar a detectar el patogen només dependrà del temps transcorregut i del nombre de mostres analitzades per setmana. No és una qüestió d'atzar, sinó de fixar els límits a la seguretat del producte.

## CONCLUSIONS

Les determinacions analítiques per a la presència de patògens en els aliments serveixen per poder trobar una relació entre els sistemes de producció i el nivell de seguretat alimentària. L'anàlisi ha de considerar-se sempre amb una perspectiva estadística, tenint sempre present que el resultat és reflex d'un mostreig sobre una població, que podria denominar-se *lot*. Si el mostreig es realitza per variables, el resultat és numèric. En aquest cas, s'ha de valorar la mitjana i la desviació típica, tenint en compte que cal calcular la mitjana més tres vegades la desviació típica, per tal de conèixer si tot el lot pot estar dins dels límits marcats. El mostreig i la posterior anàlisi de les mostres, d'una planta alimentària, ha de ser entès com el resultat de l'anàlisi de mesures repetides. És fonamental el seguiment històric dels resultats analítics per conèixer la presència real d'un patògen en una indústria i determinar-ne els factors que l'afecten, com l'estacionalitat, les vacances, els períodes de parada, etc. Aquesta és la base per a un bon mostreig per atributs, en què els resultats obtinguts són de tipus qualitatiu. Un cop conegut el nivell de risc d'una empresa, correspon fixar-ne el nivell de seguretat (FSO), per tal d'acotar els mostres successius, així com els sistemes d'alerta i les mesures de control i prevenció eficaces.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

ARENDT, S.; RAJAGOPAL, L.; STROHBEHN, C.; STOKES, N.; MEYER, J.; MANDERNACH, S. (2013). «Reporting of foodborne illness by U. S. consumers and healthcare professionals». *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 10, núm. 8 (agost), p. 3684-3714.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (UNE) (2018). *Microbiología de la cadena alimentaria: Método horizontal para la detección y el recuento de Listeria monocytogenes y Listeria spp. Parte 2: Método de recuento. (ISO 11290-2:2017)*. UNE-EN ISO 11290-2:2018.

BARJAKTAROVIĆ-LABOVIĆ, S.; MUGOŠA, B.; ANDREJEVIĆ, V.; BANJARI, I.; JOVIĆEVIĆ, L.; DJUROVIĆ, D.; RADOJLOVIĆ, J. (2018). «Food hygiene awareness and practices before and after intervention in food services in Montenegro». *Food Control*, vol. 85, p. 466-471.

BOELAERT, F.; AMORE, G.; STEDE, Y. van der; HUGAS, M. (2016). «EU-wide monitoring of biological hazards along the food chain: Achievements, challenges and EFSA vision for the future». *Current Opinion in Food Science*, vol. 12, p. 52-62.

CHAVES, R. D.; ALVARENGA, V. O.; CAMPAGNOLO, F. B.; RODRIGUEZ CATURLA, M. Y.; OTEIZA, J. M.; SANT'ANA, A. S. (2016). «Food safety». A: PANDEY, A.; SANROMAN, M. A.; DU, G.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C.-G. (ed.). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Food and beverages industry*. Amsterdam: Elsevier, p. 245-259.

DAS, A. K.; NANDA, P. K.; DAS, A.; BISWAS, S. (2019). «Hazards and safety issues of meat and meat products». A: LAKHAN SINGH, R.; MONDAL, S. (ed.). *Food safety and human health*. Amsterdam: Elsevier, p. 145-168.

EUROPEAN COMMISSION (EC) (2018). *RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed) 2017 Annual Report*. Luxemburg: Publications Office of the European

Union. També disponible en línia a: <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2017.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2017.pdf)> [Consulta: 17 maig 2020].

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EFSA-ECDC) (2019). «The European Union One Health 2018 Zoonoses Report». *EFSA Journal*, vol. 17, núm. 12, p. 1-276. També disponible en línia a: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>> [Consulta: 4 setembre 2020].

GONZÁLEZ-RIVAS, F.; RIPOLLES-AVILA, C.; FONTECHA-UMAÑA, F.; RÍOS-CASTILLO, A. G.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2018). «Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 17, núm. 5, p. 1261-1276.

HALBACH RÖSSVOLL, E.; LAVIK, R.; UELAND, Ø.; JACOBSEN, E.; HAGTVEDT, T.; LANGSRUD, S. (2013). «Food safety practices among norwegian consumers». *Journal of Food Protection*, vol. 76, núm. 11, p. 1939-1947.

KOTSANOPOULOS, K. V.; ARVANITTOYANNIS, I. S. (2017). «The role of auditing, food safety, and food quality standards in the food industry: A review». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, núm. 5, p. 760-775.

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (NMKL) (2014). *Guide on sampling for analysis of foods*. (Nordic Committee on Food Analysis; 12).

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO) (1997). *Sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (HACCP) y directrices para su aplicación. Anexo al CAC/RCP-1 (1969)*, Rev. 3. Disponible en línia a: <<http://www.fao.org/3/y1579s/y1579s03.htm>> [Consulta: 17 maig 2020].

«Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios» (2010). *Boletín Oficial del Estado* [en línia], núm. 49 (25 febrer), p. 18297-18299. <[https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2010-3032](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2010-3032)> [Consulta: 17 maig 2020].

«Reglamento (CE) n. 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios» (2005). *Diario Oficial de la Unión Europea* [en línia], L338/1 (22 desembre). <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32005R2073&from=EN>> [Consulta: 17 maig 2020].

«Reglamento (UE) n. 365/2010 de la Comisión, de 28 de abril de 2010, por el que se modifica el Reglamento (CE) n. 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriaceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina» (2010). *Diario oficial de la Unión Europea* [en línia], L107/9 (29 abril). <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32010R0365&from=ES>> [Consulta: 17 maig 2020].

RIPOLLES-AVILA, C.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, N.; CERVANTES-HUAMÁN, B. H.; MAZAHERI, T.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2019a). «Quantitative and compositional study of monospecies biofilms of spoilage microorganisms in the meat industry and their interaction in the development of multispecies biofilms». *Microorganisms*, vol. 7, núm. 655, p. 1-14.

RIPOLLES-AVILA, C.; RÍOS-CASTILLO, A. G.; FONTECHA-UMAÑA, F.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2019b). «Removal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* biofilms from food contact surfaces through enzymatic catalysis». *Journal of Food Safety*, vol. 103, p. 2117-2127.

TODD, E. C. D.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. (2007). «Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories». *Journal of Food Protection*, vol. 70, núm. 9, p. 2199-2217.

TRIENEKENS, J.; ZUURBIER, P. (2008). «Quality and safety standards in the food industry: Developments and challenges». *International Journal of Production Economics*, vol. 113, núm. 1, p. 107-122.

UNITED NATIONS (2017). *World Population Prospects: 2017 Revision*. Nova York: UN.

ZWIETERING, M. H.; ROSS, T.; GORRIS, L. G. M. (2014). «Food safety assurance systems: Microbiological testing, sampling plans, and microbiological criteria». A: MOTARJEMI, Y.; MOY, G.; TODD, E. (ed.). *Encyclopedia of food safety*. Vol. 4: *Food safety management*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, p. 244-253. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00363-2>>.