

## Dyrking av SARS-CoV-2 22.04.2020

Startet dyrking av virus 1- XXX x 25 cm<sup>2</sup> flaske kl 14.30

1. Tilsett **100 µl av pasientprøven** (forhåndfortynnet 1/10 virus) **til 600 µl av MEM** (uten FBS, 1 % Pen/Strep 2,5 % hepes)
2. Fjern mediet i **Vero E6 passage 23** celleflaskene, og tilsett negativ kontroll (MEM) i flaske 1 og MEM med pasientprøven i flaske 2 (totalt 700 µl). Pass på at væsken dekker cellene så de ikke tørker, ikke fjern alt. Jobb med en celleflaske om gangen. Skru på korken, spray celleflaskene med etanol, legg de i transportboks på ren side av kabinettet, og ta på lokket. Den som hjelper frakter lukket transportboks til inkubatoren.
3. Inkubasjonstid: 1 time ved 37 °C. Vipp litt/forsiktig på celleflaskene hvert 15. minutt. kl 14.30-15.30
4. Den som hjelper henter transportboksen med platene fra inkubatoren, setter transportboksen på ren side av kabinettet og åpner lokket på transportboksen
5. Ta bort innokulatet i begge celleflaskene og tilsett 3 ml MEM med 5 % FBS, 1 % Pen/strep og 2,5 % hepes. Jobb med en celleflaske om gangen. Skru på korken, spray celleflaskene med etanol, legg de i transportboks på ren side av kabinettet, og ta på lokket. Den som hjelper frakter lukket transportboks til inkubatoren. Innokulatet tatt bort og flaskene tilsatt 3 ml kompl medium kl 15.35.
6. Inkubasjonstid:– ca. 48 timer –
7. **24.04.20:** så på kultur, ingen CPE.
8. Tok ut 140 µl medium fra flasken med virus 1- XXX(inkubert i ca. 48 timer, ingen CPE) til 560 µl AVL/carrier RNA buffer.
9. satte til 2 ml medium med 5 % FBS, 1 % Pen/strep og 2,5 % hepes i begge flaskene fra 22.04.
10. sådde direkte ut 0,5 ml av inokulatet i celler T25 splittet 1:4 23.04.20. Byttet ikke medium. Cellene var litt tynne ca 80%. Inkuberte ikke 1 time i medium uten FBS.
11. **Dag 5 mandag 27.04.20: CPE i celleflaske 2 sådd ut 22.04.20.**
  - Ingen CPE i kontrollflaske 1 (kun MEM)
  - Spinner ned supernatant med virus i 50 ml rør.
  - 0,5 ml av supernatant overføres til T75 Vero E6 passage 24 flaske i 20 ml MEM med 5% FBS 1% P/S.
  - pellet løses i 140 ul MEM medium 0% FBS i tillegg skraper vi cellene løs fra flasken spinner 2000 rpm 5 min.
  - Tar av medium løser pellet med 140 ul inkludert den forrige pellet og lyser i 560 ul lysisbuffer (AVL/carrier RNA).
    - o XXXDyrk. 5d (sup.tatt fra T25 med CPE 27/4-20)

- XXXDyrk. 5d (celler skrappt fra T25 med CPE 27/4-20)
- Har 4 ml supernatant igjen til frysekultur, 8 rør a 0,5 ml (4ml MEM 5% + 0,222 ml FBS (til 10%)). Det siste røret mindre.

12. Titrering: Merk platen (både på lokket og på selve platen, husk spritfast tusj) med virusfortynning, dato og navn.

#### **Fortynn virus i en ren 96-brønnersplate uten celler**

Tilsett først **180 µl medium** (MEM med 0 % FBS, 2 % pen/strep og 2,5 % hepes) til alle brønnene som er satt av til virusfortynning **unntatt første brønn**

Tilsett deretter **120 µl virus til første brønn** (kan reduseres, forventer for mange plakk i uforynnet til at det kan telles).

Tilsett **20 µl** av viruset fra brønn 1 (A og B), miks ca. 5 ganger og bytt tipp. Miks 3 ganger til og tilsett **20 µl** til neste brønn. Bytt tipp mellom hver fortynning, og fortsett til du kommer til siste brønn (12). Fjern medium fra 96-brønnersplaten med celler. Pipetter på siden av brønnene, slik at cellene ikke løsner (men det pleier ikke være et problem med denne celletypen).

#### **Fjerner ca 90 ul fra Celleplaten (NB! Unngå at cellene tørker ut)**

**Tilsett virusfortynningene (50 µl)** til celleplaten med multikanalpipette

2 rader (rad A og B) med pasientvirus (opprinnelig 1:10fortynnet) **etter dyrking** fra 22.04.20 fortynnet som beskrevet over og 2 rader (G+H) med pasientvirus (1:10 fort) **ikke** dyrket fra 22.04.20 fortynnet fra. 4 negativ kontroll rad C.

Tape lukket med parafilm, spray platen(e) med etanol, og sett dem i transportboksen som står på ren side av kabinettet. Lukk lokket og spray transportboksen med etanol. Den som hjelper frakter transportboksen med celleplatene til inkubatoren kl **12.19**.

Inkubasjon: 1 time/37 grader. Vipp forsiktig på platen hvert 15. minutt ferdig kl **13.19**.

Den som hjelper henter transportboksen med platene fra inkubatoren, setter transportboksen på ren side av kabinettet og åpner lokket på transportboksen

Fjern supernatanten fra alle brønnene. Pipetter av forsiktig.

Lager Avicel 1,2%: 5 ml 2x medium med 4 % FBS, 5% hepes, 2 % pen/strep + 5 ml 2,4% Avicel.

Tilsett 100 µl Avicel 1,2% til alle brønnene med virus og negativ kontroll **tilsatt 27.04.20 kl 13.26**.

Tape platen(e), spray platen(e) med etanol, og sett dem i transportboksen som står på ren side av kabinettet. Lukk lokket og spray transportboksen med etanol. Den som hjelper frakter transportboksen med celleplatene til inkubatoren.

Inkubasjon: 3 dager ved 37 °C. Celleplaten må stå i ro! Platen tas torsdag 30.04.20. ca 72 timer.

**Tirsdag 28.04.2020:**

Lysater høstet 24/4 og 27/4 ekstraheres på QiaCube, elueres i 60µl. Disse blir kjørt RT-PCR på:

E-gen og IP RdRp.

Prøver:

1. XXXDyrk. 48h (sup.tatt fra T25 flaske 24/4-20)
2. XXXDyrk. 5d (sup.tatt fra T25 med CPE 27/4-20)
3. XXXDyrk. 5d (celler skrapet fra T25 med CPE 27/4-20)

Resultat fra PCR E-gen:

1. ct 23,14
2. ct. 11,60
3. ct. 5,86

Resultat fra PCR IP RdRP: (IP4/IP2)

1. ct. 21,18/21,00
2. ct. 9,35/9,13
3. ct. 4,69/5,02

Beregnet virustall (genomkopier/mL basert på standardkurver)

Gjennomsnitt	Harvest copies/mL
XXXDyrk.48h CoV 24/4-20	7,19E+06
XXXDyrk.5 d	2,66E+10
XXXDyrk.5 d (cellelysis)	9,15E+11

Stor feilmargin da vi er utenfor ytterpunkt av standardkurvene og antagelig utenfor øvre kvantiteringsgrense.

**2020-04-30**

Plate fra 27.04:

Inspisert brønner med avicel: vanskelig å se cellene. Går videre med fjerning av overlay, vask PBS x2, tilsetter 10% formalin (ikke 4% formaldehyd) kl 10.08 står til 10.38 i sikkerhetsbenk.

Sett raskt på celler etter 30 min m formalin: få celler, ikke pene. Også cellekontroll ser ikke god ut.

Sugd av formalin med pasteurpipette.

Satt på krystallfiolett med pasteurpipette kl 10.50. tar av m pasteurpipette kl 11.00.

Skylling m vann.

Mikroskopering: De ubehandlede cellene i midtradene er på plass. Alle brønnene som har stått med overlay og er behandlet har dårlig med celler, inkludert cellekontrollene (de har noe mer celler enn de virusinfiserte.

Flasker med utsæd fra 27.04: Tatt ut i benk

Virus 2; 1.passasje (T75) YYY: Begynnende CPE. Høster i dag.

Virus 1, 2. passasje (T75) XXX: Omfattende CPE: mest løse avrundede celler, høstes.

Vi passerer ikke disse virusene videre nå. Tar av til RNA-ekstraksjon og fryser resten av høstematr:

Helt over fra flasker til 50mL sentrifugerør. Spin 2k x 10min.

Satt >10x vol m sprit (<1 ml restvolum, >10 ml 75% alk) i de tømte kulturflaskene før de kastes.

140 µL 10x fortynnet kultursupn (i medium) til lysisbuffer for ekstraksjon.

Supernatanter overføres til nytt 50mL rør m målepipette og tilsettes ytterligere 5% FBS (0,9 mL til 18 mL) for nedfrysing. Porsjoneres derfra (500 µL) i arkivrør.

YYY: 37 arkivrør

XXX: 35 arkivrør

**Mandag 04.05.2020:**

Lysater høstet 30/4 ekstraheres på QiaCube, elueres i 60µl. Disse blir kjørt RT-PCR på:

E-gen og IP RdRp.

Prøver:

1. XXX/2020 2nd p. høstet 30/4 fra T75 m/mye CPE. Fortynnet 1/10
2. YYY/2020 1st p. høstet 30/4 fra T75 m/lite CPE (Ufort)

Resultat fra PCR E-gen:

1. Ct. 13,08
2. Ct. 16,45

Resultat fra PCR IP RdRp: (IP4/IP2)

1. Ct. 11,54/12,21
2. Ct. 14,75/15,67