

CRYOBANK[®]

Informations techniques pour la conservation
sûre et sécurisée des bactéries et champignons



Pratiquement tous les laboratoires de microbiologie conservent des cultures souches de micro-organismes à des fins de recherche, d'enseignement et/ou de contrôle qualité. Pour évaluer et valider le travail expérimental, les cultures conservées doivent présenter des caractéristiques stables telles que la morphologie et la physiologie typiques. Avec la disponibilité de congélateurs commerciaux dont la température se situe de -20°C à -80°C, les cultures souches peuvent maintenant être conservées efficacement. Le système **CRYOBANK®** est un petit cryotube contenant des billes recouvertes d'une solution cryoconservatrice hypertonique, auxquelles les micro-organismes peuvent adhérer. Une fois inoculé, le cryotube peut être conservé dans un congélateur à une température comprise entre -20°C et -80°C. Chaque boîte contient 80 cryotubes disponibles dans une gamme de couleurs, qui peuvent être utilisées en laboratoire pour identifier différentes catégories d'organismes, chaque tube contient environ 25 billes. En utilisant **CRYOBANK®**, chaque cryotube est capable de cultiver au moins 25 cultures identiques, ce qui permet de conserver un grand nombre de souches dans un petit congélateur. Les billes sont reprises individuellement du tube sans décongeler l'échantillon entier, et la bille dégèle rapidement sur un milieu solide rendant la récupération immédiate. A l'aide d'un cryoblock refroidi dans un congélateur pendant au moins 30 minutes, le temps disponible pour travailler avec des tubes congelés est considérablement augmenté.

Cette méthode s'est avérée être une procédure sûre, fiable et simple pour le stockage d'une large gamme de micro-organismes en laboratoire.

Mast Group Ltd utilise des billes de céramique poreuses en suspension dans un fluide cryoconservateur et contenues dans un cryotube comme proposé initialement par Feltham et al. en 1978³. Le fluide cryoconservateur protège les micro-organismes à basse température (-60°C à -76°C) et la nature poreuse des billes permet aux micro-organismes d'adhérer facilement à la surface des billes.

La procédure de stockage est simple. Le micro-organisme est suspendu dans le liquide pour produire une suspension fortement concentrée (environ 10⁸ organismes/mL) à l'aide d'un écouvillon ou d'une anse stérile. Le cryotube est alors bien mélangé en retournant les tubes de bas en haut, afin d'enrober toutes les billes, l'excès de liquide est retiré et le tube est placé dans un congélateur approprié.

Chaque bille fournit la matière pour une sous-culture et peut être retirée et placée directement sur un milieu de culture solide ou dans un bouillon de culture, sans avoir à décongeler le reste. La disponibilité accrue de congélateurs capables d'atteindre les températures nécessaires et le lancement de systèmes commerciaux basés sur cette méthodologie ont rendu possible l'utilisation de ce système pour de nombreux laboratoires. L'un des principaux avantages de cette méthode pour les laboratoires est que chaque cryotube peut contenir jusqu'à 25 billes, ce qui permet de stocker des centaines de souches dans un espace minimal. Ainsi, l'établissement facile de collections de cultures de laboratoire à des fins d'accréditation ou de recherche est permis.

CRYOBANK® offre une méthode fiable pour la conservation des micro-organismes sur de longues périodes. Ce système est disponible par conditionnement économique de 80 tubes. Les tubes sont livrés avec des bouchons de couleur et un code-barres pour permettre la classification de différents groupes de microbes avec une traçabilité totale. Chaque emballage a également une grille de référence imprimée sur le couvercle, ce qui permet de localiser un organisme rapidement et simplement. Ces emballages sont à l'épreuve du gel, faciles à entreposer et conçus pour s'adapter aux étagères de congélateur standard. Les tubes peuvent être facilement retirés de la boîte avec le "picker" fourni. Il a été spécialement conçu pour s'insérer dans le couvercle et faciliter son retrait.

Conçu pour une utilisation à -70°C, ce système peut également être utilisé à -20°C pour le stockage de certains microbes. Cependant, il existe quelques limites à cette température. Par exemple, il n'est pas recommandé pour la conservation des souches plus fastidieuses comme *Neisseria gonorrhoea*, *Campylobacter coli* etc.

L'utilisation efficace de l'espace est particulièrement adaptée aux méthodes de travail telles que le "Seed Lot System" qui garantit la stabilité génétique d'une culture en minimisant le nombre de passages à partir de l'isolement original. Dans cette méthode, on prépare plusieurs cryotubes à partir de l'isolat original et on les divise en lots de semences et en premier lot de travail. Les cryotubes des lots primaires sont entreposés séparément pour s'assurer qu'ils ne sont pas utilisés jusqu'à ce que le premier lot de travail soit épuisé. Un du lot primaire est ensuite utilisée pour préparer un deuxième lot de travail et ainsi de suite, garantissant ainsi que du matériel de passage précoce est toujours disponible pour la préparation des cultures de travail. Le système est particulièrement applicable aux cultures de *Legionella pneumophila*. Cet organisme s'adapte facilement à la croissance sur des milieux de laboratoire et ne devrait pas subir plus de dix passages s'il est utilisé pour le contrôle de la qualité des milieux de croissance.

La conservation d'une large gamme de micro-organismes pendant plus de 9 ans a montré que la méthode était sûre et fiable. Les laboratoires individuels devraient s'assurer que la technique fonctionne bien, ailleurs et dans des circonstances similaires avant de procéder à de grandes collectes de leurs propres souches. La possibilité d'une défaillance du congélateur est une préoccupation et il faut envisager de prévoir un dispositif de secours, soit un deuxième congélateur, soit un mécanisme de sécurité contre les fuites de dioxyde de carbone.

Caractéristiques techniques

Stockage du CRYOBANK®

La récupération réussie des microbes stockés à -70°C et -20°C.

Une étude a été menée afin de déterminer la durée maximale de stockage d'un organisme dans le CRYOBANK® avant qu'il ne puisse plus être récupéré.

Cela comprenait une gamme de différents organismes conservés à -70°C et -20°C en utilisant le système. A intervalles réguliers, les organismes ont été cultivés de manière appropriée. L'essai pour chaque organisme se poursuit jusqu'à ce que la récupération ne soit plus satisfaisante. Cette information permet d'obtenir une période pendant laquelle les organismes resteront viables en utilisant le CRYOBANK®.

Les résultats suivants ont été obtenus :

La survie des microbes stockés à -70°C et -20°C sur le système CRYOBANK®

Organisme	NCTC	ATCC®	NEQAS	Stockage avec récupération réussie (mois)		Durée de stockage recommandée (années)	
				-70°C	-20°C	-70°C	-20°C
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	5866	15309		108	78	5	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8049	7966		108	78	5	3
<i>Aspergillus niger</i>				108	24*	5	1
<i>Bacillus cereus</i>		14579		108	78	5	3
<i>Bacillus subtilis</i>	10400	6633		108	24*	5	1
<i>Bacteroides fragilis</i>				108	12*	1/2	1/2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		10580		108	70*	5	3
<i>Burkholderia cepacia</i>	10661	17759		108	78	5	3
<i>Campylobacter coli</i>	11366	33559		45*	1*	3	0
<i>Candida albicans</i>		90029		108	18*	5	1
<i>Citrobacter freundii</i>	9750	8090		108	78	5	3
<i>Clostridium difficile</i>	11204			108	70*	5	3
<i>Clostridium perfringens</i>	8237	13124		108	45*	5	2
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			3091	108	18*	5	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>		90112		108	24*	5	1
<i>Edwardsiella tarda</i>	11934			108	78	5	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10006	13048		108	70*	5	3
<i>Enterococcus faecalis</i>		29212		108	78	5	3
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>			4024	108	18*	5	1
<i>Escherichia coli</i>		25922		106	12	5	1
<i>Haemophilus influenzae</i>				108	2*	5	0
<i>Hafnia alvei</i>			3030	108	78	5	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		13883		108	45*	5	2
<i>Lactobacillus casei</i>	10302			108	6 *	5	1/2
<i>Lactococcus lactis</i>			6621	108	78	5	3
<i>Legionella pneumophila</i>	12821			108	45*	5	2
<i>Listeria ivanovii</i>	11846	19119		108	78	5	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	5214			108	78	5	3
<i>Moraxella catarrhalis</i>			4062	108	78	5	3
<i>Morganella morganii</i>			3094	108	70*	5	3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>				95	70*	5	3
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>				12*	1*	1	0
<i>Pasteurella multocida</i>			4009	108	6*	5	1/2
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>			3092	95	45*	5	2
<i>Proteus mirabilis</i>		12453		108	24*	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10662			108	18*	5	1 1/2
<i>Rhodococcus equi</i>	1621	6939		108	45*	5	2

Organisme	NCTC	ATCC®	NEQAS	Stockage avec récupération réussie (mois)		Durée de stockage recommandée (années)	
				-70°C	-20°C	-70°C	-20°C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3178			108	45*	5	2
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	12023	14028		108	78	5	3
<i>Serratia marcescens</i>	1377			108	45*	5	2
<i>Shigella sonnei</i>	8574			108	78	5	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1803			108	24*	5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11047	14990		108	78	5	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				108	2*	5	1/6
<i>Vibrio cholerae</i>	11348			108	78	5	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		17803		108	78	5	3
<i>Yersinia spp.</i>				108	78	5	3
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3879			108	12*	5	1/2

Les résultats marqués * représentent le stockage mensuel maximum possible et la récupération réussie à cette température. Tous les autres résultats représentent la durée de stockage connue à ce jour. L'essai de récupération à -20 °C a été interrompu après 78 mois.

Les durées indiquées pour le temps de stockage recommandé sont basées sur nos informations de stabilité avec la recommandation de Culture Collection (Université de Gothenberg) pour les procédures de contrôle qualité.

Décongélation

Pour la plupart des cellules, le réchauffement de la bille individuelle, à partir de l'état congelé devrait se produire aussi rapidement que possible jusqu'à ce que la décongélation complète soit atteinte.

Stabilité du **MAST®** CRYOBLOCK

L'utilisation d'un cryoblock a été documentée pour la première fois par Feltham *et al.*³ en 1978 lorsque certains organismes cryoconservés ont montré une perte de viabilité. Ce problème a été résolu lorsqu'un «cryoblock» a été fabriqué à partir de paraffine et conservé dans l'armoire de congélation pour maintenir les cryotubes congelés après leur retrait du congélateur.

Le stockage des organismes peut se faire à partir de -20°C et les cultures doivent être repiquées puis restaurées après décongélation. Alors que la décongélation de la bille individuelle utilisée doit être rapide, lors de son retrait du tube, les billes restantes dans le cryotube doivent être conservées congelées aussi longtemps que possible.

En utilisant une sonde de température, la vitesse de réchauffement d'un cryotube a été mesurée dans trois conditions.

1. Le cryotube est placé dans le **MAST®** CRYOBLOCK avec l'enveloppe en polystyrène et le couvercle.
2. Le cryotube est placé dans le **MAST®** CRYOBLOCK sans boîtier ni couvercle.
3. Le cryotube est seul, sur la paillasse de laboratoire, sans **MAST®** CRYOBLOCK.

La température ambiante au moment de chaque série de lectures a également été enregistrée. Le cryotube utilisé dans l'expérience a été configuré comme tube classique, avec la solution cryoprotectrice retirée. Un trou a ensuite été fait dans le couvercle pour permettre l'insertion de la sonde de température. Le cryotube était, dans chaque cas, placé au centre du bloc, comme ce serait le cas si un seul organisme était retiré du **MAST®** CRYOBLOCK. Le tableau (Fig1) et le graphique (Fig2) montrent les résultats obtenus. Il est évident que adns le cas du **MAST®** CRYOBLOCK avec polystyrène, le réchauffement s'effectue beaucoup plus lentement que dans le cas du bloc seul ou du cryotube sans le bloc.

Il a été démontré que les organismes survivent mieux à -70°C qu'à -20°C et que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la décongélation est aussi rapide que possible. Pour cette raison, le temps nécessaire pour que le cryotube atteigne -20°C est le meilleur guide pour la stabilité de la température du **MAST® CRYOBLOCK**.

1. Le cryotube à l'intérieur du **MAST® CRYOBLOCK**, avec couvercle en polystyrène, est resté au-dessous de -20°C pendant 45 minutes.
2. Le cryotube à l'intérieur du bloc, sans couvercle en polystyrène, est resté au-dessous de -20°C pendant 7 minutes.
3. Le cryotube seul est resté en dessous de -20°C pendant moins de 90 secondes.

CRYOBANK® Taux de réchauffement

Temps (min)	Température (°C)		
	Sans Cryoblock	Cryoblock uniquement	Cryoblock avec Polystyrene
Température ambiante	23,20	23,90	21,60
Température de départ	-70,00	-67,60	-68,20
0	-70,00	-67,60	-68,20
1	-25,80	-48,00	-57,60
2	-9,50	-39,90	-59,50
3	0,30	-34,00	-59,40
4	6,60	-29,80	-58,50
5	10,40	-26,30	-57,50
6		-23,20	-56,30
7		-20,90	-55,10
8		-18,70	-53,90
9		-16,50	-52,70
10		-14,80	-51,60
11		-12,90	-50,50
12		-11,20	-48,50
13		-9,70	-47,60
14		-8,10	-46,60
15		-7,40	-44,50
16		-6,70	-43,30
17		-5,40	-41,30
18		-4,10	-40,50
19		-3,00	-39,60
20		-1,80	-38,80
21		-0,90	-37,60
22		-0,20	-36,80

Temps (min)	Température (°C)		
	Sans Cryoblock	Cryoblock uniquement	Cryoblock avec Polystyrene
Température ambiante	23,20	23,90	21,60
Température de départ	-70,00	-67,60	-68,20
23		1,30	-36,00
24			-36,00
25			-35,20
26			-34,40
27			-33,60
28			-32,80
29			-32,20
30			-31,40
31			-30,60
32			-29,90
33			-29,30
34			-28,50
35			-28,00
36			-27,30
37			-26,60
38			-26,00
39			-25,40
40			-24,80
41			-24,20
42			-22,10
44			-21,10
45			-19,30

Figure 1.

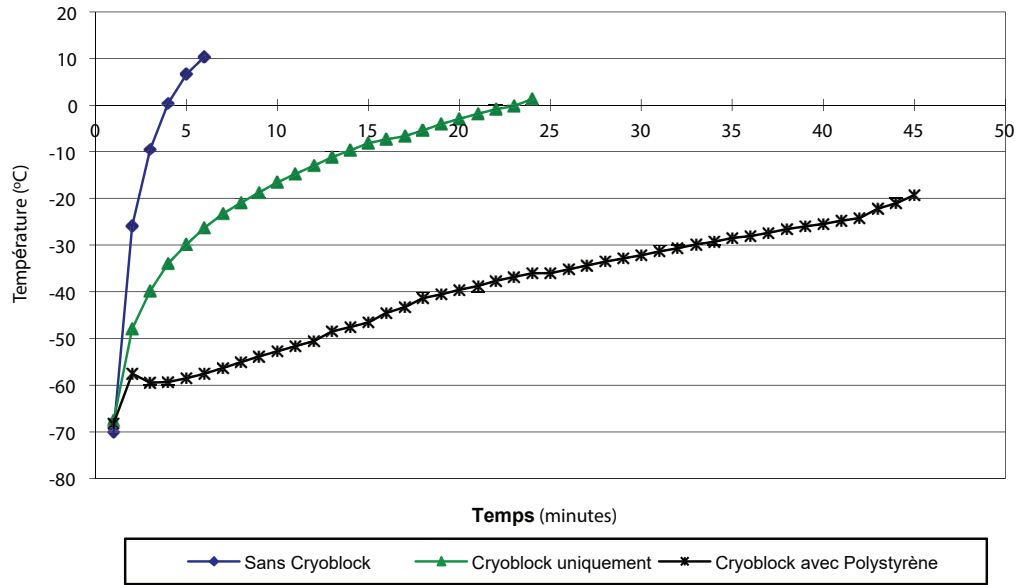


Figure 2.

La récupération réussie des microbes stockés sur les Cryobilles Mast® à -70°C et -20°C.

CRYOBANK® est basé sur un système cryotube comprenant un petit flacon contenant des billes traitées chimiquement, auxquelles les micro-organismes peuvent adhérer, et recouverts d'une solution spéciale de conservation hypertonique. Une fois ensemencés, les flacons peuvent être conservés dans un congélateur dans une plage de température de -20°C à -80°C.

Pour garantir des résultats reproductibles et une continuité dans les processus biomédicaux et de recherche, il y a la nécessité de stabiliser génétiquement les cellules vivantes. La sous-culture en série prend du temps et peut entraîner une contamination ou une dérive génétique. Cependant, une population de cellules peut être stabilisée en les soumettant à des températures cryogéniques. Par conséquent, la durée à laquelle les cellules peuvent rester stables et être récupérées avec succès est d'une importance vitale.



Tableau 1. Conditions de croissance des organismes utilisés.

Organisme	Agar (Code produit)	Température d'incubation	Conditions d'incubation	Durée d'incubation (h)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DST (DM215)	35- 37°C	Aérobie	24 h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DST (DM215)	35-37°C	Aérobie	24 h
<i>Aspergillus niger</i>	SAB (DM200)	28-30°C	Aérobie	48 h
<i>Bacillus cereus</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Bacillus subtilis</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Bacteroides fragilis</i>	5% blood (DM115)	37°C	Anaérobie	24-48 h
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Charcoal (DM109)	37°C	Humide	48 h
<i>Burkholderia cepacia</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Campylobacter coli</i>	10% blood (DM115)	37°C	Micro-aerophilic	48-96 h
<i>Candida albicans</i>	SAB (DM200)	37°C	Aérobie	48 h
<i>Citrobacter freundii</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Clostridium difficile</i>	10% blood (DM115)	37°C	Anaérobie	48 h
<i>Clostridium perfringens</i>	10% blood (DM115)	37°C	Anaérobie	48 h
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Cryptococcus neoformans</i>	SAB (DM200)	37°C	Aérobie	48 h
<i>Edwardsiella tarda</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Enterococcus faecalis</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Escherichia coli</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Haemophilus influenzae</i>	Chocolate (DM115)	37°C	5-10% CO2	24 h
<i>Hafnia alvei</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Lactobacillus casei</i>	Chocolate (DM115)	37°C	5-10% CO2	48 h
<i>Lactococcus lactis</i>	Chocolate (DM115)	37°C	5-10% CO2	24 h
<i>Legionella pneumophila</i>	BCYE (DM258)	37°C	Humide	48 h
<i>Listeria ivanovii</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	48 h
<i>Morganella morganii</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	LJ (DM100)	37°C	Aérobie	72 h
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC (DM136)	37°C	5-10% CO2	24 h
<i>Pasteurella multocida</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Peptostreptococcus assaccharolyticus</i>	5% blood (DM115)	37°C	Anaérobie	24 h
<i>Proteus mirabilis</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Rhodococcus equi</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SAB (DM200)	37°C	Aérobie	48 h
<i>Salmonella typhimurium</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Serratia marcescens</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Shigella sonnei</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5% blood (DM115)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Vibrio cholerae</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Yersinia spp.</i>	DST (DM215)	37°C	Aérobie	24 h
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	SAB (DM200)	37°C	Aérobie	72-120 h

DST Diagnostic sensitivity test agar

SAB Sabouraud dextrose agar

BCYE Base agar Legionell

LJ Milieu Lowenstein Jensen (egg)

GC Base agar Gonococci

Résultats

Les résultats peuvent être vus dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Résultats de l'essai montrant la durée de stockage avec récupération réussie à -70°C et -20°C, par rapport au temps de stockage recommandé.

Organisme	NCTC	ATCC®	NEQAS	Stockage avec récupération réussie (mois)		Durée de stockage recommandée (années)	
				-70°C	-20°C	-70°C	-20°C
<i>A. lwoffii</i>	5866	15309		108	78	5	3
<i>A. hydrophila</i>	8049	7966		108	78	5	3
<i>A. niger</i>				108	24*	5	1
<i>B. cereus</i>		14579		108	78	5	3
<i>B. subtilis</i>	10400	6633		108	24*	5	1
<i>B. fragilis</i>				108	12*	½	½
<i>B. bronchiseptica</i>		10580		108	70*	5	3
<i>B. cepacia</i>	10661	17759		108	78	5	3
<i>C. coli</i>	11366	33559		45*	1*	3	0
<i>C. albicans</i>		90029		108	18*	5	1
<i>C. freundii</i>	9750	8090		108	78	5	3
<i>C. difficile</i>	11204			108	70*	5	3
<i>C. perfringens</i>	8237	13124		108	45*	5	2
<i>C. diphtheriae</i>			3091	108	18*	5	3
<i>C. neoformans</i>		90112		108	24*	5	1
<i>E. tarda</i>	11934			108	78	5	3
<i>E. aerogenes</i>	1006	13048		108	70*	5	3
<i>E. faecalis</i>		29212		108	78	5	3
<i>E. rhusiopathiae</i>			4024	108	18*	5	1
<i>H. influenzae</i>				108	2*	5	0
<i>H. alvei</i>			3030	108	78	5	3
<i>K. pneumoniae</i>		13883		108	45*	5	2
<i>L. casei</i>	10302			108	6*	5	½
<i>L. lactis</i>	662			108	78	5	3
<i>L. pneumophila</i>	12821			108	45*	5	2
<i>L. ivanovii</i>	11846	19119		108	78	5	3
<i>L. monocytogenes</i>	5214			108	78	5	3
<i>M. catarrhalis</i>			4062	108	78	5	3
<i>M. morgani</i>			3094	108	70*	5	3
<i>M. smegmatis</i>				108	70*	5	3
<i>N. gonorrhoeae</i>				12*	1*	1	0
<i>P. multocida</i>			4009	108	6*	5	½
<i>P. assaccharlyticus</i>			3092	108	45*	5	2
<i>P. mirabilis</i>		12453		108	24*	5	1
<i>P. aeruginosa</i>	10662			108	18*	5	2
<i>R. equi</i>	1621	6939		108	45*	5	2
<i>S. cerevisiae</i>	3178			108	45*	5	2
<i>S. typhimurium</i>	12023	14028		108	78	5	3
<i>S. marcescans</i>	1372			108	45*	5	2
<i>S. sonnei</i>	8574			108	78	5	3
<i>S. aureus</i>	1803			108	24*	5	2
<i>S. epidermidis</i>	11047	14990		108	78	5	3
<i>S. pneumoniae</i>				108	2*	5	½
<i>V. cholerae</i>	11348			108	78	5	3
<i>V. parahaemolyticus</i>		17803		108	78	5	3
<i>Yersinia spp.</i>				108	78	5	3
<i>Z. rouxii</i>	7807			108	12*	5	½

Les résultats marqués * représentent le stockage mensuel maximum possible et la récupération réussie à cette température. Tous les autres résultats représentent la durée de stockage connue à ce jour. L'essai de l'étude à -20°C a été interrompu après 78 mois.

Résumé

Le stockage des microbes peut être accompli en utilisant le système **CRYOBANK®**. Bien que conçu à l'origine pour une utilisation à -70°C, le système peut également être utilisé à -20°C. Il a été noté au cours de cette étude que les organismes ayant des besoins nutritionnels minimaux conservaient leur stabilité dans le cryobank™ plus longtemps que les organismes plus exigeants. Il est recommandé que des organismes tels que *Enterobacteriaceae*, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., Entérocoques et levures (sauf *Z. rouxii*), dont beaucoup sont associés à la microbiologie des aliments et de l'eau, puissent être stockés dans ces laboratoires à -20°C.

Les organismes, recommandés pour le stockage à des températures plus basses (-70°C) comprennent pour la plupart des souches exigeantes, bien qu'il y ait quelques exceptions telles que *B. bronchiseptica* et *Mycobacterium* spp. Ainsi, le système n'a pu être recommandé pour une utilisation générale dans des laboratoires cliniques autres qu'à -70°C.

Il a été démontré au cours de cette étude que les organismes peuvent survivre pendant trois ans lorsqu'ils sont stockés à -20°C, trois ans est le temps maximum que nous recommandons, pour tout organisme stocké à -70°C cette température permet des durées de stockage plus longues allant jusqu'à cinq ans.

La majorité des organismes survivent pendant cette durée et il a également été démontré, par cette étude, leur survie allant jusqu'à neuf ans (Tableau 2).

Pour les clients utilisant ce système de stockage indéfini, il sera essentiel de vérifier régulièrement la viabilité des organismes stockés après la période de stockage recommandée de cinq ans. Ceci assure le maintien de l'intégrité et de la viabilité des organismes.

Bien qu'une grande variété d'organismes ait été testée, il y en a encore beaucoup qui n'ont pas été impliqués dans l'étude et, par conséquent, de tels organismes nécessiteraient une validation par l'utilisateur final.



CRYOBANK® – Le stockage des champignons

Les champignons formant des spores nécessitent la récolte des spores et leur suspension dans un milieu de croissance frais contenant l'agent cryoprotecteur. Lors de la congélation des spores fongiques, il faut prendre soin de ne pas retarder trop longtemps le processus de congélation pour s'assurer que la germination ne se produit pas avant la congélation. Pour les champignons qui ne forment pas de spores, des procédures spéciales pour la récolte de mycélium, avant la congélation, doivent être utilisées. Pour les champignons ayant des mycéliums résistants, la culture est récoltée à partir de la croissance de gélose, en coupant et en retirant les bouchons d'agar contenant les mycéliums et en les plaçant dans un milieu de croissance frais contenant l'agent cryoprotecteur. Les mycéliums durs qui n'adhèrent pas bien aux cultures d'agar sont cultivés en culture de bouillon et la masse mycélienne est mélangée avant la congélation.

Guide général

Type de cellules :	Nombre de cellules :	Température de stockage minimum:
Bactérie	10^7 / mL	-60°C*
Bactériophage	10^8 / mL	-60°C
Champignon- Hyphe	†	-150°C
Spores	10^6 / mL	-60°C
Levure	10^7 / mL	-150°C
Protozoaire	$10^5 - 10^7$ / mL	-150°C
Algue	$10^5 - 10^7$ / mL	-150°C

* Bien que -60°C soit adéquat pour la plupart des organismes dans les groupes mentionnés, certaines cellules sensibles peuvent ne pas survivre pour de longues périodes de stockage à cette température.

† Les masses mycéliennes sont préparées pour la congélation des hyphes des champignons sans tenir compte du nombre de cellules.

La récupération des champignons à partir des cryobilles à -70°C et -20°C

Après 6 mois de stockage, *Aspergillus niger* a été récupéré avec succès à partir de cryotubes stockés à -70°C et -20°C. La croissance produite était meilleure à -70°C qu'à -20°C. Cependant, après un an, la récupération d'*Aspergillus niger* était encore atteinte et le taux de récupération semblait être similaire pour les deux températures.

D'après des travaux antérieurs sur le stockage de champignons à -20°C, Smith (1991)⁹, a rapporté que des souches d'*Aspergillus*, *Penicillium* et des genres apparentés ont bien survécu jusqu'à 5 ans. Cependant, ils ont également signalé que certains champignons tels que *Martensiomycetes*, certains oomycètes et moisissures d'eau sont sensibles et meurent lorsqu'ils sont congelés à cette température. En général, les isolats qui poussent bien en culture sont les plus susceptibles de survivre au stockage à -70°C et -20°C.

Méthode d'inoculation de Cryotubes avec des champignons

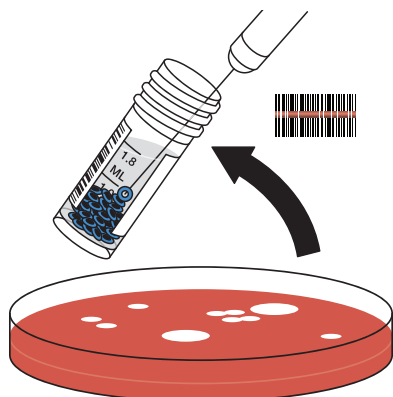
Pour le stockage adéquat des champignons, de grandes quantités de spores doivent être inoculées dans les cryotubes. La méthode utilisée doit être relativement rapide avec une exposition minimale des spores à l'air, en raison de la facilité avec laquelle de telles spores sont en suspension dans l'air et des risques associés.

Un petit bouchon d'agar est retiré à l'aide d'un perce-bouchon et placé dans le cryotube. Le cryotube est ensuite agité pour répartir et permettre l'adhérence des spores aux billes. L'excès de liquide et le bouchon d'agar sont ensuite retirés et le cryotube est placé à -70°C. Cette méthode est également recommandée pour les champignons qui ne contiennent que du mycélium.

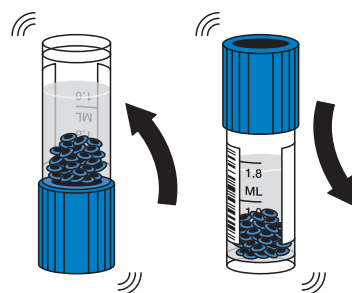
En outre, avant l'inoculation, certains chercheurs ont recommandé une étape de durcissement à froid pour les champignons. C'est là que les cultures sont placées dans un réfrigérateur à 4-7°C et laissées à croître pendant une courte période.

Stockage de vos organismes utilisant le code-barres **CRYOBANK®**

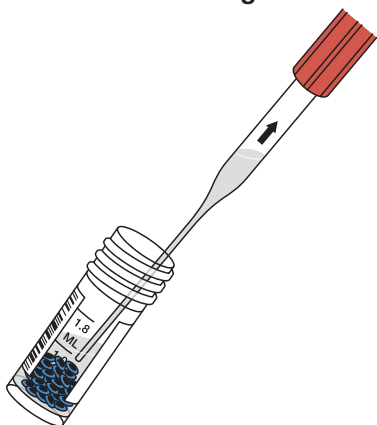
L'introduction du code-barres linéaire permet une numérisation plus rapide et une différenciation traçable dans votre **CRYOBANK®**. Le code-barres permet une traçabilité complète et peut être utilisé avec tous les lecteurs de code-barres couramment utilisés. En variante, le codage de l'organisme peut être transcrit sur le cryotube ou sur un autre enregistrement permanent.



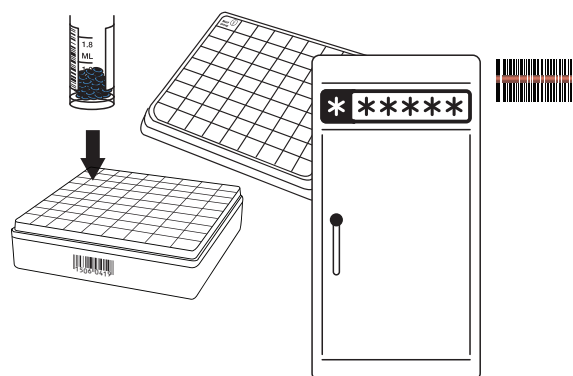
1. Scannez le code-barres pour l'affecter à l'échantillon, ou bien étiquetez le cryotube et inoculez le avec l'organisme sélectionné.



2. Mélangez soigneusement en retournant le cryotube.

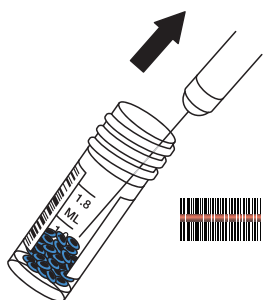


3. Enlever le liquide avec une pipette stérile.

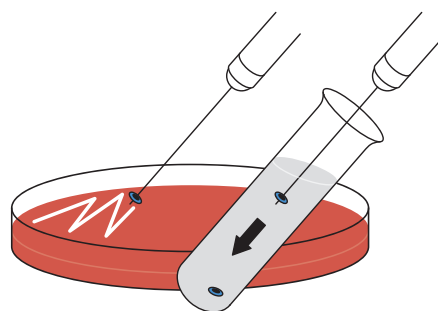


4. Scannez le code-barres sur le cryotube et la boîte vers votre logiciel. Stocker le cryotube inoculé dans la cryobox à la température sélectionnée.

Enlever vos organismes du **CRYOBANK®**



1. Retirer le cryotube du congélateur et scanner le code-barres. Retirez aseptiquement une seule bille avec une aiguille stérile.



2. Ensementez la bille par stries sur la surface d'un milieu solide approprié ou laissez-la tomber dans un milieu liquide. Incuber au besoin.

Stockage

Pour assurer la stabilité génétique d'une culture, le nombre de repiquage depuis la culture primaire doit être minimisé. Lorsque vous congelez des cellules, utilisez un système qui garantit que du matériel aux cycles de repiquage limités est toujours disponible pour la production de nouveaux stock de travail. Une méthode de préservation du matériel primaire consiste à utiliser une procédure de type "seed lot system".

Lors de la préparation du premier lot congelé d'une culture, une partie du lot est mise de côté en tant que matériel mère. Les flacons désignés comme étant des stocks mères sont maintenus séparément des stocks de travail pour s'assurer qu'ils restent inutilisés et ne sont pas manipulés pendant les opérations de récupération. Lorsque le premier stock de travail est épuisé, un flacon est récupéré du lot mère et utilisé pour préparer un deuxième lot. Le deuxième lot repiqué ne diffère que par un ou deux repiquages du matériel d'origine, mais peut être séparé de nombreuses années si les lots sont de taille adéquate.

En plus du matériel primaire, une petite partie du lot original devrait être séparée et maintenue dans un endroit éloigné de tout autre matériel. De préférence, ce matériau de réserve doit être stocké dans un emplacement hors site, similaire à la pratique de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les stocks de réserve garantissent que les souches ne sont pas perdues en cas de catastrophe physique sur le site principal. L'utilisation de lots primaires et le maintien de matériel de réserve hors site sont d'une importance primordiale pour assurer la continuité et la longévité de toute collection de culture bien gérée.

Préparation des cellules

Plusieurs facteurs doivent être pris en compte lors de la préparation des cellules pour la cryoconservation. Ceux-ci comprennent le type de cellule, les conditions de croissance, l'état physiologique des cellules, leur nombre et la façon dont elles sont manipulées. Lors de la préparation du stock d'un nouvel isolat ou d'une nouvelle lignée cellulaire, la culture doit être examinée concernant son identité et la présence de micro-organismes contaminants. Ce processus de culture devrait être répété après la conservation et chaque fois qu'un nouveau lot de la culture est préparé.

Micro-organismes

Les cellules microbiennes récoltées à partir de cultures tardives ou de cultures stationnaires précoces montrent également une plus grande résistance au processus de congélation que les cellules plus jeunes ou plus âgées.

En général, plus le nombre de cellules présentes est important, plus la récupération est importante. Pour la plupart des bactéries et des levures, environ 10^8 cellules /mL sont nécessaires pour assurer une récupération adéquate.

La viabilité et une estimation de la récupération doivent être déterminées avant et après la congélation de la culture. La viabilité est une mesure de la capacité de la culture à croître et à se reproduire. Une estimation du nombre de cellules récupérées peut être faite par plusieurs moyens incluant la dilution en série, le nombre de plaques et le comptage cellulaire direct. Une comparaison des comptages avant et après congélation donne une indication du degré de récupération ou du succès de la procédure de conservation.

Pour stocker les bactéries à l'aide d'un **CRYOBANK**[®], on cultive une culture pure sur de l'agar non sélectif (plus d'une plaque peut être nécessaire) et la suspension initiale dans le cryotube doit être très lourde et trouble. Le liquide en excès doit ensuite être retiré pour permettre aux perles congelées d'être enlevées sans décongeler les autres perles. Cela va prolonger la période de récupération.

La température à laquelle les préparations congelées sont stockées affecte la durée après laquelle les cellules peuvent être récupérées. Plus la température de stockage est basse, plus la période de stockage est longue.

Une mauvaise manipulation du matériau maintenu à des températures cryogéniques peut avoir un effet néfaste sur la viabilité des cellules congelées. Chaque fois qu'une ampoule ou un flacon congelé est exposé à un environnement plus chaud, même brièvement, il subit un changement de température. Les systèmes de stockage doivent être conçus de manière à minimiser l'exposition des matériaux stockés à des températures plus élevées, ainsi qu'à minimiser l'exposition prolongée du personnel pendant la récupération des échantillons.

En général, certaines limites ont été identifiées lors de l'utilisation de **CRYOBANK**[®] pour le stockage des microbes à -20°C. Les organismes les plus robustes s'en tirent mieux lorsqu'ils sont conservés à -20°C, contrairement aux organismes plus exigeants.

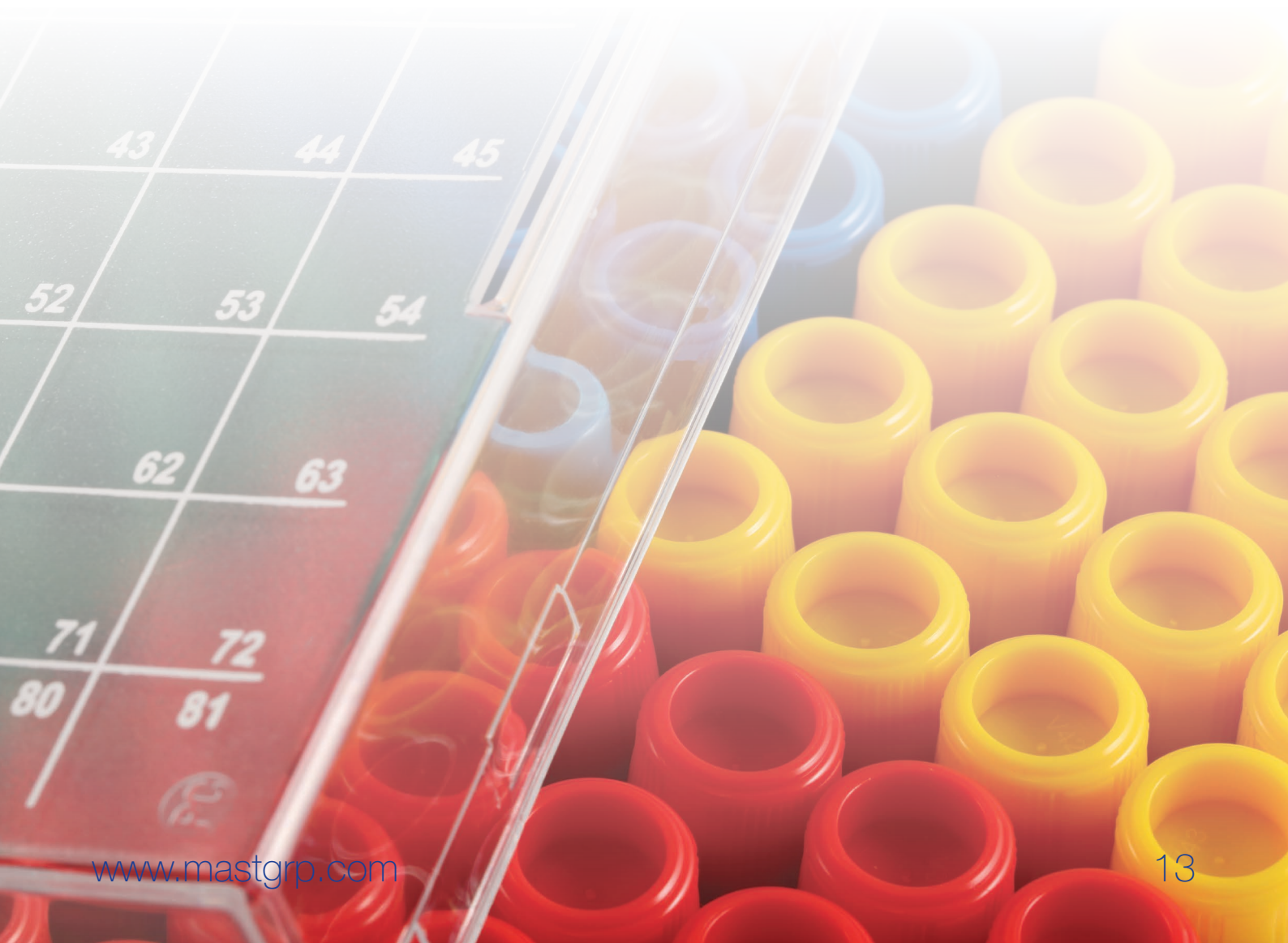
Les organismes comme *Enterobacteriaceae*, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococci* et les levures (sauf *Zygosaccharomyces rouxii*) peuvent être conservés à -20°C avec le **CRYOBANK**[®]. Beaucoup de ces organismes sont associés à la microbiologie des aliments et de l'eau et, par conséquent, le système peut être utilisé dans ces laboratoires à -20°C. Les organismes qui ne sont pas recommandés pour le stockage à cette température comprennent la plupart des souches exigeantes, bien qu'il existe quelques exceptions telles que *Bordetella bronchiseptica* et *Mycobacterium* spp. Ainsi, ce système n'a pas pu être recommandé pour une utilisation générale dans des laboratoires cliniques autres qu'à -70°C.

Stockage, stabilité et transport du CRYOBANK®

Les produits de Mast Group Ltd sont fabriqués conformément à un système de qualité certifié ISO 13485 qui couvre la conception, la fabrication et la fourniture de produits de laboratoire de diagnostic in vitro

Mast Group Ltd a effectué des tests de stabilité à long terme pour s'assurer que la performance du produit reste dans la tolérance spécifiée, dans les conditions de stockage recommandées sur la période entre la fabrication et la date de péremption indiquée. Les études sont basées sur des tests « en temps réel ». Les dossiers techniques du produit comprennent des preuves d'essais de stabilité qui indiquent que les produits **CRYOBANK®** peuvent être entreposés et transportés à température ambiante jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit et avant utilisation, conformément à l'usage auquel ils sont destinés. Une fois utilisés, conformément à leur destination, les tubes **CRYOBANK®** doivent être conservés à la température et aux conditions indiquées dans le mode d'emploi du produit.

Mast Group Ltd n'offre aucune garantie, expresse ou implicite, et n'assume aucune responsabilité en ce qui concerne les conditions d'expédition, le mode de stockage et l'utilisation incorrecte du produit, qui peuvent survenir ou échapper au contrôle de Mast Group Ltd.



Références

1. Bagi LK, Buchanan RL. Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Lett Appl Microbiol*; (1993) 17: 37-39.
2. Feltham RKA, Power AK, Pell PA, Sneath PHA. A simple method for storage of bacteria at -76°C. *J. Appl Bacteriol* (1978); 44: 313-316.
3. Heckly R.J. Preservation of micro-organisms. *Adv. Appl. Mic.* (1978) 24:1-53
4. Jones D, Pell PA, Sneath PHA. Maintenance of bacteria on glass beads at -60°C to -76°C. In: *Maintenance of micro-organisms and cultured cells*. 2nd ed. Kirsop BE, Doyle A, editors. London: Academic Press, (1991): 45-50.
5. Lapage SP, Redway KF. Preservation of bacteria with notes on other micro-organisms. *Public Health Laboratory Service. Monograph 7*. London. HMSO. (1974): 2-23.
6. Rudge RH. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In: *Maintenance of micro-organisms and cultured cells*. 2nd ed. Kirsop BE, Doyle A, editors. London: Academic Press, (1991): 31-43.
7. Simone FP. Cryopreservation manual. Nalge Company, (1992): 2.
8. Smith D. Maintenance of Filamentous Fungi. *Maintenance of Micro-organisms and Cultured Cells*. Kirsop BE, Doyle A, editors. London: Academic Press, (1991) 133 - 160.
9. Smith D., and Allsopp D. Preservation and maintenance of biotechnological micro-organisms. *Industrial Biotechnology International*. (1993).
10. Snell JJS. Preservation of control strains. In: *Quality Control -principles and practice in the microbiology laboratory*. Snell JJS, Farrell D, Roberts C, editors. *Public Health Laboratory Service*, (1991): 87 -94.
11. BS6068-4.12:(1998), ISO11731:(1998). Water Quality. Microbiological methods-detection and enumeration of *Legionella*.

Le moyen le plus rentable et le plus sûr de maintenir l'intégrité des collections de cultures précieuses consiste à utiliser les tubes CRYOBANK® et le MAST® CRYOBLOCK.

Idéal pour

- Stockage simple et pratique d'isolats précieux
- Souches de contrôle ATCC / NCTC pour le contrôle qualité
- Cultures envoyées aux laboratoires de référence
- Isolats cliniques importants, par exemple les hémocultures
- Organismes résistants à plusieurs antibiotiques
- Projets de recherche / formation



Informations

Code MAST	Désignation	Description	Conditionnement
CRYO80/B	CRYOBANK 03^ ^	25 billes bleues par tube	1 x 80 tubes
CRYO80/G	CRYOBANK 03!^^}	25 billes vertes par tube	1 x 80 tubes
CRYO80/R	CRYOBANK 03^â	25 billes rouges par tube	1 x 80 tubes
CRYO80/Y	CRYOBANK 03^ ,	25 billes jaunes par tube	1 x 80 tubes
CRYO80/M	CRYOBANK Mixed	25 billes 4 couleurs (rouge, vert, bleu, jaune)	1 x 80 tubes
291610	CRYOBLOCK	Portoir isotherme pour 18 tubes	1
CRYO80/BOX	CRYOBANK Box	Boîte en plastique vierge	1

V1.0/SJW/JAN18

Royaume Uni
Mast Group Ltd.
Mast House
Derby Road, Bootle
Merseyside L20 1EA

Tel: + 44 (0) 151 933 7277
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
e-mail: sales@mastgrp.com

Allemagne
Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld

Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
e-mail: mast@mast-diagnostica.de

France
Mast Diagnostic
12 Rue Jean-Jacques Mention
CS 91106
80011 Amiens CEDEX 1

Tél. + 33 (0) 322 80 80 67
Fax + 33 (0) 322 80 99 22
e-mail: info@mast-diagnostic.fr