

GÉNOTYPAGE DES VIRUS INFLUENZA PAR SÉQUENÇAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES (CODE 40513)

Avis d'évaluation

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

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

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

Séquençage¹ des acides nucléiques de virus influenza² par la méthode traditionnelle de Sanger [Sanger *et al.*, 1977], aussi nommée méthode didésoxy.

2.2 Description brève de la technologie

La méthode de Sanger, qui domine le séquençage depuis 1977 [Shendure *et al.*, 2011], est bien établie, par exemple pour la caractérisation du virus influenza A [Shinde *et al.*, 2009; Hiromoto *et al.*, 2000; Lindstrom *et al.*, 1998]. Elle comporte les étapes suivantes :

- a) choix d'une amorce spécifique complémentaire à un seul brin d'une matrice d'ADN amplifiée (par PCR ou par RT-PCR);

¹ Le séquençage sert à déterminer l'ordre des bases azotées qui constituent les acides nucléiques.

² 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].

- b) incubation de la matrice, de l'amorce et de l'ADN pol en présence de désoxynucléotides (dNTP) non marqués et de didésoynucléotides (ddNTP) marqués d'un fluorophore unique;
- c) la polymérisation des molécules se poursuit jusqu'à l'incorporation d'un ddNTP qui stoppe la chaîne (terminaison aléatoirement distribuée pour chaque molécule);
- d) les produits de séquence de tailles différentes sont purifiés selon leur poids moléculaire par électrophorèse capillaire;
- e) un laser parcourt le capillaire et excite le fluorochrome du ddNTP terminal de chaque fragment séparé selon sa longueur;
- f) la séquence des signaux de fluorescence émise est analysée et permet de déduire la séquence des nucléotides.

Figure 1 Représentation schématique du séquençage par la méthode didésoxy

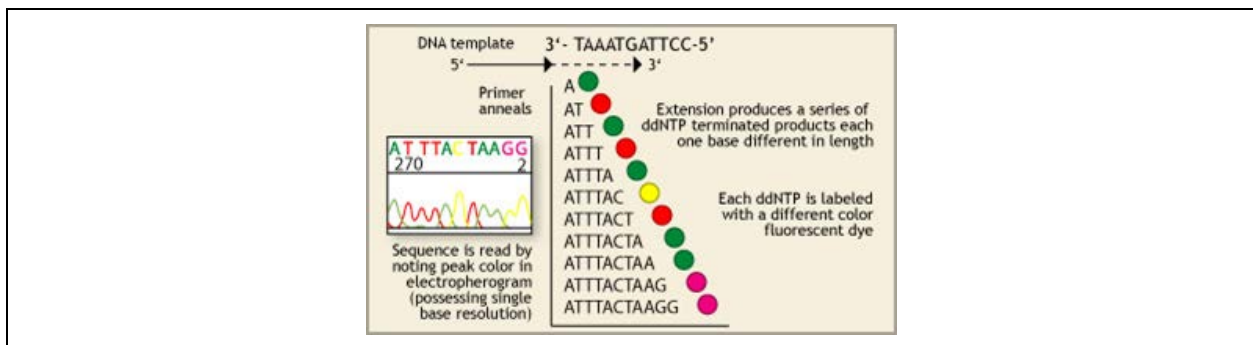


Image gracieusement fournie par National Forensic Science Technology Center, from NIJ's DNA analyst training program (Figure tirée du site Web de la NFSTC, disponible à : http://projects.nfstc.org/gallery/main.php?g2_itemId=3566).

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 : 54,0 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). Si une méthode permettant de détecter des mutations communes (p. ex., pyroséquençage) échoue en première ligne, la méthode de Sanger pourrait être utilisée pour séquencer le virus en entier.

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 fait bon nombre d'erreurs 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 séquençage sera pratiqué chez les patients qui ont un résultat positif de TAAN (par RT-PCR) pour virus influenza après cinq jours d'antiviral. Les analyses seront effectuées au laboratoire du demandeur 1 fois par semaine et le délai d'attente de la réponse est de 96 heures.

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, le **génotypage**⁴ du virus influenza est une méthode acceptée pour la surveillance de la susceptibilité à l'amantadine, que ce soit par séquençage du gène M avec la méthode de Sanger, ou 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 plaques 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; ce test fait appel à la chimioluminescence ou à la fluorescence. Quant au **génotypage**,

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].

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 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]. Par ailleurs, de nombreuses autres méthodes, comme la RT-PCR qui couvrent la mutation H275Y [Nakauchi *et al.*, 2011; Mahony *et al.*, 2010], sont en développement afin de mieux répondre aux besoins des laboratoires en milieu hospitalier (rapidité, simplicité, etc.).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La méthode de Sanger permet, en comparant la séquence étudiée à une séquence de type sauvage, d'identifier toutes les mutations, qu'elles soient connues ou non. Les séquenceurs de première génération permettent de séquencer jusqu'à 1 000 nucléotides tout en automatisant certaines étapes de la méthode de Sanger qui prennent du temps (séparation des fragments, analyse, etc.) [Shendure *et al.*, 2011].

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

La méthode de Sanger est la méthode de référence pour révéler la séquence du génome viral et pour détecter ainsi des mutations associées ou non à la résistance aux antiviraux. Cependant elle n'est peut-être pas assez rapide pour être pertinente dans un contexte clinique et pour permettre d'ajuster le traitement en conséquence.

5.2 Validité clinique

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

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; 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].

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

La méthode de Sanger est la méthode de référence. Toutefois, en ce qui concerne la sensibilité, elle ne peut détecter une population de virus présente dans une proportion de moins de 20 % à 25 % d'un mélange [Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007].

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

Aucune recommandation n'a été repérée.

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)

À l'exception des 30 à 50 premières paires de bases [Pourmand *et al.*, 2006], le séquençage de la totalité des gènes par la méthode de Sanger est précis pour la détection de changements dans le génome viral, ce qui en fait la méthode de choix pour identifier les changements, nouveaux ou établis, qui peuvent être associés à la résistance aux antiviraux. C'est ce qui distingue en effet le séquençage par la méthode de Sanger puisque le pyroséquençage, par exemple, ne peut ni séquencer la totalité du génome, ni révéler des mutations inconnues.

Par contre, rappelons que la méthode de Sanger n'est pas fiable pour discriminer des populations virales mélangées, car elle ne peut détecter une population de virus présente dans une proportion de moins de 20 % à 25 % [Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007], alors que le pyroséquençage peut en détecter qui sont présentes dans une proportion de 5 % [Deng *et al.*, 2011].

De plus, la détection rapide de la résistance est essentielle en clinique pour dicter les soins appropriés aux patients [Bao *et al.*, 2011]. Or, selon la revue narrative d'Okomo-Adhiambo et ses collègues [2013], la méthode de Sanger prend du temps, est laborieuse et est

coûteuse. En effet, même quand le séquençage est automatisé, comme dans le protocole utilisé par Suppiah et ses collaborateurs [2011], des étapes d'isolement (purification) des virus (p. ex., par culture de cellules), de l'ARN et des produits d'amplification sont nécessaires. Par ailleurs, il a été récemment recommandé que les virus analysés proviennent directement d'échantillons cliniques plutôt qu'ils ne soient purifiés par culture sur des cellules en laboratoire, car la réplication dans ces dernières peut être différente de ce qui se passe en réalité dans le corps humain (peut mener à une sélection de particules virales qui n'est pas représentative de la réalité, etc.) [Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010; Hurt *et al.*, 2009].

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Génotypage des virus influenza par séquençage des acides nucléiques (code 40513)

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

- 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.
- Chen LF, Dailey NJ, Rao AK, Fleischauer AT, Greenwald I, Deyde VM, et al. Cluster of oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infections on a hospital ward among immunocompromised patients—North Carolina, 2009. *J Infect Dis* 2011;203(6):838-46.
- 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).
- 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, 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* 2011;90(1):87-91.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hiromoto Y, Yamazaki Y, Fukushima T, Saito T, Lindstrom SE, Omoe K, et al. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 5):1293-303.
- Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 2009;83(20):10366-73.
- Lackenby A, Democratis J, Siqueira MM, Zambon MC. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies. *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.

- Lindstrom S, Endo A, Sugita S, Pecoraro M, Hiromoto Y, Kamada M, et al. Phylogenetic analyses of the matrix and non-structural genes of equine influenza viruses. *Arch Virol* 1998;143(8):1585-98.
- Mahony JB, Chong S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M. Development of a novel bead-based multiplex PCR assay for combined subtyping and oseltamivir resistance genotyping (H275Y) of seasonal and pandemic H1N1 influenza A viruses. *J Clin Virol* 2010;49(4):277-82.
- Mas A, Lopez-Galindez C, Cacho I, Gomez J, Martinez MA. Unfinished stories on viral quasispecies 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.
- Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, et al. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol* 2011;83(7):1121-7.
- 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.
- Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Sleeman K, Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: Implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res* 2010;85(2):381-8.
- 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.
- Pourmand N, Diamond L, Garten R, Erickson JP, Kumm J, Donis RO, Davis RW. Rapid and highly informative diagnostic assay for H5N1 influenza viruses. *PLoS One* 2006;1:e95.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
- Shendure JA, Porreca GJ, Church GM, Gardner AF, Hendrickson CL, Kieleczawa J, Slatko BE. Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Biol* 2011;Chapter 7:Unit7.1.
- 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.
- Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 2009;360(25):2616-25.
- Suppiah J, Yusof MA, Othman KA, Saraswathy TS, Thayan R, Kasim FM, et al. Monitoring of the h275y mutation in pandemic influenza A(H1N1) 2009 strains isolated in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011;42(1):100-4.
- Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007;17(8):1195-201.