

Production à grande échelle de virus de la grippe A sur Corning® HYPERFlask® Cell Culture Vessel

The logo consists of the word "CORNING" in white, uppercase, sans-serif font, centered within a solid orange square.

Note d'application client

*Hideo Goto, D.V.M., Ph.D.
Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology,
Institute of Medical Science University of Tokyo,
Tokyo, Japan*

Résumé

Les cellules MDCK sont couramment utilisées dans les laboratoires pour la production du virus de la grippe A. Dans cette étude, nous avons validé l'utilisation de l'HYPERFlask cell culture vessel Corning pour la production à grande échelle de ce virus. Le flacon HYPERFlask est un récipient de culture multi-couches possédant environ 10 fois plus de surface de croissance par rapport aux flacons T-175 standard. La concentration ou titre viral obtenu étant équivalent dans les deux types de flacons, l'utilisation de HYPERFlask permet une efficacité accrue pour le scale up grâce à l'utilisation d'un seul récipient par rapport à plusieurs flacons standards. De plus, la production de virus de la grippe A dans le récipient HYPERFlask ne nécessite pas d'étape d'adsorption. Ces résultats indiquent que l'utilisation de HYPERFlask offre des avantages pour la production à grande échelle de virus de la grippe A.

Introduction

La production à grande échelle de virus grippal A sur cellules en culture est effectuée dans de nombreux laboratoires. Pour augmenter la quantité de virus obtenue, une série de flacons traités pour la culture peuvent être utilisés simultanément. Le protocole de production de virus dans les cellules cultivées recommande une série d'étapes pour préparer les cellules avant l'adsorption du virus inoculé. Ces étapes utilisent non seulement de nombreux flacons, mais nécessitent beaucoup de temps et d'efforts. Grâce à ses 10 couches assemblées, l'HYPERFlask cell culture vessel fournit l'équivalent en surface de culture de 10 flacons T-175 standards avec le même encombrement. Par conséquent, il est prévisible que l'utilisation de HYPERFlask permettra d'accroître l'efficacité de production à grande échelle de virus. Dans cette étude, nous avons comparé la production de virus de la grippe A sur les deux types de récipients.

Matériel et méthodes

Cellules

Les cellules Madin Darby Canine Kidney (MDCK) ont été cultivées dans un milieu essentiel minimum (MEM) contenant 5% de sérum de veau nouveau-né, de la pénicilline et de la streptomycine. La totalité des cellules d'un flacon T-175 ont étéensemencées dans un flacon HYPERFlask et incubées à 37°C, à 5% de CO₂ pendant 3 jours.

Virus

Trois différentes souches de virus de la grippe A ont été utilisées dans cette étude, la souche de laboratoire commune, A/WSN/33 (WSN), H1N1 et H3N2. Les souches H1N1 et H3N2 ont été précédemment isolées chez l'homme respectivement en 2003 et 2002, et utilisées comme des souches cliniques.

Production de virus

Les cellules MDCK cultivées en flacon T175 ou en récipient HYPERFlask sont rincées trois fois, avec une du MEM, puis infectées par l'un des virus ci-dessus à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01. Les cellules infectées ont été cultivées dans du MEM contenant 0,3% d'albumine sérique bovine (BSA) et 50 pg/ml de trypsine TPCK pendant 48 heures à 37°C. Les volumes de culture pour le flacon T175 et l'HYPERFlask sont respectivement de 50 mL et 560 mL. La quantité produite de virus a été mesurée en utilisant des essais d'étalement sur cellules MDCK. Chaque experimentation a été réalisée en trois répétitions indépendantes.

Résultats et discussion

La croissance du virus en HYPERFlask vessel ®

Un flacon de culture de cellules à couches multiples est un avantage pour la production à grande échelle de virus. Avec son design révolutionnaire et compact, le flacon HYPERFlask a été testé pour la production de virus de la grippe A. Les cellules MDCK ont été cultivées soit en flacon T-175 ou en HYPERFlask et infectées par le virus. La quantité de virus produite après une période de 48 heures d'incubation dans chaque flacon a été comparée. La quantité de virus produite par mL dans le récipient HYPERFlask était équivalente à celle obtenue en flacon T-175 (Fig. 1). Les cellules MDCK cultivées dans le flacon HYPERFlask montrent des effets cytopathiques (CPE) quand on les observe au microscope inversé (Fig. 2). Cette observation est récurrente avec les trois virus utilisés dans cette étude. Ces résultats indiquent que le flacon HYPERFlask permet la propagation du virus de la grippe A de manière équivalente à celle observée en flacon T-175 classique.

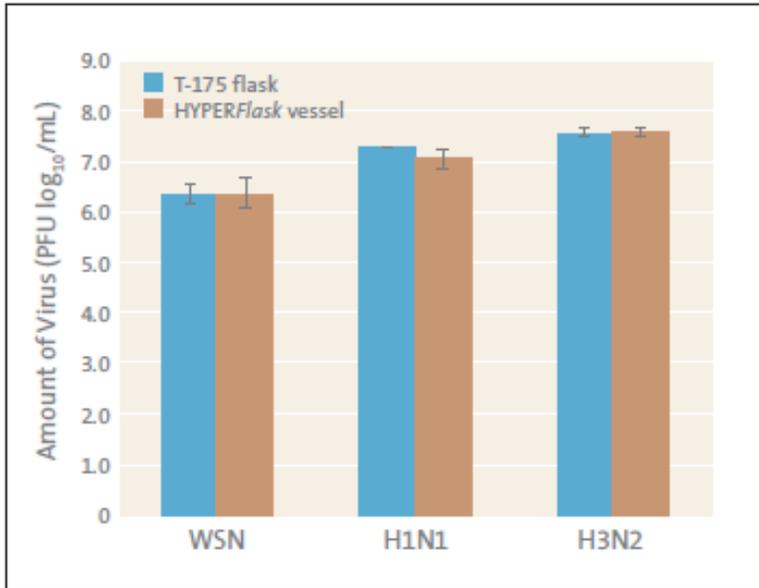


Figure 1. Virus production in the HYPERFlask vessel was similar to a conventional T-175 flask. Data represents an average from three independent experiments with standard deviations of $p > 0.1$.

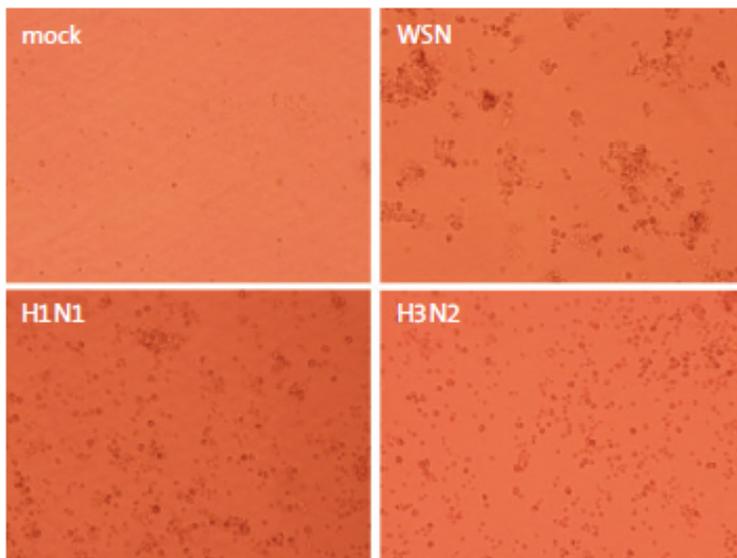


Figure 2. CPE on MDCK cells in the HYPERFlask vessel were visualized using an inverted microscope after a 48-hour incubation. Objective lens magnification, 10X.

Dans le protocole standard pour la propagation du virus de la grippe A, les cellules en culture sont incubées avec une petite quantité d'inoculum viral pendant une heure pour permettre l'adsorption. L'adsorption est généralement considérée comme une étape nécessaire pour accroître l'efficacité de l'infection par le virus. Nous avons évalué l'étape d'adsorption des cellules MDCK cultivées dans le flacon HYPERFlask, ainsi qu'un protocole simplifié sans étape

d'adsorption. Pour le protocole standard, 50 ml d'inoculum viral ont été incubés avec les cellules cultivées dans le flacon HYPER*Flask* pendant 1 heure pour l'étape d'adsorption et remplacé par 560 ml de milieu par la suite. Pour simplifier le protocole, nous avons contourné l'étape d'adsorption par incubation des cellules MDCK cultivées dans le flacon HYPER*Flask* avec 560 ml de milieu contenant le même inoculum viral. L'apparition de CPE était similaire dans les cellules MDCK obtenues avec le protocole traditionnels et le protocole de dérivation simplifiée (données non présentées). La production de virus a également été similaire entre les deux protocoles (Fig. 3). Ces résultats indiquent que l'élimination de l'étape d'adsorption n'a pas affecté la production de virus dans le flacon HYPER*Flask* et a ainsi permis une procédure simplifiée pour la production de virus.

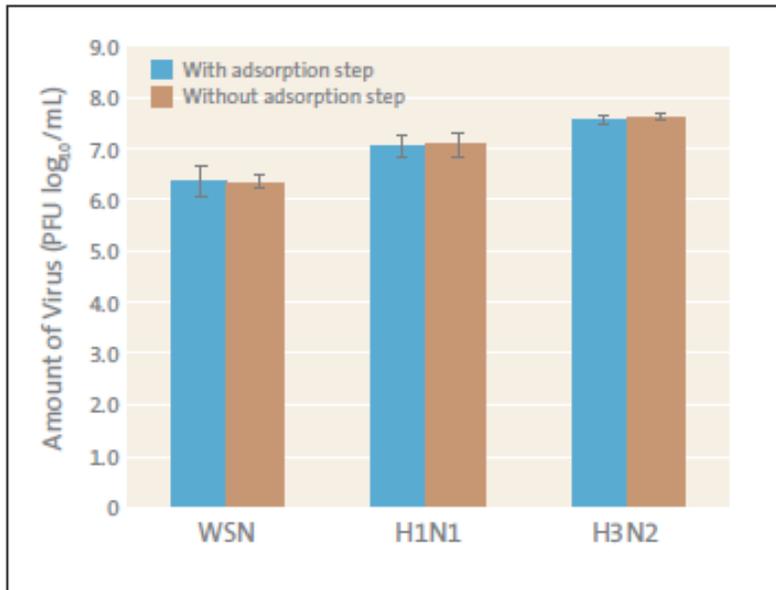


Figure 3. Bypass of the adsorption step did not affect virus production in all three viruses. Data represents an average from three independent experiments with standard deviations of $p > 0.3$.

Conclusion

La performance du flacon Corning® HYPER*Flask*® pour la production de virus de la grippe A est similaire à celui d'un flacon T-175 classique. Compte tenu de sa taille et de sa capacité, l'utilisation du flacon HYPER*Flask*, avec un protocole simplifié, offre des avantages considérables pour la production à grande échelle de virus de la grippe A (Fig. 4).

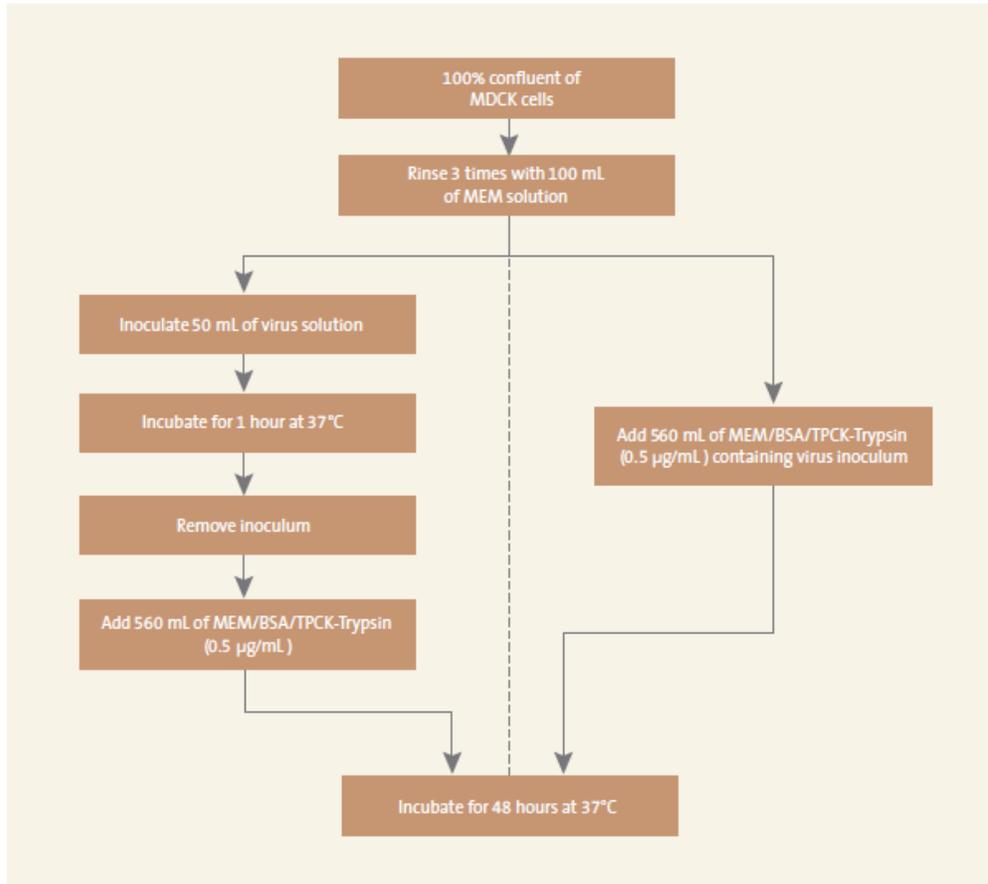


Figure 4. Schematic procedure for virus infection using standard protocol and bypass protocol. The left side indicates a standard procedure, and the right side indicates a simplified procedure by bypassing the adsorption step.