

Coalition canadienne pour la recherche sur la COVID-19 basée sur les eaux usées

Projet de protocole pour le prélèvement, le traitement et l'analyse d'échantillons pour un projet pilote valide visant à vérifier une hypothèse : surveillance du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées communautaires ou institutionnelles pour compléter les données cliniques sur la prévalence de l'infection

Contexte et objectif

Cette ébauche de document d'orientation est spécifiquement conçue pour soutenir une étude pilote au Canada visant à prouver la validité du concept selon lequel la surveillance des eaux usées pour y quantifier la présence du SRAS-CoV-2 permet de suivre les tendances de la prévalence de la COVID-19 dans la communauté.

Bien que ce protocole soit destiné à assurer une étude solide qui respecte les huit principes de conception de l'étude pilote de la Coalition eaux usées COVID-19, il précise davantage les éléments qui vont permettre tout particulièrement de garantir les principes n° 2, n° 3 et n° 4 qui suivent.

Les huit principes guidant la conception de l'étude pilote de la Coalition eaux usées COVID-19

1. Définir clairement les objectifs du programme pilote de surveillance
- 2. Obtenir rapidement la validation et l'adoption d'un protocole d'échantillonnage canadien cohérent**
- 3. Confirmer la validité des analyses du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées**
- 4. Assurer le potentiel de généralisabilité en comprenant parfaitement ce que les échantillons représentent**
5. Maximiser la valeur des résultats grâce à la conception stratégique du projet pilote
6. Maximiser le potentiel de collaboration productive avec les services publics d'eaux usées
7. Maximiser la collaboration, la coopération et l'échange des connaissances
8. Tenir compte de l'utilisation finale et de l'éthique de l'utilisation des données dans le processus décisionnel en santé publique

Depuis la fin mars 2020, les méthodes de recherche évoluent de façon accélérée dans le monde entier et il en est de même pour la science de l'épidémiologie basée sur les eaux usées qui évolue rapidement pour faire face au problème du coronavirus SRAS-CoV-2 et soutenir les mesures de

gestion de la pandémie. Il en résulte qu'une foule de méthodes différentes sont utilisées actuellement, mais qu'aucune méthode normalisée n'a encore été officiellement validée à cette fin. L'intention du présent document d'orientation n'est pas d'établir une méthode normalisée acceptée pour le Canada. Il vise plutôt à recommander une approche pour l'étude pilote. L'objectif est d'en arriver à une approche commune pour l'échantillonnage et l'analyse des eaux usées dans le cadre de l'étude pilote venant soutenir une surveillance utile qui fournira des résultats plus comparables provenant d'endroits et de laboratoires différents. Cela va sans dire, les conseils qui suivent sont le fruit du meilleur jugement d'un groupe consultatif d'experts cherchant à déterminer un point de départ uniforme pour les travaux au Canada. Ces conseils s'appuient sur l'expérience pratique de divers chercheurs qui ont relevé ce défi.

Les méthodes vont inévitablement évoluer à mesure que l'on en apprendra davantage. Ce projet de protocole a donc un caractère évolutif et pourra être modifié en fonction de l'expérience acquise. Une série de lignes directrices souples et de contrôles génériques sont suggérés pour permettre l'évolution des méthodes d'essais et la normalisation des résultats. Les réseaux nationaux et internationaux de chercheurs qui ont évolué rapidement dans le contexte de cette pandémie ont exprimé un intérêt marqué à travailler en collaboration pour favoriser le développement d'une approche s'avérant assez efficace pour réunir les preuves en vue des fins énoncées.

Une approche pratique pour réussir à comparer les analyses PCR des eaux usées

Le projet pilote de surveillance proposé cherche tout particulièrement à **détecter le SRAS-CoV-2 dans les eaux usées municipales**, une matrice qui peut susciter une inhibition et une récupération variable du signal dans le cadre de l'approche analytique la plus couramment utilisée, soit la RT-qPCR. La possibilité qu'un seul laboratoire traite les échantillons d'eaux usées provenant de nombreux sites au Canada n'est actuellement pas une option viable, et alors que la plupart des laboratoires utilisent la RT-qPCR pour détecter le SRAS-CoV-2 dans les échantillons d'eaux usées, d'autres laboratoires ont recours à des méthodes d'instrumentation numérique nouvellement en usage, telles que la ddPCR™. Chaque laboratoire adhérera forcément à des approches différentes et à des procédures opérationnelles normalisées (PON) qui lui sont propres pour le traitement et l'analyse des échantillons, en fonction de l'infrastructure dont il dispose, de son expérience et des exigences de son institution. Les PON de chaque laboratoire sont généralement très détaillées et dépendent de la méthode et du laboratoire, de sorte que les détails indiqués peuvent ne pas être particulièrement pertinents pour d'autres laboratoires, même si les principes analytiques sont applicables.

L'importance d'une procédure commune et normalisée d'assurance et de contrôle de la qualité (AQ/CQ)

Reconnaissant le fait qu'une certaine variabilité dans la préparation et l'analyse des échantillons est inévitable parmi les laboratoires participant à l'étude, le présent protocole met l'accent sur l'importance d'utiliser des procédures AQ/CQ normalisées communes pour permettre, le plus étroitement possible, la comparaison des résultats entre les différents laboratoires qui suivent des procédures qui évoluent. Pour des raisons similaires, le recours à un programme d'essais inter laboratoires dans le cadre du projet pilote est encouragé.

Ce document a été produit grâce à un grand nombre de contributions de sources nombreuses, citées dans les remerciements et dans la liste des références.

Points à considérer concernant l'échantillonnage lors de la conception de l'étude

La conception finale de l'étude pilote dépendra des critères clés établis avec les utilisateurs finaux de la santé publique et les autres partenaires, de la durée convenue de l'étude et du niveau prévu de ressources de soutien. Ce projet de protocole présente certaines considérations à prendre en compte dans la conception finale de l'étude en ce qui concerne l'échantillonnage.

Choix stratégique des communautés ou des institutions

Un des principaux objectifs du projet pilote initial, faisant l'objet de ce projet de protocole, est de valider de manière suffisante les procédures d'échantillonnage et d'analyse utilisées dans le pilote pour que l'on ait confiance à les appliquer en vue de fournir des données utiles aux décideurs en matière de santé publique. Le but du projet pilote de validation de concept est avant tout de vérifier l'hypothèse selon laquelle la surveillance des eaux usées peut fournir des renseignements utiles ce qui permettrait le développement d'un programme de surveillance plus élargi, et la mise en place potentielle d'un programme de surveillance des eaux usées à plus long terme qui couvrirait une aire géographique plus étendue.

Pour les besoins immédiats de cette étude pilote initiale – c'est-à-dire pour valider la capacité d'augmenter de façon utile la surveillance de la COVID-19 dans la population par la surveillance des eaux usées –, l'éventail des communautés ou institutions choisies pour l'échantillonnage devrait inclure une gamme de différents niveaux anticipés de COVID-19 dans la communauté pour tester l'étendue et l'efficacité de la technique. On doit inclure des communautés avec un niveau d'infection connu suffisamment élevé pour que l'on s'attende à y détecter le SRAS-CoV-2 et au moins une communauté ayant un niveau très faible d'infections signalées, de sorte que l'on s'attende à ce que la détection du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées soit difficile. Il est aussi souhaitable d'inclure des communautés ayant des niveaux d'infection se situant entre ces deux conditions limites afin de fournir des preuves de la capacité quantitative des techniques à

distinguer les charges d'infection élevées des charges d'infection moyennes et faibles, et de donner plus de confiance dans la force de la technique pour définir efficacement les tendances à partir d'une gamme de concentrations que pourrait connaître une communauté en raison des augmentations et diminutions anticipées des taux d'infection lors des éclosions, des transmissions secondaires et des rétablissements.

Fréquence de l'échantillonnage

Pour obtenir la coopération maximale des services publics d'épuration des eaux usées, l'échantillonnage devrait miser sur l'utilisation d'une partie des échantillons que le service public prélève déjà à ses propres fins. Dans la mesure du possible, il faudrait utiliser des échantillonneurs automatiques réfrigérés ou des échantillonneurs qui permettent l'ajout de glace au mécanisme de stockage pour conserver les échantillons au frais. Pour les besoins du projet pilote, il convient d'obtenir autant d'échantillons qu'il est possible d'analyser de manière réaliste et en temps utile. Ces considérations doivent tenir compte de la capacité du laboratoire à traiter les échantillons dès leur réception, de sorte que le calendrier d'échantillonnage doit prévoir la prise d'échantillons uniquement les jours où ils peuvent être traités par le laboratoire à un degré suffisant pour obtenir la stabilité de l'échantillon (enrichissement/extraction) le jour suivant (jusqu'à ce que soient validées des méthodes alternatives de préservation à la station d'épuration). Puisque le projet pilote vise à évaluer les tendances dans le titre du SRAS-CoV-2, puisqu'elles peuvent refléter les tendances de l'infection communautaire de COVID-19, il sera probablement nécessaire de prendre **plus de deux (2) échantillons par semaine** dans les phases initiales de l'étude. Une fois le calendrier local déterminé, il devrait demeurer constant pendant toute la durée du projet.

Durée du programme d'échantillonnage

Le projet pilote devra comporter une phase initiale d'échantillonnage **d'au moins trois (3) semaines**, en supposant qu'il soit possible d'obtenir trois échantillons par semaine. Si un échantillonnage moins fréquent est nécessaire, la phase initiale devra durer plus longtemps. Finalement, c'est la nature et la qualité des résultats obtenus lors de la phase initiale du projet pilote qui dicteront la durée du programme initial d'échantillonnage.

Procédure d'échantillonnage

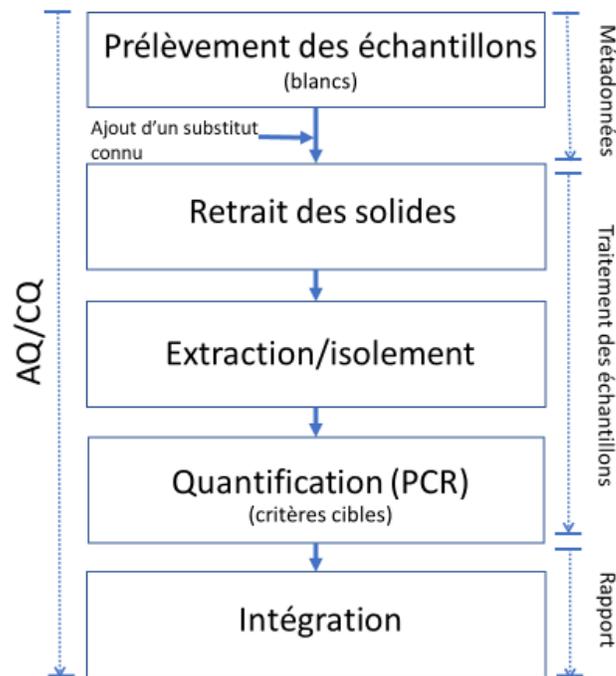


Figure 1. Grandes lignes du protocole d'échantillonnage et d'analyse

Procédure de prélèvement des échantillons

La procédure opérationnelle normalisée du service d'épuration des eaux usées doit être suivie, avec l'équipement de protection individuelle (ÉPI) nécessaire et la protection de la chaîne de possession des échantillons pour un volume maximal de 1 L. Des protocoles opérationnels propres à chaque site devraient être rédigés, car chacun diffère dans les détails, même si les principes généraux sont similaires. Certains employés peuvent avoir besoin d'une formation sur la façon appropriée de prélever les échantillons et sur la protection personnelle requise, incluant les protocoles concernant la distanciation physique, l'utilisation de gants propres, de combinaisons ou de sarraus de laboratoire, de masques, de protection oculaire, etc.

Le laboratoire travaillera normalement avec un échantillon d'eau microbiologique d'un volume approprié à la méthode utilisée, pour chaque jour d'échantillonnage. Si les volumes disponibles sont supérieurs au minimum requis pour la méthode, ils devraient être divisés en aliquotes que l'on pourra utiliser pour des essais inter laboratoires, pour d'autres mesures d'AQ/CQ ou pour le stockage aux archives. Les échantillons conservés, s'ils sont entreposés pendant plus de 24 heures, devraient être congelés à -20 °C. Si l'on compte stocker ou archiver les échantillons

pour de longues périodes (plus de 1 à 2 semaines), les échantillons devraient idéalement être congelés à -80°C . L'impact de la congélation d'échantillons d'eaux usées brutes sur les résultats de la méthode n'est pas encore connu. Dans la mesure du possible, les échantillons d'eaux usées brutes devraient être traités et l'on devrait congeler les extraits plutôt que les échantillons bruts, afin d'améliorer la stabilité. Les cycles de congélation et de décongélation doivent être évités. Cela pourrait être facilité en prélevant des échantillons plus importants et en divisant en aliquotes un échantillon donné, ou de préférence l'échantillon enrichi/concentré, ou les extraits, afin de permettre la congélation de ces échantillons divisés pour une analyse ultérieure ou pour des études inter laboratoires.

Préparation des récipients d'échantillons

Les bouteilles, les récipients et tout ce qui est utilisé pour le prélèvement des échantillons doivent être stérilisés au préalable (à l'intérieur et à l'extérieur) selon les procédures normales d'échantillonnage microbiologique (Baird et Bridgewater, 2017). L'utilisation de nouvelles bouteilles prénettoyées est fortement recommandée.

Les bouteilles d'échantillon seront fournies au personnel de terrain/municipal dans un conteneur d'échantillon qui aura été prénettoyé (par exemple, stérilisé à l'aide d'eau de Javel à 10 % – en prenant soin de ne pas laisser de résidus, ou d'éthanol à 70 %). Les bouteilles doivent toutes être pré-étiquetées et les fiches techniques (ainsi qu'un crayon/stylo stérilisé) doivent être présentes. La glacière (ou tout autre conteneur pouvant être stérilisé et contenir tout déversement) doit également être prénettoyée à l'aide d'eau de Javel à 10 % ou d'éthanol à 70 %.

Type d'échantillon (ponctuel ou composite)

Il est fortement recommandé d'utiliser des échantillons composites prélevés sur une période de 24 heures dans des dispositifs d'échantillonnage réfrigérés. Il doit s'agir d'échantillons composites pris à la noirceur à des intervalles de temps et des volumes égaux et aussi petits que possible (p. ex., 10 minutes). Les échantillons prélevés doivent être maintenus au frais (4 à 8°C). L'échantillon composite doit être recueilli dans un récipient de polypropylène ou polycarbonate prénettoyé (cela dépendra de l'échantillonneur et des procédures opérationnelles normalisées de la station d'épuration pour l'échantillonnage microbiologique). Il faut inscrire les volumes spécifiques, l'heure du prélèvement, le nom de la personne effectuant les prélèvements, le type d'échantillonneur, le récipient d'échantillon, etc. Pour les besoins du projet pilote, il est préférable d'utiliser des échantillons composites. Les échantillons ponctuels peuvent être utilisés à des fins spécifiques (p. ex., pour vérifier certains aspects des méthodes).

Récipient de l'échantillon

Sur le lieu du prélèvement, on peut recueillir les échantillons dans des bouteilles individuelles ou encore dans un récipient plus grand pour ensuite les diviser en aliquotes au laboratoire. Le

matériau du récipient peut varier, mais le choix doit dépendre d'abord de la durabilité du récipient et de la facilité de transport. Les blancs doivent cependant être manipulés de la même manière que les échantillons. L'utilisation de nouveaux récipients prénettoyés et stérilisés par le fournisseur devrait être privilégiée afin d'éviter toute possibilité de contamination. Les récipients d'échantillons ne doivent pas être trop remplis et il faut laisser un espace équivalent à 10 à 20 ml sur le dessus (pour éviter tout déversement ultérieur dans le laboratoire ou pour permettre l'expansion lors de la congélation si l'échantillon est archivé).

Volume de l'échantillon

Le volume des récipients de prélèvement d'échantillons devrait être normalisé. L'échantillonnage répété (trois fois ou plus) dans des bouteilles en polypropylène de 250 ml (ou des tubes Falcon de 50 ml) est pratique et permet de nombreuses options, mais certains laboratoires peuvent exiger des volumes plus importants par aliquote.

Site d'échantillonnage

Le site optimal d'échantillonnage dépendra du travail spécifique à faire pour évaluer la sensibilité de la méthode pour la quantification du SRAS-CoV-2. L'échantillon prélevé devrait provenir d'un influent entier de la station d'épuration. Le site d'échantillonnage dépendra probablement de l'emplacement habituel d'échantillonnage de la station d'épuration. Les particularités de ce lieu doivent être documentées et représenter au mieux les eaux usées entrantes. Il est recommandé de prélever les échantillons après le tamisage des solides les plus volumineux et le passage dans la chambre de dessablage. La possibilité d'obtenir un signal fort pour le SRAS-CoV-2 à partir des boues primaires (c'est-à-dire les solides déposés à partir des eaux usées brutes dans un traitement de sédimentation primaire) a été démontrée (Peccia et coll., 2020); cependant, pour l'étude pilote, on utilisera un influent homogène entier. Si le laboratoire participant a la capacité nécessaire, le traitement des boues primaires devrait être envisagé pour obtenir des informations supplémentaires.

Blancs de terrain

Un blanc de terrain avec de l'eau stérile devrait être transporté avec toutes les autres bouteilles de prélèvement. Les bouchons de ces flacons de blanc de terrain devraient être ouverts sur le site pendant environ la même durée que ceux des autres bouteilles, remis en place et traités comme tous les autres échantillons. Là où l'échantillonnage doit être réalisé par des employés de la station d'épuration, les limites de capacité de ces employés à assumer des tâches supplémentaires doivent être reconnues.

Échantillon enrichi – étalon interne, témoin positif

Lors du développement de la méthode, l'intégrité des analytes cibles doit être testée en utilisant des blancs et des échantillons enrichis. Il n'est peut-être pas possible d'enrichir

systematiquement des échantillons pendant les prélèvements sur le terrain, mais il faut le faire le plus tôt possible. Idéalement, tous les échantillons (incluant le blanc de terrain, mais pas le blanc de transport, sauf s'il s'agit d'un substitut différent) devraient être enrichis avec un substitut approprié dès que possible au cours du processus afin de garantir l'intégrité de l'échantillon et l'efficacité de l'extraction.

Certaines études ont utilisé le bactériophage MS-2, le bactériophage phi 6 ou le coronavirus bovin comme substitut enrichi, mais les coronavirus responsables du rhume saisonnier (souche 229E [α -CoV] ou OC43 [β -CoV]) pourraient être plus appropriés. Plusieurs substituts peuvent être utilisés à différentes étapes du prélèvement, de l'extraction et de l'analyse des échantillons (surtout dans le cadre de la mise au point de la méthode). On devrait choisir le substitut approprié pour chacune de ces étapes. Disposer d'un étalon interne (témoin positif avec ajout connu) est essentiel pour établir le degré de récupération atteint dans un laboratoire donné et donc indispensable pour permettre toute comparaison significative des résultats entre les laboratoires participants.

Il est en outre hautement souhaitable d'inclure l'analyse d'un virus que l'on trouve couramment dans les eaux usées, comme le virus de la marbrure bénigne du piment (PMMoV) (Kitajima et coll., 2020). Diverses options sont disponibles et les prochaines mises à jour du présent document fourniront des conseils supplémentaires à ce sujet.

Transport des échantillons

Les échantillons devraient être transportés dans un conteneur secondaire prénettoyé (comme une glacière) avec des sacs de glace prénettoyés (la glace est moins souhaitable puisqu'elle produit de l'eau en fondant) dès que possible au laboratoire pour le traitement et l'extraction immédiats si possible (en moins de 24 heures). Ce laps de temps devrait être normalisé et consigné pour chaque échantillon.

Stockage des échantillons

Les échantillons devraient être traités immédiatement jusqu'au stade où ils peuvent être stabilisés ou congelés sans nuire à l'intégrité de l'ARN.

Les échantillons d'eaux usées entiers ne devraient pas être congelés, sauf s'il n'y a pas d'autre option. Si les échantillons sont congelés pour le stockage, cela doit être fait à -80°C et, si c'est faisable, ils devraient être enrichis au préalable avec un substitut quantifié différent, si possible, pour évaluer les pertes dues au processus.

Traitement des échantillons

Manipulation des échantillons

Les échantillons d'eaux usées doivent être manipulés en laboratoire en suivant des techniques stériles. Toutes les surfaces doivent être stérilisées au préalable ainsi que régulièrement pendant la manipulation des échantillons. Le personnel doit utiliser l'ÉPI approprié (sarrau de laboratoire, gants, lunettes) et suivre les procédures opérationnelles normalisées locales permettant d'assurer la sécurité des personnes et l'intégrité des échantillons.

Les fragments viraux à l'état de trace dans les eaux usées nécessitent un contrôle rigoureux de la contamination croisée. Il est hautement souhaitable de séparer les tâches dans des zones ou salles distinctes. En outre, des précautions doivent être prises pour minimiser le risque de contamination croisée lors de la mise en place des réactions PCR.

- L'échantillon doit être traité dans un environnement exempt d'ARN-ase.
- La PCR doit être effectuée dans une zone « propre » dédiée qui est exempte de contamination par l'ADN.
- Tous les stocks d'embouts de pipettes, de tubes de microcentrifugation, etc. à utiliser doivent être exempts d'ADN-ase, d'ARN-ase et de nucléase, et entreposés dans un environnement sans poussière. L'utilisation d'embouts filtrants est conseillée.
- Des pipettes destinées uniquement à la PCR doivent être utilisées pour mettre en place la réaction.
- Il faut porter des gants exempts d'ARN-ase et d'ADN à tout moment.
- Le mélange réactionnel principal (*master mix*) de la PCR doit être préparé dans un endroit propre qui est isolé de l'endroit où les extractions d'ADN/ARN ou les analyses d'électrophorèse sont effectuées (p. ex., un laboratoire différent, une hotte de sécurité biologique ou enceinte de préparation de PCR).
- La matrice d'ARN doit être ajoutée dans un environnement propre et contrôlé (comme une hotte de PCR) et les précautions habituelles doivent être suivies en ce qui concerne les zones de travail du laboratoire pour éviter la contamination des échantillons.
- Il faut décontaminer les instruments et les zones de laboratoire avant et après l'isolement (par exemple, avec 10 % d'eau de Javel ou 70 % d'éthanol).
- Pour la hotte de sécurité biologique et l'enceinte de préparation de PCR, il faut allumer la lampe UV pendant au moins 15 minutes.

Désinfection du conteneur d'échantillons

L'extérieur du conteneur doit être désinfecté à l'arrivée au laboratoire avant d'être ouvert. Les bouteilles doivent être essuyées avec un désinfectant (par exemple, de l'éthanol à 70 %).

Désactivation/stérilisation

Les échantillons peuvent être pasteurisés ou désactivés par pasteurisation (p. ex., à 60 °C pendant 90 minutes) pour accroître la sécurité du laboratoire (Biobot Analytics, 2020; La Rosa et coll., 2020).

Conformément aux procédures opérationnelles normalisées du laboratoire pour tout risque biologique, tous les matériaux utilisés et les résidus doivent être placés dans des sacs pour matières contaminées et passés à l'autoclave et/ou incinérés.

Prétraitement pour retirer les matières solides

L'élimination des grosses particules peut se faire par centrifugation (à basse vitesse) ou filtration. Cela doit être fait de manière systématique dans le cadre de l'étude.

Ajustement du pH : Dans certains protocoles, des échantillons entiers d'influent peuvent être ajustés à un pH de 10,5 avec un tampon carbonate, en les agitant au vortex pour faciliter la désorption des virions.

Centrifugation : Les échantillons entiers d'influent (avec ou sans ajustement du pH) peuvent être centrifugés à basse vitesse (par exemple, 600 g pendant 10 minutes, bien que cela varie considérablement) et le surnageant décanté pour un traitement ultérieur.

Filtration : L'effluent entier peut être passé à travers des filtres séquentiels de taille de pores différente, avec une taille de pores du filtre final de 0,2 micron (μm) pour éliminer les solides.

Extraction et isolement de l'ARN

Il existe plusieurs approches qui peuvent être appliquées à l'extraction de l'ARN. La prudence s'impose ici, car la méthode doit être adaptée aux étapes de nettoyage et isolement. Il existe une variété de kits commerciaux pour l'extraction et le nettoyage de l'ARN. Plusieurs approches incluent ce qui suit, sans toutefois s'y limiter :

Ultrafiltration : L'échantillon peut être concentré par ultrafiltration (Centricon Plus-70 10 kDa) (Ahmed et coll., 2020) puis préparé en utilisant une méthode de préférence, telle qu'un kit commercial d'extraction d'ARN. Par exemple, la méthode de centrifugation en une étape utilisant le Centricon Plus-70 (MWCO) développée antérieurement pour concentrer les virus non enveloppés dans des échantillons d'eaux usées (Qiu et coll., 2012). L'ARN viral peut être extrait à l'aide de divers kits commerciaux.

Ultracentrifugation : Les échantillons peuvent être mélangés dans du polyéthylèneglycol (PEG) et centrifugés à grande vitesse (par exemple, 12 000 g pendant au moins 30 minutes) pour obtenir un culot. Le culot est récupéré dans un tampon, puis l'ARN peut être extrait à l'aide de kits commerciaux (Wurtzer et coll., 2020; Bar-Or et coll., 2020), ou encore le culot est récupéré dans du TRIzol et extrait avec du chloroforme ou de l'isopropanol et des étapes de lavage séquentielles (Biobot Analytics, 2020; Wu et coll., 2020).

Floculation : Les échantillons peuvent être précipités à l'aide de diverses méthodes, notamment le chlorure d'aluminium (AlCl₃) à pH réduit suivi d'une centrifugation. L'échantillon peut ensuite être extrait à l'aide d'un kit commercial d'isolement de l'ARN (Randazzo et coll., 2020).

Quantification de la cible

L'ARN peut être détecté à l'aide d'une technique de RT-PCR en une ou deux étapes. Le processus en deux étapes isole l'étape RT (transcription inverse) de l'étape PCR (réaction en chaîne de la polymérase) et peut permettre à l'opérateur d'optimiser davantage le processus RT isolé de l'étape PCR. Cependant, la PCR en une étape peut réduire la sensibilité en raison de l'étape de dilution supplémentaire.

L'analyse doit être faite avec au moins trois répétitions d'échantillons et au moins trois répétitions techniques. Il est recommandé d'utiliser des contrôles sans matrice et des contrôles internes sur chaque plaque.

Il convient d'utiliser des gènes spécifiques du SRAS-CoV-2 validés par la qPCR ou la dd-PCR. Ces gènes peuvent être différents, mais dans de nombreuses études sur les eaux usées on a utilisé le gène de la nucléocapside N1. Les amorces N1 et N2 du SRAS-CoV-2 devraient être incluses.

Des courbes standards sont nécessaires pour la RT-qPCR et il est recommandé de les composer à partir de dilutions décuplées (généralement de 10 copies à 10⁶ copies) d'un fragment d'ARN du SRAS-CoV-2. Les résultats peuvent être exprimés en nombre de copies de gènes, puis exprimés en volume (par exemple, en ml) de l'échantillon d'eaux usées original.

Inhibition de la PCR

S'il y a diminution du standard de récupération, on peut vérifier s'il y a inhibition de la PCR dans l'échantillon. Une quantité appropriée d'un ADN connu que l'on ne s'attend pas à trouver dans l'influent peut être ajoutée en quantité connue dans l'échantillon et comparée au contrôle sans matrice.

Protocole d'AQ/CQ

Les résultats de la PCR doivent être publiés conformément aux lignes directrices MIQE (lignes directrices sur les informations minimales pour la publication d'expériences de PCR quantitatives en temps réel) (Bustin et coll., 2009).

Le taux de récupération (%) de l'ajout connu choisi (par exemple MS2, phi6, OC43/229E) introduit dans l'influent entier doit être évalué comme étant la quantité de coronavirus ajoutée dans l'échantillon / la quantité d'ARN détectée dans l'échantillon de base x 100 (voir Li et coll., 2019). Certains laboratoires peuvent utiliser de nombreux ajouts connus supplémentaires introduits à différents stades pour surveiller les différentes étapes de la méthode. Outre la récupération de la méthode (pour les substituts et les cibles), il est préférable que les récupérations soient consignées pour chaque échantillon individuel testé.

Si des blancs de terrain ou de laboratoire pour une série d'échantillons présentent un résultat positif supérieur à un seuil prédéfini, les tests des échantillons associés doivent être considérés comme douteux. Ces résultats doivent être rejetés et les échantillons réexaminés.

Considérations sur les métadonnées d'échantillonnage pour soutenir l'interprétation

Des informations à l'appui des données compilées sur le nombre total de tests, les résultats positifs et négatifs, et les tendances temporelles et spatiales seront nécessaires pour étudier la corrélation entre le SRAS-CoV-2 dans les eaux usées et les données communautaires sur l'infection et la charge de morbidité potentielle du COVID-19 associée aux bassins d'égouts correspondants.

Il convient de recueillir autant de données correspondantes que possible au sujet du traitement des eaux usées pour étayer cette analyse, notamment : le flux (y compris les précipitations qui affectent les égouts unitaires), le pH de l'influent, la température, la conductivité et les matières en suspension, ainsi que toute autre donnée concernant l'influent des eaux usées brutes que recueille habituellement le service public d'épuration des eaux usées.



Remerciements

Ce projet de protocole a été produit par la Coalition eaux usées COVID-19 du Réseau canadien de l'eau avec les conseils et recommandations des membres du groupe consultatif de recherche de la Coalition (Steve E. Hruddy – président, Nicholas Ashbolt, Robert Delatolla, Sarah Dorner, Dominic Frigon, Graham Gagnon, John Giesy, Pierre Payment, Natalie Prystajeky, Mark Servos, Peter Vanrolleghem et Viviane Yargeau) ainsi que d'autres experts nationaux et internationaux, notamment Mike McKay et Lilly Pang. Bernadette Conant et Katrina Hitchman du Réseau canadien de l'eau ont dirigé l'organisation et la production du présent document pour la Coalition eaux usées COVID-19.

Références

- Baird, R. et L. Bridgewater (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Bar-Or, I., K. Yaniv, M. Shagan et coll. (2020). « Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: A proof-of-concept for quantitative environmental surveillance », *medRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>
- Biobot Analytics (2020). *Sewage testing protocols for SARS-CoV-2*. Tiré de : https://www.biobot.io/files/2020-03-1_Biobot_COVID19_Sewage_For_Distribution.pdf
- Bustin, S. A., V. Benes, J.A. Garson et coll. (2009). « The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR Experiments » *Clinical Chemistry*, vol. 55, n°4, p. 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Kitajima, M., H.P. Sassi et J.R. Torrey (2018). « Pepper mild mottle virus as a water quality indicator », *npj Clean Water*, vol. 1, n° 19. doi: 10.1038/s41545-018-0019-5
- Lambert, F., H. Jacomy, G. Marceau et P.J. Talbot (2008). « Titration of human Coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay », *Methods in Molecular Biology*, vol. 454, p. 93–102. doi: 10.1007/978-1-59745-181-9_8
- La Rosa, G., M. Iaconelli, P. Mancinia et coll. (2020). « First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy », *medRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.20079830>
- Li Q., Y. Qiu, X.L. Pang et N.J. Ashbolt (2019). « Spiked virus level needed to correctly assess enteric virus recovery in water matrices », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 85, n° 12. doi:10.1128/AEM.00111-19
- Qiu Y., B.E. Lee, N.J. Ruecker, N. Neumann, N. Ashbolt et X. Pang (2016). « A one-step centrifugal ultrafiltration method to concentrate enteric viruses from wastewater », *Journal of Virological Methods*, vol. 237, p. 150-153. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.09.010
- Randazzo, W., P. Truchado, E. Cuevas-Ferrando, P. Simón, A. Allende et G. Sánchez (2020). « SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area », *Water Research*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
- Wurtzer, S., V. Marechal, J.M. Mouchel et coll. (2020). « Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters », *medRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>