

## Tema 1. Muestreo.

- NORMAS GENERALES
- TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS
- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Arana, I. y M. Orruño  
Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

## 1. TOMA DE MUESTRAS (MUESTREO)

Obtención de una porción de material (*muestra*) con el fin de:

- establecer las características microbiológicas de un sistema,
- determinar presencia o ausencia de determinados microorganismos o grupos fisiológicos microbianos,
- establecer y cuantificar determinadas actividades microbianas,
- aislar microorganismos.



## NORMAS GENERALES

- La muestra ha de ser **representativa**.
- La **cantidad** o el **volumen** de muestra recogidos deben ser **suficientes**.
- Debe **evitarse la contaminación** externa de la muestra.
- Deben recogerse en el **momento adecuado**.
- Deben **etiquetarse** e identificarse correctamente.
- Los **recipientes** deben estar **limpios** y **estériles** y ser **adecuados**.
- Deben **enviarse** al laboratorio lo más pronto posible.
- Deben **rechazarse** las muestras recogidas sin mantener estas normas, así como aquellas que ofrezcan dudas.

## Representatividad de la muestra (1)

### Estudio y caracterización microbiológica un río.

Una única muestra de agua de un punto elegido al **azar** y en un **día muy lluvioso**.

Resultados **no representativos** de las comunidades microbianas presentes.

## Representatividad de la muestra (1)

### Errores:

- Variación a lo largo del curso del río y con el tiempo de los parámetros físico-químicos = cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones microbianas.
- Aumento del caudal = dilución de la muestra
- Sedimentos del fondo removidos = aporte de poblaciones no habituales
- Posibles aportes de materia orgánica.

## Representatividad de la muestra (1)

### Corrección de los errores:

- Elaboración un mapa de muestreo representativo = sitios de muestreo  
¿**Cuántos** puntos de muestro? ¿**Dónde** se sitúan?
- ¿**Frecuencia** de toma de muestras?
- ¿**Cuántas** tomas de muestras hacemos en cada punto?

## Representatividad de la muestra (2)

### Estudio microbiológico de yogures en un supermercado.

Una docena de yogures del mismo tipo y del mismo lote.

### Errores:

- Número pequeño de muestras.
- Un único lote del producto.
- ¿Existen análisis regulares previos?

### Número de muestras destinadas a un análisis (2)

- **NO** hay controles regulares

$\sqrt{N}$  unidades del lote

Lotes grandes – 1% del total

Lotes pequeños – 10% del total

- **SI** hay controles regulares  
5 – 10 muestras de cada lote

### Selección de las muestras. Ejemplo

Lote de 2.800 elementos (N). Muestras a recoger 28 (n).

1. Numeramos los 2.800 elementos
2.  $K = N/n = 2.800/28 = 100$
3. Damos al azar un número entero entre 1 y 28. P.e. 23.
4. Las muestras que debemos recoger serán:

1a unidad:	23
2a unidad:	23 + 100 = 123
3a unidad:	23 + 200 = 223
.....	
28a unidad:	23 + 2.700 = 2.723

### Representatividad de la muestra (3)

Muestras clínicas presentan características peculiares.

Evidentemente representatividad no se refiere a la recogida de un número determinado de muestras.

Generalmente **una única** muestra.

### Representatividad de la muestra (3)

#### Representatividad de muestras clínicas:

- antes de iniciarse un tratamiento con antimicrobianos.
- en lugares donde sea más probable encontrar al microorganismo con la menor contaminación externa posible.
- en el estadio de la enfermedad más apropiado.

## Cantidad o volumen de muestra

---

Cantidad **suficiente** para permitir un estudio completo.

Determinado por el tipo de estudio y de sistema a muestrear.

**Muestras de agua destinadas a análisis sanitarios** - 250 ml o más.

**Muestras de alimentos** - 200 g de alimentos sólidos  
200 ml de alimentos líquidos.

(Se recomienda recoger cantidades mayores)

**Muestras clínicas** - volúmenes recomendados inferiores dependen del tipo de muestra.

## Etiquetado e identificación de las muestras

---

Los recipientes de toma de muestras deben **rotularse**.

- > Antes de la toma de muestras
- > Referencia que permita identificación
- > Informe del muestreo
- > Rotulador de vidrio resistente al agua

## Estudios de Ecología Microbiana

---

- > Fecha y hora
- > Punto de muestreo
- > Profundidad
- > Hechos reseñables

## Estudios de Interés Sanitario. Muestras de Agua

---

- > Datos del solicitante del análisis.
- > Datos del origen del agua: lugar, término municipal, fecha y hora de la captación, etc.
- > Indicar el tipo de agua: natural o tratada (tipo de tratamiento).

## Estudios de Interés Sanitario. Muestras de Alimentos

- Datos de la empresa donde se recoge la muestra.
- Datos del fabricante, vendedor, importador, etc.
- Razón del muestreo.
- Fecha, hora y lugar del muestreo.
- Clase de alimentos que integran la muestra.
- Número, tamaño y marca de las unidades del lote.
- Método de muestreo utilizado.
- Temperatura del producto en el momento del muestreo.
- Temperatura del almacenamiento.
- Muestras sospechosas de toxiinfección:
  - Sintomatología de la enfermedad.
  - Estudio epidemiológico del caso.
  - Precintado de las muestras.

## Estudios de Interés Sanitario. Muestras Clínicas

- Identificación del paciente (edad, sexo).
- Tipo y procedencia de la muestra.
- Fecha, hora de la obtención.
- Pruebas que se solicitan.
- ¿Tratamiento antimicrobiano?

## Características de los recipientes

- Limpios, secos y esterilizados.
- Tamaño en relación con el volumen de muestra.
- Herméticos, inaccesibles a contaminación posterior a esterilización.
- No desprenden materia orgánica ni elementos alcalinos.
- No reaccionan con componentes de la muestra.

## Tipos de recipientes

**Seleccionar** el más adecuado: evitar rotura o deterioro, facilitar el muestreo, la conservación y el transporte.

- Envases de vidrio neutro con boca ancha y cierre (muestras de agua)
- Envases de plástico con boca ancha (muestras líquidas)
- Bolsas de plástico (sólidos y volúmenes pequeños de líquidos)
- Jeringas (productos patológicos sin contacto con el exterior)
- Escobillones o hisopos o torundas
- Portaobjetos de vidrio
- Otros.



## Tomadores de muestras. Muestreadores

- NO debe alterarse el número y la actividad de los microorganismos
- NO debe contaminarse con microorganismos de otros puntos

NO existe una técnica o aparato **común y válido** para **todo** tipo de muestras

## Tomadores de muestras. Muestreadores

NO existe una técnica o aparato **común y válido** para **todo tipo** de muestras

- Muestras de agua: profundidad y tipo de estudio
- Muestras de suelo y sedimento
- Muestras de aire
- Muestras de alimentos: consistencia
- Muestras de superficies
- Muestras clínicas: tipo

## Muestreadores

- [http://datateca.umad.edu.co/contenidos/358003/Residuales\\_Contento\\_en\\_linea/capitulo\\_4\\_muestreo\\_de\\_agua\\_residual.html](http://datateca.umad.edu.co/contenidos/358003/Residuales_Contento_en_linea/capitulo_4_muestreo_de_agua_residual.html)
- <http://www.kc-denmark.dk/products/water-sampler/van-dom-water-sampler.aspx>
- <http://www.wissard.org/science-and-operations/technology/science-instrumentation/in-situ-water-sampler-0>
- <http://www.directindustry.com/prod/burkle/water-samplers-63760-456972.html>



© Environmental Protection Agency, Chicago, IL  
[http://www.epa.gov/Files/Bosette\\_s](http://www.epa.gov/Files/Bosette_s)  
Recreate Commons Attribution/Share-Alike License



StevenVanderW... [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Researchers\\_using\\_pole\\_sampler\\_to\\_collect\\_water\\_sample\\_06C2%5B7\\_DN-SD-01-00282.JPEG?useformat=es](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Researchers_using_pole_sampler_to_collect_water_sample_06C2%5B7_DN-SD-01-00282.JPEG?useformat=es)

Wikimedia Commons

## Muestreadores sedimentos

- Corer: <http://www.rickly.com/as/handcorer.htm>
- Dragas: <http://woodshole.er.usgs.gov/openfile/of2005-1001/htmldocs/samplers/grab/peterson.htm>



Thomas Crook (AW) [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Piston-corer\\_model\\_hg.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Piston-corer_model_hg.jpg)



Steve Jilkehart [http://en.wikipedia.org/wiki/Meibach\\_hos?mediaviewer/File:Van\\_Veen.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Meibach_hos?mediaviewer/File:Van_Veen.svg)

Wikimedia Commons

## Muestras de aire

**Sedimentación** (exponer placas con medio durante un tiempo) – UFC/cm<sup>2</sup> h<sub>exp</sub>  
No cuantitativo. Si comparativo.

**Recogida en medio líquido** (burbujear a través de un caldo o diluyente) – UFC/cm<sup>3</sup> aire

**Filtración** (filtro y colocar sobre medio de cultivo) – UFC/cm<sup>3</sup> aire

**Impactación** (filtrar directamente sobre medio de cultivo) – UFC/cm<sup>3</sup> aire

## muestreadores

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



Scentisid  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diluting\\_Sampler.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diluting_Sampler.jpg)

Wikimedia Commons

## Muestras de alimentos

### Alimento empaquetados/envasados:

Recogida de muestras/paquetes representativas.

### Alimentos a granel:

➤ **Alimentos sólidos** se toman porciones de distintas zonas y se pasan, asépticamente, a envases esterilizados.

[http://www.sampling.com/sterile\\_food\\_scoop.html](http://www.sampling.com/sterile_food_scoop.html)

## Muestras de alimentos

### Alimento empaquetados/envasados:

Recogida de muestras/paquetes representativas.

### Alimentos a granel:

➤ **Alimentos sólidos** se toman porciones de distintas zonas y se pasan, asépticamente, a envases esterilizados.

➤ **Alimentos líquidos**, se agita el envase y se pasan asépticamente a recipientes estériles.

## TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

---

- Impedir la rotura del envase.
- Sin cambio de los parámetros a medir.
- Transporte rápido.
- Generalmente, a baja temperatura.
- Procesar lo antes posible o almacenar.

## Transporte y Almacenamiento

---

- **Agua y suelo:** 4-6°C, oscuridad, máximo 24 h.
- **Agua, análisis sanitario:** 6°C, oscuridad, máximo 12-24 h.
- **Agua contaminada:** 6°C, oscuridad, máximo 6 h.
- **Alimentos:** T<sup>a</sup> indicada para su conservación.
- **Muestras clínicas:** 4-6°C
  - Excepciones:
    - práctica no aconsejable
    - Práctica no necesaria
  - Congelación

## Medios de Transporte

---

- Finalidad:
  - Mantener los microorganismos
  - Impedir la proliferación
- Características:
  - Semisólidos
  - Tamponados
  - Exentos de nutrientes
  - Contienen un agente reductor

## Medios de Transporte. Medio de Stuart

---

- Mantiene pH favorable
  - Impide deshidratación
  - Impide oxidación y autodestrucción enzimática
    - Glicerofosfato 10 g
    - Tioglicolato sódico 1 g
    - Cloruro sódico 0,1 g
    - Azul de metileno 2 mg
    - Agar 7,5 g
    - Agua destilada 1 L
- pH final = 7,4



### Medios de Transporte. Medio de Cary y Blair

---

- Transporte de muestras fecales
  - Recuperación de *Salmonella-Shigella* y *Vibrio*
  - Transporte por correo
    - Cloruro sódico 3 g
    - Cloruro potásico 0,2 g
    - Cloruro cálcico 0,1 g
    - Cloruro de magnesio 0,1 g
    - Fosfato monopotásico 0,2 g
    - Fosfato disódico 1,15
    - Tioglicolato sódico 1 g
    - Agar 7,5 g
    - Agua destilada 1 L
- pH final = 7,4

### Anaerobiosis

---

- Transferir a un recipiente lleno de CO<sub>2</sub>, libre de oxígeno o con N<sub>2</sub>
- Sistema indicador de anaerobiosis

### Fijación

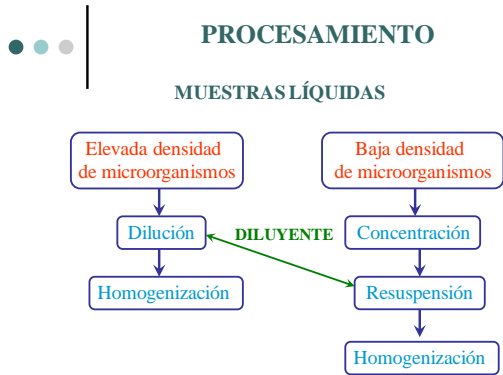
---

- Conservación estructuras internas y externas
- Inactivación de enzimas
- Protección subestructura y morfología de microorganismos delicados
- Conservación periodos prolongados
- No permite recuento de organismos vivos

### Neutralización

---

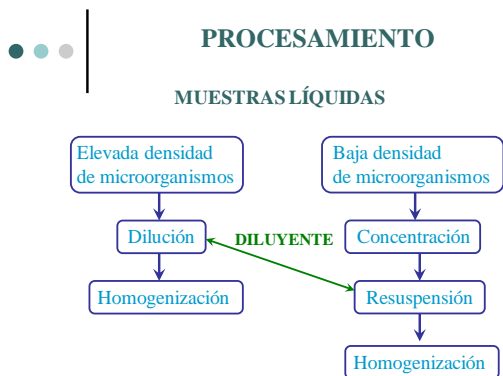
- Añadir agentes reductores
  - Tioglicolato sódico
  - Tiosulfato sódico



**Muestras líquidas. Dilución**

Dilución 1/10 =  $\frac{1 \text{ vol Muestra}}{1 \text{ vol Muestra} + 9 \text{ vol Diluyente}}$

- 1 ml M + 9 ml D = dilución 1/10
- 10 ml M + 90 ml D = Dilución 10/100 = Dilución 1/10
- 25 ml M + 225 ml D = Dilución 25/250 = Dilución 1/10
- 33 ml M + 297 ml D = Dilución 33/330 = Dilución 1/10



**Baja densidad de microorganismos**

Filtración



[http://commons.wikimedia.org/wiki/File: Bottle\\_top\\_disposable\\_filtration\\_set-Corning-D1.jpg#userbox=es](http://commons.wikimedia.org/wiki/File: Bottle_top_disposable_filtration_set-Corning-D1.jpg#userbox=es)

Centrifugación

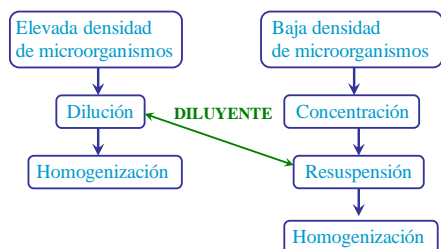


[www.fws.gov/southwest/youthambassadors/meshes.html](http://www.fws.gov/southwest/youthambassadors/meshes.html)  
: Cody Meshes, USFWS

Wikimedia Commons

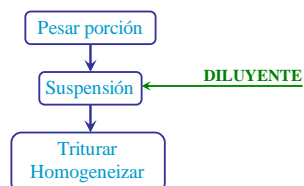
## PROCESAMIENTO

### MUESTRAS LÍQUIDAS



## 2. PROCESAMIENTO

### MUESTRAS SÓLIDAS



### Muestras sólidas. Técnica sencilla de pesado

- Tarar el recipiente estéril donde se va a triturar
- Introducir una porción medida de muestra
- Pesar el recipiente + porción
- Añadir un volumen adecuado de diluyente

Ejemplos:

10 g + 90 ml = Dilución 10/100 = Dilución 1/10

25 g + 225 ml = Dilución 25/250 = Dilución 1/10

33 g + 297 ml = Dilución 33/330 = Dilución 1/10

### Muestras sólidas. Triturado

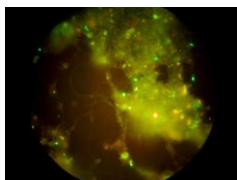
- Evitar destrucción de microorganismos
- Conseguir distribución homogénea de microorganismos y sus toxinas

#### Tipos de trituradores

- ✓ Jarra
- ✓ Triturador de paletas (Stomacher)
- ✓ Vástagos provistos de hélices

## Procesamiento previo de las muestras

### Separación células-partículas



Sonicación

Adición de tensoactivos

Agitación con bolas de vidrio

## Procesamiento previo de las muestras

Debe evitar:

- Pérdida o adición de microorganismos
- Alteraciones en la viabilidad de los microorganismos

Debe mantener:

- Esterilidad

## DILUYENTES

- No producen **modificaciones** ni **cuantitativas** ni **cualitativas** en las poblaciones microbianas
- Empleado en preparación de la muestra = empleado en diluciones

### DILUYENTES MÁS COMUNES

- Agua destilada estéril
- Agua de mar natural o artificial filtrada estéril
- Solución salina de cloruro sódico al 0,85% (p/v)
- Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline, PBS)
- Agua de Triptona con sal (Tryptone Water, TW)
- Solución Ringer ¼
- Agua de Peptona Tamponada

## Tampón PBS

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| ➢ Cloruro sódico       | 8 g    |
| ➢ Cloruro potásico     | 0,2 g  |
| ➢ Fosfato disódico     | 1,15 g |
| ➢ Fosfato monopotásico | 0,2 g  |
| ➢ Agua destilada       | 1 L    |
| pH = 7,3               |        |

### Agua de Triptona con Sal (Tryptone Water, TW)

---

- > Triptona 10 g
  - > Cloruro sódico 5 g
  - > Agua destilada 1 L
- pH = 7,5

### Solución Ringer 1/4

---

- > Cloruro sódico 2,25 g
  - > Cloruro potásico 0,105 g
  - > Cloruro cálcico 0,12 g
  - > Bicarbonato sódico 0,05 g
  - > Agua destilada 1 L
- pH = 7

### Agua Peptona Tamponada

---

- > Peptona 10 g
  - > Cloruro sódico 5 g
  - > Fosfato disódico 9 g
  - > Fosfato potásico 1,5 g
  - > Agua destilada 1 L
- pH = 7