



1. GAIA. LAGINKETA



- **ARAU OROKORRAK**
- **LAGINEN GARRAIOA ETA KONTSERBAZIOA**
- **LAGINEN PROZESAKETA**

Arana, I. eta M. Orruño

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

1. LAGINKETA



Aztertze materialaren zati bat (*lagina*) lortu:

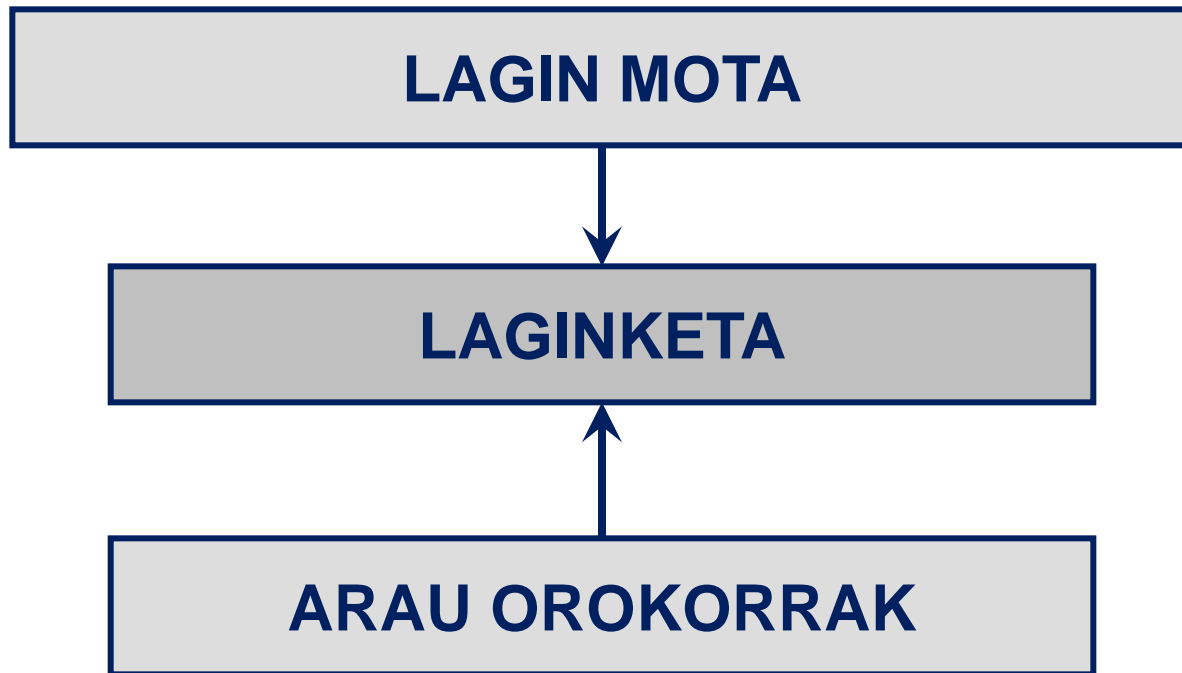
- sistemaren ezaugarri mikrobiologikoak ezartzeko
- mikroorganismo edo mikroorganismo-talde fisiologiko zehaztuen presentzia edo absentzia aztertzeke
- mikroorganismoen jarduera batzuk kuantifikatzeko
- mikroorganismoak bakartzeko

LAGINKETA



Laginketa baldintzapean jar dezaketen hainbat alderdiren gainean hausnartzea beharrezkoa da edozein lagin lortu baino lehen.

Laginketaren kalitateak emaitzen kalitatean eragina izango duela kontuan hartu behar dugu.



ARAU OROKORRAK



- Lagina **adierazgarria** izan behar da.
- Laginaren **kopurua nahikoa** izan behar da.
- Laginaren **kutsadura saihestu** behar da.
- **Une egokian** hartu behar dira.
- **Etiketatzea** eta identifikazioa zuzenki egin behar dira.
- **Ontziek garbi** eta **esteril** egon behar dira eta **egokiak** izan behar dira.
- **Ahalik eta azkarren bidali** behar dira laborategira.
- Arau hauek betetzen ez dituzten laginak **atzera bota** behar dira, baita ere zalantzazkoak.

Laginaren adierazgarritasuna (1)



Adibidea: Ibaiaren ikerketa eta karakterizazio mikrobiologikoa

Oso egun euritsu batean, ausaz aukeratutako puntu baten ur-lagin **bakarra** hartzen da.

→ Emaitzak **ez dira adierazgarriak** (ez dute mikroorganismo-komunitatea adierazten)

Laginaren adierazgarritasuna (1)



Akatsak:

- Parametro fisiko-kimikoak aldatzen dira ibaiaren ibilbidean zehar eta denboran zehar → aldaketa kuantitatibo eta kualitatiboak mikroorganismo-populazioetan
- Euriaren ondorioz:
 - Ur-emariaren igoera → laginaren diluzioa
 - Hondoko sedimentuak mugitzen dira → ez-ohiko populazioak agertuko dira
 - Agian, materia organikoaren ekarpenak

Laginaren adierazgarritasuna (1)



Akatsen zuzenketa:

- Laginketa egiteko leku adierazgarriak aukeratu
= laginketa-lekuak
 - Zenbat?
 - Non?
- Laginketaren aldizkakotasuna?
- Zenbat lagin hartu behar dira laginketa-leku bakoitzean?

Laginaren adierazgarritasuna (2)



Adibidea: Supermerkatu baten jogurten ikerketa mikrobiologikoa

Dozena bat jogurt, guztiak mota eta sorta berekoak

Akatsak:

- Lagin kopurua txikia da
- Produktuaren sorta bakarra erabiltzen da
- Badago aurreko analisi/kontrol erregularrik?

Laginaren adierazgarritasuna (2)



- **EZ dago kontrol erregularrik**

√ Sortaren unitateak

Sorta handiak → %1

Sorta txikiak → %10

- **Kontrol erregularrak egiten dira**

Sorta bakoitzeko 5 – 10 lagin

Laginen hautaketa. Adibidea



Sortak 2.800 elementu dauzka (**N**) eta 28 lakin (**n**) hartu behar ditugu.

1. 2.800 elementuak zenbakitu
2. $K = N/n = 2.800/28 = 100$
3. Ausaz aukeratuko dugu 1 eta 28 arteko zenbaki bat. Adibidez: 23
4. Hartu behar ditugun laginak hurrengoak izango dira:

1go unitatea: 23

2. unitatea: $23 + 100 (K) = 123$

3. unitatea: $23 + 200 = 223$

.....

28. unitatea: $23 + 2.700 = 2.723$

Laginaren adierazgarritasuna (3)



Adibidea: Lagin klinikoak

Lagin klinikoek ezaugarri bereziak dauzkate.

- Kasu honetan, laginaren adierazgarritasuna ez dago lagin kopuruarekin erlazionatua.
- Orokorrean, lagin **bakarra**.

Laginaren adierazgarritasuna (3)



Lagin klinikoaren adierazgarriak izateko:

- Mikrobioen aurkako tratamendua hasi baino lehen hartu
- Lagina hartzeko, mikroorganismoa aurkitzeko probabilitate handia eta kutsaduraren probabilitate txikia dituen leku aukeratu
- Gaixotasunaren fase egokienean hartu

Lagin kopurua



Nahikoa izan behar da ikerketa osoa egiteko
Lagin mota eta ikertzeko sistemaren arabera

Ur-laginak analisi sanitarioak egiteko: 250 ml gutxienez.

Elikagaien laginak: 200 g elikagai solido

200 ml elikagai likido

(kantitate handiagoak hartzea gomendatzen da)

Lagin klinikoak: laginaren arabera

Laginen etiketatzea eta identifikazioa



Laginak hartzeko erabilitako ontziak **errotulatu** behar dira:

- Laginak hartu aurretik eta errotulatzaile iraunkorra erabiliz
- Laginen identifikazioa baimentzen duten erreferentziak erabili
- Laginketaren txostenean idatzi

Ikerketa ekologikoak



- Data eta ordua
- Laginketa-lekua
- Sakontasuna
- Gertaera aipagarriak

Osasun-arloko ikerketak: Ur-laginak



- Analisisien eskatzailearen datuak
- Ur-jatorriaren datuak: lekua, udalerrria, hartzeko data eta ordua, etab.
- Ur mota: naturala edo tratatuta (tratamendu mota)

Osasun-arloko ikerketak. Elikagaien laginak



- Enpresaren datuak
- Fabrikatzaile, saltzaile edo inportatzailearen datuak
- Laginketaren arrazoia
- Laginketaren data, ordua eta lekua
- Lagina osatzen duten elikagai motak
- Sortaren unitate kopurua, tamaina eta marka
- Laginketa-teknika
- Produktuaren tenperatura lagina hartzeko unean
- Biltegiratze-tenperatura
- Toxiinfekzioaren susmoa badago:
 - Gaixotasunaren sintomak
 - Kasuaren ikerketa epidemiologikoa
 - Laginak zigilatu behar dira

Osasun-arloko ikerketak. Lagin klinikoak



- Pazientearen identifikazioa (adina, sexua)
- Lagin mota eta jatorria
- Data eta ordua
- Eskatzen diren probak
- Mikrobioen aurkako tratamendua?

Ontzien ezaugarriak



- Garbiak, lehorrak eta esterilak
- Tamaina egokia, laginaren bolumena kontuan hartuta
- Hermetikoak, esterilizatu ondoren ez kutsatzeko
- Materia organikorik edo elementu alkalikorik askatzen ez duten materialezkoak
- Laginaren osagaiekin erreakzionatzen ez dutenak

Ontzi motak



Egokiena aukeratu: haustura edo hondatzea saihesteko, laginketa, kontserbazioa eta garraioa errazteko.

- Aho zabala eta itxigailua dituzten beirazko ontziak (ur-laginak)
- Aho zabala duten plastikozko ontziak (lagin likidoak)
- Plastikozko poltsak (solidoak eta likido baten bolumen txikia)
- Xiringak (lagin patologikoak)
- Hisopoak
- Beirazko portak
- Beste batzuk



Lagingailuak



- Mikroorganismoen kopurua eta aktibitatea EZ ditu aldatu behar
- Ez da kanpoko mikroorganismoekin kutsatu behar

EZ dago lagingailu mota guztietarako balio duen tekniarik edo lagingailurik

Lagingailuak



EZ dago lagin mota guztietarako balio duen tekniarik edo lagingailurik

- Ur-laginak: sakontasuna eta ikerketa mota
- Lurraren edo sedimentuaren laginak
- Aire-laginak
- Elikagaien laginak: gogortasuna
- Gainazalen laginak
- Lagin klinikoak: mota

Lagingailuak

- [Hondakin-uraren laginketa](#)
- [Van Dorn water sampler](#)
- [In Situ Water Sampler](#)
- [Lagingailuak](#)



U.S. Environmental Protection Agency, Chicago, IL
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosette_sampler_EPA.gif?uselang=es
[Creative Commons Attribution/Share-Alike License](#)



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Niskin_bottle_hg.jpg?uselang=es



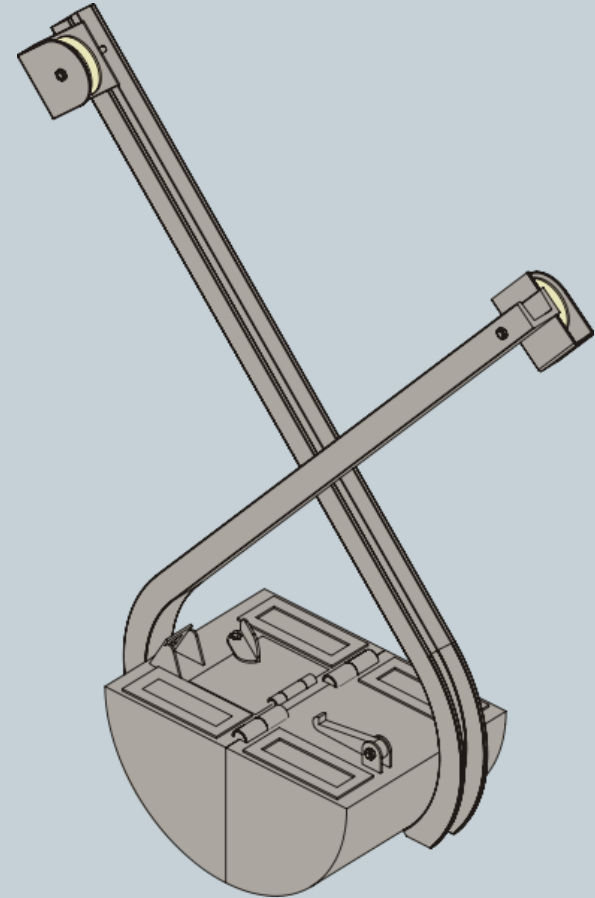
StevenVanderwerff http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Researchers_using_Niskin_bottle_to_collect_water_sample_%C2%B7_DN-SD-01-00282.JPEG?uselang=es

Sedimentuen lagingailuak

- Corer
- Dragak



[Hannes Grobe, AWI
http://commons.wikimedia.org/wiki/
File:Piston-corer_model_hg.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Piston-corer_model_hg.jpg)



[Hans Hillewaert
http://en.wikipedia.org/wiki/Meiobent
hos#mediaviewer/File:Van_Veen.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Meiobenthos#mediaviewer/File:Van_Veen.svg)

Aire-laginak



Sedimentazioa (hazkuntza-medioa duten plakak irekiak uzten dira denbora zehaztuan) – $\text{CFU}/\text{cm}^2 \text{ h}_{\text{esp}}$

Ez da kuantitatiboa, konparatiboa baizik.

Laginaren bilketa ingurune likidoan (burbuilak egin salda edo diluitzaile batean zehar) – CFU/cm^3 aire

Iragazketa (iragazkia hazkuntza-medioan kokatzen da) – cfu/cm^3 aire

Inpaktazioa (hazkuntza-medioaren gainean zuzenean iragaztea) – CFU/cm^3 aire

Lagingailuak



- <http://www.directindustry.es/prod/merck-millipore/muestreadores-aire-control-microbiologico-31514-456535.html>



Elikagaien laginak



Ontziratutako elikagaiak:

Hartzen diren laginak/paketeak adierazgarriak izan behar dira

Ontziratu gabeko elikagaiak:

- **Elikagai solidoak:** leku desberdinetako zatiak hartzen dira eta, aseptikoki, ontzi esteriletara pasatzen dira.

http://www.sampling.com/sterile_food_scoop.html

Elikagaien laginak



Ontziratutako elikagaiak:

Hartzen diren laginak/paketeak adierazgarriak izan behar dira

Ontziratu gabeko elikagaiak:

- **Elikagai solidoak:** leku desberdinetako zatiak hartzen dira eta, aseptikoki, ontzi esteriletara pasatzen dira.
- **Elikagai likidoak,** likidoa homogeneizatzen da eta laginak ontzi esteriletara pasatzen dira aseptikoki.

GARRAIOA ETA BILTEGIRATZEA



- Ontzia haustu gabe
- Neurtzeko parametroen aldaketarik gabe
- Garraio azkarra
- Orokorrean, tenperatura baxuan
- Lehenbailehen prozesatu edo biltegiratu

GARRAIOA ETA BILTEGIRATZEA



- **Ura eta lurra** : 4-6°C, iluntasuna, 24 h gehienez
- **Ura, analisi sanitarioa**: 6°C, iluntasuna, 12-24 h gehienez
- **Ur kutsatua**: 6°C, iluntasuna, 6 h gehienez
- **Elikagaiak**: kontserbatzeko temperatura egokian
- **Lagin klinikoak**: Orokorrean, 4-6°C

Garraio-medioak



- **Helburua:**
 - Mikroorganismoak mantentzea
 - Hazkuntza saihestea

- **Ezaugarriak:**
 - Erdisolidoak
 - Tanponatuak
 - Mantenu gairik gabe
 - Agente erreduzitzaileekin

Garraio-medioak. Stuart medioa



- Aldeko pHa mantentzen du.
- Deshidratazioa saihesten du.
- Oxidazioa eta autosuntsipen entzimatikoa saihesten du.

➤ Glizerofosfatoa	10 g
➤ Sodio tioglikolatoa	1 g
➤ Sodio kloruro	0,1 g
➤ Metileno-urdina	2 mg
➤ Agarra	7,5 g
➤ Ur destilatua	1 L
pH = 7,4	

Garraio-medioak. Cary & Blair medioa



- Lagin fekalen garraioa
- *Salmonella-Shigella* eta *Vibrio* bakterioen berreskuraketa
- Laginak postaz bidal daitezke

➤ Sodio kloruroa	3 g
➤ Potasio kloruroa	0,2 g
➤ Kaltzio kloruroa	0,1 g
➤ Magnesio kloruroa	0,1 g
➤ Potasio fosfatoa	0,2 g
➤ Fosfato disodikoa	1,15
➤ Sodio tioglikolatoa	1 g
➤ Agarra	7,5 g
➤ Ur destilatua	1 L
pH = 7,4	

Anaerobiosia



- Oxigenorik gabe, laginak CO_2 edo N_2 duen ontzi batean gordetzen dira
- Anaerobiosia konprobatzeko sistema

Finkapena



- Barneko eta kanpoko egiturak mantentzeko
- Entzimak inaktibatzeko
- Mikroorganismo delikatuen azpiegitura eta morfologia babesteko
- Epe luzeetan kontserbatzeko
- Ez du baimentzen organismo bizidunen zenbaketa

Neutralizazioa

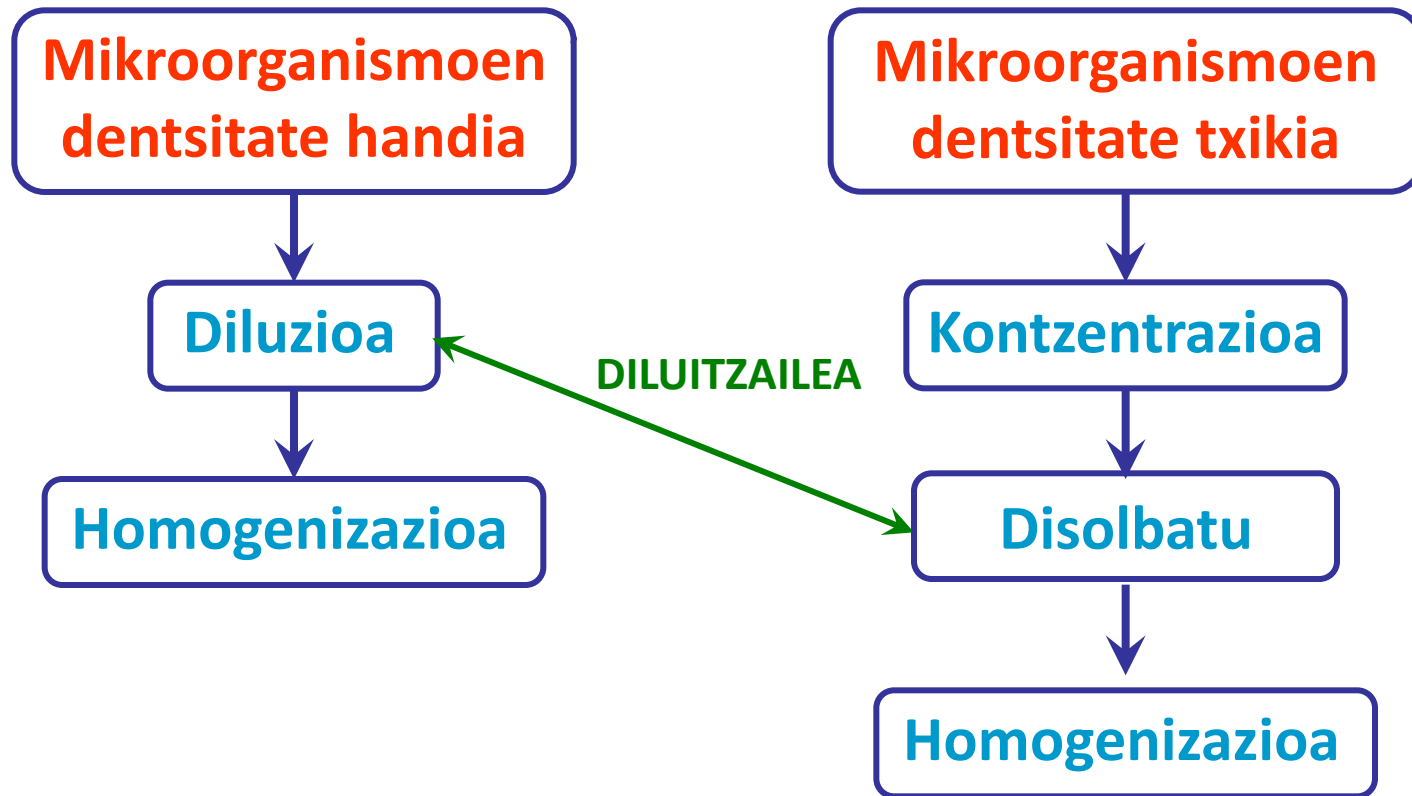


- **Agente erreduzitzaileen gehiketa**
 - **Sodio tioglikolatoa**
 - **Sodio tiosulfatoa**

PROZESAKETA



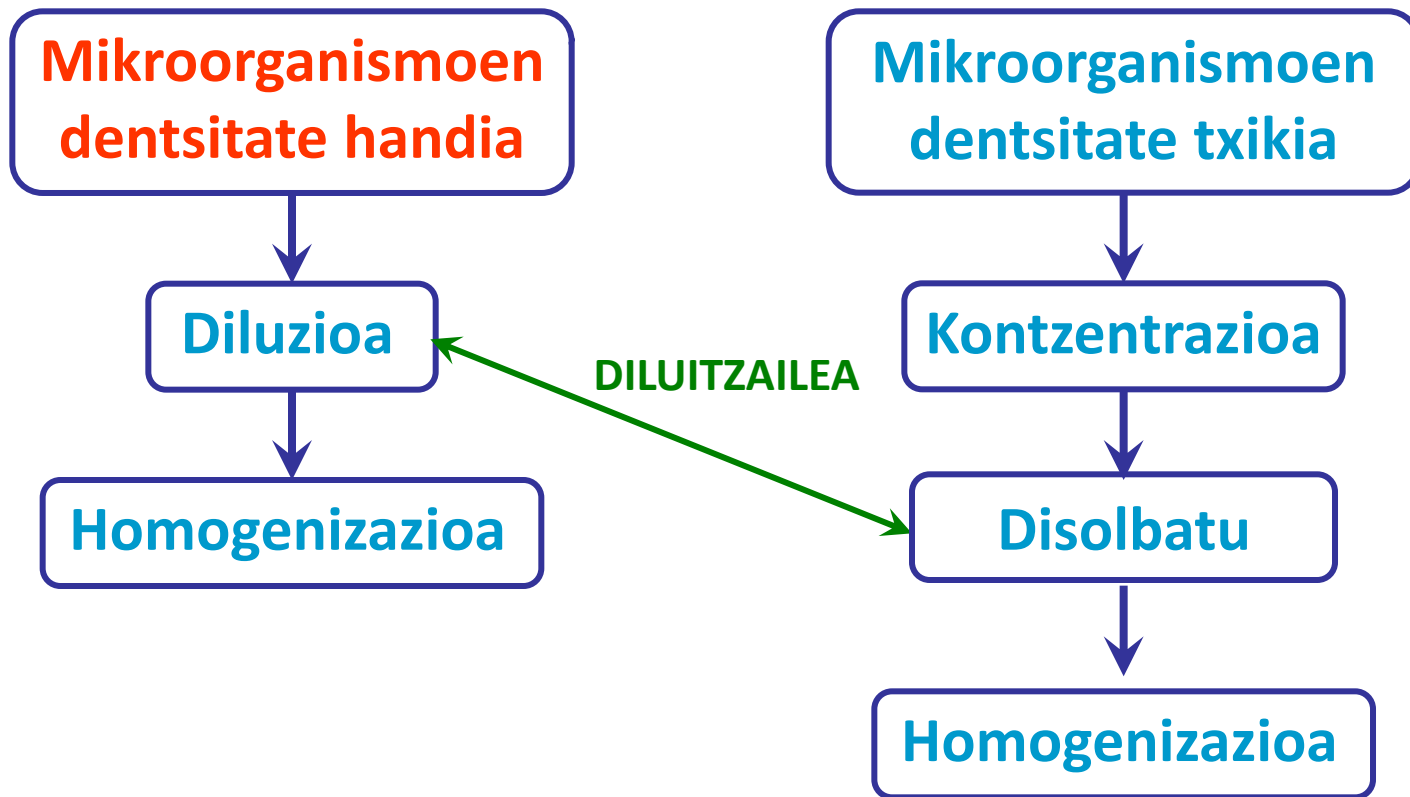
LAGIN LIKIDOAK



PROZESAKETA



LAGIN LIKIDOAK



Lagin likidoak. Diluzioa



$$\begin{array}{l} \text{1 bol Lagin} \\ \text{1/10 diluzioa} = \frac{\text{-----}}{\text{1 bol Lagin + 9 bol Diluitzaile}} \end{array}$$

$$1 \text{ ml L} + 9 \text{ ml D} = 1/10 \text{ diluzioa}$$

$$10 \text{ ml L} + 90 \text{ ml D} = 10/100 \text{ diluzioa} = 1/10 \text{ diluzioa}$$

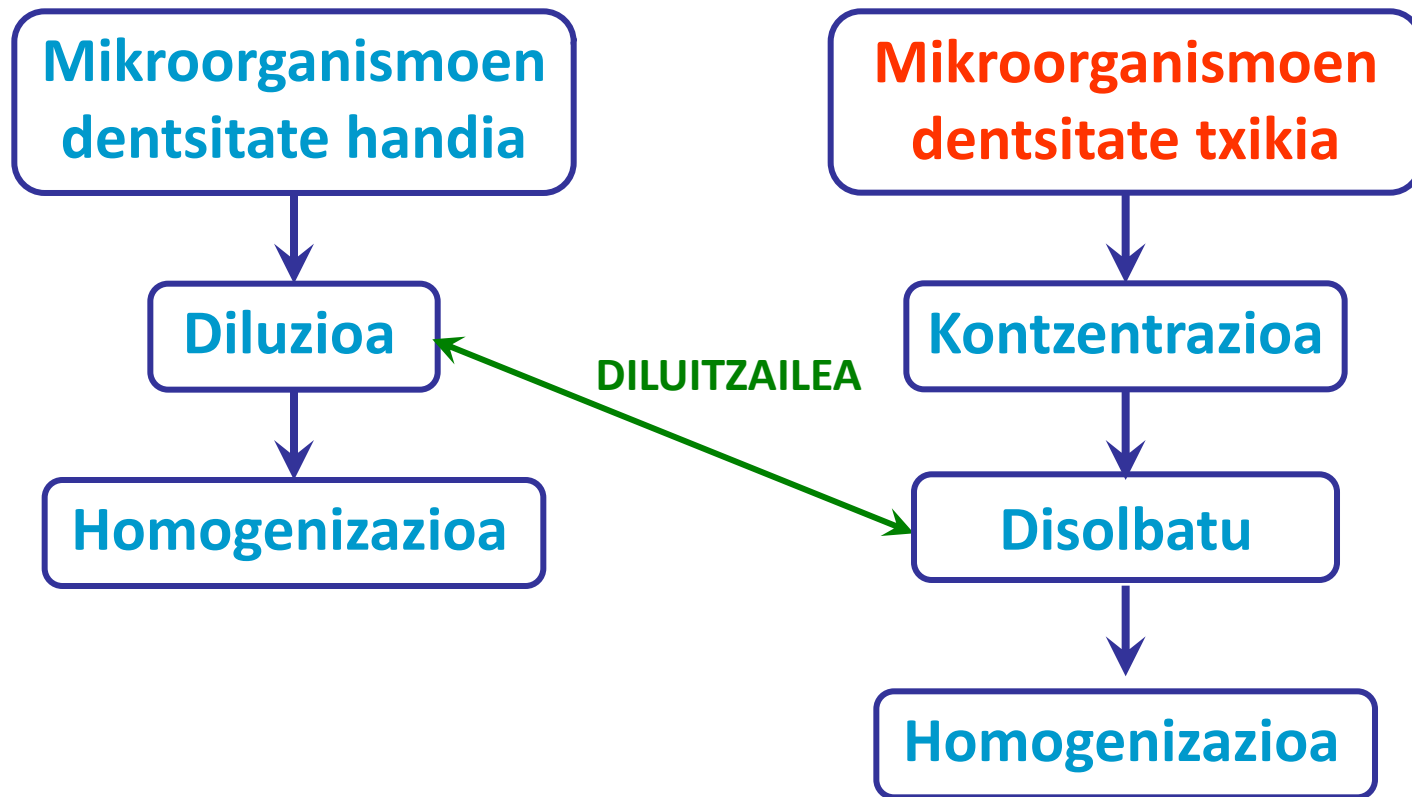
$$25 \text{ ml L} + 225 \text{ ml D} = 25/250 \text{ diluzioa} = 1/10 \text{ diluzioa}$$

$$33 \text{ ml L} + 297 \text{ ml D} = 33/330 \text{ diluzioa} = 1/10 \text{ diluzioa}$$

PROZESAKETA



LAGIN LIKIDOAK



Mikroorganismoen dentsitate txikia



Iragazketa



Lilly M.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bottle_top_disposable_filtration_set-Corning-01.jpg?uselang=es

Zentrifugazioa

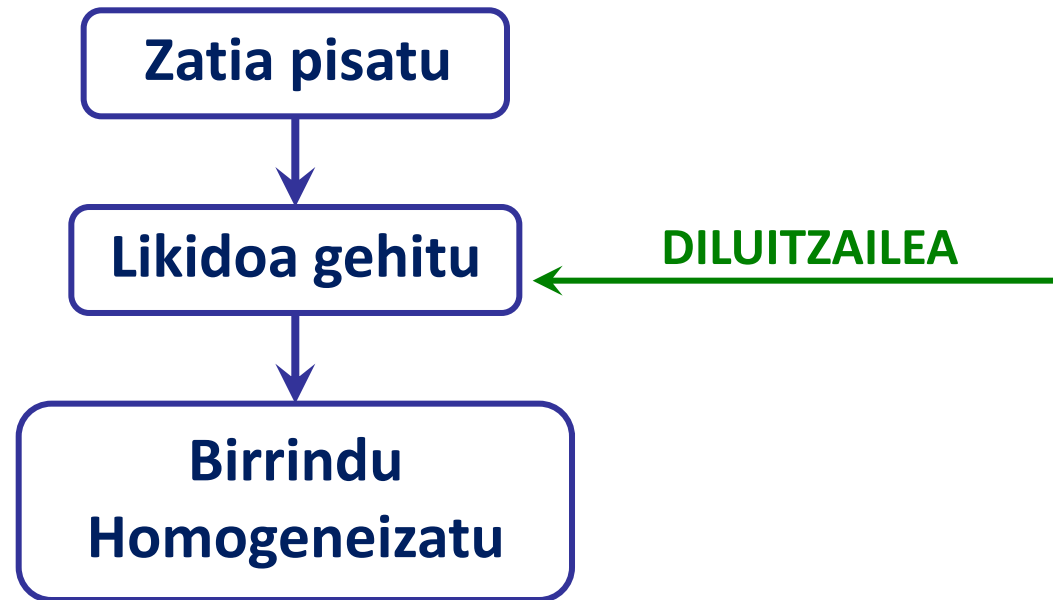


www.fws.gov/southeast/youthambassadors/meshes.html:
Cody Meshes, USFWS

PROZESAKETA. Lagin solidoak



LAGIN SOLIDOAK



Lagin solidoak.

Laginak pisatzeko teknika erraza

- Esterilizatutako ontziaren tara zehaztu
- Pisatu eta gero, laginaren zati bat sartu
- Diluitzailearen bolumen egokia gehitu

Adibideak:

10 g + 90 ml D = 10/100 diluzioa = 1/10 diluzioa

25 g + 225 ml D = 25/250 diluzioa = 1/10 diluzioa

33 g + 297 ml D = 33/330 diluzioa = 1/10 diluzioa

Lagin solidoak. Birrintzea



- Mikroorganismoen suntsipena saihesteko
- Mikroorganismoen eta haien toxinen banaketa homogeneoa lortzeko

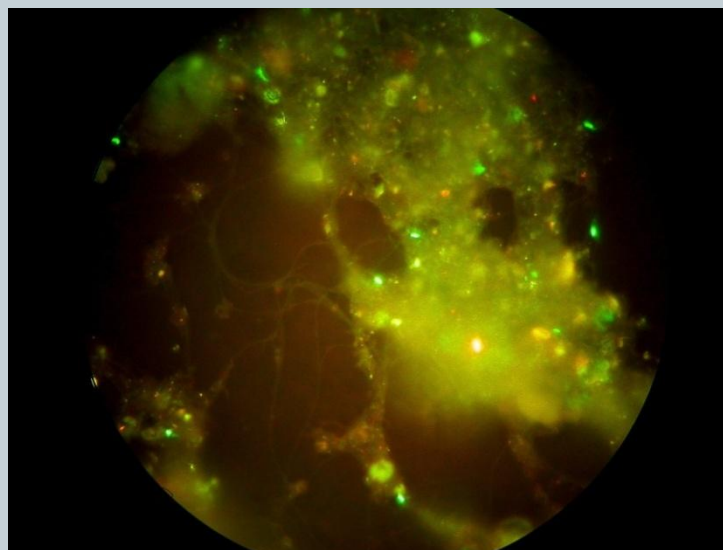
Birringailu motak:

- ✓ Pitxerra
- ✓ Palak dituen birringailua (*Stomacher*)
- ✓ Helizeak dituen birringailua

Laginen aurreprozesaketa



Zelulak eta partikulak banantzeko



Sonikazioa

Tentsioaktiboen gehiketa

Agitazioa beirazko bolak erabiliz

Laginen aurreprozesaketa



Saihesteko:

- Mikroorganismoak galtzea edo gehitzea
- Mikroorganismoen bideragarritasuna aldatzea

Mantentzeko:

- Esterilitatea

DILUITZAILEAK



- **Ez** dute eragiten mikroorganismo-populazioen aldaketa **kuantitatiborik**, ezta **kualitatiborik** ere
- Laginak eta diluzioak prestatzeko erabiltzen dira

DILUITZAILE OHIKOENAK

- **Ur destilatu esterila**
- **Itsasoko ur naturala edo artifiziala (iragazia eta esterila)**
- **Gatz-soluzioa (sodio kloruro %0,85 (p/v))**
- **PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*, PBS)**
- **Triptona-ura (*Tryptone Water*, TW)**
- **Ringer soluzioa (¼)**
- **Peptona-ur tanponatua**

PBS tanpoia



- **Sodio kloruroa** **8 g**
- **Potasio kloruroa** **0,2 g**
- **Fosfato disodikoa** **1,15 g**
- **Potasio fosfatoa** **0,2 g**
- **Ur destilatua** **1 L**

pH = 7,3

Triptona-ura (Tryptone Water, TW)



- **Triptona** **10 g**
 - **Sodio kloruroa** **5 g**
 - **Ur destilatua** **1 L**
- pH = 7,5

Ringer soluzioa (1/4)



- **Sodio kloruroa** 2,25 g
- **Potasio kloruroa** 0,105 g
- **Kaltzio kloruroa** 0,12 g
- **Sodio bikarbonatoa** 0,05 g
- **Ur destilatua** 1 L

pH = 7

Peptona-ur tanponatua



- **Peptona** **10 g**
- **Sodio kloruroa** **5 g**
- **Fosfato disodikoa** **9 g**
- **Potasio fosfatoa** **1,5 g**
- **Ur destilatua** **1 L**

pH = 7