

GÉNOTYPAGE DES VIRUS INFLUENZA PAR PYROSÉQUENÇAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES (CODE 40512)

Avis d'évaluation

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1 Demandeur : CHUQ - Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

1.2 Date de demande d'examen : 30 juillet 2012.

1.3 Date de transmission de l'avis au ministre : 12 avril 2013.

Mise en garde :

Le présent avis est fondé sur les informations scientifiques et commerciales [déposées par le(s) demandeur(s) ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire] selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE(S)

2.1 Nom de la technologie : pyroséquençage des acides nucléiques de virus influenza¹.

2.2 Description brève de la technologie

Le pyroséquençage est une méthode de séquençage² qui comporte les étapes suivantes :

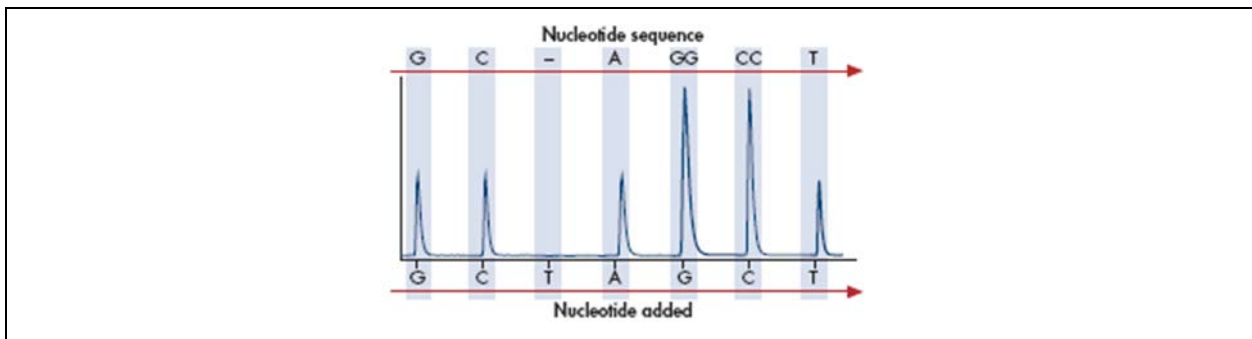
- choix d'un oligonucléotide complémentaire au produit d'amplification simple brin visé qui sert d'amorce à la polymérisation;
- incubation en présence des enzymes requises (ADN pol, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase) et de leurs substrats (dNTP, APS et luciférine);
- les nucléotides sont injectés au milieu réactionnel un à un en vue d'être potentiellement utilisés par l'ADN pol et ainsi incorporés au nouveau brin;

¹ Trois types de virus influenza (A, B et C), dont deux principaux (A et B), sont connus. Il existe plusieurs sous-types du virus influenza A et ils sont désignés en fonction de deux protéines retrouvées en sa surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). Contrairement au virus influenza A qui infecte plusieurs espèces, le virus influenza B infecte principalement les humains [Sheu *et al.*, 2010].

² Le séquençage sert à déterminer l'ordre des bases azotées qui constituent les acides nucléiques.

- d) si le nucléotide injecté est complémentaire à la matrice, une cascade enzymatique bioluminescente est déclenchée;
- e) si le nucléotide injecté n'est pas complémentaire à la matrice, celui-ci est dégradé et un autre nucléotide est injecté au milieu réactionnel;
- f) lors d'une incorporation en série du même nucléotide (GG, AAAA, CC, etc.), le pic de lumière est proportionnel au nombre de nucléotides incorporés dans la série.

Figure 1 Détermination de la séquence des nucléotides par pyroséquençage



© QIAGEN tous droits réservés. (Figure tirée du site Web de QIAGEN, disponible à : <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454&mn1=1366&mn2=1367>).

- 2.3 Société ou développeur :** aucune information n'a été fournie dans la demande.
- 2.4 Licence(s) :** aucune information n'a été fournie dans la demande.
- 2.5 Brevet, le cas échéant :** aucune information n'a été fournie dans la demande.
- 2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA) :** aucune information n'est disponible.
- 2.7 Valeur pondérée :** 49,0 selon les informations fournies dans la demande.

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Selon les informations fournies dans la demande, il s'agit des patients qui ont un résultat positif de RT-PCR pour virus influenza et pour qui le traitement antiviral est un échec (après cinq jours).

3.2 Description de la ou des maladies visée(s)

Les virus influenza sont d'importants pathogènes respiratoires qui causent, annuellement, l'hospitalisation de plus de 200 000 personnes aux États-Unis [Monto, 2009] et le décès d'approximativement un demi-million d'individus dans le monde [Englund, 2002]. Le génome de ces virus est constitué d'ARN simple brin et leur pouvoir de mutation est attribuable à leur ARN polymérase qui agit d'une façon telle que bon nombre d'erreurs sont créées lors de la réplication virale [Lauring et Andino, 2010; De la Torre et Holland 1990; Parvin *et al.*, 1986]. Plusieurs populations de virus sont ainsi produites au cours d'une infection et, en présence d'antiviraux, les seuls virus qui persistent sont ceux qui ont une ou des mutation(s) qui leur confère(nt) une résistance à ces médicaments [Mas *et al.*, 2010; Lackenby *et al.*, 2008]. Selon les informations fournies dans la demande, de 1 % à 2 % environ des souches de virus influenza sont résistantes à l'oseltamivir et la majorité est

résistante à l'amantadine. Pendant la saison grippale 2007-2008 au Canada, jusqu'à 26 % des isolats de virus influenza A H1N1 étaient résistants à l'oseltamivir [Eshaghi *et al.*, 2009]. Il ne semble pas y avoir de différences notoires, dans les symptômes ou la gravité, entre les infections causées par les virus résistants à l'oseltamivir et ceux qui y sont sensibles [Ciancio *et al.*, 2009; Dharan *et al.*, 2009].

3.3 Nombre de patients visés

Le volume provincial annuel est indéterminé selon les informations fournies dans la demande.

3.4 Spécialités médicales concernées (et autres professionnels, le cas échéant)

Microbiologie-infectiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Selon les informations fournies dans la demande, le pyroséquençage sera pratiqué en cas d'échec de traitement antiviral, par exemple chez les patients qui ont un résultat positif de TAAN (par RT-PCR) pour virus influenza après cinq jours d'oseltamivir.

Il est connu que le pyroséquençage (avec la RT-PCR) peut être fait à partir d'échantillons cliniques, par exemple ceux prélevés par écouvillonnage.

Selon la demande, l'analyse par pyroséquençage sera effectuée 1 fois par semaine et le délai d'attente de la réponse est de 48 heures. L'utilisation de l'analyse ne sera pas reliée au monitoring d'un médicament.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Unique ou complémentaire aux tests phénotypiques.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Selon l'ISIRV³, la surveillance de la sensibilité à l'amantadine s'effectue par **génotypage**⁴ du virus influenza, c'est-à-dire soit par séquençage du gène M avec la méthode de Sanger, soit par pyroséquençage de la région codant pour le domaine transmembranaire où se situent les cinq mutations connues de la protéine M2. Des essais **phénotypiques** (p. ex., dosage de la réduction des plages de lyse sur des cellules en culture) peuvent également être utilisés.

En ce qui a trait à la sensibilité à l'oseltamivir, la méthode traditionnelle **phénotypique** (ou plus précisément fonctionnelle) est le test d'inhibition de la neuraminidase, qui fait appel à la chimioluminescence ou à la fluorescence. Quant au **génotypage**, il ne saurait déterminer entièrement la susceptibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase, car la résistance à ces antiviraux est spécifique au médicament ainsi qu'au type et au sous-type de virus influenza⁵. L'approche prudente pour évaluer la susceptibilité aux inhibiteurs de la

³ International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases (ISIRV). Frequently Asked Questions – Methodology [site Web]. Disponible à : <http://www.isirv.org/site/index.php/methodology/faq-on-resistance-methodology>.

⁴ Une étape d'amplification des acides nucléiques par une PCR précède le génotypage proprement dit (séquençage par la méthode de Sanger ou pyroséquençage) [Okomo-Adhiambo *et al.*, 2013].

⁵ Bien que l'on connaisse certaines mutations de la neuraminidase qui engendrent une résistance ou une diminution de la susceptibilité [H275Y pour influenza A H1N1 saisonnier ou 2009 (pandémique); E119V, I222V ou R292K pour influenza A H3N2;

neuraminidase est d'utiliser l'essai phénotypique⁶ et de confirmer à l'aide d'essais génotypiques⁷ comme le séquençage par la méthode de Sanger ou le séquençage par pyroséquençage [Deyde *et al.*, 2010]. En ne considérant que la ou les mutation(s) connue(s), le pyroséquençage peut quand même être utilisé seul si le virus ne peut être isolé en prévision du test phénotypique [Deyde *et al.*, 2010].

Il existe divers protocoles de pyroséquençage pour le virus influenza A H1N1 (saisonnier et pandémique), H5N1 et H3N2, et pour le virus influenza B [Sheu *et al.*, 2010]. Un autre permet de détecter la résistance du virus influenza A H5N1 à la fois aux agents bloquants qui agissent sur la protéine M2 des canaux ioniques et aux inhibiteurs de la neuraminidase (sept marqueurs de résistance) [Deyde *et al.*, 2009a].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Contrairement à la méthode conventionnelle de Sanger (qui prend de 5h à 6h), le pyroséquençage se fait en temps réel et sans analyse sur gel, de sorte que, suite à la RT-PCR, 96 échantillons peuvent être analysés en 1,5 h à 2 h environ, et même parfois en moins de 1 h [Chantratita *et al.*, 2011]. Notamment, le pyroséquençage jumelé à la RT-PCR que Bao et ses collaborateurs [2011] ont décrit pour détecter, dans un laboratoire clinique, le résidu H275Y de la neuraminidase du virus influenza A H1N1 de 2009 (pandémique), nécessite moins de 8h et est décrit comme étant relativement simple d'exécution. Ainsi, le pyroséquençage peut être un moyen de déterminer, à temps, la susceptibilité à un médicament et d'aider la prise de décision dans le contrôle des virus influenza [Lackenby *et al.*, 2008]. De plus, le pyroséquençage a été décrit comme étant coût-efficace pour le diagnostic d'infections aviaires dues au virus influenza A H5N1 [Ellis *et al.*, 2007]. Le pyroséquençage est donc plus simple, plus rapide [Chantratita *et al.*, 2011] et moins coûteux que le séquençage par la méthode de Sanger [Bao *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011a].

4.4 Le coût de la technologie et des options : aucune analyse n'a été réalisée.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : ne s'applique pas.

5.1.2 Valeur diagnostique, pronostique ou thérapeutique

L'utilisation du pyroséquençage pour détecter la résistance aux antiviraux (p. ex., la résistance du virus influenza A H1N1 à l'oseltamivir lors de la pandémie de 2009) est bien adaptée au contexte clinique [Bao *et al.*, 2011]. En effet, il s'agit d'une analyse en temps réel dont les résultats peuvent être obtenus dans un délai acceptable d'un point de vue clinique [Lackenby *et al.*, 2008], notamment pour permettre un ajustement thérapeutique rapide [Hurt *et al.*, 2012]. Certains qualifient le pyroséquençage d'outil inestimable pour décider du traitement le plus approprié [Lackenby *et al.*, 2008]. Cette méthode, qui a le potentiel de discriminer plusieurs populations virales mélangées, est également utile à

R152K, D198E ou I222T pour influenza B], les mécanismes de résistance ne sont pas complètement compris et d'autres mutations, qui ne sont pas encore caractérisées, peuvent émerger.

⁶ Les essais phénotypiques permettent de détecter toute résistance, qu'elle soit due à une ou des mutation(s) connue(s) ou inconnue(s) [Okomo-Adhiambo *et al.*, 2013].

⁷ Contrairement aux essais phénotypiques, les essais génotypiques ne permettent la détection que des mutations connues [Okomo-Adhiambo *et al.*, 2013].

l'identification des individus à risque comme les patients immunosupprimés [Couturier *et al.*, 2010].

5.2 Validité clinique

La recherche documentaire n'a pas permis de repérer des études ayant évalué la validité de l'analyse dans un contexte clinique, en termes de sensibilité, de spécificité et de valeurs prédictives.

5.3 Validité analytique (ou technique)

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité		x	
Reproductibilité		x	
Sensibilité analytique	x		
Spécificité analytique	x		
Effet de matrice		x	
Concordance		x	
Corrélation entre test et comparateur		x	
Autres selon le type de test		x	

Sensibilité et spécificité

Deyde et ses collègues [2009a] ont montré que la sensibilité du pyroséquençage variait entre les dilutions 10^{-5} et 10^{-7} de stocks viraux d'influenza A H5N1, dont les concentrations variaient entre 10^5 et 10^8 unités formant des plages de lyse/ml. De plus, le pyroséquençage est assez sensible pour être pratiqué à partir d'un spécimen clinique [Deyde *et al.*, 2009b] [Duwe et Schweiger, 2008; Lackenby *et al.*, 2008] (contrairement au test d'inhibition de la neuraminidase qui ne peut être pratiqué qu'avec des virus issus de cultures cellulaires [Deng *et al.*, 2011b]). Le pyroséquençage est d'ailleurs capable de détecter la mutation H275Y lorsqu'elle est présente dans une proportion aussi faible que 5 % d'un mélange de populations virales (cette mutation devrait se retrouver dans une proportion minimale de 25 % pour être détectée par le test d'inhibition de la neuraminidase) [Deng *et al.*, 2011b]⁸. En utilisant le pyroséquençage, Deng et ses collaborateurs [2011a] ont pu parfaitement discriminer les virus influenza A H1N1 saisonnier, H3N2 et H1N1 pandémique et deux souches de H3N2. De la même manière, le pyroséquençage jumelé à la RT-PCR décrite par Bao et ses collaborateurs [2011] est spécifique au virus influenza A H1N1 de 2009 (pandémique) et n'a pas produit de faux positifs à partir d'autres virus ou de bactéries. Les équipes de Bao et ses collaborateurs [2011] et de Lackenby et ses collègues [2008] ont rapporté des sensibilités analytiques du pyroséquençage pour la détection du résidu H275Y ($43-417$ TCID₅₀/ml⁹) qui étaient similaires.

⁸ Cet avantage est important parce que de tels mélanges de populations virales sont communément présents dans les échantillons cliniques [Abed *et al.*, 2006; Gubareva *et al.*, 2001; Gubareva *et al.*, 1998].

⁹ TCID₅₀/ml (50 % Tissue Culture Infective Dose/ml): concentration virale qui produira des changements pathologiques dans 50 % de la culture.

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

Le pyroséquençage des acides nucléiques des virus influenza est utilisé dans plusieurs pays (États-Unis, Australie, etc.) et deux protocoles¹⁰ pour le virus influenza A H1N1, l'un qui concerne la protéine M2 et l'autre la neuraminidase, ont été émis par les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) qui agissent à titre de Centre collaborateur de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en matière d'influenza pour les Amériques.

6 RÉPERCUSSIONS À ANTICIPER DE L'INTRODUCTION ÉVENTUELLE DE L'ANALYSE

6.1 Impact sur les ressources matérielles et humaines : n'a pas été évalué.

6.2 Conséquences économiques d'une introduction dans le système de santé et de services sociaux québécois : n'ont pas été évaluées.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

Divers gènes qui codent pour des constituants des virus influenza varient beaucoup et les souches virales en circulation peuvent être remplacées, au fil des saisons, par d'autres qui sont génétiquement différentes, ce qui représente un défi pour la création d'amorces et l'applicabilité du pyroséquençage [Deyde et Gubareva, 2009]. Toutefois, l'approche par pyroséquençage est relativement flexible et peut être modifiée aussitôt que de nouveaux marqueurs de résistance sont établis [Deyde *et al.*, 2009b].

À l'heure actuelle, la mutation H275Y est la principale mutation responsable de la résistance du virus influenza A H1N1 pandémique à l'oseltamivir, ce qui fait du pyroséquençage la méthode idéale pour la surveiller (monitorage), car il s'agit d'une méthode sensible, précise, capable d'analyser bon nombre d'échantillons et surtout, capable de détecter des mutations directement dans des échantillons cliniques qui contiennent des mélanges de populations virales [Deng *et al.*, 2011b].

Le pyroséquençage est associé à des contrats de maintenance coûteux, de l'équipement spécialisé et des réactifs [Okomo-Adhiambo *et al.*, 2013]. Toutefois, la plateforme de pyroséquençage peut être rentabilisée, car elle est aussi utilisée pour le diagnostic d'autres pathogènes ou de désordres génétiques [Deyde *et al.*, 2009b].

Il y a eu une utilisation croissante du pyroséquençage dans divers laboratoires (de santé publique, cliniques et de recherche) et dans un avenir très proche, le pyroséquençage a le potentiel de devenir une méthode de routine pour le séquençage de l'ADN comme l'est actuellement le séquençage par la méthode de Sanger [Deyde et Gubareva, 2009].

¹⁰ World Health Organization. Influenza A (H1N1) M2 detailed pyrosequencing protocol for antiviral susceptibility testing - 13 May 2009, et Influenza A (H1N1) NA-H274 detailed pyrosequencing protocol for antiviral susceptibility testing - 13 May 2009. Disponibles à : http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/pyrosequencing_protocol/en/index.html#.

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Génotypage des virus influenza par pyroséquençage des acides nucléiques (code 40512)

Le statut de la technologie diagnostique :

- ☒ Établie
- ☐ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie : _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS :

- ☒ Avis de recommandation de maintien
- ☐ Avis de refus de maintien
- ☐ Avis de réévaluation

Recommandation additionnelle :

- ☐ Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- ☐ Décision de production d'un guide d'usage optimal
- ☐ Production d'indicateurs, dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Abed Y, Baz M, Boivin G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther* 2006;11(8):971-6.
- Bao JR, Huard TK, Piscitelli AE, Tummala PR, Aleemi VE, Coon SL, et al. Reverse-transcription polymerase chain reaction/pyrosequencing to characterize neuraminidase H275 residue of influenza A 2009 H1N1 virus for rapid and specific detection of the viral oseltamivir resistance marker in a clinical laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71(4):396-402.
- Chantratita W, Sukasem C, Sirinavin S, Sankuntaw N, Srichantaratsamee C, Pasomsub E, Malathum K. Simultaneous detection and subtyping of H274Y-positive influenza A (H1N1) using pyrosequencing. *J Infect Dev Ctries* 2011;5(5):348-52.
- Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill* 2009;14(46).
- Couturier BA, Bender JM, Schwarz MA, Pavia AT, Hanson KE, She RC. Oseltamivir-resistant influenza A 2009 H1N1 virus in immunocompromised patients. *Influenza Other Respi Viruses* 2010;4(4):199-204.
- De la Torre JC et Holland JJ. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* 1990;64(12):6278-81.
- Deng YM, Caldwell N, Barr IG. Rapid detection and subtyping of human influenza A viruses and reassortants by pyrosequencing. *PLoS One* 2011a;6(8):e23400.
- Deng YM, Caldwell N, Hurt A, Shaw T, Kelso A, Chidlow G, et al. A comparison of pyrosequencing and neuraminidase inhibition assays for the detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. *Antiviral Res* 2011b;90(1):87-91.
- Deyde VM et Gubareva LV. Influenza genome analysis using pyrosequencing method: Current applications for a moving target. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(5):493-509.
- Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimov AI, Gubareva LV. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):1102-10.
- Deyde VM, Nguyen T, Bright RA, Balish A, Shu B, Lindstrom S, et al. Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrob Agents Chemother* 2009a;53(3):1039-47.
- Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, Wallis TR, Fry A, Dharan N, et al. Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral Res* 2009b;81(1):16-24.

- Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* 2009;301(10):1034-41.
- Duwe S. et Schweiger B. A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. *J Virol Methods* 2008;153(2):134-41.
- Ellis JS, Smith JW, Braham S, Lock M, Barlow K, Zambon MC. Design and validation of an H5 TaqMan real-time one-step reverse transcription-PCR and confirmatory assays for diagnosis and verification of influenza A virus H5 infections in humans. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1535-43.
- Englund JA. Antiviral therapy of influenza. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13(2):120-8.
- Eshaghi A, Bolotin S, Burton L, Low DE, Mazzulli T, Drews SJ. Genetic microheterogeneity of emerging H275Y influenza virus A (H1N1) in Toronto, Ontario, Canada from the 2007-2008 respiratory season. *J Clin Virol* 2009;45(2):142-5.
- Gubareva LV, Kaiser L, Matrosovich MN, Soo-Hoo Y, Hayden FG. Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. *J Infect Dis* 2001;183(4):523-31.
- Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 1998;178(5):1257-62.
- Hurt AC, Chotpitayasunondh T, Cox NJ, Daniels R, Fry AM, Gubareva LV, et al. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: Public health, laboratory, and clinical perspectives. *Lancet Infect Dis* 2012;12(3):240-8.
- Lackenby A, Democratis J, Siqueira MM, Zambon MC. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasiespecies. *Antivir Ther* 2008;13(6):809-20.
- Lauring AS et Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 2010;6(7):e1001005.
- Mas A, Lopez-Galindez C, Cacho I, Gomez J, Martinez MA. Unfinished stories on viral quasiespecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol* 2010;397(4):865-77.
- Monto AS. The risk of seasonal and pandemic influenza: Prospects for control. *Clin Infect Dis* 2009;48(Suppl 1):S20-5.
- Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, Gubareva LV. Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. *Influenza Other Respi Viruses* 2013;7(Suppl 1):44-9.
- Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: Influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 1986;59(2):377-83.
- Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, Klimov AI, Gubareva LV. Detection of antiviral resistance and genetic lineage markers in influenza B virus neuraminidase using pyrosequencing. *Antiviral Res* 2010;85(2):354-60.