

Secrétariat général

PAR COURRIEL

Québec, le 21 septembre 2021



**OBJET : Réponse – Demande d'accès aux documents
N/Réf. (dossier) : 6410/2021-80**



La présente est en réponse à votre demande d'accès aux documents datée du 7 septembre 2021 relative à :

« All records describing the isolation of a SARS-COV-2 virus directly from a sample taken from a diseased patient, where the patient sample was not first combined with any other source of genetic material (i.e. monkey kidney cells a.k.a. vero cells, liver cancer cells).

Please note that I am using « isolation » in the every-day sense of the word : the act of separating a thing(s) from everything else. I am not requesting records where « isolation of SARS-COV-2 » refers instead to :

- the culturing of something (i.e. the culturing of supernatant in vero cells), or;
- the performance of an amplification test (i.e. a PCR test on a patient sample adulterated with an enzyme to release genetic material from cells), or;
- the sequencing of something. »

L'Institut national de santé publique du Québec ne détient aucun document selon la définition spécifique que vous nous avez partagée du terme « isolation ».

Néanmoins, vous trouverez en pièce jointe le document de suivi de l'inoculation du virus SARS-CoV-2 réalisée par Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) pour la toute première fois en mars 2020. Le passage surligné en jaune dans le document démontre que le virus a été isolé avec succès.


...2

Bien que la procédure que nous utilisons ne corresponde pas à la conception que vous avez de l'isolement du virus, elle demeure cependant fondée sur des standards scientifiques reconnus. Les souches proviennent d'échantillons prélevés sur différents patients dont l'analyse de laboratoire a détecté la présence du virus SARS-CoV-2. Afin de pouvoir étudier le virus, un procédé d'amplification a été utilisé pour le produire en plus grande quantité. Ce procédé exige nécessairement de recourir à un milieu de culture qui contient d'autre matériel génétique, lequel est différentiable du virus provenant de la souche utilisée. Enfin, la mise en culture des souches est réalisée dans le respect de la procédure PR-VR-002 du LSPQ, également en pièce jointe.

Vous trouverez ci-annexée une note explicative concernant l'exercice du droit de recours en révision devant la Commission d'accès à l'information.

Veuillez agréer, [REDACTED] l'expression de nos sentiments les meilleurs.

La responsable de l'accès aux documents,



Julie Dostaler
Secrétaire générale

p. j. - Documents
- Avis de recours

N/Réf. (correspondance) : 2021-8010

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
<hr/>	
Réviser(s) :	Sylvie Nancy Beaulac
<hr/>	
<hr/>	
Approbateur :	Hugues Charest
<hr/>	
Coordonnateur du document :	Sylvie Nancy Beaulac
<hr/>	

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)

AUTO TRANSLATION

Covid-19 virus infection protocol in VERO E6 cells

Date:

Thaw VERO E6 cells by Tonya Roy and put in F25 flasks with 2% MEM

Date: 2020-03-11

Passage of VERO E6 cells in 2% DMEM growth medium

1 bottle of 1×10^6

1 bottle 2×10^6

2 bottles 0.5×10^6

Date: 2020-03-13

Inoculation of specimen L00214517 in vial 1×10^6

Flask 90% confluent

Removal of DMEM growth medium

Washing cells with influenza PBS

100ul of specimen + 900ul of DMEM maintenance medium directly on the cells in the bottle.

Contact 60 minutes, slight shaking every 20 minutes.

Addition of 9 ml of DMEM maintenance medium.

Date: 2020-03-16

Reading the infected vial

50% of cells are floating, round and bloated

50% of the leaflet is attached to the vial

See photos in the secure / sharing / virology / corona virus 2020 file

20ul of the supernatant put in 2 ml of lysis solution for PCR analysis

Date: 2020-03-17

Reading the infected vial

70% of cells are detached

30% of the leaflet is attached to the vial, leaflet displays the cytopathic effect of the virus

See photos in the secure / sharing / virology / corona virus 2020 file

2 vials F25 at 0.5×10^6 VERO E6 cells

Removal of DMEM growth medium

Washing cells with influenza PBS

1 vial addition of 10 ml of 2% DMEM maintenance medium for negative control

1 vial add 500ul of infection supernatant + 500ul of maintenance medium.

Contact 60 minutes, slight shaking every 20 minutes.

Addition of 9 ml of DMEM maintenance medium.

Harvest the remainder of the supernatant from the infected vial, 7 cryovials of approximately

1.5ml

Freezer -80C in room 1.253 rack 2 position 1.

Sylvie Nancy Beaulac

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

Noms Auteur(s) : Carole Dagenais

Réviser(s) : Sylvie Nancy Beaulac

Approbateur : Hugues Charest

Coordonnateur du document : Sylvie Nancy Beaulac

I. PREAMBLE

This is a new document created as a guide for inoculation in culture of SARS-CoV 2 detected by PCR in clinical samples, or from infected cell lines in order to increase the number of viral particles.

II. OBJECT

This document aims to describe the technique used to inoculate a cell line from respiratory specimens taken or from infected cell lines in order to amplify the number of viral particles.

III. GOALS

This technique makes it possible to demonstrate the contagious nature of SARS particles CoV-2 by the observation of a cytopathic effect.

IV. SCOPE

This document is intended for personnel in the Serodiagnosis and Virology sector who have received adequate and documented CL3 training, as well as training in cell culture.

This procedure applies to specimens received for the diagnosis of virus infection respiratory SARS-CoV-2.

V. DEFINITIONS OF TERMS

CPE: Cytopathic effect

VI. PRINCIPLE

Specimen inoculation allows when viruses are present to bind them to the cell membrane.

Viruses once adsorbed enter the cell to multiply. This viral multiplication usually results in CPE in the VeroE6 cell line when several rounds of replication destroy infected cells.

VII. SPECIMEN

Specimens are respiratory in nature or may be obtained from cell cultures.

VIII. MATERIAL REQUIRED

Material:

- 15 ml or 50 ml centrifuge tube
- Serological pipettes of 1, 5 and 10 ml
- Vial for cell culture (# 5900239 or equivalent)
- Bottle (F25)
- Sterile transfer pipettes
- Incubator (36 - 38 ° C) with 5% CO₂
- Micropipette from 10 to 100 µL and sterile tips
- Micro sterile tubes 2,0ml Sarstedt #cat 72.693.005 or equivalent
- Vortex

Reagents:

- PBS solution - influenza pH 7.5
- Maintenance medium used for inoculation of specimens (DMEM medium, glutamine, HEPES, GVF 100X - gentamycin, vancomycin, fungizone - and fetal bovine serum. the

See register RE-VR-003 and modify it with the addition of GVF 100X instead of

gentamicin

- VeroE6 cells in culture

IX. EQUIPMENT (maintenance and checking)

The devices used are checked and maintained according to their respective procedures.

X. QUALITY CONTROL

Each analysis should include a negative internal control - vial of uninfected cells.

A positive control should be included when using a new batch of cells - aliquot adequate internal positive control.

XI. SPECIAL PRECAUTIONS

Any manipulation with cell cultures infected with patient samples potentially positive for SARS CoV-2 virus should be performed under a BSE in CL3.

XII. STATEMENT OF THE PROCEDURE

1) Vial inoculation:

Preparation of vials in NC2

- Wash cell cultures with sterile PBS pH 7.5 preheated to 36 - 38 ° C (2.0 mL for one vial).
- Add 2.0 ml of holding medium preheated to 36 - 38 ° C.
- At this step, add 100µL of medium to the negative control.
- Vortex the samples and place them in a case for transfer to CL3.

Transfer the vial and sample racks to CL3 to inoculate

- Add 100µL of the sample to be analyzed (if necessary tilt the tubes).
- Take care to slightly unscrew the tubes.
- Incubate the vial rack at 36 - 38 ° C with 4.0-6.0% CO₂.

If possible, take a daily culture reading for 10 days and record the results of the observation of the cell sheet in the register which will be digitized and sent to your workstation.

If necessary, if the medium becomes acidic (yellowish) or if the negative control sheet degenerates, on day 5 ± 2 days remove approximately 1.0 mL of medium to replace it with cool medium.

Note: Resume inoculation of the specimen if contamination is present.

2) Inoculation with cell culture in a flask (F25)

- Dilute the sample as needed with DMEM maintenance medium. (e.g. 100 µL culture + 900µL DMEM)
- Wash cell cultures with 5.0 mL sterile PBS pH 7.5.
- Add approximately 1.0 mL of the sample (possibly diluted) to be analyzed.
- Incubate at 36 - 38 ° C for 60 minutes at 4.0 - 6.0% CO₂, shaking every 20 minutes.
- Add the maintenance medium (eg 9.0 mL for the 25 cm² culture flasks).
- Incubate a vial of uninfected cells to serve as a negative control.
- Incubate at 36 - 38 ° C at 4.0 to 6.0% CO₂ by slightly unscrewing the vials of culture.

If possible, take a reading every day for 10 days and record these results in the registry.

If necessary, on day 5 ± 2 , change the maintenance medium if the medium becomes acid or the negative control sheet degenerates. Remove 7.0 ml of medium and add more the equivalent.

Note: Resume inoculation of the specimen if contamination is present.

If necessary, perform the PCR test with the analyzed specimens

XIII. RESULTS AND INTERPRETATIONS

A positive result is expressed by an CPE. Generally the scale used is 1+ to 4+ (1+ being a very low ECP). When the CPE is 3 to 4+, there are still less than 25% of cells adhered to the vial or vial and the sample is considered positive. Collect the supernatant and distribute in Sarstedt tubes or cryotubes at a rate of 1.0 ml / tube which will be stored in the freezer at NC3 at -70°C .

Identify the tubes by entering the identification number of the specimen, and others possibly relevant information - harvest date, post-infection day.

Make sure to update the sample placement inventory register in the tomb freezer at -70°C available in the binder in room 1.253 and also in S:
sharing / virology / freezer NC3 (-70) # 3124.

Note that a specimen is negative after 10 days if no ECP is observed in culture. The specimen is then discarded or kept if it becomes relevant to carry out further analyzes on the supernatant.

XIV. LIMITATIONS OF THE METHOD

A negative result does not exclude the presence of virus in the clinical specimen.

A cytopathic effect (CPE) is not necessarily linked to the spread of the CoV-2 virus, it may be caused by the presence of another virus or be due to a cytotoxic effect.

XV. DATA RECORDING

Enter and scan the results in the "Inoculation of virus samples Respiratory".

XVI. REFERENCES

Modification of the procedure used at the LSPQ for inoculation of respiratory virus (Influenza).

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