

GÉNOTYPAGE DU CYTOMÉGALOVIRUS (OU DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX) CONCERNANT LA RÉSISTANCE AU GANCICLOVIR (ACICLOVIR) ET AU FOSCARNET (CODE 40514)

Avis d'évaluation

1 INFORMATIONS GÉNÉRALES

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

1.2 Date de demande d'examen : 1^{er} janvier 2011.

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

Test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) suivi du séquençage de l'ADN amplifié.

2.2 Description brève de la technologie

Le demandeur a précisé que la méthode de séquençage d'ADN utilisée est le séquençage conventionnel de Sanger après amplification des acides nucléiques par réaction en chaîne par polymérase (PCR ou *polymerase chain reaction*).

Cette technique comprend six étapes :

- choix d'une amorce spécifique complémentaire à un seul brin d'une matrice d'ADN amplifiée (PCR ou RT-PCR);
- incubation de la matrice, de l'amorce et de l'ADN polymérase en présence de désoxynucléotides (dNTP) non marqués et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués d'un fluorophore unique;
- 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

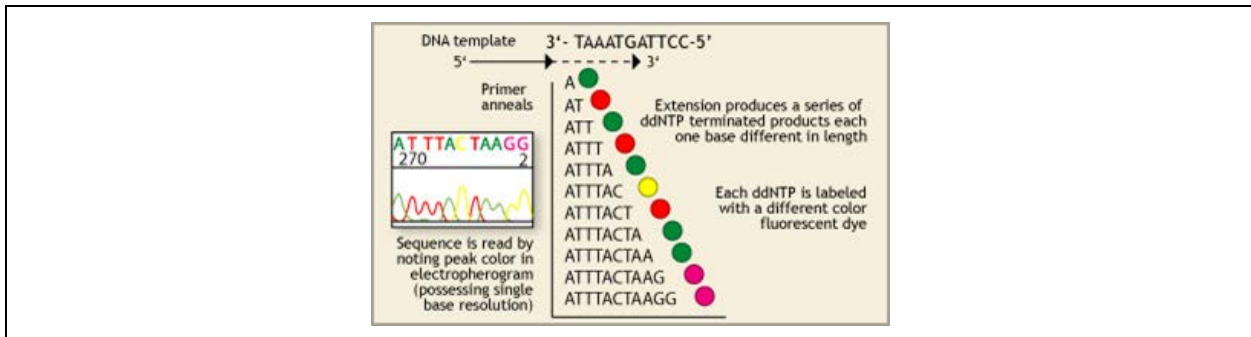


Image gracieusement fournie par National Forensic Science Technology Center, from NIJ's DNA analyst training program (Figure tirée du site Web de la NFSTC, disponible à : http://projects.nfstc.org/gallery/main.php?g2_itemId=3566).

Ce service est offert au laboratoire du demandeur une fois par semaine. Les résultats sont obtenus après dix jours ouvrables.

2.3 Société ou développeur

Procédure maison offerte seulement au CHUQ-CHUL. Le demandeur est un expert dans le domaine.

2.4 Licence(s) : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : non.

2.6 Statut d'homologation (*Santé Canada, FDA*) : ne s'applique pas.

2.7 Valeur pondérée : selon le demandeur, la valeur pondérée de l'analyse est de 118,7.

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

3.1 Patients ciblés

L'analyse sera effectuée chez des sujets immunosupprimés avec échec au traitement au ganciclovir (GCV) (aciclovir) et (ou) au foscarnet (FOS). La suspicion de résistance du cytomégalo virus (CMV) à l'antiviral fait aussi partie des indications cliniques pour lesquelles l'analyse peut être prescrite. Le TAAN doit être positif¹.

¹ L'absence de signal au PCR pourrait s'expliquer par l'absence d'ADN viral ou en raison d'une préparation d'ADN viral de mauvaise qualité (la qualité de la séquence est beaucoup influencée par la qualité de la préparation de l'ADN viral).

3.2 Description de la ou des maladies visée(s)

Le CMV est un virus de la famille des *herpes virus* dont font partie l'herpès simplex, le virus d'Epstein-Barr et le virus varicelle-zona. Sa prévalence est élevée : de 30 % à 100 % des personnes sont infectées par le CMV selon les régions du globe considérées. Il s'agit habituellement d'une infection mineure. Par contre, la gravité des infections au CMV au cours du sida, après transplantation d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques, et au cours de toute maladie nécessitant ou entraînant une immunosuppression cellulaire importante (lymphome, corticothérapie prolongée) justifie l'utilisation de traitements antiviraux, curatifs et préventifs [Alain *et al.*, 2009]. L'émergence de souches de CMV résistantes est une préoccupation particulièrement chez les personnes immunosupprimées [Drew, 2010; Kotton *et al.*, 2010; Alain *et al.*, 2009]. Cette résistance survient généralement lors d'une exposition prolongée de quelques semaines à quelques mois et se caractérise par le maintien de la charge virale ou de la maladie malgré la pharmacothérapie [Kotton *et al.*, 2010; Alain *et al.*, 2009]. Elle concerne près de 5 % des receveurs d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques, et représente un facteur d'évolution défavorable après greffe [Alain *et al.*, 2009]. Les principaux antiviraux utilisés contre le CMV sont le ganciclovir, son pro-médicament le valganciclovir (VGCV), le cidofovir (CDV) et le foscarnet [Hamilton, 2012]. La réponse au traitement permet en général d'obtenir une charge virale indétectable en trois semaines [Alain *et al.*, 2009]. La non-réponse peut s'expliquer par des facteurs virologiques (résistance) et pharmacologiques (sous-dosage de l'antiviral ou mauvaise pénétration au site de l'infection) ou peut être causée par l'immunosuppression. La recherche de mutations de résistance aux antiviraux déjà reçus par la personne permet de distinguer les non-répondeurs ou les répondeurs lents (à fort risque de rechute) des véritables résistances virologiques, et d'adapter le traitement antiviral [Alain *et al.*, 2009]. Les mutations du gène UL97 (protéine kinase) ou du gène UL54 (polymérase) confèrent les principales résistances aux précédents antiviraux. Les mutations du gène UL97 sont liées à la résistance au GCV et au VGCV croisée avec l'aciclovir et son pro-médicament le valaciclovir. Les mutations du gène UL54 plus tardives peuvent conduire à une résistance croisée au GCV et au CDV, à une résistance au FOS ou à une résistance croisée aux trois antiviraux [Alain *et al.*, 2009].

3.3 Nombre de patients visés

Le demandeur estime à 200 le nombre attendu d'analyses pour les trois prochaines années au CHUL du CHU de Québec.

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

Principalement microbiologie médicale et infectiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Le génotypage permet d'identifier les mutations connues et nouvelles à partir des particules virales isolées directement au site d'infection [Alain *et al.*, 2009]. Le spécimen peut être du plasma, du sang total ou un isolat viral [ASPC, 2011]. Le spécimen peut être conservé à la température de la pièce lorsque livré au laboratoire dans les 24 heures suivant le prélèvement [DUHS, 2011]. Il doit être conservé entre 2°C et 8°C lorsque livré dans les 72 heures suivant le prélèvement. Enfin, il faut séparer le plasma dans un sac stérile et le livrer gelé si le délai de livraison est de plus de 72 heures [DUHS, 2011]. Les isolats viraux doivent être congelés en tout temps et expédiés sur de la glace sèche [ASPC, 2011].

Afin de déterminer la résistance du CMV aux antiviraux, les gènes UL54 et UL97 du CMV sont amplifiés par PCR et séquencés. Les données sur la séquence du CMV sont ensuite analysées

par bioinformatique en comparant la séquence obtenue et celle d'un génotype sauvage de référence, et les mutations sont identifiées. L'Agence de santé publique du Canada suggère d'interpréter les résultats avec prudence puisque cette épreuve est utilisée à des fins de recherche seulement [ASPC, 2011].

Le laboratoire de l'université Duke utilise l'amplification des gènes UL54 et UL97 par PCR, suivi du séquençage d'ADN par la méthode de Sanger pour détecter les mutations conférant au CMV une résistance aux antiviraux [DUHS, 2011]. Ce laboratoire utilise l'amorce universelle M13 lors de l'amplification de l'ADN du CMV. Le délai d'exécution de ce test, utilisé en clinique, est de 14 jours [DUHS, 2011].

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Unique si l'on considère que le phénotypage exige un délai beaucoup trop long pour être acceptable en milieu clinique.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'étude du phénotype de résistance reste la méthode de référence, indispensable pour mesurer l'efficacité des antiviraux [Alain *et al.*, 2009]. La technique du génotypage a été développée en raison du délai de quatre semaines que prend généralement le phénotypage et de la subjectivité liée à l'analyse de ses résultats [James et Prichard, 2011; Alain *et al.*, 2009]. Le génotypage est devenu la méthode préférée dans la plupart des laboratoires parce qu'elle est plus pratique pour détecter des mutations liées aux résistances [James et Prichard, 2011; Drew, 2010].

Principalement trois méthodes de génotypage permettent un diagnostic rapide de mutations responsables des résistances aux antiviraux : l'analyse du patron des endonucléases de restriction (*restriction endonuclease analysis*), la PCR en temps réel (*real-time PCR*) et le séquençage d'ADN [Lurain et Chou, 2010]. L'étalon or parmi les méthodes de génotypage énumérées est le séquençage d'ADN [Lurain et Chou, 2010].

Le séquençage d'ADN selon la méthode de Sanger² est présentement la méthode de choix, et ce, même si sa limite de détection pour les mutants en minorité est relativement élevée (de 20 % à 30 % de la population) [Kampmann *et al.*, 2011; Schuurman *et al.*, 1999]. De nouvelles méthodes, comme le pyroséquençage [Ronaghi, 2001] ou le séquençage ultrasensible (*ultra-deep sequencing*), ont été développées pour offrir une détection plus sensible des mutants dans une population virale mixte [Fox *et al.*, 2009].

Le séquençage conventionnel de type Sanger après amplification par PCR permet de lire des séquences de paires de bases plus longues et avec moins d'erreurs que la méthode *ultra deep sequencing* [James et Prichard, 2011]. Cette particularité n'est pas importante pour le gène UL97 puisqu'il est court, mais elle le devient pour étudier les mutations du gène UL54, qui est beaucoup plus long. La grande taille du gène UL54 et la variété des sites mutationnels connus conférant une résistance aux antiviraux obligent un séquençage d'ADN sur au moins 2 500 paires de bases [James et Prichard, 2011].

² Aussi appelé séquençage standard au *fluorescent dideoxy* après amplification des acides nucléiques.

Peu importe la méthode de séquençage d'ADN, l'interprétation des mutations détectées doit se faire par le biais des données disponibles dans la littérature sur les mutations conférant des résistances documentées. Il est essentiel en clinique de pouvoir discriminer entre les polyphormismes et les mutations responsables de résistances aux antiviraux [Piret et Boivin, 2011]. Le phénotypage reste la méthode indispensable pour constituer la base des données sur les mutations conférant une résistance antivirale [Kotton *et al.*, 2010; Alain *et al.*, 2009].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Les avantages cliniques précisés par le demandeur sont les suivants : l'utilisation directe du spécimen sans amplification virale par culture, sa rapidité, l'identification de la mutation qui confère la résistance du virus à l'antiviral, l'évaluation de la résistance croisée avec un autre antiviral ainsi que le suivi de la présence, la disparition ou l'ajout d'autres mutations au cours du temps.

4.4 Le coût de la technologie et des options : n'a pas été analysé.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 La pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Remplace le phénotypage (depuis longtemps déclassé en clinique).

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

En termes de résultats pour le patient, la détection génotypique rapide de résistances, telles que celles développées pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B (VHB) et le CMV, représente une approche attirante [Frobert *et al.*, 2008].

5.1.3 Valeur thérapeutique

En termes de choix thérapeutiques associés au résultat du test, le passage du GCV au FOS est suggéré si le génotypage montre une mutation du gène UL97 associée à une augmentation de plus de cinq fois la résistance au ganciclovir [Kotton *et al.*, 2010]. Les mutations du gène UL97 conférant un degré de résistance moins élevé peuvent permettre l'usage du GCV à une dose augmentée (entre 5 mg/kg et 10 mg/kg deux fois par jour si la fonction rénale est normale), mais le génotypage du gène UL54 est suggéré. Le passage du GCV au FOS est suggéré en cas de mutation du gène UL54 conférant une résistance au GCV. Le CDF n'est généralement pas recommandé comme solution de rechange lors de résistance au GCV à cause de la fréquente résistance croisée GCV-CDV, à moins que la mutation UL54 soit absente et que l'infection ne soit pas grave. D'autres suggestions sont proposées en cas de résistances aux antiviraux dans les lignes directrices internationales sur le traitement des infections à CMV chez les porteurs d'organes solides transplantés [Kotton *et al.*, 2010].

5.2 Validité clinique

TERMES	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Sensibilité	x		
Spécificité		x	
Valeur prédictive positive (VPP)		x	
Valeur prédictive négative (VPN)		x	
Rapport de vraisemblance (LR)		x	
Courbe ROC		x	

Sensibilité

Le séquençage standard au *fluorescent dideoxy* après amplification des acides nucléiques (PCR) peut détecter une sous-population de mutants résistants dans une population encore sensible aux antviraux lorsque ceux-ci représentent environ de 20 % à 30 % du total. Cette mesure de sensibilité est basée sur les données de séquençage diagnostique avec le VIH de type 1 [Lurain et Chou, 2010; Schuurman *et al.*, 1999]. Les nouvelles technologies de pyroséquençage et de séquençage ultrasensible (*deep sequencing*) permettent une détection, même si la sous-population de mutants résistants représente respectivement environ 6 % et moins de 1 % de la population totale [Lurain et Chou, 2010].

L'*ultra-deep sequencing* est une technologie encore trop coûteuse et impraticable pour le diagnostic [Lurain et Chou, 2010]. Il y a encore trop d'incertitudes concernant le coût et les performances des nouvelles méthodes de séquençage [Shendure *et al.*, 2011]. L'*ultra-deep sequencing* a cependant beaucoup d'avenir relativement à l'étude de l'influence de l'usage des antviraux sur l'émergence des résistances [Lurain et Chou, 2010].

Par ailleurs, le profil de résistance du CMV peut varier selon le site de prélèvement chez un même patient. Ainsi, la grande sensibilité du génotypage peut être trompeuse si les spécimens analysés d'un seul site, par exemple le sérum, ne sont pas représentatifs de la population de CMV chez une personne [James et Prichard, 2011]. Les lignes directrices internationales sur le traitement des infections à CMV chez les porteurs d'organes solides transplantés suggèrent de répéter le génotypage deux semaines après un premier test négatif s'il n'y a pas diminution de la charge virale ou amélioration de l'état général de la personne infectée [Kotton *et al.*, 2010]. Ce deuxième génotypage devra tester les gènes l'UL97, mais aussi UL54 [Kotton *et al.*, 2010].

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	

Reproductibilité

La reproductibilité de ce test est meilleure si la concentration du spécimen étudié fait 1 000 copies/ml [Drew, 2010; Alain *et al.*, 2009]. La reproductibilité et le succès du génotypage dépendent de la disponibilité de données validées de phénotypage sur les mutations conférant des résistances aux antiviraux [Chevillotte *et al.*, 2010].

Le génotypage n'apporte pas de résultats quantitatifs (proportion inconnue de la population virale affectée par la ou les mutations) [Drew, 2010]. De plus, l'interprétation des résultats constitue une difficulté majeure avec cette technique à cause des mutations non pertinentes qu'elle peut détecter [Drew, 2010].

5.4 Les recommandations favorables d'introduction dans les autres juridictions

Aucune information n'a été repérée. Toutefois, on sait que le génotypage est une méthode rapide pour identifier la résistance aux antiviraux et qu'elle est utilisée dans un nombre croissant de laboratoires.

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

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

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

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique) : n'ont pas été analysés.

7 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Génotypage du cytomégalo virus (ou du virus herpès simplex) concernant la résistance au ganciclovir (aciclovir) et au foscarnet (code 40514)

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

- Agence de la santé publique du Canada (ASPC). Génotypage de la résistance du cytomégalo­virus humain (CMVH) aux antiviraux [site Web]. Ottawa, ON : ASPC; 2011. Disponible à : http://www.nml-inm.gc.ca/guide2/tests_fraview.php?refdiagID=224 (consulté le 15 février 2013).
- Alain S, Cotin S, Hantz S. Résistance du cytomégalo­virus aux antiviraux. *Virologie* 2009;13(4):215-22.
- Chevillotte M, Ersing I, Mertens T, von Einem J. Differentiation between polymorphisms and resistance-associated mutations in human cytomegalovirus DNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(12):5004-11.
- Drew WL. Cytomegalovirus resistance testing: Pitfalls and problems for the clinician. *Clin Infect Dis* 2010;50(5):733-6.
- Duke University Health System (DUHS). Cytomegalovirus (CMV) genotype [site Web]. Durham, NC : DUHS; 2011. Disponible à : <http://dukemolecular.duhs.duke.edu/TemplateTest.aspx?ID=10030&Menuitem=1> (consulté le 15 février 2013).
- Fox S, Filichkin S, Mockler TC. Applications of ultra-high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* 2009;553:79-108.
- Frobert E, Cortay JC, Ooka T, Najioullah F, Thouvenot D, Lina B, Morfin F. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral Res* 2008;79(1):28-36.
- Hamilton RJ, réd. *Tarascon Pocket Pharmacopoeia*. 13^e éd. Burlington, MA : Jones and Bartlett Learning; 2012.
- James SH et Prichard MN. The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infect Disord Drug Targets* 2011;11(5):504-13.
- Kampmann SE, Schindele B, Apelt L, Buhner C, Garten L, Weizsaecker K, et al. Pyrosequencing allows the detection of emergent ganciclovir resistance mutations after HCMV infection. *Med Microbiol Immunol* 2011;200(2):109-13.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010;89(7):779-95.
- Lurain NS et Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(4):689-712.
- Piret J et Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(2):459-72.
- Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11(1):3-11.

Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T, Boucher C. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 1999;37(7):2291-6.

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.