

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/LSA-INS-1320 - Version 04

Octobre 2024

Recherche du virus de l'Artérite Virale Équine par isolement sur culture cellulaire



Laboratoire de santé animale, site de Normandie

Unité Physiopathologie & Épidémiologie des Maladies Équines (PhEED)

Laboratoire national de référence pour l'Artérite virale équine

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V2	Mineures	12/12/2011	
V3	Mineures	27/10/2015	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses
V4	Mineures	10/2024	Modifications de forme : mise à jour du logo Anses, améliorations rédactionnelles en particulier homogénéisation des quantités pour 50cm ² de cellules. §5.2. Mise à jour du tableau des réactifs (concentrations, fabricants, références, conditionnements) Réception et centrifugation des échantillons déplacées au §7.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par : Delphine Froger & Aymeric Hans

Anses - Laboratoire de santé animale, site de Normandie

Laboratoire National de Référence « Artérite virale équine »

Adresse : 1180 route de l'Eglise – 14430 Goustranville

Contact : José Carlos Valle-Casuso, chef de l'unité PhEED

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	6
2. Documents de référence	6
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	7
5. Réactifs	7
5.1. Eau	7
5.2. Milieux de culture et additifs.....	7
5.2.1. Milieu de culture MEM complet à 2% de SVF :.....	8
5.2.2. Milieu CMC :.....	8
5.2.3. Tampon de coloration au Crystal Violet :.....	9
5.3. Cellules.....	9
6. Appareillage et matériels	9
7. Échantillons	10
7.1. Conditions d'acceptation des échantillons	10
7.2. Réception de l'échantillon	10
7.3. Centrifugation de l'échantillon.....	10
7.4. Conservation des échantillons avant analyse.....	11
8. Mode opératoire	11
8.1. Dilution des échantillons pour analyse	11
8.2. Isolement viral	11
8.2.1. Passage 1 :.....	11
8.2.2. Passages 2 et 3 :.....	12
8.3. Confirmation de la présence d'AVE	13



9. Résultats.....	13
9.1. Contrôle qualité	13
9.2. Calculs et expression des résultats.....	13
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	14
Annexe A - Bibliographie	15

Introduction

La mise en évidence du virus de l'artérite virale équine est réalisée par isolement et amplification du virus sur culture cellulaire.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

1. Objet et domaine d'application

Le présent document décrit la technique afin de mettre en évidence le virus de l'Artérite Virale Équine dans la semence d'étalon par isolement viral sur culture cellulaire. Elle s'applique au diagnostic de la maladie et permet aussi de définir le statut sanitaire des étalons possédant des anticorps reconnaissant le virus de l'Artérite Virale Équine.

2. Documents de référence

Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- [1] World Organization for Animal Health. Chapitre 3.6.9: Equine Viral Arteritis (Infection with Equine Arteritis Virus), Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres
- [2] NF U47-200. Méthodes d'analyse en santé animale, Guide de bonnes pratiques pour les cultures cellulaires

3. Termes, sigles et définitions

AVE : Artérite Virale Équine

RK-13 : Rabbit Kidney 13, cellules de rein de lapin

SVF : Sérum de Veau Foetal

MEM : Milieu Essentiel Minimum de Eagle

CMC : Carboxyméthylcellulose de sodium

ECP : Effet CytoPathogène

4. Principe de la méthode

L'isolement viral sur culture cellulaire permet de mettre en évidence le pouvoir cytolitique du virus de l'AVE sur les cellules de rein de lapin (RK-13). La formation de plage de lyse sur le tapis cellulaire permet de démontrer la présence dans l'échantillon à analyser d'un virus capable d'infecter de lyser les cellules.

5. Réactifs

Avertissement: Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1. Eau

L'utilisation d'une eau ultrapure est recommandée. Il est possible tout de même d'utiliser une eau dont la qualité est compatible avec les exigences de culture cellulaire.

5.2. Milieux de culture et additifs

Les références des différents réactifs utilisés au laboratoire sont détaillées à titre indicatif dans le tableau suivant :

Produit	Fabricant	Reference	Conditionnement
MEM	Gibco	31095	500 ml
NEAA 100X	Gibco	11140	100 ml
Sodium Pyruvate 100mM	Gibco	11360	100 ml

Pénicilline-streptomycine (5 000 U/ml)	Gibco	15070	100 ml
Hepes 1M	Gibco	15630	100 ml
SVF	HyClone	SV3016003	500 ml
Trypsine-EDTA (0,25 %), rouge de phénol	Gibco	25200-056	100 ml
Carboxyméthylcellulose de sodium	Sigma	C4888	500 g / 1 kg / 2.5 kg
Solution de formol, tamponnée à pH neutre (10 %)	Sigma	HT501128	4 l
Méthanol	Fisher Chemical	M/4058/PB17	2,5 l
Crystal Violet	Sigma	C0775	25 g / 100 g

5.2.1. Milieu de culture MEM complet à 2% de SVF :

Préparer le milieu de culture en ajoutant au milieu MEM : le Sodium Pyruvate, les acides aminés non essentiels, les antibiotiques et l'hépès aux concentrations recommandées pour le type cellulaire utilisé. Ajouter également du SVF décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes à une concentration finale de 2% (vol/vol).

5.2.2. Milieu CMC :

Préparer un milieu de culture MEM complet à 2% de SVF et à 0,75% de carboxyméthylcellulose de sodium comme suit :

Ajouter 3.75 g de CMC dans 70 ml d'eau en agitant afin de limiter la formation d'agréats.

Incuber à $21 \pm 4^\circ\text{C}$ pendant $16 \pm 2\text{h}$.

Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes (maintenir ensuite le milieu à une température d'environ 60°C).

Dans des conditions stériles, ajouter sous agitation douce du milieu MEM préchauffé à 60°C jusqu'à obtenir un volume d'environ 400 ml.

Une fois la température de la solution à environ 40°C , ajouter le Sodium Pyruvate, les acides aminés non essentiels, les antibiotiques et l'hépès aux concentrations recommandées et le SVF décomplémenté à une concentration finale de 2% (vol/vol).

Compléter le volume avec du milieu MEM afin d'obtenir un volume final égal à 500 ml.

Une fois préparé, conserver ce milieu CMC à 5 ± 3 °C pendant 2 mois.

5.2.3. Tampon de coloration au Crystal Violet :

5.2.3.1. Solution Stock de Crystal Violet :

Dissoudre 12g de Crystal Violet dans 600 ml de méthanol.

Conserver cette solution à 21 ± 4 °C dans une armoire ventilée.

5.2.3.2. Tampon de coloration :

Ajouter 1 volume de Solution Stock de Crystal Violet à 9 volumes de solution de formol, tamponnée à pH neutre (10 %).

Conserver cette solution à 21 ± 4 °C dans une armoire ventilée.

5.3. Cellules

Cellules RK-13 : ATCC N : CCL-37

Pour chaque échantillon et à chaque passage, prévoir une surface minimum de 50 cm² de cellules RK-13 dont la confluence est égale ou supérieure à 80%.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Systèmes de distribution (pipettes stériles, micropipettes, pipeteur)

Cônes à filtres stériles

Flasques ou plaques multipuits de culture cellulaire

Tubes stériles (15 ml – 2 ml – 1,5 ml)

Filtres 0,45 µm

Seringues (2 ou 5 ml) stériles

Microscope inversé

Autoclave

Bouteilles en verre stériles à bouchon vissé (500 ml)

Centrifugeuse

Pompe à vide

Congélateur à température $\leq -15^{\circ}\text{C}$

Enceinte réfrigérée ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$)

Balance de sensibilité adaptée

Poste de sécurité microbiologique de type 2

Enceinte thermostatée à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ à 5% de CO_2 .

7. Échantillons

7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

L'échantillon à analyser selon cette méthode est la fraction de l'éjaculat riche en sperme chez les étalons, le virus n'étant pas présent dans la partie pré-éjaculatoire du sperme. Immédiatement après avoir été recueilli, le sperme doit être réfrigéré et acheminé au laboratoire sous régime du froid. Dans le cas où le transport de l'échantillon du site de récolte au laboratoire n'est pas consécutif au prélèvement, l'échantillon peut être congelé à une température égale ou inférieure à -15°C puis transporté dans des conditions réfrigérées.

Le délai de livraison de l'échantillon au laboratoire ne doit pas excéder 48h.

7.2. Réception de l'échantillon

À réception de l'échantillon, le laboratoire doit :

- Vérifier si les échantillons sont congelés, réfrigérés ou à température ambiante.
- Vérifier au microscope que la semence à analyser correspond à la fraction riche en sperme de l'éjaculat en contrôlant la présence de spermatozoïdes.
- En cas de contamination par du sang, l'échantillon doit être refusé. En effet, si l'échantillon a été prélevé sur un étalon ayant des anticorps reconnaissant le virus de l'AVE, les résultats de l'isolement viral peuvent être erronés puisque ces anticorps sont susceptibles de bloquer l'infection des cellules par le virus AVE.

Une fois validé selon ces différentes conditions, l'échantillon ne doit pas être dilué.

7.3. Centrifugation de l'échantillon

Centrifuger l'échantillon à 1900 rpm pendant 10 minutes à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Récupérer le surnageant et éliminer le culot.

7.4. Conservation des échantillons avant analyse

Après avoir traité les échantillons tel que décrit dans le paragraphe 7.3 de cette méthode, les échantillons doivent être conservés dans une enceinte réfrigérée ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) si l'analyse est réalisée dans les 24 heures après sa réception. Pour une durée supérieure, les échantillons doivent être congelés.

8. Mode opératoire

8.1. Dilution des échantillons pour analyse

Diluer chaque échantillon au $1/10^e$, $1/100^e$ et au $1/1000^e$ final en milieu MEM complet à 2% SVF. Pour chaque dilution à tester, il faut au minimum 3 ml pour réaliser l'analyse.

8.2. Isolement viral

Nota : Pour chaque passage, si un effet de lyse est observé au microscope, conserver le surnageant de culture, le centrifuger, l'identifier et le congeler à une température inférieure à -15°C .

L'inoculation de chaque dilution sur les cellules RK-13 doit se faire sur une surface minimum de 50 cm^2 .

8.2.1. Passage 1 :

8.2.1.1. Inoculation du passage 1 :

Éliminer le surnageant de culture de la monocouche confluente de cellules RK-13(paragraphe 5.3).

Pour chaque échantillon, inoculer 2 ml de chaque dilution pour 50 cm^2 de cellules RK-13 confluentes.

Incuber 1 heure à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ à 5% de CO_2 .

Vérifier au microscope si un effet cytotoxique est observé, si oui le noter

Ajouter 18 ml de milieu CMC (paragraphe 5.2.2) pour 50 cm^2 de cellules RK-13.

Incuber à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ à 5% de CO_2 pendant 3 à 4 jours.

Nota : Prévoir une quantité suffisante de nouvelles flasques ou plaques multipuits de culture de cellules RK-13 pour le passage suivant.

8.2.1.2. Coloration du passage 1 :

Examiner chaque flasque au microscope afin d'identifier un Effet CytoPathogène (ECP).

Récupérer le surnageant de culture de chaque flasque ou puits. Même si aucun ECP n'est observé au microscope, il est conseillé de conserver chaque surnageant des isolats viraux, de les centrifuger à 4500 rpm pendant 10 minutes puis de les congeler.

Ajouter 4 ml de tampon de coloration (paragraphe 5.2.3.2) pour 50 cm² de cellules RK-13.

Incuber pendant 10 minutes au minimum à température ambiante.

Éliminer le tampon de coloration.

Rincer trois fois avec de l'eau.

Laisser sécher à température ambiante.

Noter si des plages de lyse sont observées ou non.

8.2.2. Passages 2 et 3 :

8.2.2.1. Inoculation du passage :

Éliminer le surnageant de culture de la monocouche conflente de cellules RK-13 (paragraphe 5.3).

Inoculer 2 ml de surnageant de culture de chacune des dilutions du passage 1 de l'isolement viral pour 50 cm² de cellules RK-13 confluentes.

Incuber 2 heures à 37 ± 2°C à 5% de CO₂.

Ajouter 18 ml de milieu CMC pour 50 cm² de cellules RK-13.

Incuber à 37 ± 2°C à 5% de CO₂ pendant 3 à 4 jours.

8.2.2.2. Coloration du passage :

Examiner chaque flasque au microscope afin d'identifier un Effet CytoPathogène (ECP).

Récupérer le surnageant de culture de chaque flasque ou puits. Même si aucun ECP n'est observé au microscope, il est conseillé de conserver chaque surnageant des isolats viraux, de les centrifuger à 4500 rpm pendant 10 minutes puis de les congeler.

Ajouter 4 ml de tampon de coloration (paragraphe 5.2.3.2) pour 50 cm² de cellules RK-13.

Incuber pendant 10 minutes au minimum à température ambiante.

Éliminer le tampon de coloration.

Rincer trois fois avec de l'eau.

Laisser sécher à température ambiante.

Noter si des plages de lyse sont observées ou non.

Nota : pour les échantillons négatifs après le troisième passage, il est possible d'en faire un quatrième.

8.3. Confirmation de la présence d'AVE

En cas d'isolement viral positif (présence de plages de lyse), la présence du virus AVE doit être confirmée en réalisant une RT-PCR classique ou en temps-réel sur le surnageant de chaque isolat viral positif. Il est également possible de tester le surnageant des isolats viraux ne présentant pas de plage de lyse.

9. Résultats

9.1. Contrôle qualité

Pour chaque isolement viral sur culture cellulaire, les témoins suivants doivent être analysés en parallèle des échantillons à analyser :

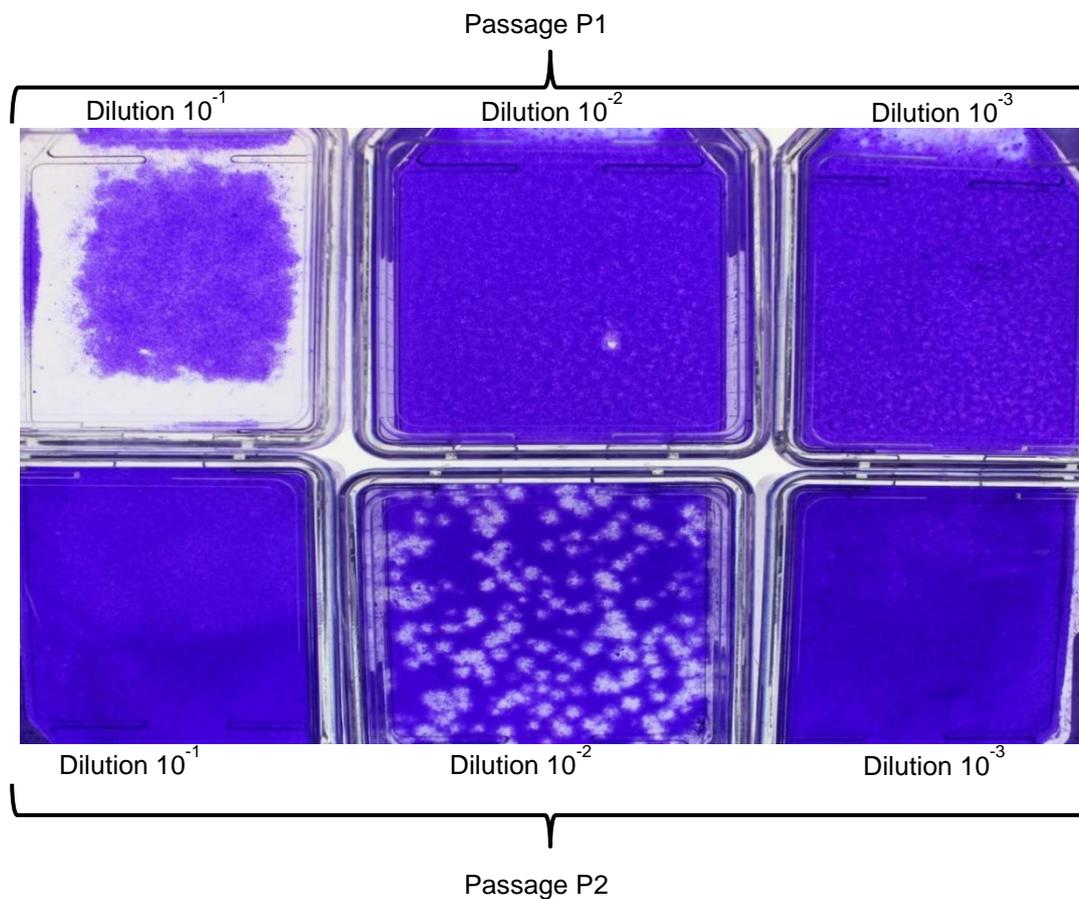
- Un échantillon de sperme dont le statut vis-à-vis du virus de l'AVE est positif en isolement viral sur culture cellulaire.
- Un échantillon de sperme dont le statut vis-à-vis du virus de l'AVE est négatif en isolement viral sur culture cellulaire.

Les résultats des témoins analysés en parallèle des échantillons doivent être conformes par rapport aux résultats attendus. Lorsque les résultats des témoins analysés ne sont pas conformes, l'analyse doit être relancée une nouvelle fois.

9.2. Calculs et expression des résultats

Si un ECP à une infection par le virus AVE est obtenu, l'échantillon est considéré comme positif en AVE. À titre indicatif, le laboratoire peut aussi noter le numéro de passage ainsi que la dilution à laquelle l'ECP a été obtenu.

Par exemple pour l'isolement viral suivant, l'échantillon analysé est positif au passage P2 à la dilution 10^{-2} .



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Un échantillon est considéré positif dès l'apparition d'un ECP quels que soient la dilution et le passage.

Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de virus infectieux dans la semence d'étalons. Cependant, si les conditions de collecte (7.1), de stockage et de transport (7.2) avant analyse ne sont pas respectées, un échantillon même positif peut ressortir négatif en isolement sur culture cellulaire. C'est pourquoi il est recommandé de réaliser une recherche du génome viral par RT-(q)PCR [3, 4] pour s'assurer que la semence est bien indemne d'AVE avant de statuer sur un résultat d'isolement viral négatif.

Annexe A- Bibliographie

- [1] World Organization for Animal Health. Mai 2013. Chapitre 3.6.9: Equine Viral Arteritis (Infection with Equine Arteritis Virus), Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, treizième édition 2024,
- [2] NF U47-200, Méthodes d'analyse en santé animale, Guide de bonnes pratiques pour les cultures cellulaires
- [3] Balasuriya UB, Leutenegger CM, Topol JB, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ. Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *J Virol Methods*. 2002 Mar;101(1-2):21-8.
- [4] Hans A, Gaudaire D, Manuguerra JC, Leon A, Gessain A, Laugier C, Berthet N, Zientara S. Combination of an unbiased amplification method and a resequencing microarray for detecting and genotyping equine arteritis virus. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):287-91

