Linee Guida Generali per il Congelamento e la Conservazione a Lungo Termine di Colture Microbiche con CLEARStable

CLEARStable è un sistema progettato per il congelamento e la conservazione a lungo termine di colture microbiche, che consente di preservare la vitalità dei microrganismi senza ricorrere alla liofilizzazione o a frequenti subcolture.
Il sistema è disponibile in due configurazioni:

CLEARStable con soluzione crioprotettiva: criotubo da 2 mL contenente biglie porose di dimensioni grandi o piccole, immerse in una soluzione crioprotettiva a base di glicerolo, idonea alla conservazione di batteri, spore batteriche, funghi inclusi muffe e lieviti.

CLEARStable Dry: criotubo da 2 mL contenente biglie porose di dimensioni grandi o piccole, privo di soluzione crioprotettiva, che consente all'operatore di scegliere il crioprotettore più appropriato in funzione del microrganismo da conservare.

Procedura d'uso

Preparazione preliminare solo per CLEARStable Dry:
Prima di iniziare la procedura di conservazione, aggiungere un crioprotettore idoneo (scelto dall'operatore) a seconda del microrganismo o del ceppo da conservare.
Assicurarsi che le sfere porose siano completamente immerse nella soluzione crioprotettrice prima di procedere.
Una volta aggiunto il crioprotettore, proseguire seguendo le istruzioni per l'uso standard riportate di seguito.

1. Conservazione dei microrganismi:

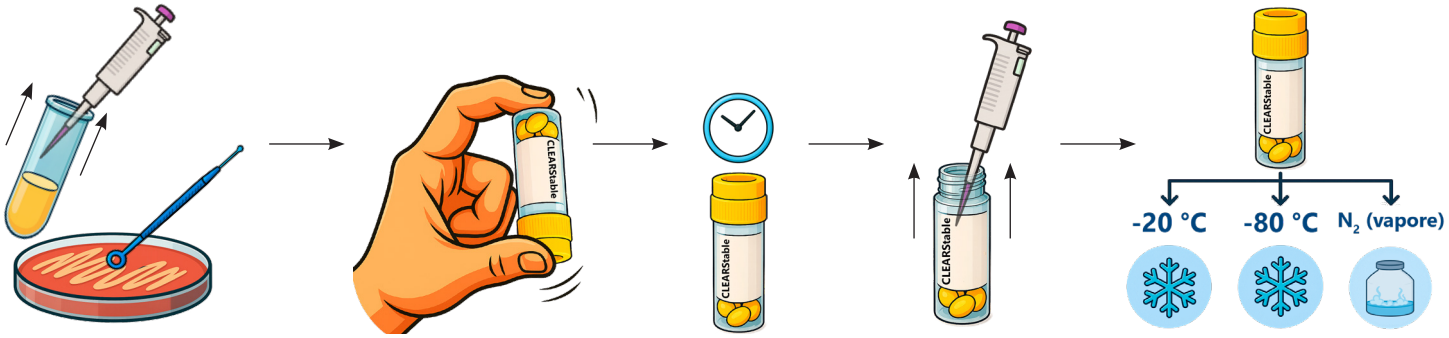
1.1. Preparazione della coltura microbica
- Per una maggiore efficienza, assicurarsi che la coltura (in sospensione liquida o su piastra) venga preparata il giorno prima dell'uso, consentendole di raggiungere la fase di crescita logaritmica (in genere 20-24 ore, a seconda del microrganismo).

1.2. Preparazione del criotubo
- Rimuovere un criotubo sterile dalla confezione, assicurandosi che la sterilità sia mantenuta.
- Etichettare il criotubo con il nome del ceppo microbico, la data e qualsiasi altra informazione rilevante.

1.3. Inoculo
- Da sospensione liquida: trasferire circa 100-200µL di coltura attivamente in crescita nel criotubo con un'ansa sterile o pipetta.
- Dalla coltura sulla piastra: prelevare una biglia sterile dal criotubo e strofinala delicatamente sulla piastra contenente i microrganismi, aderendoli correttamente alla biglia prima di trasferirla di nuovo nel criotubo. In alternativa, prelevare le colonie direttamente dalla piastra e trasferirle nel criotubo.

1.4. Miscelazione e distribuzione
- Chiudere il criotubo e capovolgerlo delicatamente più volte per assicurare l'immersione completa delle biglie nella soluzione crioprotettiva e una distribuzione uniforme dei microrganismi. **NON utilizzare il vortex.**
- Lasciare riposare per 30-60 secondi.
- Utilizzando una pipetta sterile, rimuovere il crioprotettore, lasciando le biglie il più possibile prive di liquido.
- Chiudere il tubo.

1.5. Congelamento del criotubo
- Conservare immediatamente il criotubo inoculato in un ***congelatore a -20 °C*** per la conservazione a breve termine, in un ***congelatore a -80 °C*** per la conservazione a lungo termine o ***nella fase di vapore dell'azoto*** per una conservazione ottimale, assicurandosi che il congelamento sia ben manutenuto e monitorato per mantenere una temperatura costante.



2. Recupero del ceppo microbico:

2.1. Rimozione del criotubo dal congelatore o dalla fase di vapore dell'azoto

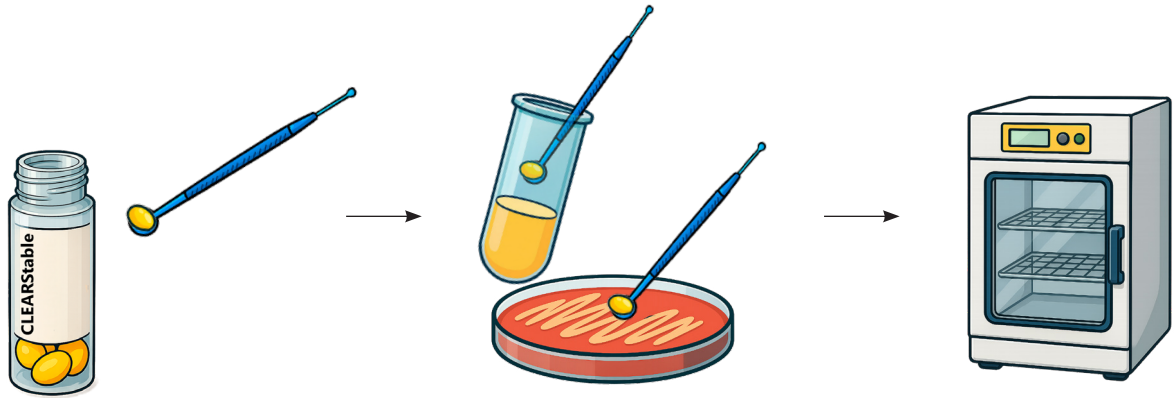
- Quando necessario, rimuovere rapidamente il criotubo dall' ambiente di conservazione.

2.2. Rimozione di una biglia

- Aprire il criotubo e, utilizzando pinzette sterili o uno strumento simile (ad esempio le anse della Biosigma ref BSV120), prelevare una biglia congelata. Chiudere immediatamente il criotubo e rimetterlo nel congelatore per ridurre al minimo le fluttuazioni di temperatura.

2.3. Scongelamento e inoculo

- Trasferire la biglia congelata in un terreno di coltura fresco e appropriato (ad esempio, brodo nutriente o piastra). Se si utilizza un terreno liquido, immergere la biglia nel brodo; se si utilizza un terreno solido, strisciare delicatamente la biglia sulla superficie.
- Incubare alla temperatura ottimale per il recupero e la crescita dei microrganismi.
- Smaltire in modo sicuro la biglia usata, seguendo le procedure previste per i materiali contaminati.

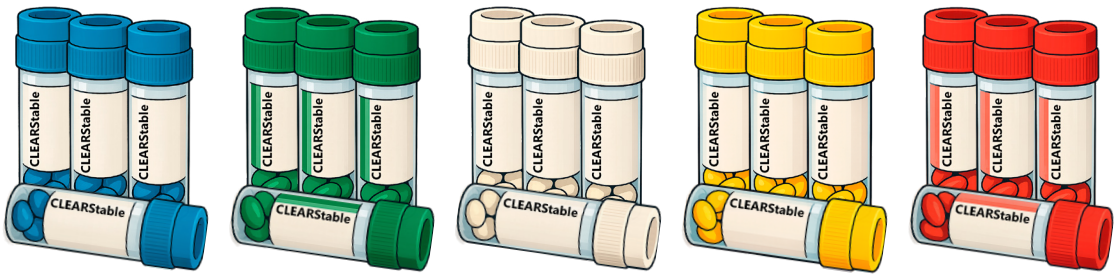


Precauzioni e Avvertenze:

- **Sterilità**: Lavorare sempre in condizioni asettiche per prevenire la contaminazione delle colture microbiche.
- **Dispositivi di protezione individuale (DPI)**: Indossare DPI appropriati durante tutte le procedure di manipolazione.
- **Controllo della temperatura**: Evitare sbalzi termici e lo scongelamento delle biglie durante il prelievo. Si raccomanda l'utilizzo di un crioblocco preraffreddato per limitare le variazioni di temperatura del criotubo.
- **Integrità del criotubo**: Non utilizzare il prodotto in presenza di perdite, danneggiamenti o torbidità anomala della soluzione crioprotettiva.
- **Condizioni di conservazione**: Selezionare la temperatura più appropriata in funzione del microrganismo e della durata prevista della conservazione.
- **Idoneità del prodotto**: CLEARStable è stato testato con ceppi di riferimento. Si raccomanda di verificarne l'idoneità per i ceppi specifici da conservare.

Informazioni aggiuntive sul Prodotto:

- **Controllo qualità**: Ogni lotto è sottoposto a test di sterilità e prestazione, documentati nel Certificato di Analisi (CoA).
- **Varianti di colore**: CLEARStable è disponibile con biglie porose e tappi di colore coordinato nelle varianti bianco, rosso, blu, giallo, verde e misto. La formulazione crioprotettiva è identica per tutte le colorazioni.
- **Configurazioni disponibili**: CLEARStable è disponibile con biglie porose grandi o piccole, con o senza soluzione crioprotettiva, in confezioni rack o bulk e con sistemi di identificazione mediante codice a barre 1D o 2D.
- **Conservazione prima dell'uso**: Conservare CLEARStable non utilizzato a temperature comprese tra +4 °C e +30 °C.



General Guidelines for Freezing and Long-Term Storage of Microbial Cultures with CLEARStable

CLEARStable is a system designed for the freezing and long-term storage of microbial cultures, allowing the preservation of microorganism viability without the need for lyophilization or frequent subculturing.
The system is available in two configurations:

CLEARStable with cryoprotectant: 2 mL cryotube containing large or small porous beads, immersed in a glycerol-based cryoprotective solution, suitable for the preservation of bacteria, bacterial spores, and fungi, including molds and yeasts.

CLEARStable Dry: 2 mL cryotube containing large or small porous beads, without cryoprotective solution, allowing the operator to choose the most appropriate cryoprotectant based on the microorganism to be preserved.

Usage Procedure

Preliminary preparation for CLEARStable Dry only:

Before beginning the preservation procedure, add a suitable cryoprotectant (selected by the operator), depending on the microorganism or strain to be preserved.
Ensure that the porous beads are completely immersed in the cryoprotective solution before proceeding.
Once the cryoprotectant has been added, continue by following the standard instructions for use provided below.

1. Preservation of the Microbial Strain:

1.1. Preparation of the microorganisms

- For greater efficiency, ensure that the culture (either liquid suspension or plate) is prepared the day before use, allowing it to reach the logarithmic growth phase (typically 20-24 hours, depending on the microorganism).

1.2. Preparation of the Cryotube

- Remove a sterile cryotube from its packaging, ensuring sterility is maintained.
- Label the cryotube with the microbial strain name, date, and any other relevant information.

1.3. Inoculation

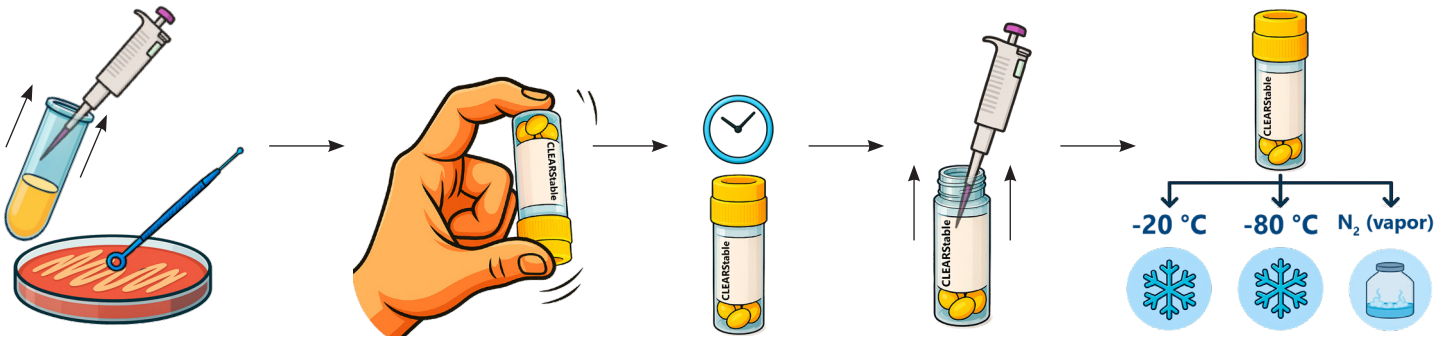
- From liquid suspension: using a sterile inoculation loop or pipette, transfer approximately 100-200 µl of actively growing culture into the cryotube.
- From plate Culture: Take a sterile bead from the cryotube, gently streak it across the inoculated plate containing microorganisms. Ensure proper adherence of the microorganisms to the bead before transferring it back into the cryotube. Alternatively, you can also pick colonies directly from the plate and transfer them into the cryotube.

1.4. Mixing and Distribution

- Cap the cryotube and gently invert it several times to ensure the beads are fully immersed in the cryoprotective solution and that the microorganisms are evenly distributed. **Do NOT vortex**.
- Let the vial stand for 30-60 seconds.
- Using a sterile pipette, remove the excess cryoprotective solution, leaving the beads as free of liquid as possible.
- Close the vial finger tight.

1.5. Freezing the Cryotube

- Immediately store the inoculated cryotube in a *-20°C freezer* for short-term storage or a *-80°C freezer* for long-term storage, or in the *vapor phase of nitrogen* for optimal preservation, ensuring the freezer is well-maintained and monitored to maintain a constant temperature.



2. Retrieval of the Microbial Strain:

2.1. Removal of the cryotube from the nitrogen vapor phase or the freezer

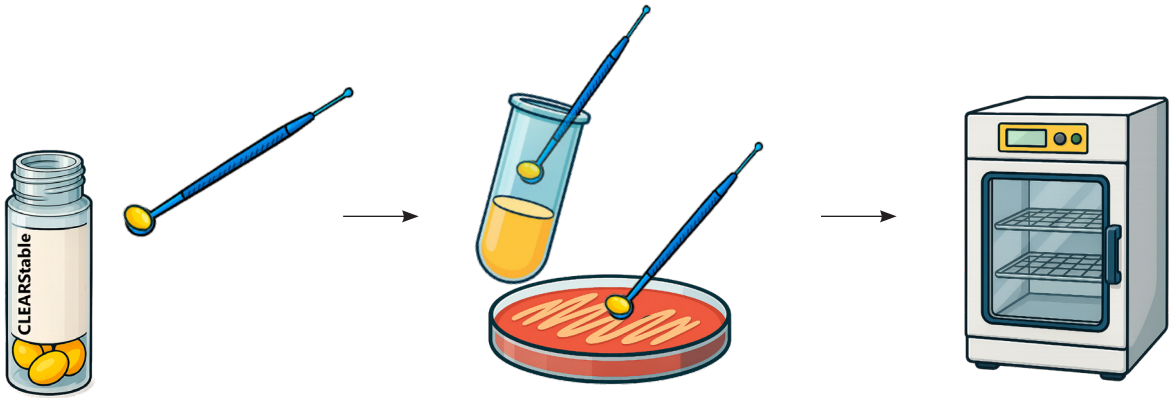
- When necessary, promptly remove the cryotube from storage.

2.2. Removal of a Bead

- Open the cryotube and, using sterile tweezers or a similar tool, (e.g., Microloops ref BSV120 from Biosigma), remove a frozen bead.
- Immediately close the cryotube and return it to the freezer to minimize temperature fluctuations.

2.3. Thawing and Inoculation

- Transfer the frozen bead into a fresh, appropriate culture medium (e.g., nutrient broth or agar plate). If using a liquid medium, immerse the bead into the broth; if using a solid medium, gently streak the bead across the surface.
- Incubate at the optimal temperature for the recovery and growth of the microorganisms.
- Safely discard the bead after use, according to the established guidelines for contaminated material disposal.



Precautions and Warnings:

- **Sterility**: Always work under aseptic conditions to prevent contamination of microbial cultures.
- **Personal Protective Equipment (PPE)**: Wear appropriate PPE throughout all handling procedures.
- **Temperature Control**: Avoid thermal shocks and the thawing of the beads during retrieval. The use of a pre-cooled cryoblock is recommended to limit temperature fluctuations in the cryotube..
- **Vial Integrity**: Do not use the product if there are leaks, damages or abnormal turbidity of the cryoprotective solution.
- **Storage Conditions**: Select the most appropriate temperature depending on the micro-organism and the expected shelf life.
- **Product Suitability**: CLEARStable was tested with reference strains. It is recommended to check their suitability for the specific strains to be stored.

Additional product Information:

- **Quality Control**: Each batch is subjected to sterility and performance tests, documented in the Certificate of Analysis (CoA).
- **Color Variants**: CLEARStable is available with porous beads and matching color caps in white, red, blue, yellow, green and mixed variants. The cryoprotective formulation is identical for all stains.
- **Available Configurations**: CLEARStable is available with large or small porous beads, with or without cryoprotective solution, in rack or bulk packs and with 1D or 2D barcode identification systems.
- **Storage before use**: Store unused CLEARStable at temperatures between +4 °C and +30 °C.

