

## INSTRUCCIONES PARA LA RECUPERACIÓN DE CULTIVOS LIOFILIZADOS

CONSERVE LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA, CONTIENE DATOS QUE LE SERÁN DE UTILIDAD

### Antes de empezar...

#### 1. Conserve adecuadamente las ampollas que no vaya a abrir inmediatamente

Protéjalas de la luz y a temperatura controlada (entre 4 y 24°C, preferiblemente 18°C). No las congele. Aunque en este estado la viabilidad puede mantenerse por periodos de tiempos muy largos, el riesgo de que ésta se pierda es real. Por tanto, se aconseja planificar la recuperación de los liófilos tan pronto como sea posible tras su recepción y en todo caso no más tarde de un año.

#### 2. Compruebe que dispone del medio de cultivo recomendado para cada cepa

Para ello consulte el albarán de entrega o la ficha de la cepa en nuestro catálogo ([www.cect.org](http://www.cect.org)).

Además del medio líquido necesario para la reconstitución del liófilo, en la mayoría de los casos es conveniente que cuente también con medio sólido.

Los medios a emplear deben estar recién preparados o conservados en buenas condiciones (no resecos ni con humedad excesiva, sin contaminantes ni precipitados y por un período máximo de tiempo que depende de su composición).

#### 3. Verifique que puede controlar los parámetros fisicoquímicos recomendados (temperatura de incubación, condiciones de anaerobiosis, ... )

Al igual que antes, consulte el albarán de entrega o nuestro catálogo ([www.cect.org](http://www.cect.org)).

Para trabajar con cultivos anaerobios y microaerófilos existen varias alternativas. Consulte bibliografía especializada si no está familiarizado con ellas.

## Apertura de la ampolla

### 1. Preparativos

Además de lo señalado anteriormente, debe contar con recipientes para desechar los fragmentos de vidrio, agua estéril, pipetas Pasteur estériles y pinzas metálicas.

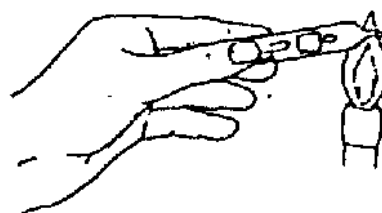
Trabaje en un entorno de seguridad microbiológica.

### 2. Calentamiento de la punta a la llama

Dependiendo de la intensidad de la combustión puede requerir entre 5 y 15 segundos (algo más si la llama es muy débil).

Asegúrese que el cono de calor sólo afecta a la punta estrecha de la ampolla para no dañar el liófilo.

El tapón interior de algodón no debe oscurecerse (pues sería señal de un calentamiento excesivo).

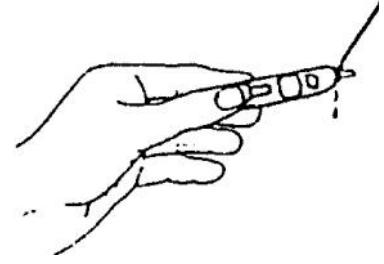


### 3. Resquebrajado del vidrio con agua estéril

Basta con dejar caer 1-4 gotas (gota a gota, no a chorro).

Si no se produce ningún agrietamiento repita el paso anterior alargando un poco el tiempo de calentamiento.

Si en el momento del resquebrajamiento el algodón se dispara hacia adentro es señal de que el calentamiento ha sido excesivo (se desplaza por la entrada violenta de aire). Además de que será más difícil su extracción se habrá corrido el riesgo de perjudicar la viabilidad del liófilo.

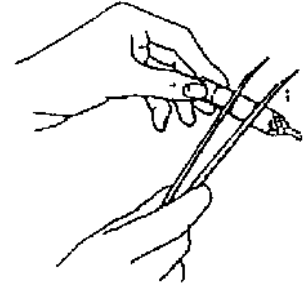


### 4. Retirada de los fragmentos de vidrio

Si no se hubieran desprendido en el momento de resquebrajarse se pueden retirar con ayuda de unas pinzas flameadas previamente dando un golpe seco como se muestra en la imagen (o con las puntas juntas si queremos que el golpe sea más contundente).

Suba con las pinzas el algodón para facilitar su manipulación posterior.

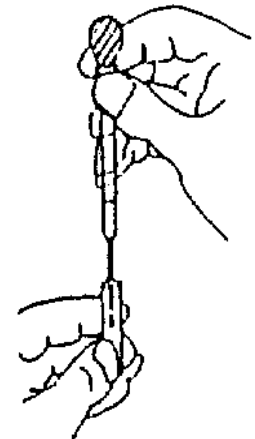
Todas estas operaciones deben hacerse con la debida atención que precisa el manejo de vidrio roto (p. ej. proteja sus ojos, no retire fragmentos con los dedos, etc).



## Resuspensión del liófilo y siembra

### 1. Resuspensión

Con ayuda de una pipeta Pasteur añada 0.2-0.3 ml del medio líquido estéril recomendado. Resuspenda cuidadosamente el liófilo hasta conseguir una rehidratación completa. Puede ayudarse de la pipeta Pasteur para aspirar y expulsar la suspensión pero hágalo suavemente y evitando la formación de burbujas de aire.



### 2. Siembra

Utilice toda la suspensión para inocular un medio sólido (tubo con agar inclinado o placa Petri) y un tubo con 5-10 ml de medio líquido que deberá ser incubado hasta observar crecimiento antes de escalar a volúmenes mayores.

No es aconsejable guardar parte de la suspensión en la propia ampolla como reserva pues una vez abierta no constituye un recipiente idóneo para este fin.

En la mayoría de nuestros lotes encontrará un rectángulo de filtro de celulosa. Si lo desea puede transferirlo también ya que muchas células se adhieren a él. Sin embargo es una operación que requiere un poco de destreza (no es fácil de manipular sin contaminarlo), por lo tanto procure hacerlo sin comprometer el estado axénico de toda la suspensión.

### 3. Incubación

A la temperatura óptima para el microorganismo y siguiendo cualquier otra indicación que exista en el albarán de entrega o en la ficha de la cepa en nuestro catálogo ([www.cect.org](http://www.cect.org)), como p. ej. incubación en anaerobiosis, exposición a la luz, etc.

Algunas cepas tienen un largo período de latencia. Incubar hasta dos semanas antes de considerar como inviable el cultivo.

### Recomendación importante:

Subcultivar al menos una vez después de la recuperación y antes de su uso como cepa de trabajo.