 Laboratoire de santé publique du Québec	RAPPORT DE VALIDATION/VÉRIFICATION - GARGARISME	
	<i>Numéro de l'analyse tel qu'indiqué dans votre répertoire d'analyse</i>	Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale : Coronavirus (SARS-CoV-2); détection (TAAN) (trousse homologuée) sur spécimen clinique (45031)
Détection de SARS-CoV-2 par Seegene Allplex 2019-nCoV PCR_PON-M-BM-LEV-010_V04		VERSION 1.0

1 Type de méthode

- Méthode normalisée utilisée sans modification (joindre un résumé des preuves de la vérification)
 Méthode qualitative **OU** Méthode quantitative/semi-quantitative
 Méthode non normalisée
 Méthode qualitative **OU** Méthode quantitative

2 Description de la méthode

MISE EN CONTEXTE

Les données de validation présentées dans le présent document incluent celles recueillies lors de la validation initiale avec la trousse Allplex 2019-nCoV de Seegene (gargarisme vs. EONP) effectuée à l'Hôtel-Dieu de Lévis (HDL) en octobre 2020 ainsi que celles produites ensuite dans le cadre de l'étude prospective multicentrique G-SPIT. La validation locale du gargarisme avec trousse Seegene Allplex 2019-nCoV fait aussi l'objet d'un article publié dans *Journal of Clinical Virology* : Dumaresq J et al. Natural spring water gargle and direct RT-PCR for the diagnosis of COVID-19 (COVID-SPRING study). *J Clin Virol.* 2021 Nov;144:104995.

Le projet G-SPIT est une étude prospective québécoise qui a pour objectif d'évaluer la sensibilité analytique des TAAN SRAS-CoV-2 à partir de prélèvements non invasifs. Pour un même patient, les tests ont été effectués en parallèle avec le prélèvement de référence, l'écouvillonnage oral (gorge) et nasopharyngé (EONP), et celui en évaluation, le gargarisme. Les prélèvements étaient effectués un respectant l'ordre du prélèvement par EONP en premier suivi du prélèvement par gargarisme.

2.1 Devis du projet

La population test ciblée :

- Phase de validation préliminaire à Lévis :
 - Usagers avec indication de dépistage de COVID-19 (majoritairement des usagers avec priorités M3, M7 ou M13) aptes à se gargariser
 - Lieux: CDD Archimède, CDD de Charny, Hôtel-Dieu de Lévis
 - Dates : 8 au 23 octobre 2020
- Étude G-SPIT :
 - Usagers symptomatiques avec indication de dépistage de COVID-19 aptes à se gargariser
 - Lieux: voir devis du projet G-SPIT
 - Dates : voir devis et rapport du projet G-SPIT

Intervention et contrôles : Comparaison prospective et en parallèle du gargarisme avec eau de source naturelle vs prélèvement usuel (écouvillonnage oro-nasopharyngé transporté avec écouvillon dans l'eau moléculaire) pour le diagnostic ou le dépistage de la COVID-19

Issues/Mesures :

- Sensibilité, spécificité, VPP, VPN, rapports de vraisemblance positif et négatif
- Taux de résultats invalides
- Appréciation subjective de la faisabilité auprès des usagers, du personnel préleveur et des technologistes de laboratoire

Méthodologie pour prélèvement :

Écouvillonnage naso-pharyngé (ou nasal) et oropharyngé transporté dans un tube contenant de l'eau moléculaire (volume minimal 1 mL) comme milieu de transport. Pour le prélèvement par gargarisme 5 ml d'eau de source des marques commerciales Eska ou Naya ont été utilisés (voir annexe 1 pour méthode de prélèvement par gargarisme).

Après le prélèvement, en attendant l'analyse, les spécimens devaient être réfrigérés à 4°C durant le transport et leur conservation au laboratoire.

Les résultats pour les deux types de prélèvements ont été émis au dossier du patient selon les délais usuels (< 24h).

Méthodologie pour extraction de détection RT-PCR et processus analytique

Au CH de l'Hôtel-Dieu de Lévis, la technique d'extraction utilisée est une lyse thermique qui a pour but l'inactivation virale (sans extraction). Tous les échantillons subissent une inactivation/lyse thermique (70°C x 10 min dans un bain-marie). Tous les échantillons sont centrifugés (3000 x g pendant 2 min) avant RT-PCR directe. Une dilution 1:3 [1/4] (500 µl dans 1500 µl – cryovial de 5 mL) des écouvillonnages est effectuée (pour diminuer le taux d'inhibition) alors qu'aucune dilution n'est requise pour les gargarismes (1 mL d'échantillon transféré dans cryovial de 5 mL).

La technique d'amplification PCR qui a été utilisée est celle de la trousse Allplex 2019-nCoV Assay Kit (Seegene). 8 µl d'échantillon servent pour l'amplification. La préparation des plaques a été effectuée avec l'automate STARlet IVD (Hamilton) et l'amplification/détection a été effectuée sur un thermocycleur CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) avec interprétation des résultats par le logiciel («viewer») de Seegene. Durant la phase de validation initiale à l'Hôtel-Dieu de Lévis les échantillons invalides ou discordants ont été ré-analysés avec la trousse RealTime SARS-CoV-2 (Abbott), après extraction sur m2000sp. Durant l'étude G-SPIT les paires d'échantillons congelés analysées avec la trousse Allplex 2019-nCoV avaient déjà été préalablement analysées par différentes trousses commerciales avant la congélation (voir rapport de l'étude G-SPIT pour plus de détails).

2.2 Essais de stabilité/robustesse avec gargarisme et différente type d'eau

Pour effectuer les essais de stabilité de l'ARN viral dans le gargarisme, des prélèvements de gargarisme ont été effectués par un même sujet avec 5 ml de quatre types d'eau (Eska; Naya; eau moléculaire BP2819 de Fisher Bioreagents; eau stérile pour injection de Baxter). Un échantillon d'EONP positif pour SARS-CoV-2 (non inactivé) a servi à enrichir les 4 échantillons de gargarisme (dilution 1:8). Une portion de chaque gargarisme non enrichi a été analysée pour s'assurer de l'absence d'ARN de SARS-CoV-2 dans l'échantillon initial. Chaque gargarisme enrichi a été séparé dans 3 tubes : un tube pour analyse

immédiate, un pour analyse après 7 jours à 4 degrés Celsius et un pour analyse après 7 jours à température pièce. Tous les échantillons ont été analysés selon la méthode décrite ci-dessus.

2.3 Analyse statistique pour validation locale

Les données sont présentées en pourcentages pour les variables catégoriques et la médiane avec intervalle interquartile (median with interquartile range - IQR) est présentée pour les variables continues. Les prélèvements par gargarisme et EONP ont été comparés à un test de référence composé, défini comme étant positif si l'un ou l'autre des prélèvements par EONP ou gargarisme était positif. Le logiciel MedCalc en ligne (<https://www.medcalc.org/calc/index.php>) a été utilisé pour calculer la sensibilité et spécificité, la prévalence de la maladie, les valeurs prédictives, la justesse, les rapports de vraisemblance (likelihood ratios) ainsi que la comparaison des proportions (test du chi-carré) et les valeurs d'intervalles de confiance. Le niveau de concordance a été évalué en utilisant les statistiques kappa. Par définition, les valeurs kappa de plus de 0.75 indiquent une excellente concordance, les valeurs entre 0.40 et 0.75 indiquent une concordance acceptable à bonne, et les valeurs sous 0.40 sont considérées comme ayant une faible concordance. Les valeurs p pour la comparaison des moyennes (t-test pour échantillons appariés) ont été calculées avec le logiciel Statistica (Statsoft Inc, OK, USA). Les diagrammes de quartiles (box and whisker plots) ont été générés avec le logiciel web Good Calculators (<https://goodcalculators.com/box-plot-maker/>).

Analyte / Mesurande :	Cibles SARS-CoV-2 N, E et RdRp
Principe analytique :	Amplification des acides nucléiques et la détection de la séquence cible dans les échantillons biologiques à l'aide des tests de RT-PCR en temps réel
Type d'échantillon / matrice :	Gargarisme

3 Mise en œuvre de l'étude de validation-vérification

PON utilisée :	Seegene Allplex 2019-nCoV PCR_PON-M-BM-LEV-010_V04
Procédure de v/v :	Plan de vérification_Gargarisme.doc (Devis projet G-SPIT; Annexe 2)
Auteurs de la v/v :	Annie-Claude Labbé (pour validation dans le cadre de la validation G-SPIT) Jeannot Dumaresq (pour validation initiale locale à HDL)
Période d'étude :	8 au 23 octobre 2020

3.1 Base / Référentiel

PR-GQ-011 / Devis du projet G-SPIT

PON Seegene Allplex 2019-nCoV PCR_PON-M-BM-LEV-010_V04

Publication accessible en ligne : <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.11.21251938v1>

La vérification a été basée sur les recommandations du Cumitech 31A, du CLSI MM19-A et du COFRAC.

3.2 Critères retenus pour la validation/vérification

Répétabilité	☒	☒	Un contrôle positif de GARGARISME a été testé 5 fois.
Reproductibilité	☒	☒	Un panel de vérification a été testé par 8 plateformes SEEGENE distinctes (Voir Tableau 1)
Justesse / Exactitude	☒	☒	Données déjà fournies lors de la vérification initiale effectuée sur des prélèvements oropharyngés.
Comparaison	☒	☒	Données du site HDL (Tableau 2) et du projet G-SPIT Tableau 3) pour les résultats de comparaison G versus EONP de SEEGENE avec d'autres plateformes
Incertitude : mesure de variabilité	☒	☒	Données non requises lors de la vérification initiale pour EONP (méthode normalisée non modifiée). Voir encart du fabricant.
Incertitude : maîtrise des facteurs de variabilité	☒	☒	Données déjà fournies lors de la vérification initiale effectuée sur des prélèvements oropharyngés
Limites de quantification	☒	☒	Méthode non quantitative
Limite de détection	☒	☒	Données de LOD via l'évaluation d'un panel du LSPQ pour cette méthode.
Sensibilité / Spécificité clinique	☒	☒	Données déjà fournies lors de la vérification initiale effectuée sur des prélèvements nasopharyngés pour la spécificité. La sensibilité du spécimen a été évaluée dans le cadre du projet G-SPIT (donnée de comparaison sensibilité du gargarisme contre un étalon composé).
Interférences (i.e. invalides)	☒	☒	Voir Tableau 4. Les données issues de HDL et du projet G-SPIT décrivent le <u>taux de spécimens invalides</u> par SEEGENE.
Contamination entre échantillons (i.e. impact de la viscosité)	☒	☒	Très peu de données associées mais les contrôles négatifs sont restés négatifs
Robustesse	☒	☒	Peu de données rétrospectives.
Stabilité des réactifs	☒	☒	Se référer au rapport de validation Seegene (Voir Tableau 5) pour la stabilité de l'échantillon de GARGARISME à 7 jours, à 4 degrés et température pièce.

3.3 Provenance et sélection des échantillons

3.3.1 VALIDATION LOCALE (HDL)

Pour la validation locale à HDL, les échantillons ont été recueillis du 8 octobre au 23 octobre 2020. Un total de 2010 spécimens cliniques pairés (1005 EONP et 1005 gargarismes) ont été prélevés chez 987 usagers. Ci-dessous les données démographiques et types d'usagers inclus dans cette étude :

Âge moyen	40 ans	(6 à 91 ans)
Participants asymptomatiques	63%	n=633
Asymptomatiques avec contact rapproché avec cas confirmé	24%	n=244
Asymptomatiques avec travaillant dans une unité COVID ou milieu de travail avec une éclosion	13%	n=216
Catégories M	% total	n
M3	18%	181
M5	7%	68
M6	3%	28
M7	46%	452
M8	0%	2
M13	25%	244
M14	1%	10
M15	0%	1
M17	1%	12
M21	0%	1
M22	0%	1
ND	1%	5

3.3.2 VALIDATION G-SPIT

Les participants du projet G-SPIT ont été recrutés dans sept centres de dépistage désignés (CDD) ou de dépistage d'employés situés à Montréal, Blainville, Québec, Rimouski, Mascouche et Joliette, entre le 10 novembre 2020 et le 1er février 2021.

Toutes les paires d'échantillons (N=7 406) testées par différentes plateformes seront toutes analysées par une plateforme unique (Allplex, Seegene), en utilisant un protocole sans extraction. Finalement, tous les échantillons positifs à partir du gargarisme ont été acheminés au LSPQ afin de préparer des panels de vérification pour l'ensemble des laboratoires. Ces panels ont été analysés par plusieurs laboratoire depuis décembre 2020 afin de contribuer à rendre disponible le gargarisme à la population desservie.

Les données présentées dans ce rapport concernent 1 617 paires d'échantillons testés par la plateforme Allplex/Seegene.

TYPE DE SPÉCIMENS :

Pour chaque participant, un EONP et un prélèvement par gargarisme ont été obtenus

STATUT :

EONP : spécimen de référence / Gargarisme : spécimen en évaluation

MÉTHODE DE PRÉPARATION :

EONP (prélèvement de référence) : Écouvillon duveteux déposé dans un milieu avec 3 ml d'eau moléculaire. Le spécimen est transporté à 4°C.

Gargarisme : Le gargarisme est obtenu à l'aide de 5 mL d'eau Eska. Le spécimen est traité de la même façon que l'EONP, en parallèle.

4 Maitrise des risques (incertitude)

Méthode qualitative et quantitative

Éléments	Points critiques	Éléments à maîtriser	Moyen de maîtrise
Infections > 7 jours	Patients en fin d'infection avec <i>Cycle threshold (Ct)</i> attendu plus élevé. Risque associé de faux-négatif.	Colliger la durée des symptômes pour en estimer l'impact sur la perte de <i>Ct</i> .	Respect des critères d'inclusion du devis
Charge virale faible (ou Ct élevée)	Voir point précédent	Ne pas recruter de patients connus infectés	Recruter un grand nombre de patients infectés afin de minimiser le risque de biais.
Eau de dilution (Naya/Eska)	Standardisation du protocole provincial	Limiter l'accès uniquement aux eaux validées (Naya et Eska) dans le cadre des essais préalables au lancement de l'étude	Communication et suivi avec les approvisionnements et les cliniques/unités désignées pour utilisation
Déversements	Risque de prélèvement inadéquat durant la gargarisation et la collecte	S'assurer qu'un protocole explicatif sur la méthode attendue soit disponible Sélectionner des populations adéquates (ex : clientèle pouvant comprendre les consignes)	Protocole écrit, audits, sélection de la clientèle cible pour ce type de prélèvements, consultation auprès du CINQ sur la question du port du masque pendant la procédure de gargarisme.
Changement de « catégorie »	Si l'analyse à partir de ce spécimen rend le TAAN moins sensible, il est possible qu'une personne infectée ait un résultat « faible quantité d'ARN détecté » à partir du gargarisme alors qu'elle aurait eu un résultat « détecté » à partir de l'écouvillonnage.	Estimer la probabilité de survenue de changement de « catégorie »	Informers les cliniciens et le personnel de santé publique de ce phénomène. Au besoin, répéter un prélèvement 48h plus tard par écouvillonnage (+/- combiné à gargarisme ou salive)*.

*Guide de gestion de risques COVID : <https://www.inspq.qc.ca/publications/3065-cas-test-amplification-acides-nucleiques-detecte-arn-covid19>

5 Performance analytique

Données Hôtel Dieu de Lévis

Cibles	Nombre de tests	Détectés	Non détecté Faux négatifs	Détecté par erreur Faux positifs**
Échantillons cliniques	1617	268		
Nombre négatifs	1323	0	N/A	1
Nombre de positifs	235	235	0	N/A
Nombre de faibles positifs	33	28	5	N/A
Échantillons simulés (Panel)				
Nombre négatifs	5	0	N/A	0
Nombre de positifs	10	10	0	N/A
Contrôles				
Nombre négatifs	10	0	N/A	0
Nombre de positifs	10	10	0	N/A

Données projet G-SPIT

Cibles	Nombre de tests	Détectés	Non détecté Faux négatifs	Détecté par erreur Faux positifs**
Échantillons cliniques	495	52		
Nombre négatifs	443	0	N/A	1
Nombre de positifs	52	43	0	N/A
Nombre de faibles positifs	0	0	5	N/A
Échantillons simulés (Panel)				
Nombre négatifs	5	0	N/A	0
Nombre de positifs	10	10	0	N/A
Contrôles				
Nombre négatifs	10	0	N/A	0
Nombre de positifs	10	10	0	N/A

5.1 Répétabilité

Un contrôle positif maison (pool d'écouvillons oro-nasopharyngés positifs) conçu au laboratoire de l'Hôtel-Dieu de Lévis a été utilisé pour évaluer la répétabilité. Ce contrôle positif est analysé sur chaque plaque PCR plusieurs fois par jour.

Voici les résultats obtenus pour ce contrôle du 2020-10-02 au 2020-10-19; l'incertitude de dispersion est calculée à partir des contrôles de la qualité (contrôles positifs) du 2 au 19 octobre 2020. Incertitude de k=2 (niveau de confiance de 95%) :

Plaque	E gene (FAM) Ct	RdRP gene (CR610) Ct	N gene (Q670) Ct
20201002CFX-S1	30,07	32,69	32
20201002CFX-S2	30,34	32,3	32,23
20201002CFX-S3	29,72	31,64	31,65
20201002CFX-S4	29,84	32,07	32,01
20201003CFX-S1	29,77	32,17	31,8
20201003CFX-S2	29,86	31,49	32,31
20201003CFX-S4	29,98	32,2	31,85
20201004CFX-S1	29,73	30,93	31,28
20201004CFX-S2	29,32	30,75	31,07
20201005CFX-S1	29,67	31,59	31,69
20201005CFX-S2	29,6	31,09	31,61
20201005CFX-S3	29,36	31,23	31,24
20201008CFX-S1	29,46	31,15	31,26
20201008CFX-S3	30,52	32,25	32,15
20201009CFX-S1	30,51	33,05	32,33
20201009CFX-S2	30,84	32,79	32,87
20201009CFX-S3	30,78	32,09	32,16
20201009CFX-S4	30,9	32,63	32,54
20201010CFX-S1	30,91	32,96	33,07
20201010CFX-S2	30,21	32,56	31,98
20201010CFX-S3	30,71	32,89	32,67
20201013CFX-S1	30,8	32,8	32,45
20201013CFX-S2	31	32,46	32,23
20201013CFX-S3	31,15	32,65	32,61
20201013CFX-S4	30,92	32,53	32,41
20201013CFX-S5	30,98	33,18	32,83
20201014CFX-S1	30,61	33,06	32,71
20201014CFX-S2	30,56	32,99	32,69
20201014CFX-S3	30,82	32,9	32,59
20201014CFX-S4	30,43	32,5	31,76
20201014CFX-S5	30,86	32,35	32,79
20201014CFX-S6	30,77	32,74	32,51
20201014CFX-S7	30,34	32,57	32,45
20201015CFX-S1	30,19	32,46	31,82
20201015CFx-S2	30,5	32,79	32,01
20201015CFX-S3	30,77	33,76	32,53
20201015CFX-S4	30,36	32,58	31,98
20201015CFX-S5	31,13	32,83	32,63
20201015CFX-S6	30,52	32,52	32,43
20201016CFX-S1	29,89	31,72	31,84
20201016CFX-S2	31,33	32,96	32,63
20201016CFX-S4	30,65	32,54	32,28
20201016CFX-S5	31,2	33,33	33,11
20201016CFX-S6	30,82	32,44	32,59
20201016CFX-S7	30,4	31,56	32,09
20201017CFX-S1	30,69	32,29	32,56
20201017CFX-S2	30,78	32,3	32,43
20201018CFX-S1	31,47	33,16	33,14
20201018CFX-S2	30,93	32,38	32,43
20201019CFX-S1	30,81	33,06	32,47
Moyenne	30,4756	32,3986	32,2554
ET	0,54	0,65	0,49
CV	1,76%	2,02%	1,52%
Incertitude CV	3,68%	4,21%	3,18%

5.2 Reproductibilité

Localement, HDL, un panel de 20 échantillons positifs et 20 échantillons négatifs ont aussi été constitués et testé en parallèle avec les trousse Allplex 2019-nCoV (Seegene), RealTime SARS-CoV-2 (Abbott) et Simplexa COVID-19 (DiaSorin). Les résultats se sont tous avérés conformes pour la détection de SARS-CoV-2 :

#requête	Allplex 2019-nCoV					Abbott RealTime SARS-CoV-2 (m2000)			Simplexa COVID-19			
	Ct gène E	Ct gène RdRp	Ct gène N	date	initiales	Cn	date	initiales	Ct gène S	Ct ORF1ab	date	initiales
S7042617	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7041448	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042277	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7041684	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042503	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042467	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042188	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7022777	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7041902	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7072004	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042297	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7041940	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042313	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042252	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042324	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042032	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042405	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7041385	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042339	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5
S7042056	0	0	0	2020-11-04	LF7	0	2020-11-05	MG22	0	0	2020-11-05	MV5

#requête	Allplex 2019-nCoV					Abbott RealTime SARS-CoV-2 (m2000)			Simplexa COVID-19			
	Ct gène E	Ct gène RdRp	Ct gène N	date	initiales	Cn	date	initiales	Ct gène S	Ct ORF1ab	date	initiales
S7041209	27,44	31,55	29,32	2020-11-04	LF7	16,04	2020-11-05	MG22	25,0	25,8	2020-11-05	MV5
S7041354	31,76	33,95	34,14	2020-11-04	LF7	21,70	2020-11-05	MG22	31,2	30,1	2020-11-05	MV5
S7041411	28,93	32,95	31,79	2020-11-04	LF7	16,57	2020-11-05	MG22	26,8	27,0	2020-11-05	MV5
S7041589	32,45	35,25	34,96	2020-11-04	LF7	21,62	2020-11-05	MG22	29,4	30,1	2020-11-05	MV5
S7041963	21,79	24,95	24,39	2020-11-04	LF7	10,65	2020-11-05	MG22	19,6	20,2	2020-11-05	MV5
S7042168	25,73	29,87	28,59	2020-11-04	LF7	14,12	2020-11-05	MG22	24,7	25,0	2020-11-05	MV5
S7042180	19,80	24,04	22,38	2020-11-04	LF7	9,81	2020-11-05	MG22	18,2	18,4	2020-11-05	MV5
S7042202	25,78	30,56	28,38	2020-11-04	LF7	15,47	2020-11-05	MG22	24,5	24,3	2020-11-05	MV5
S7042239	24,68	32,26	27,46	2020-11-04	LF7	11,51	2020-11-05	MG22	21,1	21,3	2020-11-05	MV5
S7042637	26,17	29,80	29,08	2020-11-04	LF7	14,72	2020-11-05	MG22	23,6	24,1	2020-11-05	MV5
S7042781	25,71	28,69	28,11	2020-11-04	LF7	15,03	2020-11-05	MG22	23,6	26,9	2020-11-05	MV5
S7043099	20,98	25,21	23,45	2020-11-04	LF7	10,13	2020-11-05	MG22	19,0	19,9	2020-11-05	MV5
S7043268	29,30	30,66	31,36	2020-11-04	LF7	16,54	2020-11-05	MG22	27,7	28,0	2020-11-05	MV5
S7043287	31,24	33,29	32,91	2020-11-05	VC3	19,98	2020-11-05	MG22	28,4	29,3	2020-11-05	MG22
S7043315	34,56	37,20	36,98	2020-11-04	LF7	22,60	2020-11-05	MG22	30,6	31,6	2020-11-05	MV5
S7043366	28,55	32,52	30,79	2020-11-04	LF7	17,79	2020-11-05	MG22	26,4	26,1	2020-11-05	MV5
S7043921	26,90	31,13	29,42	2020-11-05	VC3	15,04	2020-11-05	MG22	24,3	24,9	2020-11-05	MG22
S7044143	26,87	29,26	28,29	2020-11-04	LF7	17,73	2020-11-05	MG22	26,2	26,9	2020-11-05	MV5
S7044242	32,18	35,14	33,70	2020-11-04	LF7	21,07	2020-11-05	MG22	30,1	29,1	2020-11-05	MV5
S7044632	31,42	34,76	33,24	2020-11-05	VC3	20,40	2020-11-05	MG22	29,2	29,5	2020-11-05	MG22
S7044713	27,54	31,39	28,89	2020-11-05	VC3	16,02	2020-11-05	MG22	24,6	24,9	2020-11-05	MG22

Un panel de vérification, composé de 10 spécimens positifs et de 5 spécimens négatifs, a été élaboré au LSPQ et testé sur toutes les plateformes du projet G-SPIT. Cet exercice a démontré que le même panel analysé sur une même plateforme d'un centre hospitalier à l'autre donnait des résultats reproductibles :

Spécimen	Résultats attendus (Ct)	Plateforme 1 (Ct)	Plateforme 2 (Ct)	Plateforme 3 (Ct)	Plateforme 4 (Ct)	Plateforme 5 (Ct)	Plateforme 6 (Ct)	Plateforme 7 (Ct)	Plateforme 8 (Ct)	Moyenne	Écart type
1	26,63	30,48	28,60	29,50	29,89	29,72	28,11	29,26	30,90	29,23	0,97
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
3	21,19	27,08	24,35	24,13	25,18	25,19	29,46	24,65	26,40	25,29	1,57
4	21,52	26,37	23,84	24,01	23,78	24,51	22,69	23,97	25,40	24,01	0,94
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
6	21,94	27,06	24,16	25,08	24,03	25,44	23,93	24,81	26,50	24,77	1,12
7	23,82	29,53	26,23	26,64	27,17	27,64	25,54	26,65	28,20	26,82	1,16
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
10	19,75	24,14	22,07	21,63	22,34	22,92	24,14	21,98	23,70	22,52	1,07
11	23,67	28,30	26,07	26,47	26,31	26,13	25,00	25,91	27,40	26,14	0,87
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
13	23,74	29,12	26,19	26,63	26,56	27,01	26,84	26,44	27,40	26,66	0,83
14	18,86	22,11	21,00	21,84	21,21	21,94	20,05	21,34	23,20	21,28	0,89
15	24,77	30,52	27,03	27,63	28,16	28,21	25,69	27,21	28,60	27,54	1,21
										25,43	1,85

5.3 Justesse / Exactitude

Données déjà fournies lors de la vérification initiale effectuée sur EONP. Se référer aux articles de Freppel et al (2020) et Merindol et al (2020) qui ont été publiés par le groupe Seegene.

Efficient SARS-CoV-2 detection in unextracted oro-nasopharyngeal specimens by rRT-PCR with the Seegene Allplex™ 2019-nCoV assay. Freppel W, Merindol N, Rallu F, Bergevin M. *Virology*. 2020 Dec 18;17(1):196. doi: 10.1186/s12985-020-01468-x. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A, Houle C, Germain H, Danylo A.J *Clin Virol*. 2020 Jul;128:104423. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104423. Epub 2020 May 7. PMID: 32416598

5.4 Comparaison

Ci-dessous les résultats obtenus lors de la validation initiale faite localement à HDL pour comparer le gargarisme au prélèvement standard par EONP. Performance du gargarisme vs EONP avec ou sans test de référence composé (en incluant ou non les valeurs discordantes) sont présentés ci-dessous (échantillons pairés).

5.4.1 PERFORMANCE GARGARISME VS. EONP (ET EONP VS. GARGARISME)

Lorsque comparées au prélèvement standard par EONP, la sensibilité (SN) et la spécificité (SE) du gargarisme sont respectivement de 95% et 99,1%. Des valeurs qui s'avèrent très similaires à l'EONP, tout comme pour les valeurs prédictives et les rapports de vraisemblance (VPP, VPN, RVP et RVN) avec moins de 1% d'écart.



		EONP Allplex					Gargarisme Allplex		
		Détecté	Non détecté				Détecté	Non détecté	
Gargarisme Allplex	Détecté	115	8	123	EONP Allplex	Détecté	115	6	121
	Non détecté	6	876	882		Non détecté	8	876	884
Total		121	884	1005	Total		123	882	1005
		IC 95%					IC 95%		
SN	95,0%	89,5% - 98,2%			SN	93,5%	87,6% - 97,2%		
SP	99,1%	98,2% - 99,6%			SP	99,3%	98,5% - 99,8%		
VPP*	93,5%	87,8% - 96,6%			VPP*	94,9%	89,4% - 97,7%		
VPN*	99,3%	98,5% - 99,7%			VPN*	99,1%	98,3% - 99,6%		
RVP*	105	53 - 210			RVP*	137	62 - 306		
RVN*	0,05	0,02 - 0,11			RVN*	0,07	0,03 - 0,13		
* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude					* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude				

5.4.2 PERFORMANCE GARGARISME OU EONP VS. TEST DE RÉFÉRENCE COMPOSÉ

Lorsqu'on analyse avec un test de référence composé (usager considéré positif dès que le gargarisme ou l'EONP est positif), en assumant une prévalence de 12%, la sensibilité (SN) et la spécificité (SE) du gargarisme sont respectivement de 95,3% et 100%. Des valeurs qui s'avèrent très similaires à l'EONP (93,8%SE et 100%SP), tout comme pour la valeur prédictive négative et le rapport de vraisemblance négatif (VPN et RVN) avec moins de 1% d'écart.

		Test de référence composé					Test de référence composé		
		Détecté	Non détecté				Détecté	Non détecté	
Gargarisme Allplex	Détecté	123	0	123	EONP Allplex	Détecté	121	0	121
	Non détecté	6	876	882		Non détecté	8	876	884
Total		129	876	1005	Total		129	876	1005
		IC 95%					IC 95%		
SN	95,3%	90,2% - 98,3%			SN	93,8%	88,2% - 97,3%		
SP	100%	99,6% - 100%			SP	100%	99,6% - 100%		
VPP*	100%				VPP*	100%			
VPN*	99,4%	98,6% - 99,7%			VPN*	99,2%	98,4% - 99,6%		
RVP*					RVP*				
RVN*	0,05	0,02 - 0,10			RVN*	0,06	0,03 - 0,12		
* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude					* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude				

5.4.3 PERFORMANCE GARGARISME OU EONP VS. TEST DE RÉFÉRENCE COMPOSÉ AVEC CONFIRMATION DES DISCORDANTS

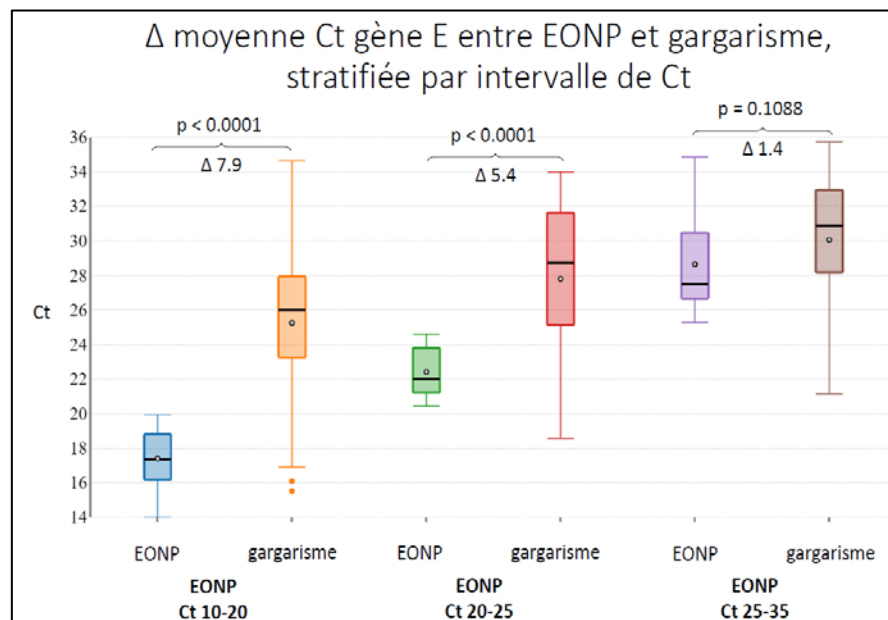
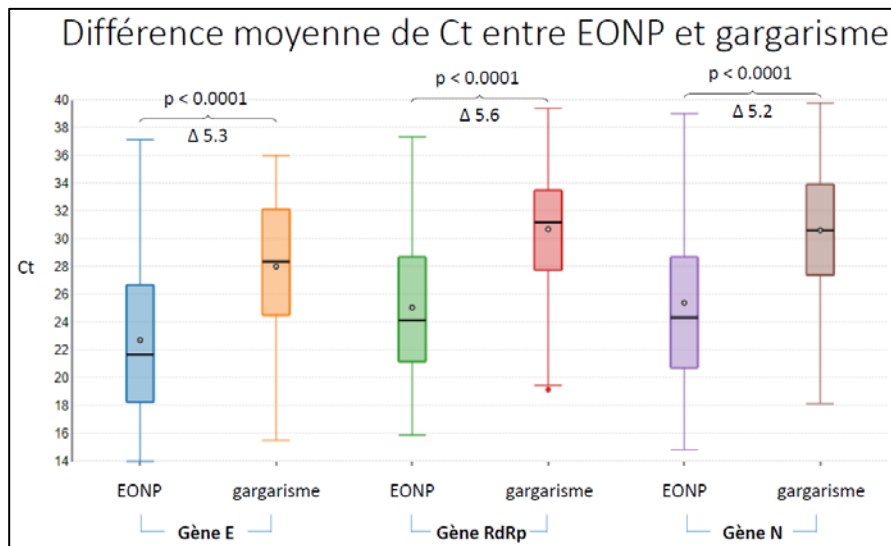
Si on applique une correction avec confirmation des discordants, la sensibilité (SN) et la spécificité (SE) du gargarisme sont respectivement de 96,1% et 99,7%. Ces valeurs s'avèrent très similaires à celles de l'EONP (94,5%SE et 99,9%SP), tout comme pour les VPP, VPN, RVP et RVN avec moins de 1% d'écart.

		Test de référence composé + analyse de discordance					Test de référence composé + analyse de discordance		
		Détecté	Non détecté				Détecté	Non détecté	
Gargarisme Allplex	Détecté	122	3	125	EONP Allplex	Détecté	120	1	121
	Non détecté	5	875	880		Non détecté	7	877	884
Total		127	878	1005	Total		127	878	1005
		IC 95%					IC 95%		
SN	96,1%	91,1% - 98,7%			SN	94,5%	89,9% - 98,2%		
SP	99,7%	99% - 99,9%			SP	99,9%	99,4% - 100%		
VPP*	97,5%	92,5% - 99,2%			VPP*	99,1%	94,2% - 99,9%		
VPN*	99,5%	98,7% - 99,8%			VPN*	99,4%	98,6% - 99,7%		
RVP*	281	91 - 871			RVP*	837,00	118 - 5938		
RVN*	0,04	0,02 - 0,09			RVN*	0,05	0,02 - 0,10		
* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude					* En assumant une prévalence de 12%, comme celle de l'étude				

5.4.4 DIFFÉRENCE DE Ct ENTRE EONP ET GARGARISME OBSERVÉE LORS DE LA VALIDATION LOCALE À HDL

Parmi les paires d'échantillons positives, l'écart de Ct entre les EONP et les gargarismes est en moyenne de 5 Ct (5,2 à 5,6) pour les trois cibles amplifiées (E, RdRp et N) par la trousse Allplex 2019-nCoV (différence significative $p < 0.0001$ – Graphique 1). Si on catégorise les échantillons selon la charge virale de l'EONP (Ct 10-20; Ct 20-25 et Ct 25-35), on observe un plus grand écart pour les échantillons avec forte charge virale (Ct 10 à 20), avec un écart moyen de +7,9 Ct pour le gargarisme, comparativement à ceux avec faible charge virale (Ct 25 à 35) qui ont un écart moyen de seulement +1,4 Ct (Graphique 2).

Malgré cette différence significative, la sensibilité clinique reste tout de même très similaire entre EONP et gargarisme (voir résultats présentés aux sections 5.4.1 à 5.4.3).



5.4.5 COMPARAISON DES SENSIBILITÉS DES DIFFÉRENTES PLATEFORMES DU PROJET G-SPIT INCLUANT ALLPLEX (SEEGENE) À PARTIR DU PRÉLÈVEMENT NASO-PHARYNGÉ (EONP) ET DU GARGARISME (G)

Ci-dessous performance globale de la trousse Allplex 2019-nCoV dans le cadre du projet G-SPIT. L'évaluation de la sensibilité faite à partir de 1591 spécimens est de 91,4% alors qu'elle est de 97,4% avec EONP. La sensibilité du gargarisme est donc légèrement inférieure à la sensibilité calculée lors de l'étude de validation locale à HDL où elle était supérieure à 95%. Il est à noter que les échantillons ont subi un cycle de gel-dégel dans l'étude G-SPIT avant d'être analysés avec la trousse Allplex 2019-nCoV :

Plateforme	Nombre de paires			Résultats			Sensibilité (IC 95%)	
				G	EONP		EONP	G
	Total	INV'	POS** (%)		NEG	POS		
Cobas 6800/8000	708	N: 2 G: 1	145/705 (20,6)	NEG	560	12	97,0% (92,8-99,0)	91,7% (85,9-95,3)
				POS	4	129		
Alinity	707	N: 4 G: 5	111/699 (15,9)	NEG	588	13	96,4% (90,7-98,7)	88,3% (80,9-93,2)
				POS	4	94		
M2000	649	N: 0 G: 2	98/647 (15,2)	NEG	549	11	98,0% (92,1-99,5)	88,8% (80,7-93,7)
				POS	2	85		
Simplexa	613	N: 16 G: 7	101/592 (17,1)	NEG	491	7	97,0% (91,1-99,1)	93,1% (86,1-96,7)
				POS	3	91		
Panther	358	0	54/358 (15,1)	NEG	304	2	100% (93,2-100)	96,3% (85,8-99,1)
				POS	0	52		
Liat	111	N: 1 G: 0	25/110 (22,7)	NEG	85	2	96,0% (73,7-99,5)	92,0% (70,9-98,2)
				POS	1	22		
BD Max	325	N: 1 G: 1	35/323 (10,8)	NEG	288	3	88,6% (72,5-95,8)	91,4% (75,8-97,3)
				POS	4	28		
Allplex	1617	N : 12 G : 16	268/1591 (16,8)	NEG	1323	26	97,4% (94,6-98,8)	91,4% (87,7-94,1)
				POS	7	235		

5.5 Limites de quantification

Méthode non quantitative

5.6 Linéarité

N/A

5.7 Limites de détection

Données de LOD déjà fournies lors de la validation initiale effectuée sur des prélèvements nasopharyngés

5.8 Sensibilité et spécificité

Données de spécificité ont déjà fournies lors de la validation initiale effectuée sur des prélèvements nasopharyngés

Le résumé de sensibilité et spécificité lors de la validation locale faite à HDL sur gargarisme est fourni ci-dessus (aussi voir section 5.4.1 à 5.4.4) :

Méthode (laboratoire)	Sensibilité (IC 95%)		Spécificité (IC 95%)	
	EONP	Gargarisme	EONP	Gargarisme
Allplex 2019-nCoV (Seegene)/ lyse thermique (HDL)	93,5 % (87.6-97.2%)	95,0 % (89.5-98.2%)	99,3 % (98,5-99,8%)	99,1 % (98,2-99,6%)
Allplex 2019-nCoV (Seegene)/ lyse thermique (HDL)vs TEST DE REFÉRENCE COMPOSÉ	93,8 % (88,2-97.3%)	95,3 % (90,2-98.3%)	100 % (99,6-100%)	100 % (99,6-100%)
Allplex 2019-nCoV (Seegene)/ lyse thermique (HDL)vs TEST DE REFÉRENCE COMPOSÉ (avec confirmation des discordants)	94,5 % (89,9-98,2%)	96,1 % (91,1-98,7%)	99,9 % (99,4-100%)	99,7 % (99-99,9%)

5.9 Interférences

Il est possible que certains prélèvements ne soient pas optimaux du fait de leur fluidité ou autre caractéristique (présence de sang, échantillon turbide, etc.), entraînant ainsi une altération du signal de mesure. Lors de la validation locale à HDL le taux d'invalides s'est avéré être de 1% pour les échantillons de gargarisme et de 3.1% pour les EONP ($p=0,0019$) :

Nombres de tests invalides lors de la validation locale à HDL avec trousse AllPlex NCoV 2019

Méthode	Nombre de paires d'échantillons invalides*		
	Total	EONP	Gargarisme
AllPlex nCoV 2019	36	27/884	9/880

En ce qui concerne l'étude multicentrique G-SPIT le taux d'invalides était de 1% pour les échantillons de gargarisme et de 0.7% pour les EONP. On peut donc conclure que le taux d'invalides est relativement faible pour le gargarisme avec la trousse Allplex 2019-nCoV (Seegene). :

Nombre de test invalides, obtenus dans le cadre du projet G-SPIT.

Plateforme	Nombre de paires			Résultats			Sensibilité (IC 95%)	
				G	EONP		EONP	G
	Total	INV'	POS** (%)		NEG	POS		
Cobas 6800/8000	708	N: 2 G: 1	145/705 (20,6)	NEG	560	12	97,0% (92,8-99,0)	91,7% (85,9-95,3)
				POS	4	129		
Alinity	707	N: 4 G: 5	111/699 (15,9)	NEG	588	13	96,4% (90,7-98,7)	88,3% (80,9-93,2)
				POS	4	94		
M2000	649	N: 0 G: 2	98/647 (15,2)	NEG	549	11	98,0% (92,1-99,5)	88,8% (80,7-93,7)
				POS	2	85		
SIMPLEXA	613	N: 16 G: 7	101/592 (17,1)	NEG	491	7	97,0% (91,1-99,1)	93,1% (86,1-96,7)
				POS	3	91		
Panther	358	0	54/358 (15,1)	NEG	304	2	100% (93,2-100)	96,3% (85,8-99,1)
				POS	0	52		
Liat	111	N: 1 G: 0	25/110 (22,7)	NEG	85	2	96,0% (73,7-99,5)	92,0% (70,9-98,2)
				POS	1	22		
BD Max	325	N: 1 G: 1	35/323 (10,8)	NEG	288	3	88,6% (72,5-95,8)	91,4% (75,8-97,3)
				POS	4	28		
Allplex	1617	N: 12 G: 16	268/1591 (16,8)	NEG	1323	26	97,4% (94,6-98,8)	91,4% (87,7-94,1)
				POS	7	235		

5.10 Contamination entre échantillons

Pas d'incident de contamination constaté. Tous les contrôles négatifs (eau) sont restés négatifs durant l'étude.

5.11 Robustesse

Stabilité de l'échantillon de gargarisme conservé à TP ou 4 °C pendant 7 jours. Résultats obtenus lors de la validation locale à HDL avec la trousse AllPlex nCoV 2019 confirme la stabilité du gargarisme :

	Day 0				Day 7 - 4 degrees Celsius				Day 7 - Room temperature			
	E gene (Ct)	RdRp gene (Ct)	N gene (Ct)	IC (Ct)	E gene (Ct)	RdRp gene (Ct)	N gene (Ct)	IC (Ct)	E gene (Ct)	RdRp gene (Ct)	N gene (Ct)	IC (Ct)
Naya water gargle	N/A	N/A	N/A	26,62								
Naya water gargle spiked	26,38	29,26	28,62	26,27	26,90	29,47	28,44	26,41	27,76	29,37	29,67	27,04
Delta					0,52	0,21	-0,18	0,14	1,38	0,11	1,05	0,77
Molecular water gargle	N/A	N/A	N/A	26,80								
Molecular water gargle spiked	26,40	27,80	27,29	25,88	26,56	29,39	28,67	26,06	26,56	29,29	28,74	26,21
Delta					0,16	1,59	1,38	0,18	0,16	1,49	1,45	0,33
Eska water gargle	N/A	N/A	N/A	26,26								
Eska water gargle spiked	26,93	30,19	29,11	26,06	27,33	30,74	29,75	26,56	27,28	29,70	29,74	27,23
Delta					0,40	0,55	0,64	0,50	0,35	-0,49	0,63	1,17
Baxter medical water gargle	N/A	N/A	N/A	27,81								
Baxter medical water gargle spiked	27,28	31,26	29,57	27,29	27,20	32,35	29,53	26,97	27,40	30,97	30,09	27,23
Delta					-0,08	1,09	-0,04	-0,32	0,12	-0,29	0,52	-0,06

Résultats obtenus localement à HDL avec différents types et fournisseurs d'eau montrant la stabilité peu importe le type d'eau ou le fournisseur, avec la trousse Allplex 2019-nCoV :

Patient	Date prélèvements	Date analyse	Échantillon	E gene
JD	2020-09-30	2020-09-30	Gargarisme (eau Naya)	nd
			Gargarisme (eau Naya) enrichi	20,93
			Gargarisme (eau Eska)	nd
			Gargarisme (eau Eska) enrichi	20,8
			Gargarisme (eau Labrador)	nd
			Gargarisme (eau Labrador) enrichi	20,79
			Gargarisme (eau Nestlé)	nd
			Gargarisme (eau Nestlé) enrichi	20,97
n/a	n/a	2020-09-30	Eau Naya pure	nd
			Eau Eska pure	nd
			Eau Labrador pure	nd
			Eau Nestlé pure	nd
n/a	n/a	2020-10-19	Eau stérile pour injection Baxter	nd
n/a	n/a	2020-10-23	Eau Naya pure	nd
			Eau Naya enrichie avec pool ctrl	29,91
			Eau Eska pure	nd
			Eau Eska enrichie avec pool ctrl	29,69
			Eau stérile AddiPak pure	nd
			Eau AddiPak enrichie avec pool ctrl	29,19
			Eau Labrador pure	nd
			Eau Labrador enrichie avec pool ctrl	29,77
			Eau stérile Baxter pure	nd
			Eau Baxter enrichie avec pool ctrl	29,94
			Eau robinet HDL pure	nd
			Eau robinet enrichie avec pool ctrl	29,72

5.12 Stabilité des réactifs

La vérification locale de la stabilité des réactifs n'est pas requise pour les laboratoires tant que les recommandations du fabricant sont respectées.

5.13 Intervalle de référence

NA

5.14 Sommaire de performance

	Critères d'acceptation	Résultats	Conformité
Répétabilité	Doit démontrer répétabilité sur un minimum de 5 contrôles positifs testés.	Écart négligeable de CT observé.	oui
Reproductibilité	Les résultats de détection doivent être reproductibles dans la plage à l'intérieur de la LoD	Panel 22 LSPQ conforme pour toutes les plateformes Seegene	oui
Comparaison	Performance des échantillons de gargarisme doit être comparable en sensibilité et spécificité à l'EONP. Doit aussi être comparable aux autres trousse (sensibilité et spécificité clinique similaire ou supérieure	Performance similaire ou supérieure à EONP	oui
Interférence	Interférence ne doivent pas influencer sur détection de SARS-CoV-2	Aucune interférence externe constatée	oui
Robustesse	Traitement et conservation des échantillons ne doit pas influencer	Conservation 7 jours à TP ou 4C n'a pas d'influence sur détection de SARS-CoV-2	oui

6 Analyse et interprétation

Cette validation effectuée localement à HDL avec 1005 paires (987 patients) ainsi qu'avec 1617 autres paires dans le cadre de l'étude multicentrique G-SPIT nous donne une sensibilité respective de 95% et 91,7% pour le gargarisme, qui est très similaire à l'EONP (93,5% et 97,4%). Le taux de positivité des deux études était de 12,0% et 16,8%.

Dans le contexte où nous sommes confrontés à un nombre croissant de refus de prélèvement par EONP, le gargarisme peut offrir une alternative moins invasive pour les dépistages répétés et pourrait également se faire en auto-prélèvement. Ceci pourrait permettre à un plus grand nombre d'employés ou de patients de se faire prélever à des fréquences plus élevées pour ainsi avoir un meilleur dépistage de la maladie. Plusieurs études démontrent d'ailleurs qu'il peut être plus judicieux d'utiliser une méthode de dépistage moins sensible, mais utilisée de façon plus fréquente.

Il sera recommandé de contrôler par EONP entre 24 et 48 heures lors d'un résultat négatif par gargarisme lorsqu'il y a une haute suspicion clinique de COVID-19. Il sera également exigé de conserver le prélèvement par EONP comme première option pour certaines indications, principalement dans la clientèle intra hospitalière (ex. : M1, M2), ainsi que pour les usagers symptomatiques dont les symptômes sont présents depuis plus de 7 jours car ces derniers n'ont pas été inclus dans les études de validation et il est connu que la charge virale diminue rapidement dans la salive après 7 jours.

7 Déclaration d'aptitude

Les données cumulées lors de la validation / vérification permettent de confirmer que la méthode est prête à l'emploi (date / paraphe) :

Responsable plateforme Seegene Allplex
au LSPQ :

Philippe Dufresne

(Paraphe)

(aaaa/mm/jj)

Coordonnatrice du projet G-SPIT au LSPQ :

Florence Doualla-Bell

(Paraphe)

(aaaa/mm/jj)

Clinicien responsable de la validation/vérification
du site hospitalier :

Jeannot Dumaresq

(Paraphe)

(aaaa/mm/jj)

Clinicienne responsable de la
validation/vérification au LSPQ

Judith Fafard

(Paraphe)

(aaaa/mm/jj)

Annexe 1

Méthode de prélèvement par gargarisme pour le diagnostic de la COVID-19

1

Se placer à au moins 2 mètres de quiconque et se laver les mains avec une solution hydro-alcoolique.

2

5 millilitres d'eau Naya ou Eska vous seront fournis dans un petit gobelet gradué jetable.



3

Se gargariser avec cette eau



5 secondes dans la bouche



5 secondes dans la gorge



Répétez une seconde fois :

- 5 secondes dans la bouche
- 5 secondes dans la gorge

4

Recracher le contenu de la bouche dans le gobelet en prenant garde de ne pas en verser à l'extérieur.



5

Verser le contenu du gobelet dans le tube prévu à cet effet et bien remettre le bouchon sur le tube en le vissant fermement. Les rebords du gobelet peuvent être légèrement écrasés pour faciliter le transfert dans le tube.



6

Jeter le gobelet et se laver les mains avec une solution hydro-alcoolique.

7

S'assurer que le bouchon du tube est bien vissé et mettre le tube dans le sac prévu à cet effet. Sceller le sac et le remettre à la personne désignée.

Annexe 2

Devis du projet G-SPIT : Évaluation prospective québécoise de la sensibilité analytique des TAAN SRAS-CoV-2 à partir de prélèvements non-invasifs

Étude **G-SPIT** : **G**argarisme ou **S**alive : **P**erformance et **I**mplantabilité des **TAAN** SRAS-CoV-2 pour le diagnostic de la COVID-19

Investigatrices principales : Annie-Claude Labbé, CIUSS-EMTL (HMR) – Grappe Optilab CHUM
Judith Fafard, LSPQ/INSPQ

Co-investigateurs : Marco Bergevin, Hôpital de la Cité de la santé de Laval – Grappe Optilab LLL
Julie Bestman-Smith, CHU de Québec
François Coutlée, CHUM
Marc Desforges, CHU Ste-Justine
Florence Doualla-Bell, LSPQ/INSPQ
Jeannot Dumaresq, Hôtel-Dieu de Lévis – Grappe Optilab Chaudière-Appalaches
Linda Lalancette, Hôpital St-Eustache – Grappe Optilab LLL
Christian Lavallée, CIUSS-EMTL (HMR) – Grappe Optilab CHUM
Michel Roger, LSPQ/INSPQ
Émilie Vallières, CHU Ste-Justine

Collaborateurs: Patrick Benoît, résident en microbiologie médicale et maladies infectieuses de l'adulte, Université de Montréal
Sarah Gobeille Paré, résidente en microbiologie médicale, Université Laval
Matthew Magyar, résident en maladies infectieuses pédiatriques, Université de Montréal

1. Contexte :

L'épidémie de SRAS-CoV-2 qui a atteint le Québec à la fin du mois de février 2020 a mobilisé le réseau de la santé à différents niveaux. Le réseau des laboratoires du Québec a rapidement implanté les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN), avec une augmentation progressive de capacité aujourd'hui > 25 000 tests par jour et ce, à partir du protocole du Laboratoire de santé publique du Québec et d'une dizaine de plateformes commerciales différentes. Par conséquent, la capacité théorique de tester est non seulement affectée par la disponibilité du matériel de prélèvement, du personnel qui effectue ce prélèvement mais surtout de l'acceptabilité par la population.

L'écouvillonnage oral (gorge) et du nasopharynx (EONP) à l'aide d'un écouvillon floqué est réputé le plus sensible. Cependant :

1. Il doit être effectué par un professionnel de la santé, ce qui constitue un problème important dans un contexte d'épuisement et de pénurie de personnel;
2. Il est très inconfortable (voire même désagréable), au point où l'acceptabilité du prélèvement répétitif (contextes d'éclosion, dépistages réguliers en CHSLD et personnel œuvrant auprès de clientèles particulièrement vulnérables, par exemple des greffés de cellules souches) peut être limitée;
3. La qualité du prélèvement peut être variable (que ce soit à cause de particularités anatomiques, de seuil de douleur ou d'appréhension de la personne prélevés ou d'habiletés du professionnel de la santé qui effectue le prélèvement);
4. Il peut provoquer des étternuements et de la toux, mettant à risque le professionnel qui effectue le prélèvement;
5. Nous ne sommes pas à l'abri de pénurie d'écouvillons floqués et de milieux de transport.

Les prélèvements moins invasifs proposés sont généralement considérés moins sensible que l'EONP. L'impact clinique et populationnel d'un prélèvement moins sensible demeure à déterminer si on considère que les études disponibles présentent certains biais de sélection (i.e. caractéristiques démographiques variables) et d'échantillons (i.e. nombre de personnes recrutées).

L'**écouvillonnage nasal ou du cornet moyen** est considéré un prélèvement acceptable par l'*Infectious Diseases Society of America* (IDSA)¹. Il est plus acceptable que l'EONP, en particulier pour les gens qui se soumettent à des prélèvements périodiques, et peut, dans certaines circonstances, être effectué par la personne elle-même (autoprélèvement). La performance analytique (sensibilité) de ce type de prélèvement est cependant généralement moindre que celle de l'EONP. De plus, cet auto-prélèvement ne serait pas applicable en pédiatrie. Chez les nouveau-nés, l'**écouvillonnage de muqueuse jugale/gencives**, qui est utilisé depuis plusieurs années pour le dépistage de l'infection congénitale à CMV, pourrait être une avenue intéressante pour la COVID-19.

Un **prélèvement salivaire** représente une autre option d'auto-prélèvement. Il n'est pas invasif² et, bien que plusieurs dispositifs commerciaux aient été développés, il ne nécessite pas nécessairement d'équipement spécialisé, hormis un contenant de transport. Une des plateformes disponibles dans plusieurs laboratoires québécois, Simplexa (Diasorin), est approuvée en Europe à partir de prélèvements salivaires³. Une étude récente publiée dans le

NEJM⁴ démontre que les niveaux d'ARN viral déterminé selon le *cycle threshold* (Ct) sont plus élevés dans la salive qu'avec un écouvillon nasopharyngé chez des patients nouvellement diagnostiqués avec symptômes. De plus cette publication rapporte un nombre plus élevé de spécimens salivaires positifs pour le SRAS-CoV-2. L'**annexe 1** présente le résumé d'autres études sur le prélèvement salivaire. Malgré ces résultats encourageants, les différents devis utilisés pourraient avoir un impact sur les résultats de sensibilité du TAAN SRAS-CoV-2 observés :

- 1- L'hétérogénéité des plateformes et protocoles utilisés;
- 2- Le traitement du spécimen de salive qui pourrait occasionner une charge de travail supplémentaire au laboratoire :
 - Des manipulations préalables à l'amplification de l'échantillon salivaire pourraient être requises à cause de la viscosité et de la probabilité plus élevée d'inhibition de l'amplification (dilution dans solution saline ou eau moléculaire⁵, centrifugation et/ou traitement à la protéinase K⁴);
 - L'utilisation de contenants spécifiques pour recueillir la salive (par exemple, Falcon 50 mL), pourrait compliquer la gestion des tubes au laboratoire;
- 3- L'hétérogénéité de la population recrutée (patients de CHSLD, patients hospitalisés, travailleurs de la santé, personnes de la population générale se présentant en CHSLD, absence/faible nombre de participants de <18 ans).

Plus récemment, certains groupes, dont celui de Cologne, en Allemagne⁶, et de la Colombie-Britannique⁷⁻⁸ ont adopté le **gargarisme** comme méthode de prélèvement. Un projet pilote chez les enfants est aussi en cours en Nouvelle-Écosse⁹. Ce type de prélèvement représenterait certains avantages par rapport à la salive, notamment pour les personnes qui n'arrivent pas à en produire ou à la cracher et, pour les laboratoires, le traitement de l'échantillon pourrait être simplifié en évitant l'étape de dilution. Bien que prometteur, les protocoles de Cologne et de la Colombie-Britannique sont basés sur un gargarisme avec solution saline, un composé incompatible avec certaines des plateformes technologiques largement utilisées au Québec, comme celle de la compagnie Seegene. En préparation de ce projet, des essais ont été faits dans certains laboratoires de notre équipe afin d'identifier la « solution » la plus prometteuse (eau de source, eau stérile utilisée dans les hôpitaux) et la façon de procéder aux prélèvements. Compte tenu des résultats préliminaires obtenus, **nous proposons d'évaluer le gargarisme à l'eau de source**. Par ailleurs, des inquiétudes ont été soulevées quant au risque d'aérosolisation de particules virales lors du gargarisme. Le Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ) a donc été interpellé et ce sujet a été discuté lors d'une de leurs réunions : « la revue de la littérature concernant le gargarisme et la possibilité de générer des aérosols par des membres du CINQ n'a pas permis d'identifier des données probantes quant au risque infectieux. Des sociétés savantes qui se positionnent à propos des soins buccaux et la dentisterie ne voient pas de génération d'aérosols dans ces contextes. Dans l'état actuel des connaissances, les membres du CINQ sont d'avis que les précautions gouttelettes-contact sont adéquates pour le gargarisme, le transvidage de spécimen et la collecte de salive. » (communication personnelle, Judith Fafard, 14 octobre 2020).

Avant d'implanter ces prélèvements non-invasifs à grande échelle au Québec, il est essentiel :

- a) De documenter la faisabilité de ces types de prélèvement dans les cliniques désignées de dépistage (CDD), les cliniques désignées d'évaluation (CDÉ) et les cliniques de dépistage des professionnels de la santé (CDPS);
- b) D'approfondir l'évaluation de la performance clinique de ces types d'échantillon, surtout sur les plateformes à « haut-débit » utilisées pour le dépistage de masse dans la population générale;

- c) De préciser le protocole de traitement des échantillons de salive et de gargarisme au laboratoire et d'évaluer de façon plus détaillée le surplus de temps technique (**dans un contexte de pénurie et d'épuisement du personnel de laboratoire**) associé à la manipulation de ces échantillons.

Le prélèvement par gargarisme étant celui qui nous apparaît le plus prometteur, ce projet se concentre principalement sur cet échantillon, comparativement au prélèvement de référence, l'EONP. Au moment de rédiger le protocole, des incertitudes persistent quant à sa supériorité potentielle comparativement à la salive (acceptabilité et faisabilité par l'utilisateur, le personnel attiré aux prélèvements et le personnel de laboratoire, ainsi que performance analytique). **Ainsi, le prélèvement de salive sera étudié comme projet secondaire chez certains participants.** Les autres prélèvements (écouvillonnage de narines antérieures ou de muqueuse jugale/gencives), seront à l'étude seulement dans certains sites. Une analyse intérimaire sera réalisée en cours de projet afin de réorienter au besoin les types de prélèvements à effectuer.

2. Objectifs :

2.1 Objectifs principaux :

1. Performance : déterminer la sensibilité et la spécificité du TAAN du SRAS-CoV-2 à partir du gargarisme et de l'EONP, chez des adultes et des enfants.
2. Implantabilité : documenter l'acceptabilité et la faisabilité du prélèvement du gargarisme (perceptions des participants et des professionnels de la santé attirés aux prélèvements, ainsi que des technologistes au laboratoire).

2.2 Objectifs secondaires :

1. Déterminer la sensibilité et la spécificité du TAAN du SRAS-CoV-2 à partir de la salive chez les adultes et les enfants;
2. Déterminer la sensibilité et la spécificité du TAAN du SRAS-CoV-2 à partir de l'auto-prélèvement de narines antérieures (adultes) et d'écouvillonnage de la muqueuse jugale/gencives (enfants);
3. Comparer la performance de certaines plateformes entre elles (protocole du LSPQ, avec extraction chimique ou lyse thermique, et trousse commerciale) à partir de prélèvements non invasifs (salive, gargarisme, auto-prélèvement de narines antérieures et écouvillonnage de la muqueuse jugale/gencives);
4. Évaluer les impacts en surplus de temps technique au laboratoire, en particulier pour les échantillons de salive;
5. Évaluer diverses variables techniques pouvant influencer la performance et l'implantabilité (par ex. matériel de prélèvement, consignes particulières, traitement des échantillons à l'arrivée au laboratoire, impact de la conservation à la température de la pièce, impact du *pooling*, analyse de la qualité du prélèvement sur la base de la détection des gènes *B-actine* ou *RNAseP* qui font partie du protocole LSPQ dans certains laboratoires comme contrôle interne).

Ces objectifs secondaires pourraient être adressés par seulement certains sites participants, selon leur population, le budget disponible et les ressources humaines en place (en tenant

compte de la volumétrie au moment du projet). L'**annexe 2** présente certains détails de ces projets.

3. Méthodes :

3.1 Population :

La population de l'étude multicentrique sur le prélèvement salivaire réalisée au printemps 2020 (**annexe 1**) consistait en des personnes connues infectées (chez qui on avait préalablement détecté la présence du virus). On leur demandait alors s'ils acceptaient, à titre volontaire, de se faire à nouveau prélever par EONP en plus de fournir un échantillon salivaire. Cette stratégie de recrutement était très lourde pour les médecins microbiologistes-infectiologues (ou leurs collègues) et impliquait un déplacement (pour les personnes en communauté) et des désagréments pour le participant, avec un taux de refus élevé. De plus, malgré cette présélection, plusieurs paires d'échantillons furent négatifs (donc exclus du projet) ou très faiblement positifs (la sensibilité du TAAN SRAS-CoV-2 a donc possiblement été sous-estimée).

Nous proposons donc un recrutement prospectif avec prélèvements simultanés dans différentes situations, incluant des travailleurs de la santé et des personnes de la population générale se présentant de façon ambulatoire pour un *dépistage*.

Afin d'augmenter la probabilité que le résultat soit positif :

- Le projet sera majoritairement offert aux adultes et aux enfants qui se présentent dans un CDD/CDÉ/CDPS et dont le code de priorité du MSSS (**annexe 3**) est :
 - M3 (travailleur de santé symptomatique);
 - M5 (travailleur de la santé dépisté dans un contexte d'éclosion);
 - M7 (personne de la population générale symptomatique);
 - M13 (autres types de contact avec la COVID-19).
- De façon ponctuelle, selon le fonctionnement local, certaines personnes connues infectées depuis < 5 jours pourraient être invitées à soumettre de nouveaux prélèvements de façon volontaire. Cette façon de recruter pourrait être particulièrement efficace pour répondre à certains objectifs secondaires. À titre d'exemple, puisqu'à la CSL le dépistage par la salive est déjà offert pour les employés, ceux qui seront dépistés avec un résultat positif pourraient être invités à fournir un échantillon de gargarisme et à se faire prélever au même moment par EONP.

De plus, chacune des institutions participantes pourra identifier une population à moindre risque d'infection, mais qui *se soumet* ou *pourrait se soumettre* à des dépistages répétitifs. À titre d'exemples :

- Employés et proches aidants des patients de l'unité de greffe de cellules souches de l'HMR, n~100
- Employés de CHSLD

3.2 Définitions, analyses prévues, issue principale et taille d'échantillon :

3.2.1 Définitions et analyses prévues:

Proportion d'échantillons invalides :

Nombre d'échantillons pour lesquels le résultat était invalide (en fonction du contrôle interne utilisé) lors de la première analyse et à la reprise sur l'ensemble des échantillons du même type (gargarisme ou EONP) analysés.

Performance clinique :

		Méthode de référence	
		Positif	Négatif
Échantillon à l'étude	Positif	Vrai positif (<i>a</i>)	Faux positif (<i>b</i>)
	Négatif	Faux négatif (<i>c</i>)	Vrai négatif (<i>d</i>)

Sensibilité (%) = $a/(a+c)$

Spécificité (%) = $d/(b+d)$

Valeur prédictive positive (%) = $a/(a+b)$

Valeur prédictive négative (%) = $b/(c+d)$

Ces résultats de performance seront présentés avec l'intervalle de confiance (IC) 95% calculé à l'aide de Stata/IC 16.1. Le coefficient kappa avec son IC95% sera aussi calculé.

Puisque chaque participant fournira au moins deux échantillons au même moment (gargarisme et EONP), et que ces échantillons seront testés par au moins une méthodologie TAAN, les analyses de performance de base seront faites sur les paires d'échantillons analysées par la même méthodologie. La méthode de référence présumera alors une spécificité de 100% (aucun faux positif) : un vrai positif sera défini par une paire d'échantillons dont l'EONP ou le gargarisme est positif. La performance de l'EONP sera comparée à celle du gargarisme.

Selon les ressources financières disponibles pour le projet et les ressources humaines disponibles à chaque site participant (site de prélèvement et ressources techniques au laboratoire), une deuxième méthodologie TAAN sera utilisée sur la même paire d'échantillons. Les analyses de performance décrites ici-haut seront faites pour cette méthodologie. Une comparaison entre méthodologies TAAN par type d'échantillons sera alors possible (par exemple, à partir du gargarisme, résultat obtenu avec le protocole LSPQ précédé de lyse thermique, vs. celui obtenu avec la trousse Cobas 8800 de Roche). De plus, une nouvelle méthode de référence élargie sera utilisée en combinant les résultats de façon à « résoudre » les résultats discordants entre le gargarisme et l'EONP.

Idéalement, tous les échantillons seront testés aussi par la même méthodologie TAAN au LSPQ. Le protocole utilisé, bien que moins sensible que plusieurs TAAN commerciaux, permettra de normaliser les analyses et de regrouper l'ensemble des échantillons afin de comparer avec une meilleure puissance/précision le gargarisme et l'EONP.

Par ailleurs, si des projets secondaires impliquant d'autres types de prélèvements sont possibles, les analyses de performance décrites précédemment seront appliquées à ces échantillons.

Finalement, des sous-analyses seront faites en fonction de catégories basées sur les valeurs de C_t obtenues. Les définitions de fort et faible positif seront diffusées par le LSPQ à l'ensemble du réseau dans la semaine du 26 octobre.

Performance analytique :

Delta C_t (pour les échantillons positifs):

- Différence de C_t entre le TAAN sur le gargarisme et le TAAN sur l'EONP par une même méthodologie (sera calculé pour chaque paire d'échantillon et une moyenne avec écart-type sera présentée)
- Différence de C_t entre deux méthodologies TAAN sur le même échantillon (sera calculé pour chaque paire d'échantillon et une moyenne avec écart-type sera présentée)

3.2.2 Issue principale :

Afin de considérer les prélèvements alternatifs acceptables, une sensibilité (comparativement à la méthode de référence) > 85% ou au maximum 10% inférieure à celle de l'EONP devrait être obtenue. Une performance supérieure est certes souhaitable : la décision d'implanter ou d'élargir l'implantation des prélèvements alternatifs dépendra de divers facteurs incluant la sensibilité de l'analyse, le risque de contagiosité estimé, les ressources humaines et matérielles supplémentaires requises (ou inversement, les ressources épargnées), la pression sociale et la volonté politique.

Une stratification selon les résultats de C_t sera faite, puisqu'une sensibilité moindre pour des échantillons faiblement positifs pourrait être tolérée, en supposant que ces personnes sont moins contagieuses.

3.2.3 Taille d'échantillon :

Avec 300 échantillons *vrais positifs*, la précision (intervalle de confiance à 95%) de l'estimation d'une sensibilité de 85% serait de 80,4-88,8 (ou 90%; 86,0-93,2).

Prémisse : Les personnes sélectionnées selon les codes de priorité M de dépistage de la COVID-19 (déterminés par le MSSS), M3/M7 (symptômes compatibles avec la COVID-19), M5 (travailleurs de la santé dans un contexte d'éclosion) et M13 (contacts étroits et prolongés des cas de COVID-19) ont une probabilité plus élevée d'être infectées.

3.3 Charge de travail et échéancier :

Afin d'estimer la durée du projet, il faudra tenir compte de la capacité des :

- CDD/CDÉ/CDPS à procéder au recrutement sans nuire à la fluidité du service à la population;
- Laboratoires à effectuer les analyses sans nuire au temps-réponse de l'ensemble des échantillons.

Pour un site comme celui du CDD Chauveau affilié au laboratoire de l'HMR, en tenant pour acquis qu'un employé ou assistant de recherche pourra être dédié au projet, selon les critères d'inclusion, il serait possible d'obtenir 30 paires (ainsi qu'un prélèvement supplémentaire selon la particularité du site participant) d'échantillons par jour. Ainsi, en recrutant du lundi au jeudi, environ 480 personnes pourraient y être recrutées sur une période d'un mois, auxquels s'ajouteraient les 150 personnes de l'unité de greffe de cellules souches

3.4 Prélèvements et transport :

- EONP (écouvillon duveteux à placer dans le milieu de transport d'eau moléculaire);
- Entre 7 et 10 mL de gargarisme à l'eau de source (c.-à-d. 5 mL d'eau de source mélangée à 2-5 mL de salive);
- Si un site met en place un projet secondaire, des prélèvements supplémentaires pourraient être sollicités (par ex. salive, auto-prélèvement nasal, écouvillonnage de la muqueuse jugale).

Les détails sur la façon de procéder aux différents prélèvements sont présentés dans le document « **procédures de prélèvements** ».

Les échantillons seront conservés à la température de la pièce ou à 4°C et transportés en < 12 heures au laboratoire. Dans la mesure du possible, un des laboratoires participants inclura une vérification de la stabilité (différents délais et différentes températures) dans le cadre de ce projet (voir **annexe 2**).

3.5 Analyses de laboratoire :

3.5.1 Traitement des échantillons:

- EONP et gargarisme : les prélèvements seront traités selon les procédures en vigueur au laboratoire. Pour le Cobas 6800/8800, deux méthodes seront comparées entre elles :
 - 1 mL de gargarisme ajouté au milieu PCR media¹;
 - 400 µl de gargarisme mélangé avec 200 µl le tampon de lyse
- Salive : à l'arrivée au laboratoire, le volume recueilli sera noté. L'échantillon sera vortexé puis décanté pendant au moins 15 minutes. Le surnageant sera aliquoté et dilué avec l'eau moléculaire, à moins que les recommandations officielles d'un fabricant recommande l'utilisation de la salive pure. Les modalités précises de dilution pourraient varier d'un laboratoire à l'autre selon les plateformes ou protocoles utilisés. Bien qu'une harmonisation soit souhaitable, ce projet vise entre autres à préciser les procédures optimales au laboratoire; celles-ci seront donc bien documentées.

Des aliquotes seront préparées d'emblée pour envoi dans un autre laboratoire participant :

- Si < 2 mL de salive, une seule aliquote sera préparée avec 1 mL de salive;

¹ Pour les analyses effectuées sur les appareils Cobas 6800/8800, il pourrait être envisagé de transvider la salive (ou une portion du gargarisme) directement dans le tube Cobas PCR media au site de prélèvement.

- Si ≥ 2 mL de salive, au moins deux aliquotes seront préparées; une servira aux analyses locales, et les autres seront congelées pour servir à des analyses ultérieures de comparaison entre différentes plateformes ou pour du génotypage si le résultat est positif.

Pour le Cobas 6800/8800, à l'arrivée au laboratoire, le volume de salive recueilli sera noté, et l'échantillon sera vortexé. Deux méthodes seront comparées entre elles :

- 1 mL de salive ajouté au milieu PCR media¹;
- 400 μ l de salive mélangée avec 200 μ l le tampon de lyse
- Les autres types d'écouvillonnage seront traités de la même façon que les EONP.

3.5.2 Méthodologie des TAAN :

Les échantillons seront analysés en parallèle (EONP et salive/gargarisme/autre type d'écouvillonnage) par TAAN selon les plateformes technologiques en place dans les laboratoires participants. Dans certains cas, les échantillons seront acheminés à un autre laboratoire pour y être analysés (**Tableau 1**).

Note : Dans le contexte actuel de volumétrie changeante, de pénurie de personnel et de possibles ruptures de marchandises en réactifs de laboratoire, il est difficile d'estimer avec exactitude le nombre de participants qui seront recrutés à chaque site et les analyses qui seront effectuées dans les laboratoires participants. Il s'agit ici d'une ébauche qui sera complétée dans les prochaines semaines et ajustée en cours de route.

Tableau 1. Cibles de recrutement et TAAN à effectuer à partir des échantillons prélevés

Site	Population à recruter				TAAN prévus et laboratoire où les échantillons seront analysés				Projet secondaire prévu
	M3/M7	M5/M13	Connu positif	Faible risque	Protocole LSPQ	Cobas	Seegene	Autre	
HMR/CHUM	400	400	20	100	HMR : sans extraction	8800 : CHUM	HDL		Salive
Grappe LLL	600					6800 : St-Eustache	CSL	Lanaudière : BDMax Simplexa	Salive
HSJ	160		0	0	Avec extraction (Flow)	8800 : CHUM?	HDL?		Écouvillon muqueuse jugale/gencives Narine antérieure
CHU-Q	800				Sans extraction et avec extraction (Flow)	8800?		8800? Simplexa	
Total	~1500	~1000	~50	~450					

Note : Les nombres sont approximatifs et le total ne correspond pas exactement à la somme des nombres inscrits. Le recrutement par site sera ajusté au fur et à mesure.

M3 : Personnel de santé symptomatique; M5 : Personnel de santé dans un contexte d'éclosion; M7 : Personnes symptomatiques; M13 : Personnes ayant eu un contact avec la COVID-19

Connus positifs : Personnes chez qui un résultat positif a été obtenu il y a < 5 jours; Faible risque : Employés susceptibles de devoir se soumettre à des dépistages répétitifs

Tous les échantillons seront analysés par au moins deux plateformes. Les paires d'échantillons trouvés positifs par l'EONP ou gargarisme seront analysés par au moins une troisième plateforme.

Enregistrement des échantillons au laboratoire et résultats à rapporter

Tous les échantillons prélevés seront enregistrés au laboratoire et les résultats seront rapportés individuellement. Ainsi, le requérant recevra deux (gargarisme et EONP) ou trois (si un écouvillonnage supplémentaire est effectué) résultats pour une même personne. Si les analyses sont effectuées par plus d'une méthodologie, l'équipe du laboratoire décidera localement si celles-ci seront effectuées en parallèle (en temps réel) ou de façon séquentielle (avec possibilité de congélation et analyses plus tard). Lorsque les analyses seront effectuées en parallèle par plus d'une méthodologie, l'équipe établira laquelle sera utilisée pour rapporter le résultat.

Puisqu'en général le requérant sera partie prenante de ce projet (par exemple, la Clinique Chauveau sera partenaire avec l'équipe du laboratoire), cela ne devrait pas générer de confusion. En cas de résultat discordant entre les deux prélèvements, la consigne sera de considérer la personne infectée lorsqu'au moins un résultat positif est émis. Cependant, les microbiologistes-infectiologues impliqués dans ce projet seront disponibles pour discuter de situations particulières.

La Direction de santé publique régionale (DSPR) pourra aussi recevoir plus d'un résultat positif, le cas échéant. Ainsi, les partenaires des DSPR seront informés à l'avance au démarrage de ce projet, afin d'éviter de la confusion.

3.6 Variables supplémentaires :

En plus des résultats de laboratoire, les informations suivantes seront colligées (voir le **document « questionnaire »**). Selon les processus en place localement, ce questionnaire pourra être rempli sur place par le participant lui-même, administré par un professionnel de la santé ou un assistant de recherche, ou transmis par courriel lorsque le dépistage est prévu par rendez-vous (notamment pour les CDPS). Il pourrait aussi être envisagé de développer une plateforme *web* afin que le questionnaire soit rempli en ligne.

- Âge
- Code M (ce qui permettra de catégoriser si présence de symptômes ou contact)
- Nombre de jours depuis le contact et durée des symptômes, le cas échéant
- Date du premier résultat positif pour les participants volontaires qui accepteront de se faire prélever à nouveau
- Facilité/difficulté à obtenir le prélèvement de gargarisme (et volume recueilli)

Au laboratoire, les informations suivantes seront colligées :

- Taux de rejet car déversement dans le sachet (ce qui peut être particulièrement problématique dans un contexte d'auto-prélèvement)
- Taux d'invalides/reprise du spécimen
- Temps technique
- Acceptabilité par les technologistes (un questionnaire standardisé sera développé)

3.7 Conservation des échantillons :

Tous les échantillons seront conservés à -80°C. Les échantillons pourront servir à la création de panels de validation pour l'ensemble du réseau québécois. De plus, dans le contexte de la

pandémie, le LSPQ et ses collaborateurs participent à un projet de génotypage. Les échantillons positifs y sont donc acheminés.

4. Éthique :

Ce projet multicentrique sera soumis au Comité d'éthique de la recherche de l'HMR.

Le consentement éclairé à participer au projet sera verbal et implicite. En effet, puisqu'il s'agit de soumettre un échantillon supplémentaire, seules les personnes consentantes participeront. Le formulaire d'information et de consentement permet de comprendre le processus.

5. Budget :

Afin de réaliser ce projet, en plus des coûts reliés au prélèvement par EONP et du TAAN SRAS-CoV-2 de cet échantillon qui sera assumé par l'établissement, il faudra tenir compte des frais suivants :

1. Coordonnateur(s) de projet sur chacun des sites : proposer, expliquer et obtenir le consentement à participer au projet; administrer le questionnaire; assurer le suivi (*tracking*) des prélèvements; colliger les résultats;
2. Personnel de laboratoire (temps technique): réception d'échantillons supplémentaires qui devront être traités différemment; TAAN supplémentaires; envoi des échantillons dans un autre laboratoire (le cas échéant); tri et conservation des échantillons une fois les analyses complétées.
3. Matériel de prélèvement et réactifs supplémentaires;
4. Matériel explicatif/promotionnel (dépliant à distribuer aux personnes qui se présentent pour un dépistage).



Références

1. Kimberly E. Hanson, Angela M. Caliendo, Cesar A. Arias *et al.* 2020 Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-diagnostics/>
2. Khurshid Z. *et al.* Saliva as a non-invasive sample for the detection of SARS-CoV-2: a systematic review. <https://doi.org/10.1101/2020.05.09.20096354>
3. Mona Gross 2020 DiaSorin Molecular's Simplexa™ COVID-19 Direct Molecular Test CE Marked for Saliva Specimens : <https://molecular.diasorin.com/us/wp-content/uploads/2020/09/2020.09.09-DiaSorin-Molecular-COVID-19-CE-Saliva-Press-Release-approved.pdf>
4. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, *et al.* 2020 Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 383:1283-1286
5. Alainna JJ *et al.* Sensitivity of nasopharyngeal swab and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20081026>
6. Malecki M, *et al.* (2020). Pharynx gargle samples are suitable for SARS-CoV-2 diagnostic use and save personal protective equipment and swabs. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, <https://doi.org/10.1017/ice.2020.229>
7. BCCDC 2020 B.C. launches new mouth rinse and gargle sample collection for school-aged children : <http://www.bccdc.ca/about/news-stories/stories/2020/b-c-launches-new-mouth-rinse-and-gargle-sample-collection-for-school-aged-children>
8. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.09.13.20188334v1.full.pdf>
9. <https://www.thechronicleherald.ca/news/local/nova-scotia-expands-covid-19-testing-capacity-starts-pilot-program-for-gargle-tests-506266/>

Annexe 1 – Résumé de quelques études portant sur le prélèvement salivaire

Projet multicentrique piloté par le LSPQ

Le Laboratoire de santé publique (LSPQ) a piloté un projet multicentrique (laboratoires de sept institutions du réseau public) afin d'explorer la sensibilité du TAAN SRAS-CoV-2 en utilisant le protocole LSPQ et diverses trousse commerciales à partir d'un prélèvement salivaire. Les 124 participants étaient tous préalablement connus infectés sur la base d'un résultat antérieur positif à partir de l'EONP. Les échantillons de salive ont été testés à l'état pur ou dilués 1 :1 avec eau moléculaire. Bien que les résultats de ce projet suggèrent que la salive soit associée à une sensibilité moindre que le prélèvement EONP, les différences ne sont pas statistiquement significatives (tableau 1). Ce projet a aussi mis en évidence une variabilité de performance entre les diverses méthodologies utilisées au Québec.

Tableau 1. Sensibilité du TAAN SRAS-CoV-2 en fonction du type de prélèvement, de la méthode de référence, une seule analyse par participant (n=122)

Méthode de référence (définition de vrai positif)	EONP positif	EONP <u>ou</u> salive positif	
Échantillon à l'étude	Salive	Salive	EONP
Sensibilité (% , IC95%)	79,8 (71,1-86,4)	82,0 (74,0-87,9)	89,3 (82,4-93,7)

IC95% : Intervalle de confiance 95%

Projet de la Cité de la Santé de Laval (CSL)

Un autre projet de validation de la salive (comparativement à l'EONP) a eu lieu à la CSL. Les participants ont été recrutés à des centres de dépistage (CDD) ou à l'urgence (n=222) et aux étages de la CSL (n=19; 22 paires). De plus, 14 échantillons de salive (sans EONP au même moment, mais prélevés à < 48h d'un échantillon positif de l'EONP) ont été inclus. Parmi les participants recrutés, on retrouvait six enfants symptomatiques et cinq enfants asymptomatiques. Au total, 68 paires d'échantillons avec au moins un résultat positif ont été obtenues.

Conformément aux procédures déjà en place, les spécimens ont été dilués avec une solution d'eau moléculaire contenant de la protéinase K (PK) à une concentration finale de 50-200 ug/ml (EONP 1 :1 et salive 1 : 4). Les TAAN SRAS-CoV-2 ont été effectués directement avec la trousse Allplex 2019-nCoV de Seegene. Les échantillons avec résultat invalide ont été repris après extraction chimique sur l'appareil Starlet de Seegene.

Tableau 2. Distribution des résultats de TAAN SRAS-CoV-2 (trousse Allplex 2019-nCoV de Seegene, sans extraction chimique préalable)

		EONP		Total
		Positif	Négatif	
Salive	Positif	52	7	59
	Négatif	6	193	199
	Total	58	200	258

Tableau 3. Sensibilité du TAAN SRAS-CoV-2 (trousse Allplex 2019-nCoV de Seegene, sans extraction chimique préalable) à partir de la salive et de l'EONP et estimation de la valeur prédictive négative (VPN), (% , IC95%)

Sensibilité	VPN si la prévalence est de	
	1%	40%

Salive	90,8 (81,0- 96,5)	99,9 (99,8-100)	94,2 (88,4- 97,2)
EONP	89,2 (79,1- 95,6)	99,9 (99,8-100)	93,3 (87,4- 96,6)

IC95% : Intervalle de confiance 95% *Il est à noter qu'un échantillon d'une participante chez qui un résultat faiblement positif a été obtenu uniquement à partir du culot salivaire extrait en triplicata a été considéré comme un faux négatif pour les deux types d'échantillons.

Étude de Yale

Selon une étude publiée récemment⁵, comportant deux volets, 1) la salive était positive dans 81% des cas et les SNP dans 71% des cas; 2) la salive semblait plus sensible que le prélèvement de SNP autoprélévées. La validité externe de cette étude est toutefois limitée par différents éléments :

- Le nombre d'échantillons est faible
 - Premier volet (patients hospitalisés): n=70
 - Deuxième volet (travailleurs de santé asymptomatiques) : 13/495 avaient un échantillon salivaire positif; neuf d'entre eux avaient procédé à un autoprélèvement de SNP en parallèle et 7/9 étaient négatifs;
- Le prélèvement de SNP n'est pas accompagné par l'écouvillonnage de gorge, ce qui est la méthode préconisée au Québec depuis le début de la pandémie;
- Le protocole inclut un traitement des échantillons avec la protéinase K, ce qui alourdit le travail de laboratoire;
- La population étudiée dans le premier volet est limitée à des patients hospitalisés chez qui le diagnostic d'infection par le SRAS-CoV-2 avait été posé 1-5 jours au préalable, et il est difficile de tirer des conclusions sur les résultats du deuxième volet, qui représente la population ciblée dans notre contexte québécois. Il est toutefois intéressant de constater que pour ces travailleurs de la santé, on a observé une plus grande variabilité dans la qualité du prélèvement (sur la base de la détection de RNase P) à partir de l'autoprélèvement de SNP que de la salive.

Annexe 2 – Projets secondaires

1. D'autres prélèvements non invasifs seront également soumis à des études de performance, faisabilité et acceptabilité (en comparaison avec la salive/gargarisme et l'EONP), afin de mieux cibler leur utilisation :
 - Au CHU Ste-Justine : écouvillonnage de muqueuse jugale/gencives et prélèvement de narines antérieures
 - À l'HMR (si possible, en fonction des ressources): autoprélèvement de narines antérieures
2. Pour le gargarisme, la solution à utiliser (eau de source [et quelle marque, i.e. Eska, Naya, Aquafina, etc.], eau stérile utilisée en milieu hospitalier) et le mode d'administration idéal (incluant celui que nous utiliserons dans le cadre du projet) ne sont pas encore bien établis. Il est même probable que différents modes d'administration (seringue préremplie, dispensateur calibré, Falcon 50 mL prérempli, mesure de la quantité requise par la personne elle-même en utilisant une bouteille d'eau de source) soient éventuellement adaptés à différentes situations : prélèvement à domicile vs prélèvement dans une clinique ou en milieu hospitalier. Des petits projets pilote sont en cours au moment de la rédaction du protocole.
3. Les conditions de conservation et de transport des échantillons (température et délais acceptables) sont des éléments essentiels à la qualité des analyses. Dans le cadre du projet, nous avons établi, afin de faciliter les procédures aux différents sites, que les échantillons seraient conservés à la température de la pièce ou à 4°C et transportés en < 12 heures au laboratoire. En pratique, les délais seront certainement plus courts. Il sera essentiel de documenter ces détails à chacun des sites. De plus, un des laboratoires participants inclura une vérification de la stabilité (différents délais et différentes températures) dans le cadre de ce projet.
4. Au laboratoire, certaines procédures d'optimisation pourraient améliorer la sensibilité (dilution, vortex, centrifugation, traitement à la protéinase K, protocole de lyse du Cobas vs PCR media) mais au coût de délais et temps technique supplémentaire. Il sera donc utile, dans le cadre de ce projet, de documenter et de partager ces différents aspects. D'autres interventions pourraient accélérer le temps réponse. À titre d'exemple, le *pooling* est utilisé dans certains laboratoires pour les analyses à partir de l'EONP. Il sera important d'en documenter l'impact sur d'autres types de prélèvements. De plus,
5. Parce qu'une recherche concomitante du virus Influenza pourrait être indiquée chez les personnes symptomatiques avec facteurs de risque de complications de l'Influenza, certaines analyses de laboratoire pour la recherche de COVID-19 seront multiplexées. Cela représentera un enjeu pour les échantillons et milieux de transport privilégiés. Dans le cadre de ce projet, s'il s'étale jusqu'à la saison grippale, il pourrait être possible de procéder à des validations. Un amendement au formulaire d'information et de consentement serait alors soumis au Comité d'éthique de la recherche.

Les détails de ces différents projets seront inscrits au protocole au fur et à mesure de leur élaboration.

Annexe 3 - Considérations pour le calcul de taille d'échantillons

Compte tenu de l'épidémiologie actuelle, afin d'obtenir au moins 200 échantillons *vrais positifs* (avec « l'espoir » de recruter au moins 300 personnes infectées), il faudrait recruter :

SANS CRITÈRES D'INCLUSION : **~7 000 participants volontaires**

- Ce nombre est basé sur le taux de positivité des prélèvements effectués à la Clinique Chauveau (CDD du CEMTL) et analysés à l'HMR : du 1^{er} au 26 septembre, 908 des 29 706 prélèvements par EONP ont été positifs (3,0%).

AVEC CRITÈRES D'INCLUSION : **~3 000 participants volontaires**

Les critères d'inclusion sont limités aux personnes :

- qui ont eu un contact domiciliaire (transmission~10-20%) ou un autre contact à risque considéré modéré ou élevé (transmission~6%), et chez qui la probabilité de résultat positif entre le 1er et le 26 septembre [code M13] = 233/2198; 9,2%
- symptomatiques (probabilité de résultat positif entre le 1er et le 26 septembre chez les travailleurs de la santé symptomatiques du CEMTL [code M3] = 32/868; 3,7%; dans la population générale [code M7] = 432/12832; 3,4%).

En date du 25 septembre, les analyses associées aux codes M7 et M13 ont représenté 11 947 des 25 780 (46%) analyses réalisées au Québec (communication personnelle, Isabelle Goupil-Sormany).

Le nombre de participants à recruter dans chacune des catégories devrait être de :

- **~1000** participants; personnes qui ont eu un contact (objectif de 100 *vrais positifs*)
- **~1500** participants; personnes symptomatiques (objectif de 50 *vrais positifs*)
- **~50** participants; personnes connues infectées depuis < 5 jours

De plus, nous souhaitons inclure **~450** participants à faible risque, mais faisant partie d'une population chez qui le dépistage pourrait être répétitif, notamment les professionnels de la santé.