 Laboratoire de santé publique du Québec	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>
	Secteur : IDBM
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	VERSION 1.0 2020-04-07

Rédigé par :	Marc-Christian Domingo
Révisé par :	Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger

## 1. INTRODUCTION

Le diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2 actuellement disponible au Québec repose principalement sur l'extraction d'acides nucléiques, à partir de spécimens cliniques, avec des réactifs commerciaux et la détection d'acides nucléiques par RT-PCR. Dans ce contexte de pandémie, les réactifs commerciaux pour une extraction d'acides nucléiques ne sont pas toujours disponibles selon les besoins croissants des laboratoires. Ainsi, une solution alternative d'extraction thermique d'acides nucléiques, en cas de pénurie de réactifs commerciaux, a été envisagée par plusieurs laboratoires.

Mais, avant d'adopter cette méthodologie d'extraction thermique d'acides nucléiques, les laboratoires doivent s'assurer que la chaleur inactive efficacement le virus SARS-CoV-2 dans un niveau de confinement biologique 2 (NC2) avant une analyse diagnostique par RT-PCR.

## 2. OBJET

Inactiver le virus SARS-CoV-2 responsable du COVID-19 dans des spécimens cliniques en vue de leur manipulation sécuritaire à des fins de diagnostic moléculaire

## 3. MATÉRIEL ET MÉTHODE

### a. Échantillons

Les spécimens cliniques utilisés sont des échantillons provenant de la sphère nasopharyngée et conservés dans du milieu de transport UTM. Le volume, par échantillon, des spécimens cliniques inactivés par la chaleur est de **200 µl**, conservés dans du liquide de transport UTM, à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Cinq (n=5) spécimens cliniques pour lesquels la RT-PCR a donné des Ct de 15,72 ; 16,16 ; 17,39 ; 17,8 ; et 24,61 ont été sélectionnés pour ces tests d'inactivation thermique.

### b. Conditions et températures d'inactivation pour chaque spécimen


Deux blocs chauffants réglés à 65 °C et à 90 °C, respectivement, ont été utilisés. Chaque spécimen a subi le traitement d'inactivation thermique suivant :

- 65 °C pendant 15 min
- 90 °C pendant 2 min
- 90 °C pendant 5 min
- Spécimen contrôle non traité à la chaleur

### c. Cellules inoculées

Des cellules VeroE6 ayant une croissance confluyente après une incubation de 72 heures ont été utilisées pour l'infection virale. Milieu de maintien des cellules DMEM 2 %.

Rédigé par : Marc-Christian Domingo	Révisé par : Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 1 de 6
-------------------------------------	---	-------------

 Laboratoire de santé publique du Québec	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>
	Secteur : IDBM
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	VERSION 1.0 2020-04-07

**d. Inoculation et incubation des cellules infectées**

Les manipulations ont été effectuées dans un niveau de confinement de classe 3 (NC3) par un personnel technique qualifié.

Pour chaque spécimen, une inoculation de 100 µl d'échantillons inactivé par la chaleur et un échantillon non inactivé a été réalisée.

Les cellules ont été incubées à 36°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 10 jours


**e. Observation des effets cytopathiques**

L'observation des effets cytopathiques sur les cellules VeroE6 infectées a été faite après 2 jours, 4 jours, 7 jours et 10 jours d'incubation. Un renouvellement du milieu a été effectué au jour 7 avec 1 ml de milieu DMEM à 2 %.

**f. Amplification par RT-PCR**

Une détection du gène N du virus SARS-CoV-2 et du gène RdRp par la méthode RT-PCR développée au LSPQ, dans le surnageant des cellules infectées et des contrôles, aux différents temps d'incubation a été effectuée. Pour ce faire, une portion aliquote de 100 µl de surnageant des milieux cellulaires a été prélevée aux jours J-2, J-4, J-7 et J-10 puis congelés à -80 °C avant leur utilisation à des fins de diagnostic. Les acides nucléiques ont été extraits avec la plateforme d'extraction Qiasymphony SP.

<b>Rédigé par :</b> Marc-Christian Domingo	<b>Révisé par :</b> Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 2 de 6
--	--	-------------

 Laboratoire de santé publique du Québec	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>
	Secteur : IDBM
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	VERSION 1.0 2020-04-07

#### 4. RÉSULTATS

##### a. Observation des effets cytopathiques

Tableau 1. Effets cytopathiques observés à différents temps d'incubation


# Spécimen	Inactivation	ECP Jour 2	ECP Jour 4	ECP Jour 7**	ECP Jour 10	Remarques
1 (Ct : 17,8)	65 °C/15 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/2 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/5 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	Non chauffé	Non	Oui	Oui	Oui	ECP : Oui (Conforme)
2 (Ct : 24,6)	65 °C/15 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/2 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/5 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	Non chauffé	Non	Oui	Oui	Oui	ECP : Oui (Conforme)
3 (Ct : 16,2)	65 °C/15 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/2 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/5 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	Non chauffé	Non	Oui	Oui	Oui	ECP : Oui (Conforme)
4 (Ct : 17,4)	65 °C/15 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/2 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/5 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	Non chauffé	Non	Oui	Oui	Oui	ECP : Oui (Conforme)
5 (Ct : 15,7)	65 °C/15 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/2 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	90 °C/5 min	Non	Non	Non	Non	Aucun ECP
	Non chauffé	Non	Non	Oui	Oui	ECP : Oui (Conforme)
Contrôle $\Phi$ Vero (x2)	Non chauffé	Non	Non	Non vacuoles	Non	Aucun ECP (Conforme)

\*\*Renouvellement de milieu fait à 7 jours

ECP = effet cytopathique

Ct : cycle de seuil de positivité RT-PCR pour les spécimens clinique sélectionnés

Rédigé par : Marc-Christian Domingo	Révisé par : Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 3 de 6
-------------------------------------	---	-------------

 Laboratoire de santé publique du Québec	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>
	Secteur : IDBM
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	VERSION 1.0 2020-04-07

**b. Détection par RT-PCR du gène N**

**Tableau 2. Résultats RT-PCR du gène N sur les extraits du surnageant des cultures virales**


# Spécimen	Inactivation	Valeur de Ct du gène N					Interprétation
		J0	J2	J4	J7**	J10	
1 (Ct : 17,8)	65 °C/15 min	NA	29	29	30	32	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	28	28,5	29	31,8	Aucune croissance
	90 °C/5 min	21,5	31,1	31,8	31,1	34	Aucune croissance
	Non traité	17,8	25,8	17,7	12,7	13,2	Croissance virale
2 (Ct : 24,6)	65 °C/15 min	NA	34	34	34,6	38	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	33,3	35,1	34,6	36,8	Aucune croissance
	90 °C/5 min	26,6	Ind.	38,0	Ind.	34,6	Aucune croissance
	Non traité	24,6	26,3	15,8	12,6	12,6	Croissance virale
3 Ct : 16,2)	65 °C/15 min	NA	26,1	26,1	27,2	29,5	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	26,1	26,1	27,9	29,0	Aucune croissance
	90 °C/5 min	26,5	31,0	31,8	31,8	33,2	Aucune croissance
	Non traité	16,16	26,1	16,9	13,7	13,7	Croissance virale
4 Ct : 17,4)	65 °C/15 min	NA	27,9	27,9	27,9	31,0	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	27,9	27,9	29,0	29,5	Aucune croissance
	90 °C/5 min	20,3	29,5	30,1	31,0	35,1	Aucune croissance
	Non traité	17,4	22,1	12,6	12,6	13,2	Croissance virale
5 (Ct : 15,7)	65 °C/15 min	NA	25,3	25,9	26,9	28,8	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	25,9	25,5	26,9	28,8	Aucune croissance
	90 °C/5 min	16,2	25,9	27,6	28,8	28,8	Aucune croissance
	Non traité	15,7	25,9	23,48	12,87	13,4	Croissance virale
Contrôle ☿ nég (x2)	Non chauffé	NA	NA	NA	NA	Ind.	Aucune croissance

\*\*Renouvellement de milieu fait à 7 jours

C+ pour le gène N : Seuil de positivité du contrôle, RT-PCR, Ct = 28,9

NA : Aucune analyse pour ce spécimen

Rédigé par : Marc-Christian Domingo	Révisé par : Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 4 de 6
-------------------------------------	---	-------------

 Institut national de santé publique <b>Québec</b> Laboratoire de santé publique du Québec	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>	
	Secteur : IDBM	
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>		VERSION 1.0 2020-04-07

c. Détection par RT-PCR du gène RdRp

Tableau 3. Résultats RT-PCR du gène RdRp sur les extraits du surnageant des cultures virales


# Spécimen	Inactivation	Valeur de Ct du gène RdRp					Interprétation
		J0	J2	J4	J7**	J10	
1 (Ct : 17,8)	65 °C/15 min	NA	30,1	30,7	31,5	33,6	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	29,5	30,2	31,4	33,4	Aucune croissance
	90 °C/5 min	26,6	32,6	33,1	33,7	Ind.	Aucune croissance
	Non traité	NA	26,6	19,1	14,9	15,5	Croissance virale
2 (Ct : 24,6)	65 °C/15 min	NA	Ind.	37,2	38,5	Ind.	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	36,0	Ind.	Ind.	Ind.	Aucune croissance
	90 °C/5 min	31,5	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Aucune croissance
	Non traité	NA	28,1	17,4	14,4	15,6	Croissance virale
3 (Ct : 16,2)	65 °C/15 min	NA	27,4	28,2	29,2	31,3	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	27,2	28,4	29,1	31,4	Aucune croissance
	90 °C/5 min	23,9	33,1	33,1	35,1	35,1	Aucune croissance
	Non traité	NA	25,6	18,1	15,7	16,2	Croissance virale
4 (Ct : 17,4)	65 °C/15 min	NA	28,2	28,7	29,8	31,8	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	28,8	29,3	30,2	32,5	Aucune croissance
	90 °C/5 min	25,6	32,7	32,5	33,3	35,0	Aucune croissance
	Non traité	NA	23,6	14,8	14,8	14,9	Croissance virale
5 (Ct : 15,7)	65 °C/15 min	NA	27,6	28,1	29,2	31,4	Aucune croissance
	90 °C/2 min	NA	27,4	27,7	29,1	31,2	Aucune croissance
	90 °C/5 min	23,1	28,5	28,9	30,0	31,7	Aucune croissance
	Non traité	NA	27,4	25,9	15,6	15,8	Croissance virale
Contrôle C nég (x2)	Non chauffé	NA	NA	NA	NA	Ind.	Aucune croissance

\*\*Renouvellement de milieu fait à 7 jours

C+ pour le gène RdRp : Seuil de positivité du contrôle, RT-PCR, Ct = 31,8

NA : Aucune analyse pour ce spécimen

Rédigé par : Marc-Christian Domingo	Révisé par : Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 5 de 6
-------------------------------------	---	-------------

 Institut national de santé publique <b>Québec</b> <small>Laboratoire de santé publique du Québec</small>	<b>RAPPORT : INACTIVATION VIRALE DU SARS-CoV-2</b>
	Secteur : IDBM
<b>INACTIVATION THERMIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 DANS DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES</b>	VERSION 1.0 2020-04-07

## 5. CONCLUSION

La chaleur inactive le virus SARS-CoV-2 dans un volume de spécimen de 200 µl (UTM) lorsque celui est chauffé à 65 °C pendant 15 min, 90 °C pendant 2 min ou à 90 °C pendant 5 min. Ces méthodes d'inactivation thermique permettront d'utiliser de façon sécuritaire, des spécimens cliniques, contenant du SARS-CoV-2 inactivé, pour des tests de diagnostics moléculaires dans des niveaux de confinement réduits.

## 6. RÉFÉRENCES

1. Miriam E.R. Darnella, Kanta Subbaraob, Stephen M. Feinstonea, Deborah R. Taylora. *Journal of Virological Methods* 121 (2004) 85–91 : Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV.
2. M. Yunoki; T. Urayama; I. Yamamoto; S. Abe; K. Ikuta. Heat sensitivity of a SARS-associated coronavirus introduced into plasma products. *Vox Sanguinis*. (2004) 87, 302–303
3. H. F. Rabenau Æ J. Cinatl Æ B. Morgenstern Æ G. Bauer; W. Preiser Æ H. W. Doerr. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med Microbiol Immunol* (2005) 194: 1–6
4. Edward I. Pattersona,\* , Kelsey L. Warmbroda, Donald H. Bouyera, and Naomi L. Forrestera. Evaluation of the inactivation of Venezuelan equine encephalitis virus by several common methods. *J. Virol Methods*. 2018 April ; 254: 31–34.
5. Chang L. et al. 2020. Coronavirus disease 2019: coronaviruses and blood supply. *Transfusion Med Rev*. 2020 Feb 21. pii: S0887-7963(20)30014-6.
6. Kariwa H. et al. 2006. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. *Dermatology* 212:119-123. <https://doi.org/10.1159/000089211>.
7. Darnell M.E.R. et al. 2004. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS CoV. *J. Virol. Methods* 121:85-91. doi:10.1016/j.jviromet.2004.06.006.
8. Rabenau HF et al. 2004. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med Microbiol Immunol* 194:1-6. doi:10.1007/s00430-004-0219-0.
9. Kumar M. et al. 2015. Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *J Virol Methods* 223:13-18. doi:10.1016/j.jviromet.2015.07.002.
10. Leclercq I. et al. 2014. Heat inactivation of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 8:585–586. doi:10.1111/irv.12261.
11. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. *Transfusion*. 2006 Oct;46(10):1770-7. 10. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. Chin A et al. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.20036673>

<b>Rédigé par :</b> Marc-Christian Domingo	<b>Révisé par :</b> Cynthia Massé, Carole Dagenais, Hugues Charest, Christian Therrien, Michel Roger	Page 6 de 6
--	--	-------------