



# Détection par la réaction en chaîne quantitative de la polymérase après transcription inverse en temps réel du variant Delta du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées du Canada

Shelley Peterson<sup>1</sup>, Jade Daigle<sup>1</sup>, Codey Dueck<sup>1</sup>, Audra Nagasawa<sup>2</sup>, Michael Mulvey<sup>1,3</sup>, Chand S Mangat<sup>1\*</sup>

## Résumé

**Contexte :** Les variants préoccupants du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) sont associés à une augmentation de l'infectivité, de la gravité et de la mortalité de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) et sont de plus en plus souvent détectés dans le cadre de la surveillance clinique et de la surveillance des eaux usées au Canada et dans le reste du monde. Dans cette étude, nous présentons un essai de réaction en chaîne quantitative de la polymérase après la transcription inverse en temps réel (RT-qPCR) pour la détection de la mutation D377Y du gène N associée au variant Delta du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées.

**Méthodes :** Des échantillons d'eaux usées (n = 980) ont été prélevés dans six villes et 17 collectivités rurales du Canada de juillet à novembre 2021 et ont fait l'objet d'un dépistage de la mutation D377Y.

**Résultats :** Le variant Delta a été détecté dans toutes les grandes villes canadiennes et les régions éloignées du Nord, ainsi que dans la moitié des collectivités rurales du sud. La sensibilité et la spécificité de cet essai étaient suffisantes pour détecter et quantifier le variant Delta dans les eaux usées afin de contribuer à un dépistage et à une surveillance rapides au niveau de la population.

**Conclusion :** Cette étude démontre un nouveau test RT-qPCR rentable pour suivre la propagation du variant Delta du SRAS-CoV-2. Ce test rapide peut être facilement intégré dans les programmes actuels de surveillance des eaux usées afin de faciliter le suivi des variants au niveau de la population.

**Citation proposée :** Peterson SW, Daigle J, Dueck C, Nagasawa A, Mulvey MR, Mangat CS. Détection par la réaction en chaîne quantitative de la polymérase après transcription inverse en temps réel du variant Delta du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées du Canada. *Relevé des maladies transmissibles au Canada* 2023;49(5):238–46. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v49i05a07f>

**Mots-clés :** SRAS-CoV-2, eaux usées, variant, Delta, B.1.617.2, qPCR

Cette oeuvre est mise à la disposition selon les termes de la licence internationale [Creative Commons Attribution 4.0](#)



## Affiliations

<sup>1</sup> Unité de surveillance des eaux usées, Laboratoire national de microbiologie, Agence de la santé publique du Canada, Winnipeg, MB

<sup>2</sup> Centre de données sur la santé de la population, Statistique Canada, Ottawa, ON

<sup>3</sup> Département de la microbiologie médicale et des maladies infectieuses, Collège de médecine Max Rady, Université du Manitoba, Winnipeg, MB

## \*Correspondance :

[chand.mangat@phac-aspc.gc.ca](mailto:chand.mangat@phac-aspc.gc.ca)



## Introduction

La pandémie de coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) a débuté à Wuhan, en Chine, fin 2019, avant de devenir une pandémie mondiale en 2020. À partir du mois de septembre 2020, des variants préoccupants (VP) ont commencé à émerger, présentant des mutations entraînant une augmentation des taux de transmission virale, une virulence accrue ou la capacité d'échapper aux vaccins existants (1–4). Le 11 mai 2021, l'Organisation mondiale de la Santé a déclaré que le variant Delta (B.1.617.2) était un VP (5). Il a été démontré que le variant Delta est à la fois plus transmissible et plus virulent que le type sauvage (TS) (Wuhan) (6–8).

L'épidémiologie des eaux usées s'est avérée un outil puissant pour suivre la propagation du SRAS-CoV-2 au niveau de la population, et est récemment devenue essentielle pour surveiller la diffusion des VP au Canada et dans le monde (9–12). Les essais de réaction en chaîne quantitative de la polymérase après transcription inverse en temps réel (RT-qPCR) ont déjà été élaborés pour identifier les mutations associées aux VP émergents, notamment Alpha (Sdel69-70, ND3L), Beta (Sdel241, N501Y) et Gamma (N501Y) (13–15). La détection précoce des VP peut potentiellement conduire à une amélioration des réactions de santé publique, telles que l'augmentation du séquençage des isolats cliniques, la surveillance accrue et l'amélioration des mesures de santé publique. La surveillance des quantités relatives des variants du SRAS-CoV-2 au fil du temps peut être utile pour suivre les tendances de la transmission virale et, éventuellement, évaluer l'efficacité réelle des interventions en santé publique (16).

Dans ce rapport, nous décrivons un nouveau test RT-qPCR pour la détection de l'allèle D377Y du gène N, associé au variant Delta dans les eaux usées. Nous avons appliqué ce test à des échantillons d'eaux usées prélevés dans 36 sites d'échantillonnage situés dans 23 villes canadiennes, éloignées ou urbaines, afin de surveiller la propagation du variant Delta dans l'ensemble du pays. Cette approche de surveillance au niveau de la population pourrait être utile pour suivre l'évolution de la prévalence des VP et les effets des interventions en santé publique visant à réduire la propagation virale dans les régions sanitaires.

## Méthodes

### Prélèvement d'échantillons et extraction des acides nucléiques

Les eaux usées ont été collectées entre le 30 juin et le 1<sup>er</sup> décembre 2021 dans 16 stations de traitement des eaux usées urbaines (STEU) de six villes, ainsi que 20 STEU et des stations de relèvement de 17 (petites) villes et localités rurales du Canada. Quinze des STEU de cinq villes ont été échantillonnées

dans le cadre de l'enquête canadienne sur les eaux usées de Statistique Canada (17). Un échantillon composite de 24 heures a été prélevé trois fois par semaine dans chaque station de traitement et expédié au Laboratoire national de microbiologie à 4 °C. Les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant 24 heures jusqu'à ce qu'ils soient traités.

Un échantillon de 300 ml des effluents primaires après tamisage ou de l'eau usée brute a été mélangé par inversion, puis une aliquote de 30 ml a été prélevée et traitée selon la procédure décrite précédemment (14). L'ARN a été extrait à l'aide de la trousse grand volume « MagNA Pure 96 DNA and Viral NA » (Roche Diagnostics, Laval, Québec) en utilisant le protocole « Plasma External Lysis 4.0 » selon les instructions du fabricant.

### Conception de l'essai concernant le variant préoccupant Delta

Un essai a été conçu pour détecter la mutation D377Y consistant en un G->T dans le gène N (G29406T) en raison de sa rareté relative dans la population canadienne générale des génomes du SRAS-CoV-2 et de son exclusivité relative au sein du génome du variant Delta (communication personnelle, G. Van Domselaar). Cet essai a été conçu pour détecter à la fois les séquences des TS et les séquences des variants (V) pour chaque allèle, ce qui permet de faire la distinction entre les V et l'ARN des TS du SRAS-CoV-2.

La séquence du TS du SRAS-CoV-2 (NC\_045512.1), ainsi que les séquences du variant Delta (EPI\_ISL\_1372093, EPI\_ISL\_2134533, EPI\_ISL\_2134644, EPI\_ISL\_2134933, EPI\_ISL\_2135087), ont été obtenues auprès de la « Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data » (18) et utilisées pour la conception d'amorces et de sondes. Des amorces oligonucléotidiques et des sondes ont été choisies pour chaque région cible à l'aide du logiciel Primer Express v3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) et de Primer3 v4.1.0 (19). Des fragments linéaires d'oligonucléotides d'ADNdb (ADN Intégré, Coralville, Iowa) constitués de la région génique entourant la région du variant pour la séquence TS ou V (**tableau A1**) ont été utilisés comme normes et quantifiés à l'aide d'une trousse RT-ddPCR avancée en une étape pour les sondes (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) sur un système de PCR numérique par gouttelettes QX200 (Bio-Rad).

### Conditions d'essai de la réaction en chaîne quantitative de la polymérase après la transcription inverse en temps réel

RT-qPCR a été effectué pour les essais D377Y TS et V, avec les essais N1 et N2 des Centres pour le contrôle et la prévention des maladies des États-Unis et interprété comme décrit précédemment (14,20) avec des concentrations de 500 nM de chaque amorce (D377Y\_F : CATTCCCACCAACAGAGCCT,



D377Y\_R : TGTCTCTGCGGTAAGGCTTG) et 500 nM de chaque sonde (D377Y\_TS : AGAAGGCTGATGAAA, D377Y\_V : AGAAGGCTTATGAAAC). Chaque PCR en temps réel a été réalisée en duplicata ou en triplicata, comme indiqué, avec les témoins sans modèle et les témoins positifs appropriés.

## Détermination de la limite de détection

La limite de détection (LD) de l'essai a été évaluée comme étant la concentration la plus faible à laquelle il y avait > 95 % de positivité du test dans 15 répétitions d'une série de dilutions en série 1,5 fois de 45 copies/réaction (cp/rxn) à 1,8 cp/rxn des normes d'oligonucléotides d'ADNdb.

## Analyse de données

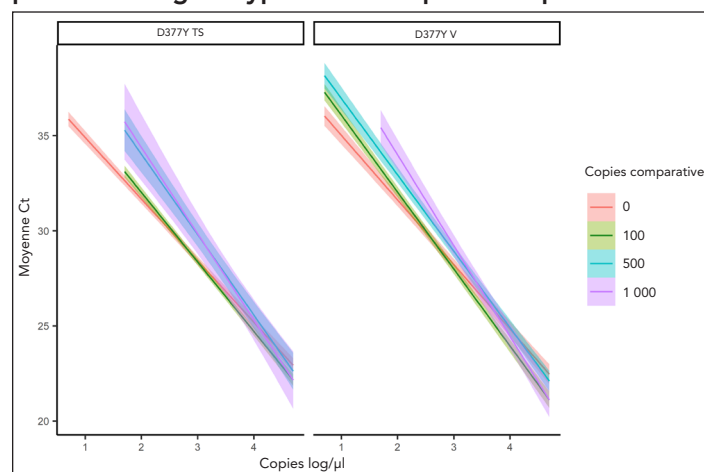
Les efficacités d'amplification (E) ont été calculées en utilisant  $E = -1 + 10^{(-1/\text{pente})} \times 100$ . Les analyses de données ont été effectuées en utilisant la version R 4.1.1 sur RStudio à l'aide des progiciels tidyverse (21).

## Résultats

Les limites de détection de l'essai étaient de 4 cp/rxn (TS) et de 3 cp/rxn (V) lorsqu'elles étaient mesurées en tant qu'échantillon pur sans allèles interférents. Ces LD étaient proches de la limite théorique de la RT-qPCR et suffisantes pour une détection sensible dans les eaux usées, où les concentrations d'ARN du SRAS-CoV-2 peuvent être très faibles. Les courbes standard étaient comme suit : TS (pente = -3,45, intercept = 38,52,  $R^2 = 0,999$ ); et V (pente = -3,29, intercept = 38,25,  $R^2 = 0,999$ ). Les efficacités d'amplification des réactions TS et V étaient respectivement de 101 % et 95 %.

Comme les quantités relatives de modèle TS et V dans les échantillons d'eau usée peuvent varier considérablement, des courbes standard ont également été créées pour chaque essai en présence de 100, 500 et 1 000 cp/μL de l'allèle alternatif afin d'évaluer leur stabilité (**figure 1**). La présence du modèle TS a eu un effet limité sur la détection du modèle V avec l'essai du variant, avec une perte de signal à 1 cp/μL TS seulement en présence de 1 000 cp/μL TS; une concentration beaucoup plus élevée que celle qui est susceptible d'être détectée dans les eaux usées. La présence du modèle V a entraîné une diminution de la sensibilité et une augmentation de la marge d'erreur de l'essai TS, avec une détection à 10 cp/μL TS, mais pas à 1 cp/μL TS en présence de n'importe quelle concentration du modèle V. Les écarts types des deux essais ont été déterminés en utilisant les allèles alternatifs dans cette expérience afin d'évaluer la variance sur une gamme de concentrations. Les écarts types ont été calculés en moyenne sur trois concentrations (100 cp/μL, 500 cp/μL et 1 000 cp/μL) et étaient de 0,38 Ct (TS) et 0,31 (V), contre 0,09–0,18 pour les essais publiés antérieurement (14).

**Figure 1 : Courbes standard pour les essais D377Y en présence du génotype alternatif pour chaque allèle<sup>a</sup>**



Abréviations : Ct, cycle de seuil; SRAS-CoV-2, coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère; TS, type sauvage; V, variant

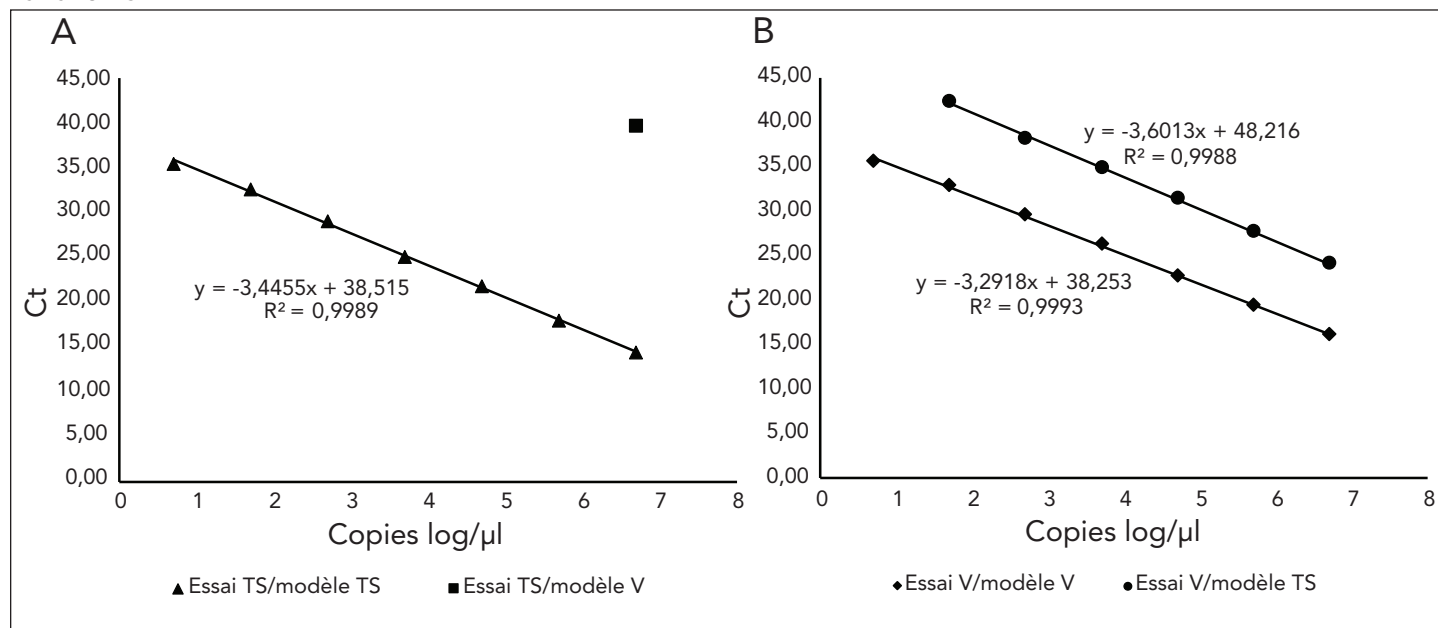
<sup>a</sup> Courbes standard pour les essais de réaction en chaîne quantitative de la polymérase après la transcription inverse en temps réel SRAS-CoV-2 de type sauvage et du variant D377Y B.1.617 par rapport à des dilutions au décuple des témoins ADN oligonucléotides en présence de 100, 500 et 1 000 copies/μL du génotype alternatif pour chaque allèle

Pour tester la spécificité analytique, les cibles TS et V ont été testées en triplicata contre des dilutions en série de  $10^6$  cp/μL à  $10^0$  cp/μL de l'oligonucléotide de l'allèle alternatif. Le test TS a montré une réactivité croisée négligeable, avec une détection retardée de 25 Ct en présence de  $1 \times 10^6$  cp/μL TS. L'essai V a montré une réactivité croisée avec le modèle TS; cependant, l'amplification a été retardée de ~8 Ct (**figure 2**).

Un total de 980 échantillons provenant de 36 stations de traitement des eaux usées et stations de relèvement urbaines et éloignées du Canada ont été prélevés entre le 30 juin et le 1<sup>er</sup> décembre 2021 (**tableau A2**). Parmi ceux-ci, 539 (55 %) ont eu un test positif pour la mutation D377Y du variant Delta du SRAS-CoV-2, 210 (21,4 %) ont eu un test positif pour N1/N2 uniquement et 232 (23,6 %) échantillons ont eu un test négatif à la fois pour N1/N2 et D377Y. En outre, 8 échantillons (0,8 %) ont permis de détecter le SRAS-CoV-2 par les tests D377Y mais non par les tests N1/N2. Pour sept d'entre eux, le test D377Y n'a été détecté que dans un des deux tests répétés et pour six autres, la détection était < 10 cp/mL. Le variant Delta a été détecté dans les six grandes villes, la détection initiale survenant entre le 11 juillet et le 30 août dans les grandes villes et le 7 octobre dans le NL11 (St. John's) (**figure 3**). Le signal du variant Delta a été initialement détecté dans la majorité des villes entre le 17 et le 22 juillet. Le signal maximal (concentration la plus élevée de Delta détectée) dans les villes tout au long de la période d'étude allant de 22 juillet au 18 octobre, soit en moyenne 32 jours après la détection initiale (intervalle : 0–66, EI : 10–49). Après la détection initiale dans cinq des six villes, le signal Delta a rapidement augmenté, devenant à peu près équivalent au signal SRAS-CoV-2 N1 + N2 pendant le reste de la période d'étude. Cette forte augmentation est le signe d'un déplacement rapide des autres variants en circulation par Delta, comme cela a été



Figure 2 : Courbes standard<sup>a,b,c</sup> pour les essais d'amplification en chaîne de la polymérase en temps réel du D377Y effectués avec des dilutions en série d'oligonucléotides d'ADN synthétiques pour les allèles de type sauvage et du variant D377Y



Abréviations : Ct, cycle de seuil; TS, type sauvage; V, variant

<sup>a</sup> Pour toutes les courbes standard, les équations pour les lignes et les valeurs  $R^2$  sont indiquées

<sup>b</sup> (A) Courbe standard pour le test TS utilisant le modèle TS et la réactivité croisée avec le modèle V

<sup>c</sup> (B) Courbe standard pour l'essai V utilisant le modèle V (ligne continue) et réactivité croisée avec le modèle TS (ligne en tirets)

observé dans les cas cliniques par la surveillance génomique des **variants du SRAS-CoV-2**. Le signal Delta n'a été détecté que deux fois au cours de la période d'étude à St. John's (Terre-Neuve-et-Labrador) et le signal SRAS-CoV-2 est resté faible, une situation que l'on retrouve généralement dans les localités les plus éloignées de l'étude.

Les régions peu peuplées étudiées dans le cadre de cette étude ont montré une détection moins constante du D377Y, la détection dans 50 % des sites éloignés de Terre-Neuve-et-Labrador ( $n = 6/12$ ) pendant au moins un point temporel tout au long de la période d'échantillonnage. À Terre-Neuve-et-Labrador, D377Y n'a pas été détecté dans 4/6 sites avant la dernière semaine d'octobre 2021, tandis que les deux sites restants ont connu une détection en juillet et en septembre.

Dans les régions territoriales du Nord, le signal Delta a été détecté dans les six sites des Territoires du Nord-Ouest et dans les deux sites du Nunavut (NU) pendant au moins un point temporel. Le variant NU1 a fait l'objet d'une détection sporadique à faible niveau en septembre, tandis que le variant D377Y a été détecté dans NU2 d'août à mi-septembre, avec un signal maximal de forte intensité le 8 septembre. Le variant NT1 n'a été échantillonné qu'en novembre, avec des niveaux de détection élevés tout au long du mois. Le signal Delta a été détecté pour la première fois entre le 12 et le 19 août dans quatre des cinq autres sites des Territoires du Nord-Ouest, et le

20 septembre pour le dernier site. Quatre sites des Territoires du Nord-Ouest (NT1, NT4–NT6) n'ont pas été échantillonnés au cours du mois d'octobre.

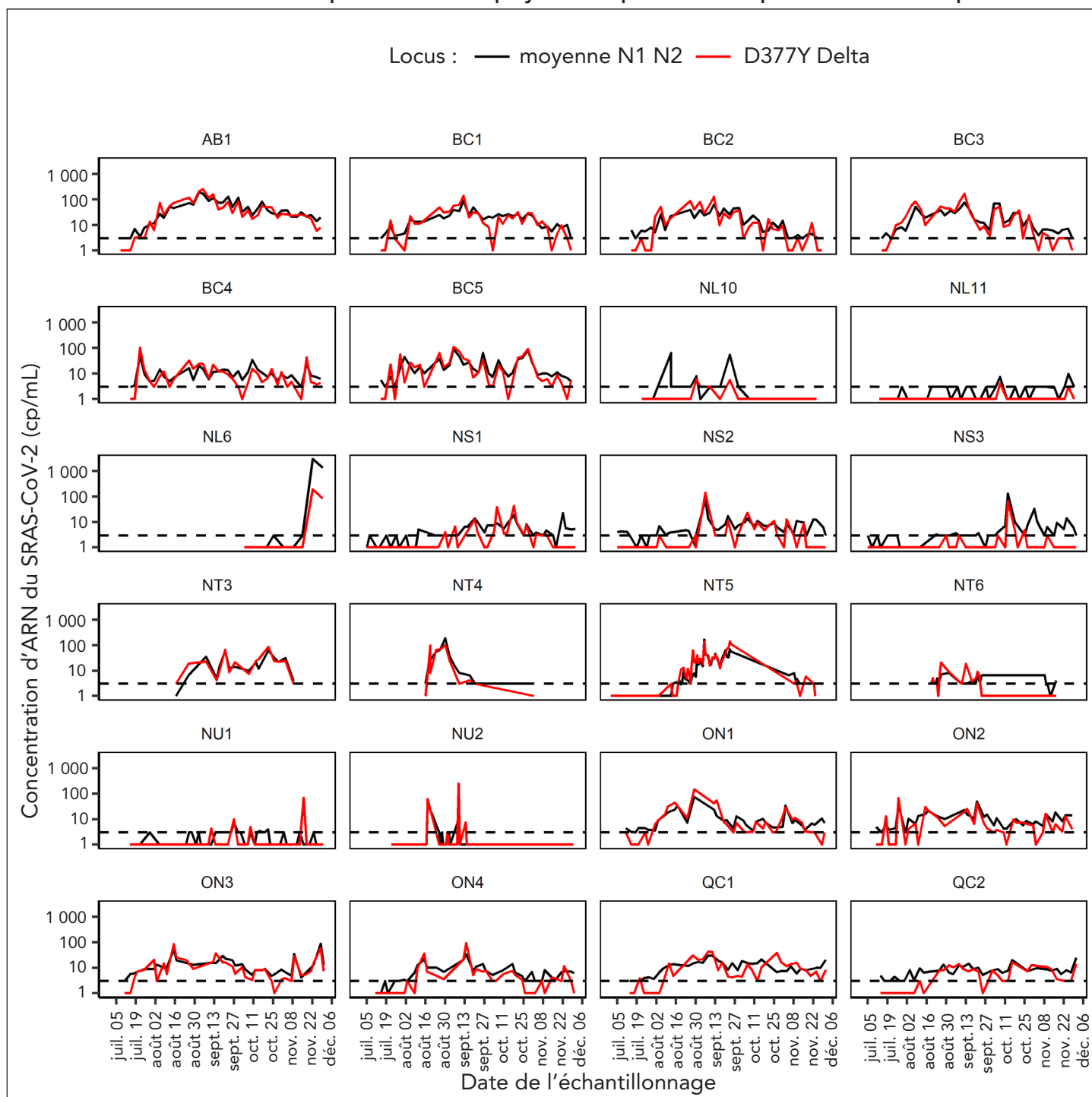
## Discussion

Cette étude décrit la réalisation des essais de RT-qPCR pour détecter la mutation D377Y du gène N associée au variant Delta du SRAS-CoV-2. Les LD de cet essai étaient proches de la limite théorique de RT-qPCR et suffisantes pour une détection sensible dans les eaux usées, où les concentrations d'ARN du SRAS-CoV-2 peuvent être très faibles. La robustesse et la sensibilité du composant V de l'essai permettent d'analyser les tendances et, le cas échéant, de détecter les alertes précoces dans les collectivités et de surveiller le déclin de la vague du Delta.

L'essai D377Y V est utile pour suivre la propagation du variant Delta dans les eaux usées, puisqu'il a été utilisé pour surveiller la propagation du variant Delta dans huit grandes villes et 26 villes et localités rurales à travers le Canada sur une période de quatre mois. Le variant Delta a été détecté dans les eaux usées de toutes les grandes villes canadiennes, avec une augmentation rapide du signal peu après le début de la détection, ce qui indique une propagation rapide de Delta et un déplacement des autres variants. Le signal Delta a également été observé dans environ la moitié des localités rurales du sud du Canada et dans



**Figure 3 : Détection du variant Delta du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées des villes et des zones rurales du Canada à l'aide d'une réaction en chaîne quantitative de la polymérase après la transcription inverse en temps réel<sup>a,b</sup>**



Abréviations : AB, Alberta; ARN, acide ribonucléique; BC, Colombie-Britannique; NL, Terre-Neuve-et-Labrador; NS, Nouvelle-Écosse; NT, Territoires du Nord-Ouest; NU, Nunavut; ON, Ontario; QC, Québec; SRAS-CoV-2, coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

<sup>a</sup> La ligne rouge représente les copies/ml (cp/ml) de la mutation D377Y indiquant la présence du variant Delta

<sup>b</sup> La ligne noire représente la concentration de SRAS-CoV-2 en utilisant la moyenne des Centres pour le contrôle et la prévention des maladies N1 et N2 cp/mL. Les sites testés sur une période de moins d'un mois ou avec moins de trois échantillons dans lesquels le SRAS-CoV-2 a été détecté par N1 ou N2 ne sont pas indiqués. La ligne en tirets représente la limite de quantification de l'essai. Les sites sont décrits dans le tableau A2



toutes les localités du nord du Canada. Ces données démontrent l'utilité de cet essai pour suivre la propagation du variant Delta du SRAS-CoV-2. Ces essais RT-qPCR en une seule étape peuvent être facilement intégrés dans les programmes de surveillance des eaux usées actuellement utilisés pour contribuer à la surveillance du SRAS-CoV-2.

### Limites

Les limites de l'essai comprennent la perte de sensibilité en présence de l'allèle V, qui limite l'interprétation du composant TS de l'essai pendant le début d'une vague Delta, où des niveaux élevés de matériel génomique du variant atténueront le signal TS. Ceci est cohérent avec les études précédentes qui ont trouvé un niveau similaire de réactivité croisée entre les essais du variant et de TS (13,22). Dans les échantillons d'eaux usées, cette réactivité croisée retardée est négligeable, car la concentration de SRAS-CoV-2 est très faible. Les autres limites de cet essai sont les suivantes : 1) une détection incohérente lorsque la concentration d'ARN dans les échantillons est proche de la LD de l'essai ou 2) la présence d'inhibiteurs dans les eaux usées. Les limites de la surveillance basée sur les eaux usées comprennent la limitation des tests aux populations présentes dans le bassin récepteur des eaux usées, les variations de l'excrétion virale entre les variants du SRAS-CoV-2 et les personnes infectées, et les variations de la composition des eaux usées dues aux événements météorologiques ou industriels.

Le variant Delta du SRAS-CoV-2 est défini par 27 mutations, qui sont généralement détectées par le séquençage du génome entier (3,23–25). Si la détection d'une mutation telle que D377Y n'est pas déterminante pour la présence du variant Delta, elle l'est fortement, car la mutation D377Y du gène N est très rare dans les souches autres que Delta (26).

### Conclusion

La surveillance par RT-qPCR est une méthode rapide et rentable de dépistage des variants du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées et les échantillons cliniques. Ces essais complètent les essais de détection des variants du SRAS-CoV-2 décrits précédemment (14) pour la surveillance des variants du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées. La surveillance basée sur les eaux usées est un outil précieux pour suivre la propagation des variants du SRAS-CoV-2 au niveau de la population dans les régions où les tests cliniques sont limités. La fraction relative du variant Delta mesurée dans les eaux usées à l'aide de l'essai conçu dans le cadre de ce travail a été communiquée aux décideurs en matière de santé publique par le biais d'un rapport hebdomadaire dans un réseau de sites de surveillance à travers le Canada. À notre connaissance, ces données ont été utilisées comme un flux complémentaire de renseignements sur la santé publique et n'ont pas fait l'objet d'une action directe. Ainsi, au cours de la pandémie, ce sont principalement les dirigeants de la lutte contre les maladies infectieuses et de la santé publique qui ont utilisé les données de surveillance des eaux usées, probablement en raison d'un manque de confiance dû à l'absence des antécédents et à

la méconnaissance des données, ainsi qu'à l'examen et à la pression du public associés à la pandémie. Nous espérons que ce travail et celui des autres établiront une base de cas d'utilisation qui améliorera la capacité d'action de la surveillance des eaux usées. Un cas d'utilisation prudente pourrait consister à maintenir des mesures de contrôle des infections à grande échelle sur la base des données de surveillance des eaux usées. Bien que plus d'un an se soit écoulé depuis la vague Delta, l'essai décrit ici reste pertinent, car des sous-lignées des VP Delta ont été observées dans des populations sauvages de cerfs de Virginie (27,28) et ce travail pourrait contribuer à la surveillance de l'expansion de la gamme d'hôtes de ce virus. Compte tenu du nombre élevé de cas asymptomatiques de la COVID-19 et des capacités de test limitées au niveau mondial, l'augmentation des capacités de surveillance par le suivi de la propagation des variants du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées peut contribuer aux efforts en matière de santé publique.

### Déclaration des auteurs

S. W. P. — Conceptualisation, méthodologie, investigation, validation, rédaction, visualisation  
J. D. — Méthodologie, investigation, validation  
C. D. — Méthodologie, investigation, validation  
A. N. — Conceptualisation, ressources, administration du projet  
M. R. M. — Conceptualisation, supervision, administration du projet  
C. S. M. — Conceptualisation, rédaction, supervision, recherche de financement, administration du projet

### Intérêts concurrents

Aucun.

### Financement

Ce travail a été soutenu par des fonds autogénérés de l'Agence de la santé publique du Canada.

### Remerciements

Nous tenons à remercier Stacie Langner, Umar Mohammed, Graham Cox, Quinn Wonitowy, Nestor Medina, Nataliya Zharska, Ravinder Lidder et Dave Spreitzer pour leur assistance technique et leur soutien. Chrystal Landgraff et Gary von Domselaar pour avoir fourni des données génomiques sur le SRAS-CoV-2 en circulation au Canada. Le personnel du laboratoire provincial Cadham chargé de la détection des virus, ainsi que les collectivités et les municipalités qui ont fourni des échantillons d'eaux usées à des fins d'analyse.





## Références

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5(4):536–44. [DOI PubMed](#)
2. Naveca F, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, Silva G, Costa A, Duarte D, Pessoa K, Goncalves L, Brandao MJ, Jesus M, Fernandes C, Pinto R, Silva M, Mattos T, Wallau GL, Siqueira MM, Resende PC, Delatorre E, Graf T. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein. <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585>
3. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, Doolabh D, Pillay S, San EJ, Msomi N, Mlisana K, von Gottberg A, Walaza S, Allam M, Ismail A, Mohale T, Glass AJ, Engelbrecht S, Van Zyl G, Preiser W, Petruccione F, Sigal A, Hardie D, Marais G, Hsiao NY, Korsman S, Davies MA, Tyers L, Mudau I, York D, Maslo C, Goedhals D, Abrahams S, Laguda-Akingba O, Alisoltani-Dehkordi A, Godzik A, Wibmer CK, Sewell BT, Lourenço J, Alcantara LC, Kosakovsky Pond SL, Weaver S, Martin D, Lessells RJ, Bhiman JN, Williamson C, de Oliveira T. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 2021;592(7854):438–43. [DOI PubMed](#)
4. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, Hinsley WR, Laydon DJ, Dabrera G, O'Toole Á, Amato R, Ragonnet-Cronin M, Harrison I, Jackson B, Ariani CV, Boyd O, Loman NJ, McCrone JT, Gonçalves S, Jorgensen D, Myers R, Hill V, Jackson DK, Gaythorpe K, Groves N, Sillitoe J, Kwiatkowski DP, Flaxman S, Ratmann O, Bhatt S, Hopkins S, Gandy A, Rambaut A, Ferguson NM; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* 2021;593(7858):266–9. [DOI PubMed](#)
5. World Health Organization Tracking SARS-CoV-2 Variants. Geneva (CH): WHO; 2023. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
6. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* 2021;62(11):961–8. [DOI PubMed](#)
7. Fisman DN, Tuite AR. Evaluation of the relative virulence of novel SARS-CoV-2 variants: a retrospective cohort study in Ontario, Canada. *CMAJ* 2021;193(42):E1619–25. [DOI PubMed](#)
8. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, Fera D, Shafer RW. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet* 2021;22(12):757–73. [DOI PubMed](#)
9. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, Choi PM, Kitajima M, Simpson SL, Li J, Tschärke B, Verhagen R, Smith WJ, Zaugg J, Dierens L, Hugenholtz P, Thomas KV, Mueller JF. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 2020;728:138764. [DOI PubMed](#)
10. Daigle J, Racher K, Hazenberg J, Yeoman A, Hannah H, Duong D, Mohammed U, Spreitzer D, Gregorchuk BS, Head BM, Meyers AF, Sandstrom PA, Nichani A, Brooks JI, Mulvey MR, Mangat CS, Becker MG. A sensitive and rapid wastewater test for SARS-COV-2 and its use for the early detection of a cluster of cases in a remote community. *Appl Environ Microbiol* 2022;88(5):e0174021. [DOI PubMed](#)
11. Kumar M, Patel AK, Shah AV, Raval J, Rajpara N, Joshi M, Joshi CG. First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Sci Total Environ* 2020;746:141326. [DOI PubMed](#)
12. Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Wiedera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ* 2021;751:141750. [DOI PubMed](#)
13. Graber TE, Mercier É, Bhatnagar K, Fuzzen M, D'Aoust PM, Hoang HD, Tian X, Towhid ST, Plaza-Diaz J, Eid W, Alain T, Butler A, Goodridge L, Servos M, Delatolla R. Near real-time determination of B.1.1.7 in proportion to total SARS-CoV-2 viral load in wastewater using an allele-specific primer extension PCR strategy. *Water Res* 2021;205:117681. [DOI PubMed](#)
14. Peterson SW, Lidder R, Daigle J, Wonitowy Q, Dueck C, Nagasawa A, Mulvey MR, Mangat CS. RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69-70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples. *Sci Total Environ* 2022;810:151283. [DOI PubMed](#)
15. Yaniv K, Ozer E, Shagan M, Lakkakula S, Plotkin N, Bhandarkar NS, Kushmaro A. Direct RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 variants of concern (Alpha, B.1.1.7 and Beta, B.1.351) detection and quantification in wastewater. *Environ Res* 2021;201:111653. [DOI PubMed](#)



16. Corchis-Scott R, Geng Q, Seth R, Ray R, Beg M, Biswas N, Charron L, Drouillard KD, D'Souza R, Heath DD, Houser C, Lawal F, McGinlay J, Menard SL, Porter LA, Rawlings D, Scholl ML, Siu KW, Tong Y, Weisener CG, Wilhelm SW, McKay RM. Averting an Outbreak of SARS-CoV-2 in a University Residence Hall through Wastewater Surveillance. *Microbiol Spectr* 2021;9(2):e0079221. [DOI PubMed](#)
17. Statistique Canada. Enquête canadienne sur les eaux usées (ECEU). Ottawa, ON : StatCan; 2022. <https://www.statcan.gc.ca/fr/enquete/entreprise/5280>
18. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. [DOI](#)
19. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):e115. [DOI PubMed](#)
20. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, Kamili S, Lynch B, Malapati L, Burke SA, Harcourt J, Tamin A, Thornburg NJ, Villanueva JM, Lindstrom S. CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg Infect Dis* 2020;26(8):1654–65. [DOI PubMed](#)
21. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, D'Agostino McGowan L, Francois R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pederson TL, Miller E, Bache SM, Muller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw* 2019;4(43):1686. [DOI](#)
22. Lee WL, Gu X, Armas F, Wu F, Chandra F, Chen H, Xiao A, Leifels M, Chua FJD, Kwok GWC, Tay JYR, Lim CYJ, Thompson J, Alm EJ. Quantitative detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 variants in wastewater by allele-specific RT-qPCR. *medRxiv* 2021.12.21.21268077. [DOI](#)
23. Crits-Christoph A, Kantor RS, Olm MR, Whitney ON, Al-Shayeb B, Lou YC, Flamholz A, Kennedy LC, Greenwald H, Hinkle A, Hetzel J, Spitzer S, Koble J, Tan A, Hyde F, Schroth G, Kuersten S, Banfield JF, Nelson KL. Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants. *MBio* 2021;12(1):e02703–20. [DOI PubMed](#)
24. Fontenele RS, Kraberger S, Hadfield J, Driver EM, Bowes D, Holland LA, Faleye TO, Adhikari S, Kumar R, Inchausti R, Holmes WK, Deitrick S, Brown P, Duty D, Smith T, Bhatnagar A, Yeager RA 2nd, Holm RH, von Reitzenstein NH, Wheeler E, Dixon K, Constantine T, Wilson MA, Lim ES, Jiang X, Halden RU, Scotch M, Varsani A. High-throughput sequencing of SARS-CoV-2 in wastewater provides insights into circulating variants. *Water Res* 2021;205:117710. [DOI PubMed](#)
25. Hodcroft E. CoVariants: Variant 21A (Delta). <https://covariants.org/variants/21A.Delta>
26. Nextstrain. Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months. [https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m?c=gt-N\\_377](https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m?c=gt-N_377)
27. McBride D, Garushyants S, Franks J, Magee A, Overend S, Huey D, Williams A, Faith S, Kandeil A, Trifkovic S, Miller L, Jeevan T, Patel A, Nolting J, Tonkovich M, Genders JT, Montoney A, Kasnyik K, Linder T, Bevins S, Lenocho J, Chandler J, DeLiberto T, Koonin E, Suchard M, Lemey P, Webby R, Nelson M, Bowman A. Accelerated evolution of SARS-CoV-2 in free-ranging white-tailed deer. *Res Sq* 2023;rs.3.rs-2574993. [DOI PubMed](#)
28. Caserta LC, Martins M, Butt SL, Hollingshead NA, Covalada LM, Ahmed S, Everts MR, Schuler KL, Diel DG. White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) may serve as a wildlife reservoir for nearly extinct SARS-CoV-2 variants of concern. *Proc Natl Acad Sci USA* 2023;120(6):e2215067120. [DOI PubMed](#)

## Appendice

**Tableau A1 : Séquences gBlock de témoins positifs pour les essais de réaction en chaîne quantitative de la polymérase après la transcription inverse en temps réel du variant Delta du SRAS-CoV-2**

Région	Allèle	Séquence
N D377Y	TS	AAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATGACGCATACAAAACATTCACCAACAGCCTAAAG-GACAAAAAGAAGGCTGATGAACTCAAGCCTTACCGAGCAGACAGAAACCAAACTGTGACTTCTCCTGCTGCAGATTG-GATGATTCTCCAAACAATTGCAA
	Variant	AAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATGACGCATACAAAACATTCACCAACAGCCTAAAG-GACAAAAAGAAGGCTTATGAACTCAAGCCTTACCGAGCAGACAGAAACCAAACTGTGACTTCTCCTGCTGCAGATTG-GATGATTCTCCAAACAATTGCAA

Abréviations : SRAS-CoV-2, coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère; TS, type sauvage





**Tableau A2 : Emplacement et nombre d'échantillons prélevés dans les stations de traitement des eaux usées et les stations de relèvement au Canada**

Code du site	Région	Période d'échantillonnage	Date de la première détection	Date du signal maximal	Nombre d'échantillons
AB1	Edmonton (AB)	Du 2021-07-08 au 2021-11-28	2021-07-18	2021-09-05	40
BC1	Vancouver (BC)	Du 2021-07-15 au 2021-11-28	2021-07-22	2021-09-12	37
BC2	Vancouver (BC)	Du 2021-07-12 au 2021-11-28	2021-07-22	2021-09-12	37
BC3	Vancouver (BC)	Du 2021-07-12 au 2021-11-28	2021-07-22	2021-09-12	38
BC4	Vancouver (BC)	Du 2021-07-12 au 2021-11-28	2021-07-22	2021-07-22	37
BC5	Vancouver (BC)	Du 2021-07-12 au 2021-11-28	2021-07-22	2021-09-05	38
NL1	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-04 au 2021-11-29	Non détectée	Non détectée	9
NL2	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-04 au 2021-11-29	2021-11-29	2021-11-29	9
NL3	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-04 au 2021-11-29	2021-11-16	2021-11-16	8
NL4	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-11-24 au 2021-11-24	Non détectée	Non détectée	14
NL5	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-06 au 2021-11-01	Non détectée	Non détectée	6
NL6	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-04 au 2021-11-29	2021-11-22	2021-11-22	9
NL7	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-07-14 au 2021-11-24	2021-07-21	2021-07-21	20
NL8	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-09-16 au 2021-11-29	Non détectée	Non détectée	8
NL9	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-14 au 2021-11-30	Non détectée	Non détectée	7
NL10	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-07-22 au 2021-11-24	2021-08-30	2021-08-30	20
NL11	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-07-13 au 2021-11-29	2021-09-02	2021-10-07	39
NL12	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-04 au 2021-11-30	2021-10-25	2021-10-25	9
NL13	Terre-Neuve-et-Labrador	Du 2021-10-14 au 2021-11-30	Non détectée	Non détectée	7
NS1	Halifax (NS)	Du 2021-07-05 au 2021-12-01	2021-08-23	2021-10-18	42
NS2	Halifax (NS)	Du 2021-07-05 au 2021-12-01	2021-08-04	2021-09-06	42
NS3	Halifax (NS)	Du 2021-07-05 au 2021-12-01	2021-08-30	2021-10-13	42
NT1	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-11-03 au 2021-11-24	2021-11-04	2021-11-10	15
NT2	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-10-19 au 2021-11-17	2021-09-20	2021-09-20	11
NT3	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-08-16 au 2021-11-08	2021-08-16	2021-09-20	16
NT4	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-08-16 au 2021-11-01	2021-08-19	2021-08-30	12
NT5	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-06-30 au 2021-11-23	2021-08-12	2021-09-23	53
NT6	Territoires du Nord-Ouest	Du 2021-08-19 au 2021-11-16	2021-08-19	2021-08-26	23
NU1	Nunavut	Du 2021-07-14 au 2021-11-29	2021-09-10	2021-11-15	54
NU2	Nunavut	Du 2021-07-22 au 2021-11-29	2021-08-17	2021-09-08	56
ON1	Toronto (ON)	Du 2021-07-11 au 2021-11-30	2021-07-11	2021-08-29	38
ON2	Toronto (ON)	Du 2021-07-11 au 2021-11-28	2021-07-18	2021-07-27	37
ON3	Toronto (ON)	Du 2021-07-11 au 2021-11-30	2021-07-18	2021-08-15	37
ON4	Toronto (ON)	Du 2021-07-11 au 2021-11-30	2021-08-03	2021-09-14	38
QC1	Montréal (QC)	Du 2021-07-14 au 2021-12-01	2021-07-21	2021-09-08	36
QC2	Montréal (QC)	Du 2021-07-17 au 2021-12-01	2021-08-11	2021-10-16	36

Abréviations : AB, Alberta; BC, Colombie-Britannique; NL, Terre-Neuve-et-Labrador; NS, Nouvelle-Écosse; NT, Territoires du Nord-Ouest; NU, Nunavut; ON, Ontario; QC, Québec