

PROTOCOLE d'infection du virus Covid-19 dans les cellules VERO E6

Date :

Dégel des cellules VERO E6 par Tonya Roy et mis dans flacons F25 avec MEM 2%

Date : 2020-03-11

Passage des cellules VERO E6 dans du milieu de croissance DMEM 2%

1 flacon de 1×10^6

1 flacon 2×10^6

2 flacons $0,5 \times 10^6$

Date : 2020-03-13

Inoculation du spécimen L00214517 dans le flacon 1×10^6

Flacon confluent à 90%

Retrait du milieu de croissance DMEM

Lavage des cellules avec PBS influenza

100ul de spécimen + 900ul de milieu de maintien DMEM directement sur les cellules dans le flacon. Contact 60 minutes, légères agitation aux 20 minutes.

Ajout de 9 ml de milieu de maintien DMEM.

Date : 2020-03-16

Lecture du flacon infecté

50% des cellules flottent, rondes et boursouflées

50% du feuillet est attaché au flacon

Voir photos dans le fichier secure /partage/virologie/corona virus 2020

20ul du surnageant mis dans 2 ml de solution de lyse pour analyser au PCR

Date : 2020-03-17

Lecture du flacon infecté

70% des cellules sont détachées

30% du feuillet est attaché au flacon, feuillet affiche l'effet cytopathique du virus

Voir photos dans le fichier secure /partage/virologie/corona virus 2020

2 flacons F25 à $0,5 \times 10^6$ cellules VERO E6

Retrait du milieu de croissance DMEM

Lavage des cellules avec PBS influenza

1 flacon ajout de 10 ml de milieu de maintien DMEM 2% pour contrôle négatif

1 flacon ajout de 500ul de surnageant de l'infection + 500ul de milieu de maintien.

Contact 60 minutes, légères agitation aux 20 minutes.

Ajout de 9 ml de milieu de maintien DMEM.

Récolte du reste du surnageant du flacon infecté, 7 cryovials d'environ 1,5ml

Congélateur -80C au local 1.253 portoir 2 position 1.

Sylvie Nancy Beaulac



INOCULATION DE SPÉCIMEN POUR LA CULTURE DE VIRUS SARS-CoV-2

Noms

Auteur(s) : Carole Dagenais

Réviseur(s) : Sylvie Nancy Beaulac

Approbateur : Hugues Charest

Coordonnateur du document : Sylvie Nancy Beaulac

Cette page se veut intentionnellement sans texte

COPIE DE COURTOISIE

I. PRÉAMBULE

Ceci est un nouveau document créé comme guide pour l'inoculation en culture de SARS-CoV-2 détectés par PCR dans des échantillons cliniques, ou à partir de lignées cellulaires infectées afin d'amplifier le nombre de particules virales.

II. OBJET

Ce document vise à décrire la technique employée pour inoculer une lignée cellulaire à partir de spécimens respiratoires prélevés ou à partir de lignées cellulaires infectées afin d'amplifier le nombre de particules virales.

III. OBJECTIFS

Cette technique permet de mettre en évidence le caractère contagieux de particules de SARS CoV-2 par l'observation d'un effet cytopathique.

IV. CHAMP D'APPLICATION

Ce document est destiné au personnel du secteur Sérodiagnostic et virologie ayant reçu une formation en NC3 adéquate et documentée, ainsi qu'une formation en culture cellulaire. Cette procédure s'applique aux spécimens reçus pour le diagnostic d'une infection par le virus respiratoire SARS-CoV-2.

V. DÉFINITIONS DES TERMES

ECP : Effet cytopathique

VI. PRINCIPE

L'inoculation de spécimen permet lorsqu'il y a présence de virus de fixer ces derniers sur la paroi cellulaire. Les virus une fois adsorbés pénètrent dans la cellule pour se multiplier. Cette multiplication virale permet généralement d'observer un ECP dans la lignée de cellule VeroE6 lorsque plusieurs cycles de répliquations détruisent les cellules infectées.

VII. SPÉCIMEN

Les spécimens sont de nature respiratoire ou peuvent provenir de cultures cellulaires.

VIII. MATÉRIEL REQUIS

Matériel :

- Tube à centrifugation de 15 ml ou de 50 ml
- Pipettes sérologiques de 1, 5 et 10 ml
- Vial pour culture cellulaire (#5900239 ou équivalent)
- Flacon (F25)
- Pipettes de transfert stériles
- Incubateur (36 – 38°C) avec 5% de CO₂
- Micropipette de 10 à 100 µL et embouts stériles
- Micro tubes stériles 2,0ml Sarstedt #cat 72.693.005 ou équivalent
- Vortex

Réactifs :

- Solution de PBS - influenza pH 7,5
- Milieu de maintien utilisé pour l'inoculation des spécimens (milieu DMEM, glutamine, HEPES, GVF 100X – gentamycine, vancomycine, fungizone – et sérum fœtal bovin. Voir le registre RE-VR-003 et le modifier avec l'ajout de GVF 100X au lieu de gentamicine
- Cellules VeroE6 en culture

IX. ÉQUIPEMENT (entretien et vérification)

Les appareils utilisés sont vérifiés et entretenus en fonction de leur procédure respective.

X. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Chaque analyse doit inclure un contrôle interne négatif – vial de cellules non infecté.
Un contrôle positif doit être inclus à l'utilisation d'un nouveau lot de cellules – portion aliquote adéquate de contrôle positif interne.

XI. PRÉCAUTIONS SPÉCIALES

Toute manipulation avec des cultures cellulaire infectées avec des échantillons de patients potentiellement positifs pour le virus SARS CoV-2 doit être effectuée sous une ESB en **NC3**.

XII. EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

1) Inoculation en vial :

Préparation des vials en NC2

- Laver les cultures de cellules avec du PBS pH 7,5 stérile préchauffé à 36 - 38°C (2,0 mL pour un vial).
- Ajouter 2,0 ml de milieu de maintien préchauffé à 36 - 38°C.
- À cette étape, ajouter 100µL de milieu dans le témoin négatif.
- Vortexer les échantillons et les placer dans une mallette pour le transfert en NC3.

*Transférer les portoirs de vials et échantillons en **NC3** pour faire l'inoculation*

- Ajouter 100µL de l'échantillon à analyser (au besoin incliner les tubes).
- Prendre soin de dévisser légèrement les tubes.
- Incuber le portoir de vials à 36 – 38°C avec 4,0-6,0% de CO₂.

Si possible, effectuer une lecture journalière des cultures pendant 10 jours et inscrire les résultats de l'observation du feuillet cellulaire dans le registre qui sera numérisé et envoyé à votre poste de travail.

Au besoin, si le milieu devient acide (jaunâtre) ou si le feuillet du témoin négatif dégénère, au jour 5 jours ± 2 retirer environ 1,0 mL de milieu pour le remplacer par du milieu frais.

Note : Reprendre l'inoculation du spécimen s'il y a présence de contamination.

2) Inoculation avec culture cellulaire en flacon (F25)

- Diluer l'échantillon au besoin avec du milieu de maintien DMEM. (ex.100 µL culture + 900µL DMEM)
- Laver les cultures de cellules avec 5,0 mL de PBS pH 7,5 stérile.
- Ajouter environ 1,0 mL d'échantillon (possiblement dilué) à analyser.
- Incuber à 36 - 38°C pour 60 minutes à 4,0 - 6,0% de CO₂ en agitant à toutes les 20 minutes.
- Ajouter le milieu de maintien (ex: 9,0 mL pour les flacons de culture de 25 cm²).
- Incuber un flacon de cellules non infectées qui servira comme contrôle négatif.
- Incuber à 36 - 38°C à 4,0 à 6,0% de CO₂ en dévissant légèrement les flacons de culture.

Si possible, effectuer une lecture à tous les jours pendant 10 jours et inscrire ces résultats dans le registre.

Au besoin, au jour 5 ± 2, faire un changement de milieu de maintien si le milieu devient acide ou le feuillet du témoin négatif dégénère. Retirer 7,0 ml de milieu et en ajouter l'équivalent.

Note : Reprendre l'inoculation du spécimen s'il y a présence de contamination.

Au besoin, effectuer le test PCR avec les spécimens analysés

XIII. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Un résultat positif est exprimé par un ECP. Généralement l'échelle utilisée est de 1+ à 4+ (1+ étant un ECP très faible). Quand l'ECP est de 3 à 4+, il reste moins de 25% de cellules encore adhérentes au vial ou flacon et l'échantillon est considéré positif. Récolter le surnageant et le distribuer dans des tubes Sarstedt ou cryotubes à raison de 1,0 ml/tube qui seront entreposés dans le congélateur au NC3 à -70°C.

Bien identifier les tubes en inscrivant le numéro d'identification du spécimen, et autres informations possiblement pertinents - la date de récolte, la journée post-infection.

S'assurer de mettre à jour le registre d'inventaire de placement des échantillons dans le congélateur tombeau à -70°C disponible dans le cartable au local 1.253 et aussi dans S : partage/virologie/congélateur NC3 (-70) #3124.

Noter qu'un spécimen est négatif après 10 jours si aucun ECP n'est observé en culture. Le spécimen est alors jeté ou conservé si il devient pertinent d'effectuer d'autres analyses sur le surnageant.

XIV. LIMITES DE LA MÉTHODE

Un résultat négatif n'exclut pas la présence de virus dans le spécimen clinique.

Un effet cytopathique (ECP) n'est pas nécessairement relié à une propagation du virus CoV-2, il peut être causé par la présence d'un autre virus ou être dû à un effet cytotoxique.

XV. ENREGISTREMENT DES DONNÉES

Inscrire et numériser les résultats au registre "Inoculation d'échantillons pour virus Respiratoire".

XVI. RÉFÉRENCES

Modification de la procédure utilisée au LSPQ pour l'inoculation de virus respiratoire (Influenza).

Abstract publié 2020-03-11 : CDC Volume 26, Number 6 – June 2020 (ISSN :1080-6059)