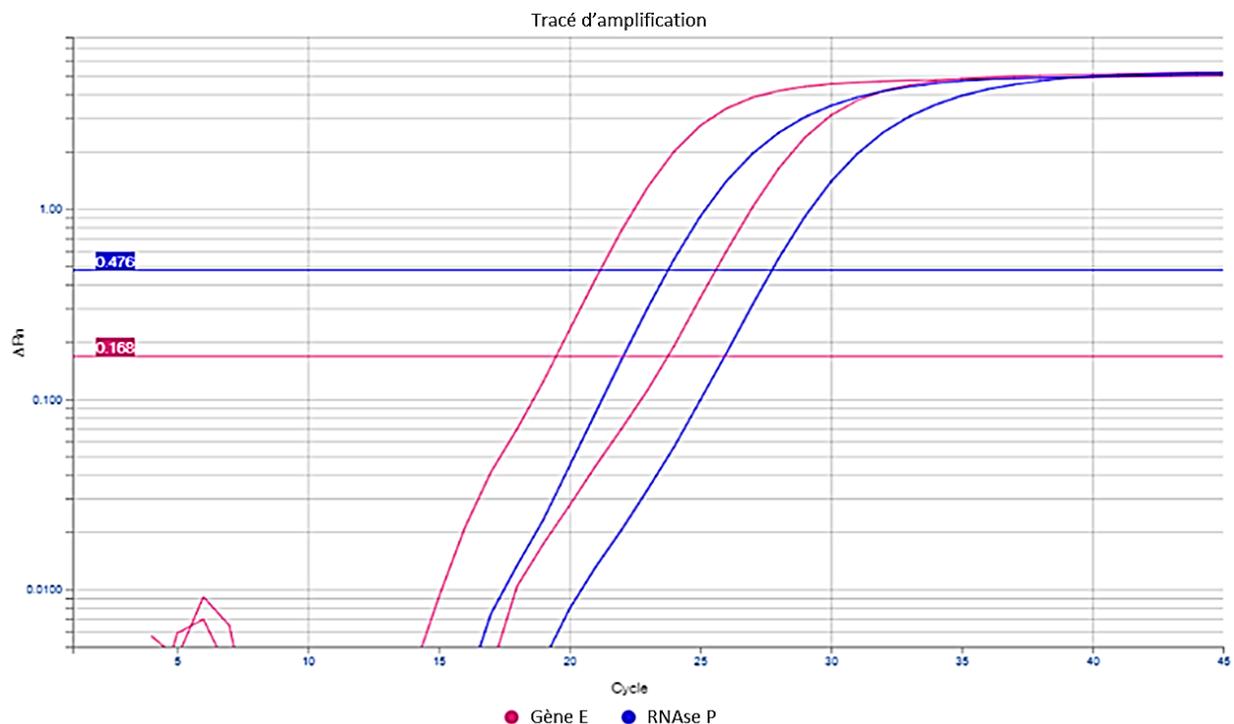


Pleins feux sur

Un aperçu des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel



Septembre 17, 2020

Introduction

Ce document offre un aperçu des valeurs Ct et, plus particulièrement, de leur mode d'établissement, de leur rapport avec la charge virale et de leur contribution possible à l'interprétation des résultats positifs au test de dépistage par rRT-PCR chez les patients à faible probabilité pré-test. De plus, on y examine les facteurs clés de détermination du rendement des tests et y formule des conseils sur l'investigation des résultats faux positifs possibles. Le document présente aussi des données qui ont été produites aux laboratoires de Santé publique Ontario (SPO) et démontrent l'effet de la probabilité pré-test sur la valeur prédictive positive (VPP) d'un test en laboratoire de dépistage du SARS-CoV-2 par rRT-PCR dans le contexte ontarien.

Contexte

Le premier cas de COVID-19 a été signalé à Wuhan, en Chine, en décembre 2019. L'infection s'est ensuite propagée au reste du monde et a été qualifiée de pandémie au début mars 2020. La situation a entraîné la mise au point et en application rapide et généralisée d'une multitude de tests et de plateformes de détection du SARS-CoV-2, le virus responsable de cette nouvelle maladie. Le dépistage s'est avéré une composante critique de la riposte à la pandémie, en ce sens que la détection rapide de l'infection et l'adoption de mesures cliniques et sanitaires correspondantes constituent des aspects essentiels de la prise en charge des patients et de la gestion de l'épidémie. Les avancées effectuées sur le plan du dépistage et des technologies ont fait évoluer notre compréhension à la fois de la maladie et de son épidémiologie. Par exemple, les tests en laboratoire ont montré qu'il est possible d'obtenir un résultat positif (c.-à-d. détection du SARS-CoV-2) sans manifester de symptômes, que ce soit parce que la personne est asymptomatique (c.-à-d. qu'elle ne manifestera jamais de symptômes) ou pré-symptomatique (c.-à-d. qu'elle manifestera plus tard des symptômes), ou qu'il s'agit d'un résultat faussement positif.

Le risque d'obtention d'un résultat faussement positif augmente à mesure que décroît la probabilité pré-test de COVID-19, comme dans les cas de faible prévalence. De plus, les résultats positifs au test de transcriptase inverse-amplification en chaîne de la polymérase en temps réel (rRT-PCR) sont plus susceptibles de constituer de faux positifs s'ils sont proches de la limite de détection (LD) de l'essai. Cela s'explique par le fait que lorsque des prélèvements sont contaminés par de très faibles quantités de cible durant le processus d'essai en laboratoire, on obtient un résultat positif à valeur Ct élevée s'approchant de la LD de l'essai. Des signaux non spécifiques peuvent également survenir durant les derniers cycles d'amplification et être mépris pour des produits d'amplification en raison de la présence de cible dans le prélèvement, ce qui peut aussi donner des résultats faussement positifs associés à des valeurs Ct élevées.

Par conséquent, lorsqu'un patient asymptomatique à faible probabilité pré-test (c.-à-d. aucune exposition à risque élevé connue) obtient un résultat positif, les lignes directrices actuelles de l'Ontario recommandent de communiquer avec le laboratoire chargé du test pour discuter du résultat et passer en revue la valeur Ct.¹ La clarification des résultats selon le contexte épidémiologique pourrait permettre de distinguer les vrais positifs des faux positifs, et ainsi déterminer les mesures de suivi appropriées à prendre (p. ex. gestion de cas, recherche de contacts et (ou) déclaration d'éclosions). Des campagnes de dépistage d'envergure menées malgré l'absence de cas/d'éclosions, comme l'administration périodique de tests de dépistage aux résidents, employés et visiteurs asymptomatiques des établissements de soins de longue durée à des fins de surveillance, ont mené à la détection de cas chez des personnes asymptomatiques à faible probabilité pré-test.

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

Le fait de comprendre et d'interpréter les valeurs Ct dans le contexte d'essais de laboratoire revêt une importance particulière pour les professionnels de la santé publique, qui utilisent les résultats des tests pour déterminer dans quelle mesure les personnes satisfont (ou ne satisfont pas) aux critères de la définition de cas provinciale et prendre les décisions qui s'imposent en matière de gestion de la santé publique, y compris en ce qui a trait à la recherche de contacts et (ou) à la déclaration d'éclosions.¹ Il peut aussi arriver que des patients ayant obtenu un résultat positif au SARS-CoV-2 se demandent où ils auraient bien pu y avoir été exposés ou aient ultérieurement un faux sentiment de sécurité, deux scénarios cliniques importants.

Méthodologie

Le Groupe de travail technique sur le dépistage de la COVID-19 en Ontario est formé de représentants du secteur de la microbiologie d'un grand nombre de laboratoires de dépistage du SARS-CoV-2 de tout l'Ontario. Les membres du groupe discutent de questions prioritaires et mettent en commun leur expérience en matière de dépistage du SARS-CoV-2.

Le besoin de fournir de l'information additionnelle aux parties prenantes pour aider les fournisseurs de soins de santé à comprendre certains aspects clés de l'interprétation des tests de rRT-PCR, et plus particulièrement l'application des valeurs de cycle seuil (Ct) à l'interprétation des résultats, s'est vite fait ressentir. Le Groupe de travail a reconnu la nécessité de publier des lignes directrices sur certaines questions prioritaires connexes, et s'est entendu sur les questions à aborder. Les laboratoires de SPO ont également fourni des données de laboratoire tirées d'une étude menée afin de mieux comprendre l'effet qu'a la probabilité pré-test d'infection à la COVID-19 sur la VPP des résultats de tests de rRT-PCR.

La première ébauche de ce document a été préparée par les laboratoires de SPO et distribuée aux autres membres du Groupe de travail, ainsi qu'à d'autres parties prenantes de SPO, pour obtenir leurs commentaires avant de mettre la touche finale au document et de le rendre public.

Questions et informations importantes à prendre en compte

1. Qu'entend-on par valeur de cycle seuil (Ct)?

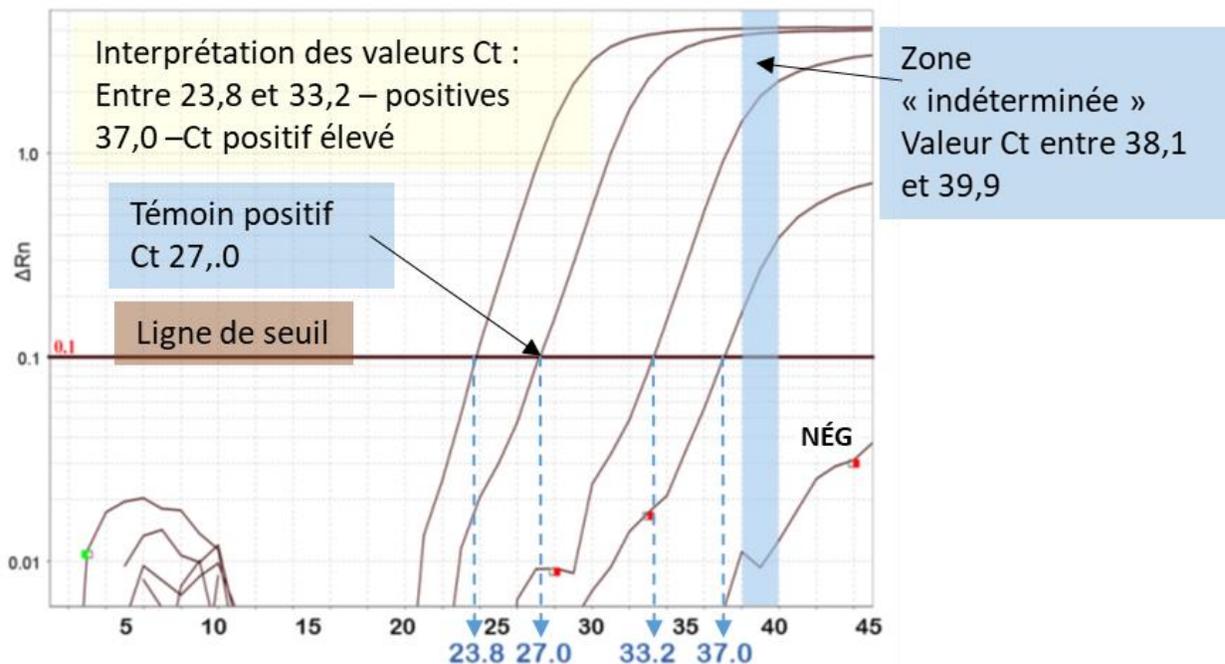
On qualifie de valeur Ct le nombre de cycles d'amplification (obtenu au moyen de la rRT-PCR) requis pour que la fluorescence émise par un produit de PCR (c.-à-d. cible/amplicon) atteigne le point où elle sera supérieure au bruit de fond (signal de faible intensité présent dans l'essai, que la cible soit présente ou non). Au moment d'effectuer la rRT-PCR, un nombre prédéterminé de cycles d'amplification de l'acide nucléique cible (p. ex. SARS-CoV-2) se produit. Si la cible est présente dans le prélèvement, chaque cycle d'amplification en doublera la quantité. Par conséquent, l'amplification est exponentielle et produit une courbe exponentielle d'amplification (Figure 1). Une sonde à acide nucléique fluorescente permet la visualisation de cette amplification exponentielle. Les sondes sont des oligonucléotides d'ADN fluorescents qui se lient à la cible. À mesure que se poursuit l'amplification, la sonde fluorescente se lie à une part plus grande de la cible, ce qui augmente le signal d'émission de fluorescence. En règle générale, la quantité de signal d'émission observée augmente à mesure que se poursuit l'amplification et est proportionnelle à la quantité de cible présente dans le prélèvement.

L'amplification est jugée significative et équivaut à la « détection » de la cible lorsque le seuil de fluorescence est atteint (voir la ligne horizontale brune de la Figure 1). Le seuil de fluorescence est habituellement établi au point médian de la phase exponentielle d'amplification du prélèvement témoin positif de l'expérience PCR.

Le prélèvement témoin positif est typiquement constitué d'un prélèvement clinique précédemment déclaré positif, d'une culture virale inactivée ou d'un acide nucléique viral. Si le matériel témoin positif est limité, on utilise comme matériel de rechange une séquence d'ARN synthétique identique à la région cible du virus.

Une ligne verticale (voir les lignes pointillées bleues de la Figure 1) est tracée de façon orthogonale entre le point où la courbe d'amplification traverse le seuil et celui où elle rencontre l'axe X du graphique, ce qui correspond à la valeur Ct. La valeur Ct représente le nombre de cycles de doublage de la cible nécessaires pour détecter la cible.

Figure 1 : Exemple de courbe d'amplification par PCR en temps réel



Remarque : Cette courbe d'amplification est illustrée sur une échelle logarithmique. Les courbes peuvent également être illustrées sur une échelle linéaire. L'aspect visuel du graphique est alors différent, mais l'interprétation du Ct demeure la même. Les essais de PCR en temps réel mis en marché ne permettent pas toujours à l'utilisateur de visualiser les valeurs Ct ou courbes d'amplification. De plus, certains essais moléculaires sont basés sur d'autres technologies (p. ex. cytométrie de flux) qui n'utilisent pas de valeurs Ct.

2. Comment interprète-t-on les valeurs Ct limites des résultats

« détecté », « non détecté » ou « indéterminé » ?

Aux étapes de mise au point et de validation des essais, on détermine la limite de détection (LD) au moyen d'une quantité connue de cible qui est diluée en série, par dilutions logarithmiques (c.-à-d. 10

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

fois), puis soumise à un essai de PCR. La valeur Ct de positivité limite (valeur Ct la plus élevée) est souvent semblable à la valeur Ct générée par le nombre de copies le moins élevé pouvant être détecté de façon fiable lors de l'essai (p. ex. $Ct \leq 38$). Cette Valeur Ct limite est fixée par les fabricants de tests commerciaux ou les laboratoires durant l'étape de validation des tests mis au point en laboratoire (TMPL). Dans le cas de certains tests commerciaux, la valeur limite est déterminée de façon individuelle pour chaque expérience PCR, en fonction de la courbe d'amplification et de la valeur Ct du prélèvement témoin positif.

Une valeur limite négative est assignée à la valeur Ct et représente le point limite de détection de la cible selon la LD déterminée (p. ex. $Ct \geq 40$).

Certains essais incluent une zone « indéterminé », dont l'intervalle de valeurs Ct se situe entre les valeurs limites établies pour les résultats « détecté » et « non détecté » (p. ex. Ct entre 38,1 et 39,9 pour le TMPL de SPO). On obtient des résultats « indéterminé » quand les valeurs Ct se situent entre les valeurs limites des résultats « détecté » et « non détecté » plus tard durant le processus d'amplification. Cela peut être attribuable à de faibles quantités de cible virale dans le prélèvement clinique, qui correspondent à la LD de l'essai ou s'y approchent, ou représenter une réactivité non spécifique (faux signal) dans le prélèvement. Lorsque cela est pertinent sur le plan clinique, les prélèvements ayant obtenu un résultat « indéterminé » devraient être soumis à un second essai de PCR en temps réel validé qui cible un gène différent et affiche une sensibilité équivalente ou supérieure à l'épreuve ou méthode employée initialement. Comme solution de rechange, il est possible d'effectuer le séquençage d'un acide nucléique de la cible amplifiée. La Figure 1 inclut une barre bleu pâle qui délimite l'éventail des valeurs Ct utilisées par les laboratoires de SPO (Ct entre 38,1 et 39,9) pour qualifier un résultat d'« indéterminé ». On obtient un résultat « indéterminé » quand la courbe d'amplification traverse le seuil de la zone « indéterminé ».

3. Les valeurs Ct correspondent-elles à la quantité de cible présente dans un prélèvement?

La plupart des tests de rRT-PCR sont qualitatifs (c.-à-d. cible *détectée* ou *non détectée* sans indication du nombre de copies de la cible) et non quantitatifs (indication du nombre de copies de la cible par unité de volume de la matrice de prélèvement ou par réaction). Individuellement, les valeurs Ct fournissent une mesure *relative* de la quantité de virus dans le prélèvement, mais **pas** la quantité réelle de virus présente. La valeur Ct peut potentiellement fournir une mesure du nombre de copies si différents standards de quantités connues sont inclus à la même expérience PCR et testés en parallèle. La (les) valeur(s) Ct associée(s) à une quantité donnée du standard est (sont) ensuite utilisée(s) pour déterminer par extrapolation la quantité de virus dans le prélèvement à partir de la valeur Ct produite lors de l'essai. La quantification et l'emploi de standards rendent les essais de rRT-PCR plus complexes et requièrent l'emploi de matériel de référence approprié. Chaque cycle de PCR double la quantité de cible de la réaction. On peut donc établir par extrapolation que chaque hausse de 3,3 en valeur Ct correspond à environ 1 log (c.-à-d. 10 fois) de moins de cible dans le prélèvement clinique primaire soumis à la réaction de PCR.

Les essais par PCR quantitative sont effectués principalement dans le but d'orienter la prise en charge clinique (p. ex. traitement) ou la gestion de la santé publique (p. ex., recherche de contacts), par exemple pour déterminer quel traitement antiviral administrer aux personnes atteintes de certains virus transmissibles par le sang (p. ex. VIH, cytomégalo virus et hépatites). Les virus transmissibles par le sang se prêtent davantage à la quantification étant donné que le sang est un type de prélèvement plus

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

standardisé. Les tests menés sur des prélèvements respiratoires affichent une plus grande variabilité, qui n'a pas de lien avec la quantité de cible dans le prélèvement, mais peut avoir un effet sur le résultat. Cette variabilité peut être attribuable au type d'écouvillon utilisé pour le prélèvement, au mode de transport, au mode de collecte du prélèvement et à sa qualité, à l'essai par PCR et à la façon d'établir la ligne de seuil de chaque expérience de PCR (prédéterminée, *de novo*, manuellement, électroniquement, etc.). De plus, le degré d'excrétion virale des sécrétions respiratoires peut varier au fil du temps.

Il est possible de comparer les valeurs Ct obtenues de tests de PCR effectués dans un même laboratoire, au moyen du même essai, sur des prélèvements consécutifs obtenus d'un même patient pour obtenir une mesure *relative* de la quantité de virus présente dans les différents prélèvements. Cependant, comme nous l'expliquons précédemment, cela *n'offre pas* d'indication de la quantité réelle de virus dans les prélèvements.

Plusieurs études ont été menées pour tenter d'établir une corrélation entre les valeurs Ct et l'infectiosité du SARS-CoV-2. Par exemple, il est possible de mesurer la viabilité du virus par l'inoculation de lignées cellulaires en culture et l'examen des preuves de reproduction virale. Il s'agit cependant d'un processus laborieux pouvant uniquement être effectué dans un laboratoire de niveau de confinement 3 (NC3). Le processus n'est pas standardisé à l'heure actuelle et ne peut servir à orienter la prise de décisions. Fait significatif, il n'a pas été établi qu'une personne n'est pas infectieuse si ses prélèvements positifs au test par PCR ne peuvent pas être mis en culture. Cela revêt une importance particulière étant donné que certains laboratoires ont eu de la difficulté à mettre en culture le SARS-CoV-2, comparativement à d'autres virus.

Par exemple, une étude menée sur la mise en culture du virus au Laboratoire national de microbiologie (LNM) du Canada a révélé que les prélèvements affichant des valeurs Ct > 24 obtenaient des résultats négatifs à la culture virale.² Cependant, les CDC des États-Unis ont affirmé avoir réussi à mettre le virus en culture en utilisant des prélèvements affichant des valeurs Ct allant jusqu'au début de la trentaine (données non publiées).³ Il importe de noter que ces laboratoires (LNM et CDC) utilisaient des essais de PCR en temps réel différents dans le cadre de leurs évaluations. L'Institute of Quality Management in Healthcare (IQMH), qui administre le programme de gestion de la qualité des services de laboratoire en Ontario, a distribué une épreuve de compétence relative au SARS-CoV-2 à 26 à différents laboratoires de dépistage du SARS-CoV-2 de l'Ontario en avril 2020. Dans le cadre de cette épreuve, le même matériel prélevé a été soumis à jusqu'à huit cycles d'amplification dans les laboratoires participants, et les valeurs Ct obtenues ont été passées en revue. Les conclusions de l'épreuve confirment qu'il n'est pas approprié de comparer les valeurs Ct de différents essais ni d'utiliser les valeurs Ct limites utilisées par un laboratoire pour évaluer la viabilité du virus dans un autre laboratoire. Elles confirment également que les valeurs Ct ne peuvent pas être utilisées de façon fiable pour déterminer la viabilité du virus. Les CDC des États-Unis appliquent ces principes pour affirmer que la corrélation établie entre les valeurs Ct et la capacité de récupérer du virus capable de réplication s'applique uniquement aux prélèvements de voies respiratoires supérieures testés dans leur laboratoire. De plus, le lien entre la capacité de mettre un virus en culture (réplication virale) en laboratoire et son infectiosité chez les humains n'est pas encore connu.

Selon certains experts, les rapports de laboratoire devraient faire systématiquement état des valeurs Ct pour faciliter la prise des décisions cliniques et sanitaires.⁴ Une telle mesure pourrait être applicable dans les milieux restreints où les fournisseurs de soins de santé reçoivent des rapports d'un laboratoire uniquement et pourraient être informés du rendement et des caractéristiques des valeurs Ct d'un test particulier. On pourrait cependant douter de l'utilité de tels rapports dans les milieux desservis par un réseau de laboratoires complexe, comme en Ontario, où les prélèvements peuvent être soumis à

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

différents laboratoires (> 40 laboratoires menant des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par rRT-PCR dans la province au moyen d'une variété de plateformes d'extraction et de PCR). De plus, les résultats de test sont reçus et examinés par une myriade de fournisseurs de soins de santé et de patients dont la compréhension des valeurs Ct varie. Par conséquent, l'ajout des valeurs Ct aux rapports de laboratoire émis en Ontario (et ailleurs au Canada) n'est pas recommandé. Utilisée en vase clos, cette information additionnelle a peu d'utilité lorsqu'il s'agit d'interpréter les résultats d'une rRT-PCR. Dans les cas rares et précis où le fait de connaître les valeurs Ct pourrait orienter la prise en charge clinique et la gestion de la santé publique, les fournisseurs de soins cliniques et professionnels de la santé publique devraient communiquer avec le laboratoire chargé du test pour discuter de l'interprétation des valeurs Ct avec l'équipe de microbiologie, dans le contexte de leur situation épidémiologique et clinique particulière.

4. Les résultats faussement positifs au test de dépistage de la COVID-19 sont-ils courants? Quelle est la cause des faux positifs et comment peut-on en réduire l'incidence?

Selon les données des laboratoires de SPO, la province affiche un taux extrêmement bas de résultats positifs devant être plus tard rectifiés et déclarés négatifs. L'incidence exacte de ces faux positifs dans la province n'est pas connue, étant donné que l'information relative à la rectification de faux positifs n'est pas centralisée. En Ontario, toute incidence importante de faux positifs parmi les résultats d'un laboratoire (telle que déterminée par le laboratoire) est rapportée à la Direction des laboratoires communautaires et de génétique du ministère de la Santé, et à l'IQMH.

En date du 15 août 2020, les laboratoires de SPO avaient détecté environ 30 cas de résultats faux positifs possibles au test de dépistage du SARS-CoV-2 sur approximativement 850 000 prélèvements testés pour la COVID-19. De ces tests effectués, environ 17 500 (2 %) ont donné un résultat positif. On parle ici d'un taux de faux positifs de moins de 0,01 % (spécificité de >99,99 %), ce qui surpasse amplement les cibles de rendement des tests en laboratoire, et ce, même lorsqu'on reconnaît que certains faux positifs ne sont probablement jamais détectés.

En règle générale, les tests de dépistage de la COVID-19 par PCR ont une excellente valeur prédictive positive (VPP) chez les patients ayant une probabilité pré-test élevée, proche de 100 %. Ce constat a été effectué aux laboratoires de SPO au moyen du séquençage viral effectué sur des prélèvements ayant obtenu un résultat positif au test de PCR, à l'exception des prélèvements dont le nombre de copies virales s'approchait de la LD de l'essai.

Cependant, en période de faible prévalence, quand le degré de circulation du virus dans la collectivité n'est pas élevé, la VPP baisse de façon considérable. Par exemple, si la prévalence communautaire du SARS-CoV-2 s'élève à 1 %, le degré de sensibilité du test à 80 % et la spécificité à 99 %, la VPP d'un test positif ne sera que de 44,7 %. Si la prévalence passe à 5 % ou à 10 %, la VPP augmentera de façon considérable à 80,8 % ou 89,9 %, respectivement. Une enquête sérologique récente menée par SPO au moyen de prélèvements résiduels de commodité a permis d'obtenir une séroprévalence rajustée de 1,1 % (IC à 95 % 0,8, 1,3) en juin.⁵ Cela confirme que l'Ontario est actuellement un milieu à faible prévalence d'infections à SARS-CoV-2.

On peut obtenir des résultats faussement positifs à différentes étapes d'analyse de laboratoire. Les faux positifs peuvent être regroupés selon les catégories suivantes :

1. Erreurs pré-analytiques. Erreurs survenues avant le début du test, y compris les erreurs d'étiquetage des prélèvements, qui mènent à la communication des mauvais résultats. Ces erreurs peuvent aussi être attribuables à la contamination de prélèvements au moment de leur collecte, de leur transport ou de leur aliquotage en laboratoire.

2. Erreurs analytiques. Erreurs survenues durant le processus de dépistage en laboratoire. Par exemple, cela inclut les erreurs liées à la contamination du réactif. Les réactifs peuvent arriver au laboratoire déjà contaminés. Pour réduire le risque d'erreurs connexes, chaque nouveau lot de réactif doit être soumis à une vérification de sa qualité avant d'être utilisé. Une contamination attribuable à des erreurs de pipetage peut également occasionner des résultats faussement positifs. Les erreurs de pipetage peuvent être dues à une erreur humaine ou à une déficience du matériel automatisé. Le contrôle de ce genre d'erreurs analytiques s'effectue au moyen de prélèvements témoins positifs et négatifs inclus à chaque expérience de PCR puis examinés avant de transmettre les résultats du test.

3. Erreurs post-analytiques. Ces erreurs surviennent aux étapes de l'interprétation et de la communication des résultats. L'interprétation fautive des courbes d'amplification pourrait entraîner un résultat faussement positif. Des erreurs de transcription pourraient également mener à la production de résultats faussement positifs. On peut éviter de telles erreurs en veillant à interpréter et à passer en revue tous les résultats de test avant de les rendre publics.

5. Quelles mesures peut-on prendre pour assurer l'investigation d'un résultat positif obtenu par un patient asymptomatique à faible probabilité pré-test ou d'un résultat positif après guérison?

Fait notable, les vrais faux positifs au test de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en Ontario se font rares. Dans la plupart des cas, un résultat positif représente une infection à la COVID-19, que le patient ait ou non des symptômes ou des facteurs de risque. Cette véracité du résultat est distincte de l'évaluation des mesures de santé publique recommandées pour les personnes asymptomatiques et leurs contacts. Au moment d'investiguer un résultat positif, la personne ayant obtenu le résultat positif devrait être présumée infectieuse et placée en isolement jusqu'à ce que le bureau de santé publique local en décide autrement.¹ Ses contacts devraient être retracés, sans être nécessairement placés en quarantaine avant la fin de l'investigation du résultat positif du cas. Pour obtenir des renseignements additionnels, les fournisseurs de soins de santé devraient contacter leur bureau de santé publique local.⁶

Pour investiguer un possible résultat faussement positif obtenu par un patient asymptomatique à faible probabilité pré-test (c.-à-d. aucun contact avec un cas confirmé de COVID-19, autre type d'exposition à risque élevé ou degré élevé de circulation du virus au sein de la collectivité locale), il est possible de prendre plusieurs mesures, qui incluent :

1. l'examen des antécédents cliniques, plus particulièrement les symptômes et manifestations cliniques compatibles avec la COVID-19, les contacts avec un cas confirmé de COVID-19 ou tout autre exposition.⁷ Si des symptômes ou facteurs de risque épidémiologiques sont constatés, le degré de probabilité pré-test n'est pas faible, et la probabilité d'un résultat faussement positif baisse considérablement. Voir l'étude de cas ci-après. En cas de transmission communautaire élevée, la probabilité pré-test ne peut pas être faible, même en l'absence de symptômes ou d'expositions épidémiologiques à risque spécifiques.

2. Si l'essai effectué comptait plus d'une cible et que plus d'une cible a été détectée, on peut croire à une charge virale élevée dans le prélèvement. Les prélèvements à charge virale relative élevée, dans lesquels plusieurs cibles ont été détectées, sont moins susceptibles de donner des résultats faux positifs.
3. Communiquez avec le laboratoire chargé du test pour déterminer si des problèmes techniques surviennent ou sont survenus qui pourraient avoir des répercussions sur le dépistage, par exemple en entraînant des faux positifs.
4. En règle générale, les prélèvements dont les valeurs Ct sont bien en deçà des valeurs limites de positivité de l'essai (p. ex. Ct < 35 lorsque le laboratoire a fixé une valeur limite de positivité de Ct = 38 pour l'essai) sont moins susceptibles de donner des résultats faux positifs. En cas de doute, communiquez avec le laboratoire chargé du test pour obtenir la vérification de la valeur Ct (si l'essai utilisé génère une valeur Ct) et du rapport. Il est aussi possible de réévaluer la courbe d'amplification pour veiller à ce qu'il n'y ait pas eu d'erreur d'interprétation au moment de transmettre les résultats. Voir la Figure 1 pour obtenir un exemple de bonne courbe d'amplification pour un prélèvement à valeur Ct positive élevée.
5. Les lignes directrices de santé publique actuelles recommandent la reprise immédiate du test de dépistage des patients asymptomatiques à faible probabilité pré-test ayant obtenu un résultat positif.¹ Si le second test donne également un résultat positif, on obtient une preuve à l'appui supplémentaire d'un résultat vrai positif. Cependant, si le résultat positif initial avait une valeur Ct élevée s'approchant de la valeur limite de l'essai, le second prélèvement obtenu donnera généralement un résultat négatif en raison de la baisse de l'excrétion virale au fil du temps et (ou) d'un rendement inconstant de l'essai dans le cas de prélèvements à valeur Ct proche de la valeur limite, ou égale à celle-ci. L'obtention d'un résultat négatif au second test ne signifie pas nécessairement que le premier test a donné un résultat faux positif. Cependant, le second résultat peut fournir un contexte additionnel aux responsables de la prise en charge du patient et en dire plus long sur la nécessité de procéder à la gestion de ses contacts.
6. Songez à exiger que le second prélèvement soit soumis au même essai et (ou) à un essai différent s'il est possible pour le laboratoire chargé du test de procéder ainsi. L'obtention d'un second résultat positif augmente les probabilités qu'il s'agisse bien d'un résultat vrai positif. Cependant, l'obtention d'un résultat négatif au second test ne signifie pas nécessairement que le résultat initial était incorrect, étant donné le manque de constance du rendement des essais à valeur proche de la LD et des résultats variables des reprises de test. De plus, différents essais effectués sur un même prélèvement donneront des résultats variables lorsque la charge virale s'approche de la LD.

Pendant que vous prenez les mesures susmentionnées, il est important de présumer que le patient est atteint de la COVID-19 et de veiller à ce qu'on mette en place toutes les mesures de santé publique et de prévention et de contrôle des infections qui s'imposent.

RÉSULTATS POSITIFS APRÈS GUÉRISON

Il a été bien établi qu'il est possible d'obtenir un résultat positif après avoir reçu son congé d'isolement en raison du temps passé en isolement ou de l'obtention d'un résultat négatif. On parle alors de positivité après guérison.⁸ En règle générale, l'administration d'un test de dépistage à une personne qui a obtenu un résultat positif par le passé n'est pas recommandée, à moins d'indication clinique.⁹ Cependant, compte tenu du peu de preuves recueillies en matière d'immunité et des preuves

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

émergentes du risque réel de réinfection, tout résultat positif après guérison obtenu par une personne symptomatique et (ou) ayant récemment eu une exposition à haut risque à une personne infectée pourrait en effet constituer un cas de réinfection. Lorsqu'on tente de déterminer si un résultat positif obtenu après guérison constitue probablement un cas de détection continue de l'infection initiale ou un cas de réinfection, la valeur Ct et le nombre de cibles détectées peuvent aider à brosser un portrait clinique de la situation et à jauger la nécessité d'effectuer un suivi de cas réel de réinfection. Pour pousser l'analyse et procéder par exemple au séquençage génétique viral afin de déterminer si la souche s'apparente à celle de l'infection initiale ou à celles d'autres cas positifs auxquels la personne a pu être exposée après guérison, le résultat positif après guérison obtenu serait tenu d'avoir une valeur Ct faible (p. ex. <32).

6. Étude de cas : Effet de la probabilité pré-test sur la valeur prédictive positive (VPP)

La probabilité pré-test est un élément important à prendre en compte au moment d'envisager la possibilité qu'un résultat positif soit faussement positif. Les laboratoires de SPO ont mené une évaluation limitée chez des patients dont le prélèvement affichait une valeur Ct positive élevée (Ct \geq 35) lors d'un essai commercial ou mis au point en laboratoire qui ciblait le gène E. La PCR et le séquençage d'une seconde cible indépendante (ARN polymérase ARN-dépendante; RdRp) ont donné des proportions de détection variables selon la probabilité pré-test.

Dans le cadre de l'étude, la présence du virus a été confirmée par PCR et séquençage du gène RdRp dans 103 prélèvements de commodité de patients testés dans les laboratoires de SPO et ayant des valeurs Ct \geq 35. Le virus a été détecté chez :

- 18 sur 23 patients (78 %) ayant déjà obtenu un résultat positif au dépistage du SARS-CoV-2 à partir d'un prélèvement précédent;
- 17 sur 20 patients (85 %) ayant des symptômes au moment du dépistage;
- 10 sur 15 patients asymptomatiques (67 %) constituant des proches contacts de cas confirmés de COVID-19.
- 16 sur 32 patients asymptomatiques (50 %) ayant subi un test dans le contexte d'une éclosion en établissement qui a fait \geq 10 cas confirmés.
- 5 sur 32 patients asymptomatiques (16 %) ayant subi un test dans le contexte d'une éclosion ou à des fins de surveillance, dans un établissement comptant uniquement de 1 à 3 patients positifs au SARS-CoV-2 (tous asymptomatiques).

Voir les Tableaux 1A et 1B de l'annexe pour obtenir des renseignements additionnels sur les analyses susmentionnées.

Fait notable, les prélèvements de patients asymptomatiques qui n'avaient aucun lien épidémiologique à des cas de COVID-19 avaient la plus faible proportion de résultats positifs au séquençage du gène RdRp (5/32, 16 % de cas confirmés). Cette proportion était considérablement plus faible que chez les patients asymptomatiques testés, ayant des liens épidémiologiques à de multiples cas confirmés (16/32, 50 % confirmés; méthode exacte de Fisher $p=0.007$). Ce phénomène laisse entendre qu'un résultat positif à

Un survol des valeurs de cycle seuil et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par PCR en temps réel

valeur Ct élevée est plus susceptible de constituer un faux positif lorsque le patient est asymptomatique et sans lien épidémiologique avec des cas durant des périodes de faible prévalence communautaire de la maladie. Cependant, il est difficile de savoir exactement quels patients de ce sous-groupe sont des cas réellement positifs par opposition à des cas faussement positifs puisque, comme nous le savons, les prélèvements vrais positifs à valeur Ct élevée ne donnent pas nécessairement de second résultat positif lorsqu'ils sont soumis une seconde fois à un essai sur la même plateforme ou sur une plateforme différente. Sans données cliniques et épidémiologiques détaillées, il est impossible de repérer les résultats faussement positifs à l'aide des seules valeurs Ct, dont l'utilité se limite à appuyer l'investigation des résultats faussement positifs dans le contexte clinique approprié.

Le ministère de la Santé de l'Ontario a publié des lignes directrices sur la [gestion des cas et des contacts relatifs à la COVID-19 en Ontario](#) qui permettent la prise de mesures sanitaires réduites lorsqu'un patient asymptomatique à faible probabilité pré-test obtient un résultat positif suivi immédiatement d'un résultat négatif sur un nouveau prélèvement.¹ Cette approche réduit la nécessité d'établir si un tel résultat constitue systématiquement un vrai positif par opposition à un faux positif, ce qui est souvent difficile à faire à l'échelle individuelle à moins d'identifier des problèmes techniques systémiques au sein du laboratoire ou de pouvoir confirmer le résultat positif à l'aide d'un essai indépendant. De plus, étant donné les éléments de preuve émergents sur l'immunité et la réinfection, la détermination du statut réel positif ou négatif d'une personne n'a aucune répercussion sur les recommandations du ministère relatives au maintien des mesures de santé publique afin de prévenir une infection potentielle future.

Conclusions

La pandémie de COVID-19 a entraîné le dépistage à grande échelle de la maladie chez des personnes asymptomatiques à faible probabilité pré-test, une pratique qui n'a auparavant jamais été adoptée pour un pathogène viral respiratoire. En contexte de SARS-CoV-2, les valeurs Ct peuvent être utiles au moment d'interpréter des résultats de laboratoire positifs de patients à faible probabilité pré-test, en particulier les personnes asymptomatiques sans lien épidémiologique à des cas confirmés de COVID-19. La province de l'Ontario a produit des lignes directrices qui facilitent la prise en charge fondée sur le risque et le suivi des patients sans avoir à conclure définitivement à la positivité réelle ou fausse du résultat obtenu. Il est nécessaire de continuer de sensibiliser les intervenants au fait qu'il est possible d'obtenir davantage de résultats faux positifs au moment de soumettre au dépistage des quantités élevées de personnes asymptomatiques durant les périodes de faible prévalence communautaire du SARS-CoV-2, et ce, même lorsqu'on utilise des essais à excellent rendement. Cela bénéficierait au secteur de la santé et pourrait permettre d'éviter les cas d'isolement de personnes, de recherche de contacts et de déclaration d'éclousions s'avérant inutiles.

Bibliographie

1. Ontario. Ministère de la Santé. Gestion des cas et des contacts relatifs à la COVID-19 en Ontario [Internet]. Version 8.0. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020 [modifié le 23 juin 2020; cité le 21 août 2020]. Disponible à : health.gov.on.ca/fr/pro/programs/publichealth/coronavirus/docs/contact_mngmt/management_cas_es_contacts.pdf
2. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis. 2020 May 22 [diffusion en ligne avant la version imprimée]. Disponible à : doi.org/10.1093/cid/ciaa638
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Duration of isolation and precautions for adults with COVID-19 [Internet]. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2020 [modifié le 16 août 2020; cité le 21 août 2020]. Disponible à : cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/strategy-discontinue-isolation.html
4. Tom MR, Mina MJ. To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. Clin Infect Dis. 2020 May 21 [diffusion en ligne avant la version imprimée]. Disponible à : doi.org/10.1093/cid/ciaa619
5. Agence ontarienne de protection et de promotion de la santé (Santé publique Ontario). Résumé de la sérosurveillance de la COVID-19 : Séroprévalence de la COVID-19 en Ontario : du 27 mars 2020 au 30 juin 2020 [Internet]. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020 [cité le 21 août 2020]. Disponible à : publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/epi/2020/07/covid-19-epi-seroprevalence-in-ontario.pdf?la=fr
6. Ontario. Ministère de la Santé, ministère des Soins de longue durée. Services de santé dans votre collectivité : Emplacements des bureaux de santé [Internet]. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2019 [modifié le 6 mai 2020; cité le 25 août 2020]. Disponible à : health.gov.on.ca/fr/common/system/services/phu/locations.aspx
7. Ontario. Ministère de la Santé. COVID-19 – Document de référence sur les symptômes [Internet]. Version 6.0. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020 [modifié le 6 août 2020; cité le 22 août 2020]. Disponible à : health.gov.on.ca/fr/pro/programs/publichealth/coronavirus/docs/2019_reference_doc_symptoms.pdf
8. Agence ontarienne de protection et de promotion de la santé (Santé publique Ontario). Pleins feux sur : COVID-19 : Détection virale continue et résultats positifs après guérison [Internet]. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020 [cité le 28 août 2020]. Disponible à : publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/06/covid-19-ongoing-viral-detection-repeat-positives.pdf?la=fr
9. Ontario. Ministère de la Santé. COVID-19 – Aide-mémoire des conseils de la Santé publique concernant les tests et les congés [Internet]. Version 9.0. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020 [modifié le 29 juillet 2020; cité le 28 août 2020]. Disponible à : health.gov.on.ca/en/pro/programs/publichealth/coronavirus/docs/2019_testing_clearing_cases_guidance.pdf

Annexe : Description et définition des catégories de patients de l'étude de cas relative aux valeurs Ct élevées, et tableaux de données

Tableau 1A : Description et définition des catégories de patients de l'étude de cas relative aux valeurs Ct élevées

| CATÉGORIE | DÉFINITION |
|---|---|
| Groupe témoin : second échantillon (Ct élevé) d'un prélèvement précédemment positif (Ct faible) | Groupe témoin – Résultat positif à valeur Ct faible (Ct <30) suivi d'un résultat à valeur Ct élevée (Ct ≥35) |
| Symptomatiques et Ct élevé | Personnes ayant obtenu un résultat positif à valeur Ct élevée (Ct ≥35) et eu au moins un symptôme, selon les indications du système d'information de laboratoire de SPO |
| Asymptomatiques : Exposition à un cas probable ou confirmé* | Personnes asymptomatiques selon le système d'information de laboratoire de SPO et soumises à un test en raison d'une exposition à un cas probable ou confirmé OU de la présence d'un cas positif à la même adresse |
| Asymptomatiques : Établissement comptant ≥10 cas positifs | Personnes asymptomatiques selon le système d'information de laboratoire de SPO et soumises à un test dans le contexte d'une éclosion comptant au moins 10 cas positifs |
| Asymptomatiques : Établissement procédant au dépistage généralisé et comptant ≤3 cas positifs, tous asymptomatiques | Personnes soumises à un test dans le contexte de mesures de surveillance ou d'intervention post-éclosion affichant trois cas positifs asymptomatiques ou moins et aucun cas positif symptomatique, selon le système d'information de laboratoire de SPO |

*Note – Cette catégorie contient des prélèvements obtenus en établissement lors d'éclosions (et non) qui pourraient aussi être classés dans la catégorie « Établissements comptant ≥10 cas positifs »

Tableau 1B : Sommaire des résultats de l'étude de cas relative aux valeurs Ct élevées : résultats du test initial ciblant le gène E et de la PCR de détection du gène RdRp, stratifiés par catégorie de patients

| Catégorie | PATIENTS | | | Gène RdRp DÉTECTÉ par PCR | | Gène RdRp NON DÉTECTÉ par PCR | |
|---|----------|-------------------------|--|---------------------------|--|-------------------------------|--|
| | N | Âge médian (Intervalle) | Ct médian (Intervalle) – PCR initiale de détection du gène E | N (%) | Ct médian (Intervalle) – PCR initiale de détection du gène E | N (%) | Ct médian (Intervalle) – PCR initiale de détection du gène E |
| Groupe témoin – Résultat positif à valeur Ct faible (Ct <30) suivi d'un résultat à valeur Ct élevée (Ct ≥35) | 23 | 52 (14-99) | 36,9 (35,0-38,4) | 18 (78,3) | 36,7 (35,0-38,3) | 5 (21,7) | 38,1 (35,9-38,4) |
| Symptomatiques et Ct élevé (≥35) | 20 | 68,5 (26-94) | 36,6 (35,0-38,3) | 17 (85,0) | 36,9 (35,03-38,3) | 3 (15,0) | 36,3 (35,6-37,4) |
| Asymptomatiques : Exposition à un cas probable ou confirmé | 15 | 38 (10-93) | 36,1 (35,4-38,0) | 10 (66,7) | 36,0 (35,4-37,2) | 5 (33,3) | 37,5 (36,0-38,0) |
| Asymptomatiques : Établissement comptant ≥10 cas positifs | 32 | 57,5 (15-97) | 37,5 (35,4-40,6) | 16 (50,0) | 36,6 (35,4-40,6) | 16 (50,0) | 37,7 (35,5-38,3) |
| Asymptomatiques : Établissement procédant au dépistage généralisé et comptant ≤3 cas positifs, tous asymptomatiques | 32 | 46 (17-95) | 36,9 (35,2-39,8) | 5 (15,6) | 36,2 (35,6-37,5) | 27 (84,3) | 37,0 (35,2-39,8) |
| Total | 122 | 53,5 (10-99) | 36,9 (35,0-40,6) | 66 (54,1) | 36,2 (35,0-40,6) | 56 (45,9) | 37,5 (35,2-39,8) |

Ct = cycle seuil; E = transcriptase inverse-amplification en chaîne de la polymérase du gène enveloppe; RdRp = PCR en point final de détection du gène ARN polymérase ARN-dépendante avec confirmation par séquençage de Sanger. * 20 patients étaient symptomatiques et deux étaient asymptomatiques au moment du test initial; un cas manquait d'information relative au statut symptomatique au moment du test initial.

Auteurs

Santé publique Ontario
Groupe de travail technique sur le dépistage de la COVID-19 en Ontario

Citation

Agence ontarienne de protection et de promotion de la santé (Santé publique Ontario). Pleins feux sur : Un aperçu des valeurs de cycle seuil (ou cycle seuil) et de leur rôle dans l'interprétation des résultats des tests de dépistage du SARS-CoV-2 par RT-PCR. Toronto, ON: Imprimeur de la Reine pour l'Ontario; 2020.

©Imprimeur de la Reine pour l'Ontario, 2020

Avis de non-responsabilité

Santé publique Ontario (SPO) et le Groupe de travail technique sur le dépistage de la COVID-19 en Ontario ont conçu le présent document. SPO offre des conseils scientifiques et techniques au gouvernement, aux agences de santé publique et aux fournisseurs de soins de santé de l'Ontario. Son travail s'appuie sur les meilleures données probantes actuellement disponibles.

Le présent document peut être reproduit sans permission à des fins non commerciales seulement, sous réserve d'une mention appropriée de SPO. Il est interdit de le modifier sans l'autorisation écrite expresse de SPO.

Santé publique Ontario

Santé publique Ontario est une société de la Couronne vouée à la protection et à la promotion de la santé de l'ensemble de la population ontarienne, ainsi qu'à la réduction des inégalités en matière de santé. SPO met les connaissances et les renseignements scientifiques les plus pointus du monde entier à la portée de professionnels de la santé publique, des travailleurs de la santé de première ligne et des chercheurs.

Santé publique Ontario fournit un soutien scientifique et technique d'expert au gouvernement, aux bureaux locaux de santé publique et aux fournisseurs de soins de santé dans les secteurs suivants :

- maladies transmissibles et infectieuses
- prévention et contrôle des infections
- santé environnementale et santé au travail
- préparation aux situations d'urgence
- promotion de la santé, prévention des maladies chroniques et des traumatismes
- services de laboratoires de santé publique

Les activités de Santé publique Ontario incluent aussi la surveillance, l'épidémiologie, la recherche, le perfectionnement professionnel et la prestation de services axés sur le savoir. Pour obtenir des renseignements additionnels sur SPO, consultez : santepubliqueontario.ca.

