

2018

PRUEBA DE UN PRODUCTO COMERCIAL PARA LA DETECCIÓN DE BIOFILMS

OLIVARES SALINAS, SABRINA OLIVIA

<https://hdl.handle.net/11673/47389>

Repositorio Digital USM, UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA**

**PRUEBA DE UN PRODUCTO COMERCIAL PARA LA DETECCIÓN
DE BIOFILM**

Trabajo de Titulación para optar al Título de
Técnico Universitario en CONTROL DE
ALIMENTOS

Alumna:

Sabrina Olivia Olivares Salinas

Profesor Guía:

Miguel Zazópulos Garay

2018

RESUMEN

KEYWORDS: GRADO DE LIMPIEZA – MÉTODOS DE VERIFICACIÓN – SERVICIO DE ALIMENTACIÓN

El siguiente trabajo, describe y analiza los resultados obtenidos por tres métodos de verificación utilizados para determinar el grado de limpieza de dos áreas específicas en el Servicio de Alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar.

Para evaluar el grado de limpieza se escogió el método de hisopado, el método de bioluminiscencia y el test de detección de biofilms. Las zonas escogidas para los análisis son la sala de preelaborado donde se manipula la materia prima y la sala del cuarto frío, en la que se maneja el alimento listo para servir. Para cada área se designan los mesones como zona a muestrear, debido al mayor contacto que tienen los alimentos sobre estos y por el mayor riesgo que presentan estos lugares para la ocurrencia de la contaminación microbológica. Se realizan tres visitas en las que previamente se realizaron los procesos de limpieza y desinfección por parte de los trabajadores. La primera es avisada con anticipación a la encargada del Servicio de Alimentación y las otras dos se realizan de manera imprevista. Posteriormente se determina el grado de limpieza encontrado en las diferentes áreas. Además, se busca verificar que a través del método de hisopado el resultado arrojado cumpla con los parámetros determinados por el Instituto de Salud Pública para el control de superficies.

En la primera parte del trabajo se aborda sobre las áreas del servicio de alimentación analizadas y de la importancia del monitorio de los procesos de limpieza y desinfección, los métodos de verificación y, además, acerca de algunas de las enfermedades más importantes causadas por los alimentos.

La segunda y tercera parte tratan sobre el experimento en sí, sobre los resultados obtenidos por cada método, la verificación del cumplimiento de la normativa y la evaluación del resultado del grado de limpieza en cada área.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que se encontraron niveles aceptables en cuanto a UFC/cm² presentes en las superficies de ambas salas. Una alta cantidad de URL para una de las salas y presencia de biofilm en solo una sala. Durante las tres visitas realizadas se obtuvo un grado de limpieza moderado en ambas salas que no representan un riesgo inmediato para la salud de los consumidores.

ÍNDICE

RESUMEN

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES	2
1.1. SERVICIO DE ALIMENTACIÓN	3
1.1.1. Sala de preelaborado	4
1.1.2. Sala de cuarto frío	4
1.2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	5
1.2.1. Aplicación de programa de limpieza y desinfección	5
1.2.2. Etapas de limpieza y desinfección	6
1.3. MÉTODOS DE VERIFICACIÓN	7
1.3.1. Método del hisopo	7
1.3.2. Método de Bioluminiscencia	8
1.3.3. Método para la detección de biofilms	9
1.4. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)	11
CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	14
2.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO	15
2.2. PROCEDIMIENTOS	16
2.2.1. Método de detección de biofilms Test TBF 300	16
2.2.2. Método de muestreo por hisopado	18
2.2.3. Control por bioluminiscencia de ATP	21
2.3. EXPRESIÓN DE RESULTADOS	23
2.4. CÁLCULOS	24
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	28
3.1. RECUENTO DE MICROORGANISMOS VIABLES TOTALES	29
3.2. RESULTADOS MUESTREALES POR LUMINOMETRÍA	32
3.3. RESULTADOS TEST TBF 300	36
3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

ANEXOS	45
ANEXO A: CUADROS	46
ANEXO B: GRÁFICOS	48
ANEXO C: CÁLCULOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Sala de preelaborado	4
Figura 1-2. Sala de cuarto frío	4
Figura 1-3. Luminómetro 3M Clean-Trace	8
Figura 1-4. Matriz extracelular y material filamentosos que une las bacterias	10
Figura 1-5. Test TBF 300	10
Figura 1-6. Secuencia de eventos que ocasionan una ETA causada por bacterias y virus	12
Figura 2-1. Aplicación Test TBF 300	17
Figura 2-2. Método del Hisopo	21
Figura 2-3. Uso del Luminómetro	22
Figura 2-4. Ejemplo de resultados obtenidos por método de hisopado	25
Figura 3-9. Presencia de biofilms en sala de preelaborado	37
Figura 3-10. Presencia de biofilm en sala de preelaborado	38
Figura 3-11. Presencia de biofilms en sala de preelaborado	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Ejemplo de mediciones realizadas por bioluminiscencia	26
Tabla 2-2. Ejemplo de resultados obtenidos por test TBF 300	27
Tabla 3-1. Muestreo en sala de preelaborado	29
Tabla 3-2. Muestreo en sala de cuarto frío	29
Tabla 3-3. Muestreo en sala de preelaborado	30
Tabla 3-4. Muestreo en sala de cuarto frío	30
Tabla 3-5. Muestreo en sala de preelaborado	30
Tabla 3-6. Muestreo en sala de cuarto frío	31
Tabla 3-7. Clasificación e interpretación de la OMS para el control de superficies	31
Tabla 3-8. Estándares dados por la Comunidad Económica Europea	31

Tabla 3-9. Medición por luminometría en sala de preelaborado	32
Tabla 3-10. Primera medición por luminometría en sala de cuarto frío	32
Tabla 3-11. Segunda medición por luminometría en sala de cuarto frío	33
Tabla 3-12. Medición por luminometría en sala de preelaborado	33
Tabla 3-13. Primera medición realizada por luminometría en sala de cuarto frío	34
Tabla 3-14. Segunda medición por luminometría en sala de cuarto frío	34
Tabla 3-15. Medición por luminometría en sala de preelaborado	35
Tabla 3-16. Primera medición en sala de cuarto frío	35
Tabla 3-17. Segunda medición en sala de cuarto frío	36
Tabla 3-18. Muestreo con Test TBF 300 en sala de preelaborado	36
Tabla 3-19. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío	37
Tabla 3-20. Muestreo con Test TBF 300 en sala de preelaborado	37
Tabla 3-21. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío	38
Tabla 3-22. Muestreo con Test TBF 300 en sala de preelaborado	38
Tabla 3-23. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío	39

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLAS:

ATP	:	Adenosín trifosfato
EPS	:	Sustancias poliméricas extracelulares
ETA	:	Enfermedades transmitidas por los alimentos
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
URL	:	Unidades relativas de luz

SIMBOLOGÍAS:

cm ²	:	Centímetro cuadrado
g	:	Gramo
L	:	Litro
ml	:	Mililitro
°C	:	Grados Celsius

INTRODUCCIÓN

El continuo monitoreo en la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección por parte de las empresas de alimentos ha sido un tema muy importante para contribuir a la obtención de productos inocuos y aptos para la salud de los consumidores.

El estudio a realizar se considera debido al gran número de personas que consumen diariamente los alimentos otorgados por el Servicio de Alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar; por lo que la correcta ejecución de los procesos de sanitización, manteniendo el grado de limpieza de las áreas en óptimas condiciones, es necesario para evitar cualquier riesgo de contaminación microbiológica que puede ocasionar algún daño en la salud de la población.

Se busca determinar el grado de limpieza de dos áreas específicas de dicho servicio, seleccionando desde una primera instancia un método en particular; el de la espuma, que detecta zonas con presencia de biofilms, los que representan focos de contaminación microbiológica mayor, por lo que constituyen un riesgo en zonas de manipulación de alimentos, por lo cual posteriormente se decide complementar con dos métodos más por lo que se procede a usar tres métodos de verificación mediante muestreos realizados bajo las mismas condiciones.

Los tres métodos utilizados son, el método por hisopado, el método de bioluminiscencia y el test TBF 300, los cuales conllevan diferentes fundamentos que se analizan en la primera parte del presente trabajo, donde se recopiló información sobre la importancia de la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección, y las posteriores consecuencias de una mala aplicación.

Los métodos señalados anteriormente, se realizaron durante los meses de Diciembre del 2016 y Enero del año 2017, en el Servicio de Alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar, específicamente en el área de la cocina; en las zonas de preelaborado y cuarto frío, y posteriormente se analizaron las muestras tomadas en el Laboratorio de Microbiología de dicha Universidad.

El objetivo principal de este estudio es comprobar el grado de limpieza de dos áreas dentro del Servicio de Alimentación (la sala de preelaborado y la sala de cuarto frío); en donde se escogieron dos zonas específicas dentro de estas salas (los mesones de acero inoxidable); además, se busca verificar que las superficies analizadas cumplan con los parámetros estipulados por el Instituto de Salud Pública según el método de hisopado. También, analizar las tres metodologías utilizadas, con sus respectivos resultados, para determinar las variaciones encontradas según cada método utilizado.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. SERVICIO DE ALIMENTACIÓN

El servicio de alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar, corresponde a las instalaciones donde se preparan y sirven alimentos para el consumo humano; la mayoría de los equipos y áreas de estas instalaciones están construidas de acero inoxidable, debido a que este, no se corroe fácilmente, es de fácil limpieza, no reacciona con los alimentos ni tampoco es tóxico.

Este servicio debe entregar alimentos con un alto valor nutricional, que posean óptimas características sensoriales e inocuos, que no generen riesgos para la salud de los consumidores. Para lograr obtener alimentos inocuos es necesario mantener condiciones de higiene óptimas en todas las áreas del servicio, principalmente en aquellas donde se entra en contacto directo con los alimentos. Por ello, el monitoreo y evaluación del grado de limpieza de zonas en las que se manipulan los alimentos es uno de los puntos críticos de control.

El grado de limpieza corresponde a la verificación de la correcta realización de los procesos de limpieza y desinfección por parte del personal y se divide en cinco criterios de evaluación (muy bueno, bueno, moderado, insuficiente y malo). Los niveles de material orgánico como también la cantidad de microorganismos que estén presentes sobre las zonas previamente sanitizadas, indicarán cual es el grado de limpieza que estas presentan. Los métodos utilizados para comprobar el grado de limpieza son el método de hisopado, bioluminiscencia y test de detección de biofilms.

Para realizar la evaluación del grado de limpieza sobre superficies en las que se manipulan los alimentos se escogieron dos áreas a muestrear: la sala de preelaborado y la sala de cuarto frío pertenecientes al Servicio de Alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar, siendo la encargada de este servicio es la Señorita Yessica Montorio.

La importancia del monitoreo de estas áreas se debe a que en la sala de preelaborado, se inician los procesos de sanitización de la materia prima, por lo que, algún problema de contaminación en las superficies en las que se manipulan los alimentos, afectaría en los procesos siguientes de la preparación de los alimentos para su posterior consumo, mientras que en el cuarto frío se entregan los alimentos listos para el consumo, por lo que, no debe existir ningún riesgo para la salud de los consumidores y los alimentos deberían encontrarse sanos e inocuos.

1.1.1. Sala de preelaborado

Esta sala (Figura 1-1.) corresponde a la preelaboración de verduras y frutas, aquí estos alimentos se seleccionan, sanitizan y cortan según la especificación de la receta a preparar. Terminado este proceso las verduras y frutas se repartirán hacia los cuartos frío y caliente. En el cuarto caliente se realizan los procesos de cocción, mientras que en el cuarto frío se mantienen los alimentos tanto cocidos como crudos.

Figura 1-1. Sala de preelaborado



Fuente: Imagen tomada en el Servicio de Alimentación de la U.T.F.S.M, Sede Viña del Mar

1.1.2. Sala de cuarto frío

En la sala de cuarto frío (Figura 1-2.) se elaboran postres y ensaladas tanto crudas como cocidas. Los alimentos se encuentran listos para el consumo directo. Además, se utiliza como lugar de almacenamiento de postres o verduras que se encuentran listos para guardar.

Figura 1-2. Sala de cuarto frío



Fuente: Imagen tomada en el Servicio de Alimentación de la U.T.F.S.M, Sede Viña del Mar

1.2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Debido a que se requieren medidas que aseguren una calidad duradera en los alimentos, las operaciones de limpieza y desinfección en su conjunto contribuyen a alcanzar tal objetivo, formando parte de las buenas prácticas de manufactura que deben ser utilizadas por todas las empresas elaboradoras de alimentos.

La limpieza y desinfección tienen como objetivo varios fines, pero el más importante siempre será velar por la salud de los consumidores. A continuación, se muestran algunos de los más importantes:

- Cumplir exigencias estéticas.
- Restablecer el normal funcionamiento de las instalaciones y utensilios tras su actividad.
- Prolongar la vida útil de instalaciones y utensilios.
- Asegurar la calidad óptima de los alimentos frente a influencias químicas.
- Asegurar una calidad óptima de los alimentos frente a influencias microbianas.

Aunque estos conceptos son difícilmente separables entre sí, la limpieza por un lado busca mediante el uso de diferentes procesos, eliminar la suciedad visible o macroscópica, por lo que uno de sus principales objetivos es la destrucción de la fracción principal de microbios presentes; en términos generales, la separación más completa posible como mínimo de dos sustancias unidas entre sí físicamente de forma floja. Mientras, que la desinfección tiene como objetivo la destrucción de los microorganismos, no necesariamente la totalidad de ellos, sino más bien la reducción de su número a un nivel aceptable, que no resulte nocivos para la salud, ni que perjudique la calidad de los alimentos.

1.2.1. Aplicación de programa de limpieza y desinfección

Para efectuar una correcta limpieza y desinfección se debe realizar un estudio previo analizando los siguientes parámetros:

- Suciedad: clase, estado y cantidad.
- Objeto a limpiar: forma, material y rugosidad.
- Etapas a realizar: preenjuague, limpieza con detergente, enjuague, desinfección con desinfectante, enjuague y secado.
- Productos a emplear: tipo, modo de aplicación, temperatura, tiempo de contacto y dosificación.

- Periodicidad de la limpieza y desinfección.

1.2.2. Etapas de limpieza y desinfección

Una correcta aplicación del protocolo de limpieza y desinfección es la herramienta más segura para minimizar el riesgo de contaminación, por lo que es necesario realizar estos protocolos en forma rutinaria. Los equipos, utensilios y superficies deben estar limpios al inicio de la jornada, durante su utilización, cuando se contaminan y al finalizar la jornada, evitando la acumulación de suciedad en equipos de preparación de alimentos y en el ambiente en el que estos se elaboran. A continuación, se describen los diferentes pasos que conlleva el proceso de limpieza y desinfección:

- Preenjuague: se realiza una limpieza previa con agua, eliminando la suciedad más grosera. Se evitará realizar esta operación mediante sistemas de alta presión ya que pueden proyectar partículas de suciedad hacia otras zonas.
- Aplicación del detergente: mediante agua potable de forma abundante, a una presión de media a baja para evitar aerosoles.
- Aplicación del desinfectante: una vez realizado el proceso de limpieza como tal, se procede a aplicar un desinfectante, que busca destruir los microorganismos que no se hayan eliminado en el proceso de limpieza.
- Enjuague: el objetivo de este paso es evitar que los residuos de algún desinfectante contaminen a los alimentos.
- Secado: se realizará, ya que el agua, además de favorecer el crecimiento bacteriano, puede contribuir como vehículo diseminador de residuos.

Es muy importante que todo el personal de limpieza conozca cuál es su función y como realizarla óptimamente (manejo de equipos, aplicación de detergentes y desinfectantes que sean apropiados para cada área), y cada función debe ser supervisada por los trabajadores continuamente para verificar su correcta ejecución.

1.3. MÉTODOS DE VERIFICACIÓN

Para garantizar la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección es necesario comprobar su correcta aplicación mediante la realización de monitoreos e inspecciones. Se deben llevar a cabo registros rutinarios sobre la realización de los procedimientos y su frecuencia; asimismo es necesario la implementación de inspecciones regulares mediante pruebas de validación. Si se encuentran problemas potenciales de contaminación luego de realizar alguna inspección es necesario ajustar los procedimientos. Estas prácticas se basan en el hecho de que ciertos microorganismos que generan un riesgo para la salud pueden sobrevivir al realizar una mala ejecución en los procesos de limpieza y desinfección.

Como forma de control, las inspecciones, son una forma segura de validar la correcta ejecución de los planes de saneamiento y a su vez, asegurar la obtención de productos inocuos. A continuación, se presentarán algunos de los métodos utilizados como forma de evaluación dentro de las áreas en las que se manipulan alimentos.

1.3.1. Método del hisopo

Es el método más utilizado para el control microbiológico, tanto de superficies planas como no planas. Es uno de los más antiguos, se realiza generalmente en superficies que tienen contacto directo con los alimentos; además, se puede utilizar en superficies muy contaminadas ya que a partir de la solución salina estéril utilizada es posible efectuar diluciones decimales precisas. Se utiliza el procedimiento de recuento de mesófilos totales, para la obtención de resultados.

Es un procedimiento de lavado con tórula (hisopo) de un área conocida de la superficie a investigar, limitada por una plantilla. “Los microorganismos recogidos por la tórula se recuperan en un volumen conocido de líquido con el que se realiza el recuento bacteriano” [3]. Generalmente se utiliza un medio tamponado como solución diluyente, se realiza, una vez efectuados los procedimientos de limpieza y desinfección, por lo general en equipos, utensilios o superficies y siempre antes de realizar cualquier actividad. Las zonas a muestrear deben encontrarse secas antes de efectuar el procedimiento para captar la mayor cantidad de microorganismos presentes.

El método permite tomar muestras, sobre zonas donde el hisopo es más efectivo para tomar microorganismos que otros métodos.

1.3.2. Método de Bioluminiscencia

Es una técnica rápida y eficiente que permite evaluar el estado higiénico de las instalaciones, además de detectar los niveles residuales de material orgánico o del tipo microbiológico. Esta técnica está basada en la reacción de las moléculas de ATP, presentes en restos celulares con enzimas de tipo luciferasa, que resulta en la emisión de luz con una intensidad proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

Esta metodología requiere el uso de hisopos para muestrear las superficies y así recoger los residuos orgánicos que se encuentran presentes. A continuación, estos hisopos se introducen en un medio reactivo y posteriormente se colocan en un luminómetro (Figura 1-3.) diseñado para leer, la medida de bioluminiscencia emitida. Por lo que esta técnica permite obtener resultados rápidos y de manera cuantitativa, dando a conocer el estado higiénico de las instalaciones.

Figura 1-3. Luminómetro 3M Clean-Trace



Fuente: Imagen obtenida en la Universidad al realizar protocolo bioluminiscencia.

1.3.2.1. Adenosín Trifosfato (ATP)

Es una molécula indicadora, sensible a la presencia de residuos biológicos debido a su presencia universal en todas las células vivas (células microbianas, animales y vegetales). Un aumento en la suciedad (residuo biológico) sobre la superficie da como resultado un aumento en la cantidad de ATP presente en dicha superficie, lo que hace que el ATP sea un indicador efectivo de la evaluación del estado de higiene de superficies.

1.3.2.2. El principio de la reacción de bioluminiscencia

Se basa en los niveles de adenosín trifosfato presentes en la superficie, para lo cual, se utiliza un hisopo que se encuentra pre-humedecido con una sustancia catiónica la que facilita la obtención de residuos de material orgánico y de ATP procedentes de células intactas.

Una vez tomada la muestra, el ATP recogido por el hisopo se pone en contacto con la enzima (luciferina-luciferasa), la enzima reacciona con cualquier residuo de adenosín trifosfato que quede sobre la cabeza del hisopo, emitiendo luz. “La intensidad de la luz es proporcional a la cantidad de ATP, y, por tanto, al grado de contaminación existente” [6]. La medición de la luz requiere el uso de un luminómetro, y los resultados aparecen en unidades relativas de luz (URL).

1.3.3. Método para la detección de biofilms

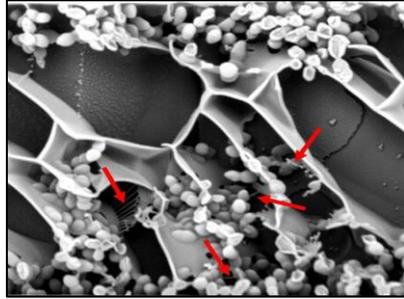
El uso de productos para la detección de biofilms surge como una herramienta para el control de la higiene de las superficies que entran en contacto con los alimentos. Debido a que estas biopelículas forman un reservorio de microorganismos pueden ocasionar contaminación en los alimentos y además ocasionar los siguientes problemas:

- Deterioro de la calidad y vida útil de los alimentos.
- Degradación de equipos, materiales y superficies en las que se encuentre.
- Riesgo en la salud de los consumidores, por la posible presencia de microorganismos dañinos para la salud.

1.3.3.1. ¿Qué es un biofilm?

Los biofilms o biopelículas se definen como una “comunidad estructurada de microorganismos ya sea de una o varias especies, que se encuentra dentro de una matriz polimérica extracelular, autoproducida por los microorganismos y adherida a una superficie viva o inerte” [2]. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que conforman la matriz del biofilm pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, entre otros; y al ser producidas por los mismos microorganismos, forman una estructura adherente en donde estos quedan atrapados, proporcionando protección frente al medioambiente, concentrando los nutrientes, otorgando una barrera de protección frente a agentes antimicrobianos y, además, de prevenir la desecación. Al producir una estructura como la que se muestra en la Figura 1-4., se genera una mayor resistencia, por lo que su remoción debe ser enfocada en productos capaces de degradar la matriz del biofilm.

Figura 1-4. Matriz extracelular y material filamentosos que une las bacterias



Fuente: <https://lacienciaysusdemonios.com/2010/06/13/imagenes-de-la-ciencia-y-la-naturaleza-biopelículas-bacterianas/>

1.3.3.2. Test TBF 300 método para la detección de biofilms

El test TBF 300 es una espuma que posee una fórmula basada en colorantes, que tiñe selectivamente la matriz del biofilm provocando su detección de forma visual. Fue creado por la empresa española Betelgeux y permite el muestreo de distintos puntos en las superficies de interés, y la detección de áreas de crecimiento de biofilms para su posterior tratamiento. Se utiliza para la comprobación de la presencia de biofilms en superficies tras las operaciones de limpieza y desinfección, mediante su aplicación en distintos puntos de muestreo. Puede ser utilizado en superficies horizontales tanto como verticales. Permite obtener resultados de forma rápida y sencilla.

Se presenta en un envase generador de espuma listo para su empleo como lo muestra la Figura 1-5. El producto se puede aplicar sobre superficies no porosas como acero inoxidable o aluminio y, tras su aclarado, resaltan los puntos en los que se ha producido el crecimiento de un biofilm, ayudando a un mejor control de la higiene, entrega resultados de forma cualitativa.

Figura 1-5. Test TBF 300



Fuente: <http://biofilmtest.com/tbf-300/>

1.4. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)

Las enfermedades que tienen origen debido a la ingesta de alimentos contaminados principalmente por microorganismos que son perjudiciales para la salud de la población reciben el nombre de ETAS. Se denominan así, debido a que el alimento actúa como vehículo de transmisión de microorganismos dañinos y sustancias tóxicas para el consumidor (Figura 1-6.).

La sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá; ya que existen factores necesarios para que se dé lugar a una ETA, tales como:

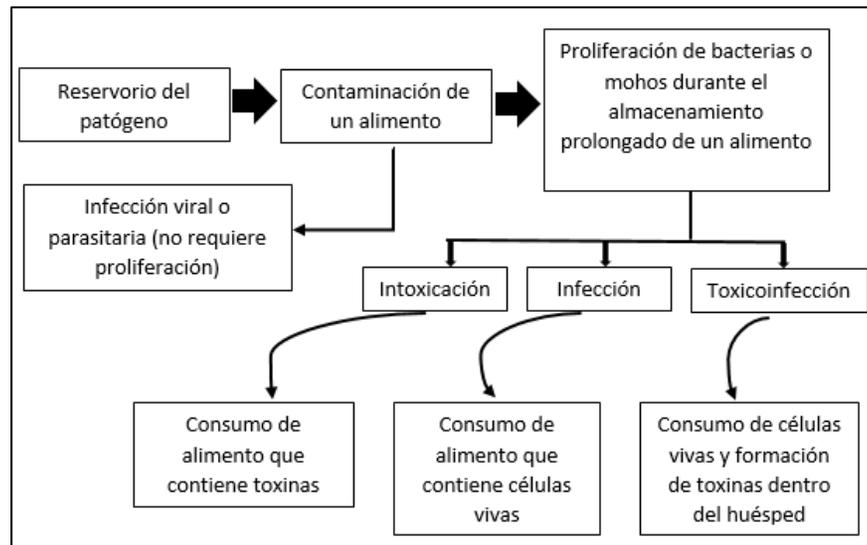
- La cantidad de un mismo patógeno sea suficiente como para causar una infección o para producir toxinas.
- El alimento debe presentar características intrínsecas, tales como, actividad acuosa, pH y nutrientes disponibles que sean capaces de sustentar el crecimiento de los patógenos.
- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- Debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) pueden clasificarse en infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxina (toxicoinfecciones):

- Infección: es el resultado del “consumo de alimentos y agua contaminados con bacterias o virus enteropatógenos” [4]. Se requiere que este tipo de microorganismos se mantenga vivo durante su consumo. Aunque las células viables se encuentren en un número reducido, son capaces de establecerse y multiplicarse en el tracto digestivo de la persona provocando la infección.
- Intoxicación: este tipo de enfermedad se produce debido a la “ingestión de toxinas bacterianas preformadas o de mohos (micotoxinas), que crecen en los alimentos” [4]. Una vez que se genera la toxina no será necesario una célula viable durante el consumo del alimento. La toxina debe encontrarse presente de forma activa en el alimento contaminado.
- Toxicoinfección: ocurre debido a una alta ingesta de bacterias patógenas viables que se encuentran en el agua, en alimentos contaminados y que son capaces de

esporular, colonizar o morir y liberan toxinas preformadas provocando la enfermedad.

Figura 1-6. Secuencia de eventos que ocasionan una ETA causada por bacterias y virus



Fuente: Fundamentos de Microbiología de los alimentos, página 186. [4]

Entre las enfermedades de mayor relevancia producidas por contaminación en los alimentos se encuentran:

- Campilobacteriosis: se produce debido a especies del género *Campylobacter* en donde las más comunes son *Cam.jejuni* y *Cam.coli* produciendo enfermedades diarreicas. Son bacilos Gram negativos oxidasa positivo, móviles con flagelos.
- Escherichia coli patogénica: es una bacteria móvil, anaeróbica facultativa, no esporulante, con forma de bastón, existen más de un tipo de cepas entre las cuales se encuentra *E.coli* O157:H7 enterohemorrágica la que provoca el síndrome urémico hemolítico.
- Salmonelosis: es producida por bacilos pertenecientes al género *Salmonella*, por lo general móviles gracias a flagelos peritricos, aunque pueden existir cepas que son inmóviles. Esta enfermedad se caracteriza por trastornos gastrointestinales.
- Listeriosis: causada por *Listeria monocytogenes*, una bacteria anaeróbica facultativa, Gram positiva no esporulante con forma de bastón. Provoca dos formas de enfermedad: gastroenteritis febril y enfermedades sistémicas invasivas.

Para evitar este tipo de brotes dentro del área en la que los alimentos son elaborados y preparados, es necesario mantener la limpieza, realizar los respectivos monitoreos de las zonas, principalmente las que entran en contacto con los alimentos, tal como se mencionó anteriormente dentro de este capítulo, además, de una correcta implementación de los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento.

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El presente estudio se desarrolló en las dependencias del Servicio de Alimentación de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar; específicamente en el área de la cocina, durante los meses de Diciembre del 2016 y Enero del año 2017, en donde se escogieron dos zonas a muestrear: la sala de preelaborado en donde, seleccionan, sanitizan y cortan la materia prima; y la sala de cuarto frío en la que reciben el alimento, cocido o crudo y prácticamente listo para servir. Los sitios de muestreo se escogieron en conjunto con el profesor guía y la encargada del Servicio de Alimentación de acuerdo a las necesidades propias de cada lugar.

Sobre las áreas a analizar se escogen los mesones de acero inoxidable debido a que se tiene una mayor manipulación de los alimentos sobre estos, por lo que las probabilidades de ocurrencia en cuanto a contaminación cruzada son más altas. El n para cada muestreo y para cada análisis realizado fue de cinco. En el caso de las mediciones realizadas por el luminómetro, para el cuarto frío; se deciden efectuar dos mediciones: una al momento de comenzar los muestreos y otra luego de limpiar la superficie, con tan solo un paño y un poco de agua; todo esto, para poder comparar el cambio existente en las cantidades de unidades relativas de luz encontradas en ambos casos. Solo se realiza en esta zona debido a la mayor cantidad de emisiones encontradas. Cabe mencionar que los muestreos realizados en ambas zonas se efectúan bajo condiciones posteriores a la limpieza realizada por el personal, por lo que se deberían encontrar las condiciones óptimas para manipular alimentos.

Para la evaluación de las áreas, las técnicas utilizadas conllevan diferentes fundamentos; el test TBF 300 tiñe de forma selectiva la matriz del biofilm, el método de análisis por hisopado determina la carga microbiológica presente y el luminómetro mide el nivel de higiene de la superficie. Para efectuar el monitoreo de las dos áreas seleccionadas se proceden a realizar tres visitas a las instalaciones, cada una en una semana diferente para comparar los cambios en la efectividad que se tuvo sobre las prácticas de limpieza y desinfección; la primera visita es avisada a la encargada del servicio de alimentación acordando la hora de llegada y las dos últimas son hechas de manera imprevista comparando los cambios dentro de las condiciones higiénicas de cada zona.

El resultado obtenido en el recuento de microorganismos fue comparado con los niveles aceptables sobre el control de superficies, utilizado por La Organización Mundial de la Salud y La Comunidad Económica Europea, ya que estos mismos parámetros son utilizados por el Instituto de Salud Pública. Para la medición realizada por el luminómetro se determinará el nivel de variabilidad de los resultados obtenidos por cada muestra analizada y de esta manera comprobar la confiabilidad de las mediciones realizadas; además, con respecto a los resultados obtenidos en la zona de cuarto frío se observará la variación de los niveles de URL conseguidos al inicio del muestreo y aquellos que fueron obtenidos posteriormente a la limpieza realizada por la encargada del muestreo. En el caso de la espuma que tiñe el biofilm de forma selectiva este proporcionará un análisis visual del estado de las superficies analizadas. Finalmente se evaluará el grado de limpieza encontrado en las respectivas áreas gracias a cada uno de los resultados obtenidos por los métodos utilizados.

2.2. PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos se realizaron cada uno en las mismas zonas asignadas (mesones de acero inoxidable), el mismo día y hora; con el fin de comparar el grado de limpieza encontrado en cada área, por cada método utilizado.

Cada ensayo será descrito dentro de este capítulo de manera ordenada, separando cada sección, con sus respectivos materiales, equipos, fundamentos y metodologías.

2.2.1. Método de detección de biofilms Test TBF 300

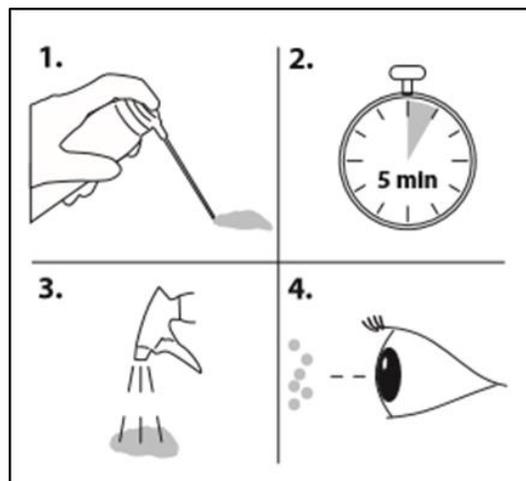
- Fundamento teórico: La espuma tiñe de forma selectiva la matriz exopolimérica de los biofilms, sin interferencias por parte de la mayoría de los residuos habituales de la industria alimentaria. Este ensayo proporciona información cualitativa sobre la presencia de biofilms en las superficies estudiadas y no sustituye a los métodos oficiales para el control de las condiciones higiénicas.
- Materiales
 - Test TBF 300, Test de detección de biofilms, proveedor Betelgeux, S.L., código A1451202.

- Procedimiento:

1. Seleccionar la superficie de interés y aplicar la espuma TBF 300 sobre un área aproximada de 10 cm².
2. Dejar un tiempo de contacto de 5 minutos.
3. Aclarar con agua el área de ensayo para eliminar a espuma.
4. Comprobar si, después del aclarado, permanecen restos de coloración fucsia sobre la superficie.

Nota: La permanencia de restos de colorante indica la presencia de biofilm en el área de ensayo, al ser una fuente de contaminación, se recomienda proceder a una limpieza y desinfección de la superficie de manera profunda, con el fin de destruir principalmente la matriz que es la estructura clave que contiene a todo el conjunto de microorganismos.

Figura 2-1. Aplicación Test TBF 300



Fuente: <http://biofilmtest.com/tbf-300/>

Precauciones de uso: No aplicar sobre superficies porosas que puedan retener el colorante de forma permanente (madera, tela, cartón, etc.). Se recomienda utilizar guantes durante su aplicación para evitar manchas en la piel que puedan ser difíciles de eliminar. Las aguas de aclarado pueden contener una gran cantidad de colorante que puede teñir materiales absorbentes con los que entren en contacto.

2.2.2. Método de muestreo por hisopado

Para una mayor comprensión se separó la metodología de hisopado en dos secciones la primera trata del muestreo realizado in situ y la segunda sección, aborda el momento en que las muestras son trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Viña del Mar; para realizar el recuento de microorganismos totales viables.

- Fundamento teórico: Es un procedimiento de lavado con tórula (hisopado) de un área conocida de la superficie a investigar, limitada por una plantilla. Los microorganismos recogidos por la tórula se recuperan en un volumen conocido de líquido con el que se realiza el recuento bacteriano. El objetivo es conocer la carga microbiana presente en la superficie.

- Materiales:
 - 10 tubos de ensayo con tapa
 - 10 hisopos estériles
 - Plantilla metálica de 10 x 10cm
 - Espátula
 - Matraz aforado de 100ml
 - Matraz aforado de 200ml
 - Vaso precipitado 50ml
 - Varilla de vidrio
 - Piseta
 - Pipeta
 - Pipeta graduada 10ml
 - Cofia

- Reactivos:
 - KH_2PO_4

- Equipos:
 - Balanza semi-analítica, modelo WT6002K.
 - Autoclave Oppici, modelo VC100CRL.
 - pHmetro

- Soluciones:
 - Solución stock de tampón fosfato de potasio monobásico: se pesan 3,40g de KH_2PO_4 y se disuelven en 50ml de agua destilada en un vaso precipitado. Luego se ajusta el pH a $7,2 \pm 0,2$, traspasando todo a un matraz aforado de 100ml.
 - Composición del diluyente: a partir de la solución stock diluir 0,25ml en un matraz aforado de 200ml y enrasar con agua destilada.
 - De la solución diluyente se toman 10ml y se pasan a un tubo de ensayo con tapa. Luego se someten a esterilización junto con los hisopos en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

Toma de muestras

Una vez que se tiene esterilizado el medio de transporte con el hisopo al interior del tubo de ensayo, se procede al muestreo:

1. Colocar la plantilla de 10 x 10cm sobre la superficie a muestrear.
2. Abrir el tubo y sacar el hisopo que se encuentra en su interior, eliminar el exceso de medio rozando el hisopo por las paredes del tubo.
3. Pasar el hisopo por la superficie haciendo un ángulo de 30° con la superficie de muestreo.
4. Repetir la acción 5 veces de arriba hacia abajo y 5 veces de derecha a izquierda.
5. Insertar el hisopo en el interior del tubo.
6. Realizar muestreo en 5 partes diferentes dentro del área a analizar.
7. Transportar al laboratorio mantener a temperaturas de refrigeración, no congelar.
8. Analizar antes de 24 horas.

NOTA: Para realizar el procedimiento de muestreo es necesario que la persona encargada utilice el pelo tomado, el uso de cofia, guantes estériles y delantal blanco, con el fin de evitar ser un vector de contaminación.

Además, la superficie a muestrear debe encontrarse seca, ya que de lo contrario los resultados se van a ver afectados, disminuyendo la cantidad de bacterias recogidas.

2.2.2.1 Recuento de microorganismos viables totales

- Fundamento teórico: Conocer el número total de microorganismos viables presentes en la muestra. Método de medición utilizado como indicador de las características higiénicas de la zona.

- Materiales:
 - 20 placas Petri
 - Asa Drigalsky
 - 10 pipetas graduadas 1ml
 - 2 matraz Erlenmeyer 500ml
 - Espátula
 - Pinzas para matraz
 - Piseta
 - Probeta

- Reactivos:
 - Etanol
 - Solución saturada de sulfato de cobre

- Medios de cultivo:
 - Agar nutritivo Biomark Laboratories, Cod N° B550

- Equipos:
 - Autoclave Oppici, modelo VC100CRL.
 - Balanza semi-analítica, WT6002K.
 - Estufa de esterilización
 - Estufa WTB Binder, modelo 78532.

Preparación de agar nutritivo

Pesar 8,40g de agar nutritivo en balanza semi-analítica y transferir a matraz Erlenmeyer de 500ml, agregar 300ml de agua destilada. Hervir para disolver completamente. Repetir el procedimiento para un segundo matraz Erlenmeyer (se utilizan dos matraces al ser más fáciles de manipular al momento de plaquear). Una vez disuelto el medio de cultivo se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C.

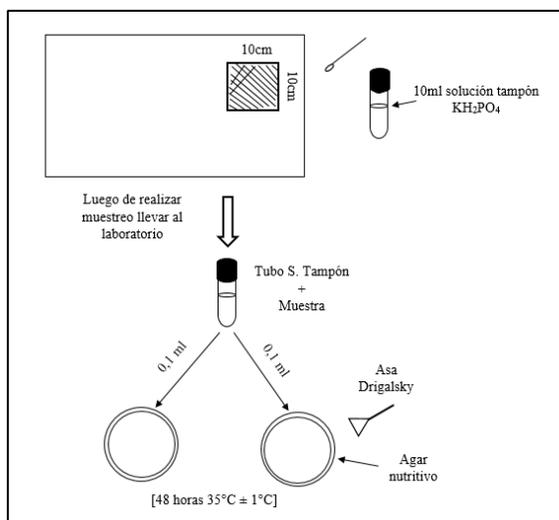
- Esterilización del material
 - Las placas Petri una vez limpias, se reúnen en paquetes, se envuelven en papel kraft y se esterilizan en la estufa junto con las pipetas graduadas.

Procedimiento:

Al recibir las muestras en el laboratorio de microbiología se procede a efectuar la inoculación de las muestras sobre el agar nutritivo, ver (Figura 2-2.):

1. Agitar vigorosamente el tubo de ensayo para liberar los microorganismos que han quedado retenidos en el hisopo.
2. Pipetear 0,1ml de la solución contenida en el tubo de ensayo e inocular sobre una placa con agar nutritivo.
3. Extender el inóculo mediante asa de Drigalsky estéril en toda la superficie del agar.
4. Realizar método por duplicado a cada tubo que contiene las muestras.
5. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Figura 2-2. Método del Hisopo



Fuente: Elaboración propia a partir del procedimiento realizado

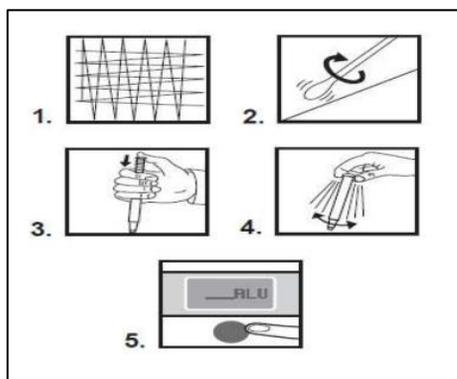
2.2.3. Control por bioluminiscencia de ATP

- Fundamento Teórico: Se basa en una reacción química gracias a la presencia de una proteína denominada luciferina, la enzima catalizadora luciferasa, oxígeno molecular y ATP, sustancia capaz de generar la energía necesaria para que se dé la reacción. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP.
- Materiales:
 - Plantilla metálica de 10 x 10cm.

- Equipos:
 - Luminómetro 3M Clean-Trace NG3, número serial TRF0593.

- Procedimiento:
 1. Encender el luminómetro.
 2. Dejar las pruebas Clean-Trace a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de usarlas.
 3. Sujetar la varilla de obtención de muestras por el mango y extraer el hisopo del dispositivo.
 4. Pasar el hisopo por la zona delimitada por la plantilla de 10 x 10cm primero en una dirección y después en la contraria, al menos cinco veces, ver (Figura 2-3.). Presionar el hisopo y girarlo mientras se obtiene la muestra para asegurar de que se realiza el proceso de forma que sea repetible y eficaz.
 5. Volver a insertar el hisopo en la varilla de obtención de muestras, introduciendo el mango de manera que quede en la misma posición en que estaba antes de usarlo.
 6. Para procesar la muestra, presionar firmemente hacia abajo el mango de la varilla de la muestra por la parte superior. El mango se deslizará hacia el interior del tubo del dispositivo, presionar hasta el fondo.
 7. Sujetar la parte superior del tubo y agitar de lado a lado con movimientos rápidos durante unos diez segundos para mezclar la muestra con el reactivo.
 8. Abrir inmediatamente la cámara de muestras del luminómetro e introducir la prueba Clean-Trace. Cerrar la tapa de la cámara y pulsar el botón de medición.
 9. Se medirá la luz que emita el dispositivo de prueba y en la pantalla aparecerá en resultado en unidades relativas de luz (URL).

Figura 2-3. Uso del Luminómetro



2.3. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Media aritmética: Corresponde a la suma de todos los valores de la variable dividida entre el número total de elementos, se utilizará para determinar el promedio de colonias obtenidas en placas de una misma muestra durante el recuento de microorganismos viables totales y para los resultados obtenidos por luminometría.

Donde:

\bar{x} = Es el símbolo de la media aritmética

$x_1 + x_2 + \dots + x_n$ = Valores de la variable (x_i = valor i de la variable, donde $i = 1, 2, 3, \dots, n$)

n = Suma del número de valores de la variable

$$\bar{x} = \frac{(x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{n}$$

- Desviación estándar: Es una medida de dispersión para los resultados de las mediciones obtenidas por luminometría, por lo que esta indicará que tan alejados se encuentran los valores respecto a la media aritmética.

Donde:

S = Desviación estándar

x = Valor de la variable

\bar{x} = Media aritmética

$n - 1$ = Número de datos menos uno

$$S = \sqrt{\left(\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}\right)}$$

- Coefficiente de variación: Permite demostrar una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad.

Donde:

C_V = Coeficiente de variación

S = Desviación estándar de la muestra

\bar{x} = Media aritmética de la muestra

$$C_V = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

- Recuento de microorganismos viables totales: Para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias encontradas por centímetro cuadrado se procede a formular lo siguiente:

N = número de colonias por ml

n= número de colonias encontradas en placa

0,1ml = corresponde a la alícuota tomada para realizar la extensión en placa

n1= Al no existir dilución se dividirá siempre por uno, ya que se sembró de manera directa.

$$N = n \times \frac{1}{n1} \times \frac{1}{0,1}$$

Entonces:

10ml = Cantidad de KH₂PO₄ utilizada en cada tubo para muestrear

X= unidades formadoras de colonias en cien cm²

$$N \text{ UFC/ml} \times 10\text{ml} = X \text{ UFC}$$

Para conocer la cantidad de UFC en un cm²:

Y = Unidades formadoras de colonias por cm²

$$X \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$Y \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

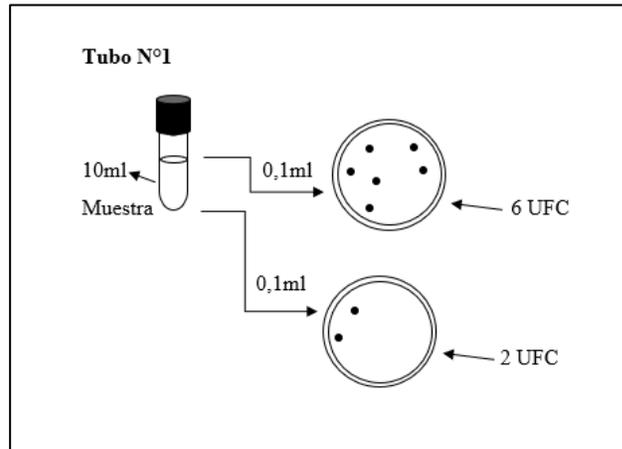
2.4. CÁLCULOS

Para el cálculo de recuento de microorganismos viables totales por análisis de hisopado se realizará lo siguiente, ver (Figura 2-4.):

Día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas

Sala de preelaborado

Figura 2-4. Ejemplo de resultados obtenidos por método de hisopado



Fuente: Elaboración propia a partir del procedimiento realizado

Se obtendrán dos resultados por cada muestra, por lo que se deberá obtener el promedio de UFC por cada tubo analizado:

$$\bar{x} = \frac{6+2}{2} = 4 \text{ UFC}$$

Entonces para conocer las unidades formadoras de colonias presentes por centímetro cuadrado se realizará lo siguiente:

$$4 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1\text{ml}} = 40 \text{ UFC/ml}$$

$$40 \text{ UFC/ml} \times 10\text{ml} = 400 \text{ UFC}$$

$$400 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$X = 4 \text{ UFC/cm}^2$$

En relación a las mediciones realizadas por el luminómetro se efectuará lo siguiente:

Día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas

Sala de preelaborado

Muestra N°1

Tabla 2-1. Ejemplo de mediciones realizadas por bioluminiscencia

N° medición	URL/100cm ²
1	113
2	114
3	113
4	118
5	115

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

$$\bar{x} = \frac{113 + 114 + 113 + 118 + 115}{5} = 114,6 \text{ [URL/100cm}^2\text{]}$$

Al obtener la media aritmética se procederá a calcular la desviación estándar:

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
113	-1,6	2,56
114	-0,6	0,36
113	-1,6	2,56
118	3,4	11,56
115	0,4	0,16
		$\Sigma = 17,2$

$$S = \sqrt{\left(\frac{17,2}{4}\right)} = 2,07$$

Para una mejor interpretación del grado de variabilidad de los resultados obtenidos se obtendrá el coeficiente de variación de manera porcentual:

$$C_V = \frac{2,07}{114,6} \times 100 = 1,81 \%$$

Con respecto al uso del Test TBF 300 para la detección de biofilm, los resultados se obtendrán por medio de un ensayo visual el cual demostrará la ausencia o presencia de biofilms.

Día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas

Sala de preelaborado

Tabla 2-2. Ejemplo de resultados obtenidos por test TBF 300

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Presencia
4	Ausencia
5	Presencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. RECuento DE MICROORGANISMOS VIABLES TOTALES

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por el método de hisopado en las salas de preelaborado y de cuarto frío. Recordar que el primer día de muestreo fue avisado con anticipación a la encargada del servicio de alimentación. Las muestras obtenidas se llevaron directamente al Laboratorio de Microbiología para realizar posteriormente el método de recuento de microorganismos totales viables.

- Muestreo realizado el día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas

Tabla 3-1. Muestreo en sala de preelaborado

Muestra	UFC/cm²
1	4
2	3
3	7
4	5
5	2

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

Tabla 3-2. Muestreo en sala de cuarto frío

Muestra	UFC/cm²
1	7
2	9
3	3
4	6
5	3

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

- Muestreo realizado el día 4 de enero del 2017 a las 12:30 horas

Tabla 3-3. Muestreo en sala de preelaborado

Muestra	UFC/cm²
1	5
2	10
3	8
4	7
5	10

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

Tabla 3-4. Muestreo en sala de cuarto frío

Muestra	UFC/cm²
1	13
2	6
3	11
4	10
5	8

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

- Muestreo realizado el día 11 de enero a las 14:30 horas

Tabla 3-5. Muestreo en sala de preelaborado

Muestra	UFC/cm²
1	9
2	7
3	3
4	11
5	6

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

Tabla 3-6. Muestreo en sala de cuarto frío

Muestra	UFC/cm ²
1	7
2	12
3	5
4	9
5	10

Fuente: Elaboración propia, mediante método de hisopado

El Instituto de Salud Pública posee a su disposición dos tablas a modo de parámetros para poder conocer el grado de limpieza de las superficies analizadas:

Tabla 3-7. Clasificación e interpretación de la OMS para el control de superficies

Nº Colonias/cm ²	Designación	Interpretación
< 3	0	Muy bueno
3-9	1	Bueno
10-29	2	Moderado
30-90	3	Insuficiente
>90	4	Malo

Fuente: Sección microbiología de alimentos del Instituto de Salud pública

Tabla 3-8. Estándares dados por la Comunidad Económica Europea

Nº De microorganismos	Interpretación
<1 colonia/cm ²	Excelente
De 2 a 10 colonias/cm ²	Bueno
11 o más colonias	Limpiar la superficie inmediatamente
Nivel de riesgo	
Nivel	Nº UFC /100 cm ²
Muy bajo riesgo	<10
Riesgo moderado	>10<100
Alto nivel de riesgo	>100<1000
Muy alto nivel de riesgo	>1000

Fuente: Sección microbiología de alimentos del Instituto de Salud pública

3.2. RESULTADOS MUESTREALES POR LUMINOMETRÍA

- Medición realizada el día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas
 - Sala de preelaborado

Tabla 3-9. Medición por luminometría en sala de preelaborado

N° medición	URL/100cm ²
1	113
2	114
3	113
4	118
5	115
Promedio	114,6 ≈ 115

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 2,07

Coefficiente de variación: 1,81%

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

Tabla 3-10. Primera medición por luminometría en sala de cuarto frío

N° medición	URL/100cm ²
1	1468
2	1537
3	1542
4	1555
5	1563
Promedio	1533

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 37,77

Coefficiente de variación: 2,4%

Muestra N°2

Tabla 3-11. Segunda medición por luminometría en sala de cuarto frío

N° medición	URL/100cm ²
1	175
2	177
3	179
4	177
5	184
Promedio	178,4 ≈ 178

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 3,44

Coefficiente de variación: 1,93%

- Medición realizada el día 4 de enero del 2017 a las 12:30 horas

- Sala de preelaborado

Tabla 3-12. Medición por luminometría en sala de preelaborado

N° medición	URL/100cm ²
1	1003
2	986
3	978
4	963
5	989
Promedio	983,8 ≈ 984

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 14,72

Coefficiente de variación: 1,49%

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

Tabla 3-13. Primera medición realizada por luminometría en sala de cuarto frío

N° medición	URL/100cm²
1	5146
2	5033
3	5089
4	5094
5	5013
Promedio	5075

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 52,93

Coefficiente de variación: 1,04%

Muestra N°2

Tabla 3-14. Segunda medición por luminometría en sala de cuarto frío

N° medición	URL/100cm²
1	1159
2	1115
3	1165
4	1131
5	1104
Promedio	1134,8 ≈ 1135

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 26,71

Coefficiente de variación: 2,35%

- Medición realizada el día 11 de enero a las 14:30 horas

- Sala de preelaborado

Tabla 3-15. Medición por luminometría en sala de preelaborado

Nº medición	URL/100cm ²
1	559
2	537
3	517
4	511
5	516
Promedio	528

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 19,97

Coefficiente de variación: 3,78%

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

Tabla 3-16. Primera medición en sala de cuarto frío

Nº medición	URL/100cm ²
1	4008
2	4097
3	4137
4	4147
5	4134
Promedio	4104,6 ≈ 4105

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 57,23

Coefficiente de variación: 1,39%

Muestra N°2

Tabla 3-17. Segunda medición en sala de cuarto frío

N° medición	URL/cm ²
1	788
2	816
3	845
4	850
5	874
Promedio	834,6 ≈ 835

Fuente: Elaboración propia, mediante medición por bioluminiscencia

Desviación estándar: 33,22

Coefficiente de variación: 3,98%

3.3. RESULTADOS TEST TBF 300

- Día 28 de diciembre a las 14:30 horas

Tabla 3-18. Muestreo con Test TBF 300 en sala de prelaborado

N° muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Presencia
4	Ausencia
5	Presencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Figura 3-7. Presencia de biofilms en sala de preelaborado



Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Tabla 3-19. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Ausencia
4	Ausencia
5	Ausencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

- Día 4 de enero a las 12:30 horas

Tabla 3-20. Muestreo con Test TBF 300 en sala de preelaborado

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Presencia
3	Ausencia
4	Ausencia
5	Ausencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Figura 3-8. Presencia de biofilm en sala de preelaborado



Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Tabla 3-21. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Ausencia
4	Ausencia
5	Ausencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

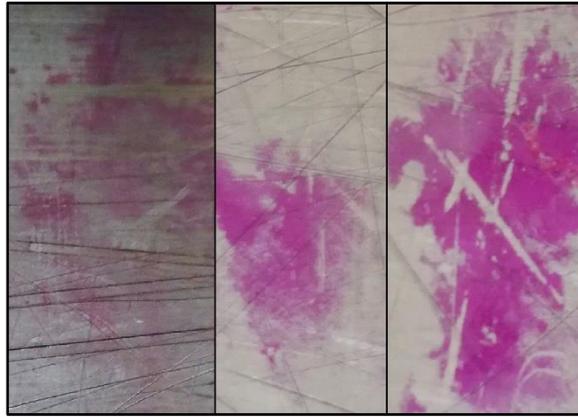
- Día 11 de enero a las 14:30 horas

Tabla 3-22. Muestreo con Test TBF 300 en sala de preelaborado

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Presencia
3	Ausencia
4	Presencia
5	Presencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Figura 3-9. Presencia de biofilms en sala de preelaborado



Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

Tabla 3-23. Muestreo con Test TBF 300 en sala de cuarto frío

Nº muestreo	P/A
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Ausencia
4	Ausencia
5	Ausencia

Fuente: Elaboración propia, mediante resultados del Test TBF 300

3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos por el método de hisopado, durante las tres visitas realizadas a ambas salas, y efectuando una comparación con los parámetros estipulados por el Instituto de Salud Pública, las superficies analizadas en todos los casos son interpretadas como buenas y representan un riesgo moderado para la posibilidad de contaminación en los alimentos.

En relación a las mediciones realizadas con el método de bioluminiscencia hubo una mayor cantidad de emisiones de URL durante las visitas posteriores a la primera visita en ambas salas, tal como se muestra en el Cuadro A-2. para la sala de preelaborado y el Cuadro A-3. para la sala de cuarto frío. Aunque hubo emisiones significativamente mayores en la sala de cuarto frío, esto puede deberse a que fueron distintas las personas que realizaron la limpieza de las áreas en los diferentes días en que se realizaron los muestreos y que cada una de las personas puede realizar la ejecución de los procesos de saneamiento de manera diferente, dado que en todos los casos se utilizaron los mismos productos para efectuar la limpieza. La diferencia encontrada en la sala de cuarto frío al inicio de comenzar el muestreo, luego de que se realizaron los procesos de limpieza y desinfección y posteriormente limpiando la superficie intencionalmente con un poco de agua para volver a evaluar la limpieza de la superficie puede definirse como una diferencia significativa, ya que los valores de URL disminuyeron notablemente, tal como se demuestra en el Cuadro A-4. en donde, por ejemplo, el día cuatro de enero del presente año fueron encontradas 5075 URL y posteriormente limpiando la superficie con un poco de agua fueron encontrados 1135 URL lo que corrobora una mala ejecución en las prácticas de saneamiento de las superficies existiendo una diferencia de un 77,64% de unidades relativas de luz encontradas. Aunque no existe ningún parámetro oficial de unidades relativas de luz para las superficies que entran en contacto con los alimentos el solo hecho de existir una mayor cantidad de URL en una superficie puede indicar un problema de higiene, por la falta de control en la correcta aplicación de los procesos de limpieza y desinfección, ya que independientemente de que no haya una relación directa entre cantidad de UFC encontradas y URL, la sola presencia de material orgánico puede contribuir a que algunos microorganismos presentes en la superficie puedan proliferar gracias a la obtención de nutrientes y posteriormente ser focos de contaminación.

El uso del luminómetro pudo entregar resultados confiables ya que los porcentajes de variación encontrados durante las tres visitas junto con todas las mediciones realizadas oscilaron entre un 1,04% y 3,98%, es un método que permite tomar acciones correctivas de forma rápida, altamente sensible pero que presenta un costo

elevado debido a la continua reposición de cartuchos que contienen los hisopos que son utilizados por el equipo.

Para la detección de biofilm en las salas se aplicó el uso del test TBF 300 que indico la presencia de biofilm en la sala de preelaborado durante las tres visitas realizadas y la nula presencia de este para la sala de cuarto frío, lo que puede deberse a que en la sala de preelaborado se realiza la selección de los alimentos, se lavan, sanitizan, pelan y cortan y donde hay mayor presencia de microorganismos debido a la presencia de materia prima que aún no ha sido tratada y como consecuencia de una mala ejecución de los procesos de saneamiento y condiciones favorables (nutrientes disponibles, pH, temperatura) existió una proliferación de biofilm en esta área. Lo que no puede asegurarse con exactitud es que la presencia de los biofilms encontrados puede ser en sí, un foco de contaminación anterior o de hace pocos días, ya que el hecho de que el método de detección solo tiñe la matriz polimérica extracelular y no permite identificar con exactitud si solo se ha detectado una estructura antigua en la que anteriormente si hubo posibles focos de contaminación o de un biofilm en estado latente. Pero el hecho de que en las tres visitas haya existido biofilm puede indicar que se encuentra en estado latente. Es importante recalcar que el solo hecho de la existencia de biofilms indica un mal manejo en las prácticas de saneamiento.

Por consiguiente y en relación a todos los datos registrados y por los resultados obtenidos durante las tres visitas realizadas el grado de limpieza para la sala de preelaborado es moderado debido a que principalmente durante las tres visitas hubo presencia de biofilms, lo que indica posibles focos de contaminación, independiente de que las UFC/cm² cumplen con los parámetros en todas las inspecciones realizadas, las URL son bastante bajas en comparación a los encontrados en la otra sala, la superficie no se encuentra en perfectas condiciones ya que algunas frutas y verduras pasan a la sala de cuarto frío crudas y son servidas directamente a los consumidores por lo que no debería existir ningún riesgo de contaminación.

La sala de cuarto frío representa un punto al que se le debe tomar mayor atención ya que en este lugar los alimentos se sirven de manera directa a los consumidores, por lo que las condiciones deben ser óptimas y la presencia de altos niveles de URL encontrados pueden contribuir a una mayor proliferación de microorganismos por lo que por ejemplo, luego de realizar una mala ejecución en los procesos de saneamiento al finalizar la jornada puede existir una alta cantidad de URL provocando una mayor cantidad de microorganismos durante la noche gracias a la obtención de nutrientes y al regresar al otro día, volver a ejecutar malas prácticas de saneamiento se mantendrá una alta cantidad de UFC en la superficie y habrá un alto riesgo de contaminación al momento de manipular las frutas y verduras y sobre todo aquellas que se encuentran crudas y que no pasan por ningún proceso de cocción. El grado de limpieza obtenido en esta área es moderado por

los altos niveles de URL independiente de la nula presencia de biofilms y la aceptación de UFC/cm².

Para las mediciones realizadas por el método de bioluminiscencia se determinó que los resultados obtenidos en cuanto a la primera visita fueron significativamente más bajos, que los días posteriores para ambas áreas; lo que puede deberse al cambio de personal que realizó la limpieza. A pesar de que el método de bioluminiscencia sea un método indirecto para el control de microorganismos en superficies la sola presencia de elevadas cantidades de unidades relativas de luz puede favorecer a una mayor proliferación de estos microorganismos en la superficie debido a la obtención de nutrientes, generando un riesgo de contaminación. El uso del luminómetro entregó resultados altamente confiables, demostró ser un método estable y que permite tomar acciones correctivas de forma rápida. Además, es posible comprobar cierta correlación entre UFC y URL como lo demuestran los gráficos B-1. y B-2. pero que no necesariamente determinará las cantidades exactas de contaminación microbiológica debido a que las URL captan además otros residuos orgánicos; pero que si representa un método viable para un monitoreo efectivo y continuo dentro de una empresa de alimentos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos según los parámetros utilizados por el Instituto de Salud Pública por el método de hisopado, se consideran aceptables para las dos salas analizadas.

El método de detección de biofilms determinó que durante las tres visitas en la sala de preelaborado hubo presencia de biofilms por lo que es importante realizar un mejor control en esta área para evitar focos de contaminación.

El empleo de los métodos de bioluminiscencia y el de detección de biofilm debe utilizarse de forma complementaria al método de hisopado ya que siempre es importante conocer la cantidad de UFC presentes una superficie.

Algunas de las recomendaciones a considerar es que luego de realizar el método de hisopado, al momento de la recuperación de microorganismos para el método de recuento es necesario agitar los tubos por bastante tiempo para poder liberar los microorganismos obtenidos por el hisopo ya que el material del hisopo puede retener microorganismos interfiriendo su recuperación. Además, al momento de realizar cualquier muestreo es necesario el uso de cofia, pelo tomado, delantal para evitar de esta manera, ser un vector de contaminación. Para el método de detección de biofilm además se requiere el uso de guantes que eviten cualquier tinción en la piel.

Es muy importante el continuo monitoreo de la correcta aplicación de los procesos de limpieza y desinfección para evitar riesgos de contaminación.

Finalmente es posible comprobar que gracias al uso de las tres metodologías utilizadas durante este experimento el grado de limpieza correspondiente para la sala de preelaborado y la sala de cuarto frío, es moderado.

BIBLIOGRAFÍA

[1] BETELGEUX, Test TBF 300. [En línea] <<http://biofilmtest.com/tbf-300/>> [Consulta: diciembre del 2016].

[2] DUNNE, W. Michael, Jr. FOCUS Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. Clinical Microbiology Reviews, 2002, Vol. 15 (2). ISSN 0893-8512. Documento PDF.

[3] INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE, Procedimiento recuento de microorganismos en suspensión por método de torunda en superficie. [En línea] <http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-077.pdf> [Consulta: diciembre del 2016].

[4] RAY, Bibek, BHUNIA, Arun. Fundamentos de Microbiología de los alimentos. Editorial McGrawHill Interamericana México, 2008. ISBN 978-607-15-0339-8.

[5] WILDBRETT, Gerhard. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia S.A., 2006. ISBN 84-200-0913-X.

[6] 3M, Guía de monitoreo de higiene por Bioluminiscencia. [En línea] <http://www.3msalud.cl/enfermeria/files/2012/11/Protocolo_Monitoreo-Biolominiscencia.pdf> [Consulta: Febrero del 2017].

ANEXOS

ANEXO A: CUADROS

Cuadro A-1. Algunas ventajas y desventajas de los métodos utilizados

Métodos utilizados durante el experimento		
Hisopado	Bioluminiscencia	Test detección biofilms
<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Adaptable a una amplia variedad de superficies.- Método altamente conocido y de uso general.- Permite determinar las UFC presentes en una superficie por lo que, si se desea conocer la presencia de patógenos con análisis posteriores se podrá averiguar.	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Método rápido, sensible y estable.- Fácil de utilizar y de almacenar.- Permite tomar acciones correctivas de forma rápida.	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Detecta de forma rápida la presencia de biofilms.- Fácil de utilizar y de almacenar.- Gran capacidad de cobertura sobre las áreas a analizar.
<p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Material del hisopo puede retener microorganismos interfiriendo su recuperación para método de recuento.- Necesita un período de incubación para obtener resultados.	<p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- No diferencia entre restos orgánicos y microorganismos presentes.- Costo elevado.	<p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- No puede utilizarse en cualquier tipo de superficie.- No se puede determinar el nivel de carga microbiológica real presente en la superficie.

Fuente: Elaboración propia mediante

Cuadro A-2. Cuadro resumen de resultados obtenidos en sala de preelaborado

Sala de preelaborado			
Días de muestreo	Promedio recuento de microorganismos (UFC/cm²)	Promedio mediciones por bioluminiscencia (URL/100cm²)	Cantidad de biofilms encontrados
28 de diciembre 2016	5	115	3
4 de enero 2017	8	528	1
11 de enero 2017	8	984	2

Cuadro A-3. Cuadro resumen resultados obtenidos en sala de cuarto frío

Sala de cuarto frío			
Días de muestreo	Promedio recuento de microorganismos (UFC/cm²)	Promedio mediciones por bioluminiscencia (URL/100cm²)	Cantidad de biofilms encontrados
28 de diciembre 2016	6	1533	Ausencia
4 de enero 2017	10	5075	Ausencia
11 de enero 2017	9	4105	Ausencia

Cuadro A-4. Porcentaje de diferencia encontrado en el cuarto frío al inicio del muestreo y luego al limpiar la superficie

Sala de cuarto frío			
Días de muestreo	Al inicio del muestreo	Luego de limpiar la superficie	Porcentaje de diferencia
28 de diciembre 2016	1533	178	88,39%
4 de enero 2017	5075	1135	77,64%
1 de enero 2017	4105	835	79,66%

ANEXO B: GRÁFICOS

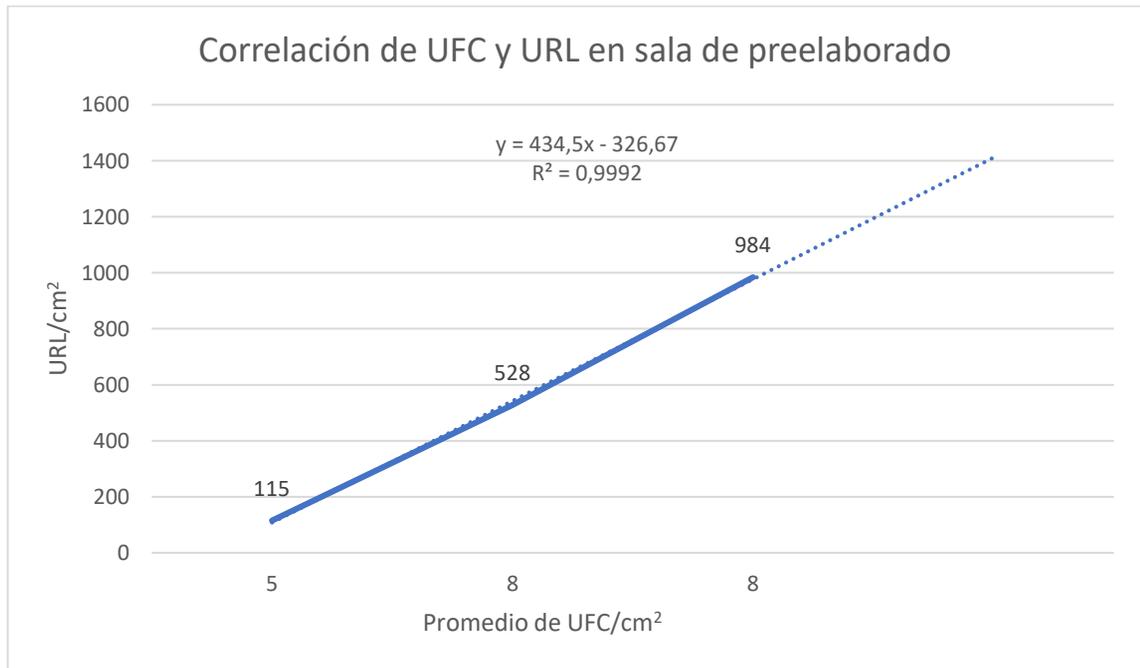


Gráfico B-1. Correlación de UFC y URL en sala de preelaborado

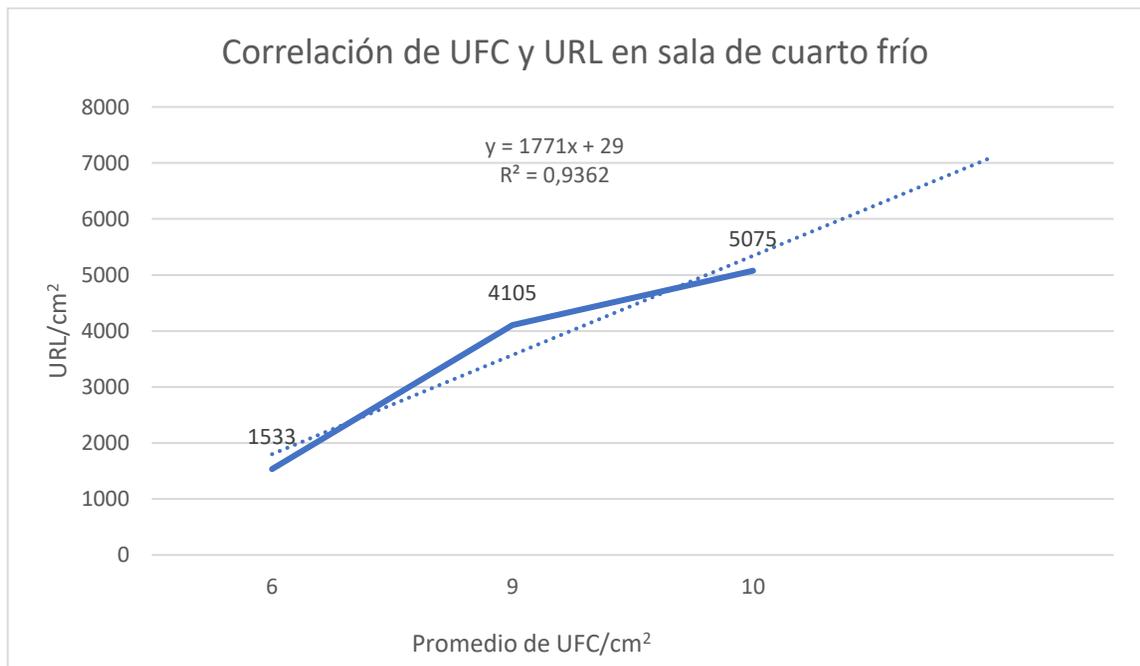


Gráfico B-2. Correlación de UFC y URL en sala de cuarto frío

ANEXO C: CÁLCULOS

C-1. Resultados obtenidos por recuento de microorganismos totales viables

Como recomendación, se han colocado solo algunos de los cálculos, debido a la gran cantidad de datos obtenidos y en la repetitividad en la forma que se calculan.

- Día 28 de diciembre 14:30 horas

Sala de preelaborado:

Tubo N°1

6 UFC y 2 UFC

$$\bar{x} = \frac{6+2}{2} = 4$$

$$4 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 40 \text{ UFC/ml}$$

$$40 \text{ UFC/ml} \times 10\text{ml} = 400 \text{ UFC}$$

$$400 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$X = 4 \text{ UFC/cm}^2$$

Sala de cuarto frío:

Tubo N°1

8 UFC y 5 UFC

$$\bar{x} = \frac{8+5}{2} = 6,5 \text{ UFC}$$

$$6,5 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 65 \text{ UFC/ml}$$

$$65 \text{ UFC/ml} \times 10\text{ml} = 650 \text{ UFC}$$

$$650 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$X = 6,5 \approx 7 \text{ UFC/cm}^2$$

- Día 4 de enero 12:30 horas

Sala de preelaborado:

Tubo N°2

9 UFC y 11 UFC

$$\bar{x} = \frac{9+11}{2} = 10$$

$$10 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 100 \text{ UFC/ml}$$

$$100 \text{ UFC/ml} \times 10 \text{ ml} = 1000 \text{ UFC}$$

$$1000 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$\mathbf{X = 10 \text{ UFC/cm}^2}$$

Sala de cuarto frío:

Tubo N°2

8 UFC y 4 UFC

$$\bar{x} = \frac{8+4}{2} = 6$$

$$6 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 60 \text{ UFC/ml}$$

$$60 \text{ UFC/ml} \times 10 \text{ ml} = 600 \text{ UFC}$$

$$600 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$\mathbf{X = 6 \text{ UFC/cm}^2}$$

- Día 11 de enero 14:30 horas

Sala de preelaborado:

Tubo N°4

15 UFC y 7 UFC

$$\bar{x} = \frac{15+7}{2} = 11$$

$$11 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 110 \text{ UFC/ml}$$

$$110 \text{ UFC/ml} \times 10 \text{ ml} = 1100 \text{ UFC}$$

$$1100 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$X = 11 \text{ UFC/cm}^2$$

Sala de cuarto frío:

Tubo N°4

6 UFC y 11 UFC

$$\bar{x} = \frac{6+11}{2} = 8,5$$

$$8,5 \times \frac{1}{1} \times \frac{1}{0,1} = 85 \text{ UFC/ml}$$

$$85 \text{ UFC/ml} \times 10 \text{ ml} = 850 \text{ UFC}$$

$$850 \text{ UFC} \rightarrow 100 \text{ cm}^2$$

$$X \rightarrow 1 \text{ cm}^2$$

$$X = 8,5 \approx 9 \text{ UFC/cm}^2$$

C-2. Resultados muestrales realizados por análisis con luminómetro

- Día 28 de diciembre del 2016 a las 14:30 horas
 - Sala de preelaborado

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
113	-1,6	2,56
114	-0,6	0,36
113	-1,6	2,56
118	3,4	11,56
115	0,4	0,16

$$\bar{X} = 114,6$$

$$\Sigma = 17,2$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{17,2}{4}\right)} = 2,07$$

Coficiente de variación:

$$Cv = \frac{2,07}{114,6} \times 100 = 1,81\%$$

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
1468	-65	4225
1537	4	16
1542	9	81
1555	22	484
1563	30	900
$\bar{X} = 1533$		$\Sigma = 5706$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{5706}{4}\right)} = 37,77$$

Coefficiente de variación:

$$C_v = \frac{37,77}{1533} \times 100 = 2,46 \%$$

Muestra N°2

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
175	-3,4	11,56
177	-1,4	1,96
179	0,6	0,36
177	-1,4	1,96
184	5,6	31,36
$\bar{X} = 178,4$		$\Sigma = 47,2$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{47,2}{4}\right)} = 3,44$$

Coefficiente de variación:

$$C_v = \frac{3,44}{178,4} \times 100 = 1,93\%$$

- Día 4 de enero del 2017 a las 12:30 horas
 - Sala de preelaborado

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
1003	19,2	368,64
986	2,2	4,84
978	-5,8	33,64
963	-20,8	432,64
989	5,2	27,04
$\bar{X} = 983,8$		$\Sigma = 866,8$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{866,8}{4}\right)} = 14,72$$

Coefficiente de variación:

$$C_V = \frac{14,72}{983,8} \times 100 = 1,49\%$$

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
5146	71	5041
5033	-42	1764
5089	14	196
5094	19	361
5013	-62	3844
$\bar{X} = 5075$		$\Sigma = 11206$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{11206}{4}\right)} = 52,93$$

Coefficiente estándar:

$$C_V = \frac{52,93}{5075} \times 100 = 1,04\%$$

Muestra N°2

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
1159	24,2	585,64
1115	-19,8	392,04
1165	30,2	912,04
1131	-3,8	14,44
1104	-30,8	948,64

$$\bar{X} = 1134,8$$

$$\Sigma = 2852,8$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{2852,8}{4}\right)} = 26,71$$

Coficiente estándar:

$$C_V = \frac{26,71}{1134,8} \times 100 = 2,35\%$$

- Día 11 de enero del 2017 a las 14:30 horas
- Sala de preelaborado

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
559	31	961
537	9	81
517	-11	121
511	-17	289
516	-12	144

$$\bar{X} = 528$$

$$\Sigma = 1596$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{1596}{4}\right)} = 19,97$$

Coficiente de variación:

$$C_V = \frac{19,97}{528} \times 100 = 3,78\%$$

- Sala de cuarto frío

Muestra N°1

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
4008	-96,6	9331,56
4097	-7,6	57,76
4137	32,4	1049,76
4147	42,4	1797,76
4134	29,4	864,36
$\bar{X} = 4104,6$		$\Sigma = 13101,2$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{13101,2}{4}\right)} = 57,23$$

Coficiente de variación:

$$C_V = \frac{57,23}{4104,6} \times 100 = 1,39\%$$

Muestra N°2

X	X- \bar{X}	(X- \bar{X}) ²
788	-46,6	2171,56
816	-18,6	345,96
845	10,4	108,16
850	15,4	237,16
874	39,4	1552,36
$\bar{X} = 834,6$		$\Sigma = 4415,2$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\left(\frac{4415,2}{4}\right)} = 33,22$$

Coficiente de variación:

$$C_V = \frac{33,22}{834,6} \times 100 = 3,98\%$$