

AVIS

## Détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe

(Référence - 2017.01.007B)

Transmission au ministre : 10 janvier 2018  
Publication officielle : 12 mars 2018

Une production de l'Institut national  
d'excellence en santé  
et en services sociaux (INESSS)

# DÉTECTION MOLÉCULAIRE DES ENTÉROPATHOGENES VIRAUX PAR PCR MULTIPLÈXE (RÉFÉRENCE - 2017.01.007B)

Avis d'évaluation

## 1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine
- 1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 10 janvier 2018
- 1.3 Date de publication de l'avis : 12 mars 2018

### Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes en charge de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

### Conflit d'intérêts

Tous les membres du comité ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

### Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, l'expert consulté est :

- **D<sup>r</sup> Christian Lavallée**, microbiologiste-infectiologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

## 2 RÉSUMÉ

La détection des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe a pour objectif d'identifier les agents étiologiques des diarrhées chez les patients vulnérables tels que les immunosupprimés, les patients atteints de maladie intestinale inflammatoire (MII), les prématurés avec entérocolite nécrosante néonatale et les patients en contexte d'éclosion de gastro-entérites. Cette analyse « maison » (ou LDT, de l'anglais *Laboratory Developed Test*) n'est pas encore prête à être mise en service, c'est-à-dire qu'elle est encore à l'étape de la planification. Les étapes nécessaires à la validation clinique et analytique de l'analyse seront entreprises par le centre demandeur uniquement à la suite d'un avis favorable de l'INESSS concernant l'utilité clinique de celle-ci. À terme, cette analyse permettrait la détection des adénovirus 40/41 et totaux, du rotavirus, du norovirus, du sapovirus et de l'astrovirus.

Selon le demandeur, le regroupement de plusieurs analyses moléculaires permettrait notamment d'alléger le processus diagnostic, de diminuer le temps de réponse, d'identifier les causes infectieuses tout en évitant des examens plus invasifs, d'optimiser l'efficacité du laboratoire et de réduire le nombre ou la durée des traitements antibiotiques.

Une revue de la documentation scientifique a permis de recenser trois études traitant de la détection d'entéropathogènes viraux à l'aide d'une technique de PCR multiplexe en temps réel de type LDT. Selon les résultats présentés, la PCR multiplexe est plus simple, plus fiable et procure un taux de positivité significativement plus élevé que les techniques microbiologiques conventionnelles telles que la détection d'antigènes et la microscopie. Lorsque comparé aux analyses PCR individuelles, le multiplexage des tests n'a que peu ou pas d'effet sur les performances analytiques. Certains ont donné de meilleurs résultats par PCR multiplexe que par l'amplification individuelle des cibles moléculaires. Selon les résultats de validation analytique, la PCR multiplexe est une technique sensible, spécifique et robuste.

Pour le CHU Sainte-Justine, l'ajout de l'analyse pourrait générer une réduction des coûts d'environ 8 000 \$ par année pour un total de 24 000 \$ pour les trois premières années suivant son introduction. Advenant que l'analyse puisse être implantée pour répondre aux besoins de l'ensemble de la province, elle pourrait générer une réduction de coûts de près de 62 000 \$ par année pour un total de près de 185 000 \$ pour les trois premières années.

Selon l'Association of Public Health Laboratories (États-Unis), les tests moléculaires sont plus rapides, permettent de détecter simultanément plusieurs pathogènes, et procurent des données dans des délais cliniquement plus pertinents pour le clinicien et son patient. Ces analyses peuvent être plus économiques que les techniques microbiologiques classiques et requièrent moins de personnel. Selon le Public Health England, les méthodes moléculaires peuvent être supérieures aux méthodes conventionnelles et devraient être considérées lorsqu'elles sont disponibles. Au West of Scotland Specialist Virology Centre, afin de rationaliser le service d'analyses moléculaires, la plupart des

tests reposant sur une amplification PCR ont été multiplexés en fonction du syndrome ou du type d'échantillon. Ceci a permis d'améliorer la rapidité, le coût et le débit de tests en plus de simplifier les algorithmes d'analyses.

### **3 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE**

#### **3.1 Nom et objectif de l'analyse**

Détection des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe. L'analyse aura pour objectif d'identifier les agents étiologiques des diarrhées virales.

#### **3.2 Description de la méthode**

Cette analyse « maison » (ou LDT, de l'anglais *Laboratory Developed Test*) n'est pas encore prête à être mise en service, c'est-à-dire qu'elle est encore à l'étape de la planification. Les étapes nécessaires à la validation clinique et analytique de l'analyse seront entreprises par le centre demandeur uniquement à la suite d'un avis favorable de l'INESSS concernant l'utilité clinique de celle-ci. Cette analyse qualitative consistera en l'amplification par PCR multiplexe en temps réel d'acides nucléiques spécifiques aux entéropathogènes viraux suivants :

- adénovirus 40/41 et totaux;
- rotavirus;
- norovirus;
- sapovirus;
- astrovirus.

Les résultats seraient de type qualitatif. L'analyse serait effectuée à tous les jours de la semaine avec un temps de roulement d'environ 24 heures. Un délai de moins de 24 heures pourrait être envisagé pour les patients admis à l'urgence et pour les patients immunosupprimés.

#### **3.3 Modalité d'administration du test selon le demandeur**

Un échantillon de selles fraîches, acheminé au laboratoire du CHU Sainte-Justine en pot stérile, serait utilisé pour l'extraction d'acides nucléiques préalablement à la détection des entéropathogènes viraux par amplification moléculaire.

#### **3.4 Société ou concepteur**

Il s'agit d'une analyse « maison » qui sera développée localement.

Le demandeur propose d'élaborer le protocole en collaboration avec l'Eastern Health de Terre-Neuve-et-Labrador, qui ont déjà développé et implanté une PCR multiplexe en temps réel pour le diagnostic clinique des entéropathogènes viraux et bactériens.

#### **3.5 Homologation**

Cette analyse et la technologie utilisée n'ont fait l'objet d'aucune homologation auprès de Santé Canada ou de la Food and Drug Administration (FDA).

Il existe toutefois des trousse commerciales homologuées par Santé Canada permettant la détection d'entéropathogènes par PCR multiplexe (annexe A).

### **3.6 Valeur pondérée : 45,17**

## **4 CONTEXTE**

### **4.1 Patients ciblés**

La détection moléculaire des entéropathogènes viraux cible les patients vulnérables tels que les immunosupprimés avec diarrhée, les patients atteints de maladie intestinale inflammatoire (MII), les prématurés avec entérocolite nécrosante néonatale et les patients en contexte d'éclosion de gastro-entérites.

### **4.2 Description de la maladie visée**

La gastro-entérite aiguë, accompagnée de diarrhées et de vomissements, est majoritairement de cause infectieuse, surtout virale, même si rarement identifiée. Elle touche principalement les enfants de moins de 5 ans. Parmi les autres agents infectieux possibles, on compte des bactéries et des parasites.

La gastro-entérite est une affection généralement bénigne, caractérisée par des selles plus liquides, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales. Elle peut s'accompagner de sang ou de mucus dans les selles, de déshydratation, de fièvre et de céphalées. Les complications liées à la diarrhée varient selon l'agent causal. La principale complication est la déshydratation, qui peut s'accompagner d'un déséquilibre électrolytique et d'une hypoglycémie. La malabsorption survient rarement, mais peut persister plusieurs semaines après l'infection [Fletcher *et al.*, 2013].

La diarrhée peut se présenter sous trois formes [Fletcher *et al.*, 2013] :

- Diarrhée aiguë aqueuse habituellement associée au *Vibrio cholerae* et au rotavirus, qui dure plusieurs jours et pose un risque de déshydratation pouvant être fatal, particulièrement chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les patients immunosupprimés.
- Diarrhée aiguë sanglante habituellement causée par *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entérohémorragique ou d'autres microorganismes pouvant mener à la déshydratation (dommages intestinaux, sepsie et malnutrition).
- Diarrhée persistante qui dure 14 jours ou plus et est habituellement associée à des parasites. La période diarrhéique peut être fatale, particulièrement chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les patients immunosupprimés.

Chez le jeune enfant (6 mois à 2 ans), les rotavirus sont la première cause de diarrhée. Ils provoquent souvent des épidémies hivernales extensives et sont responsables d'infections communautaires et nosocomiales. Chez l'adulte, les virus les plus souvent responsables de diarrhée sont les norovirus qui provoquent souvent des épidémies d'origine alimentaire ou hydrique. Les astrovirus sont également responsables de gastro-

entérites chez l'enfant, les personnes âgées et les immunosupprimés. Les adénovirus entériques sont responsables de gastro-entérites sans caractère saisonnier<sup>1 2 3</sup>.

#### **Maladies à déclarations obligatoires (MADO)<sup>4</sup>**

En 2015, 6 794 cas d'infections entériques ont été déclarés au Québec. Ces infections occupent le deuxième rang des maladies à déclaration obligatoire les plus fréquentes. La grande majorité est causée par des bactéries. En effet, les infections à *Campylobacter* représentent un peu plus du tiers des cas, alors que la salmonellose concerne un cas sur cinq.

Les épidémies de gastro-entérites demeurent fréquentes, avec 401 épisodes déclarés en 2015. On soupçonne souvent des virus d'en être responsables. Elles touchent plus fréquemment des milieux comme les services de garde éducatifs à l'enfance, les écoles ou les milieux de soins et d'hébergement.

Les données sur les maladies entériques procurent cependant une image partielle de ces infections, car seulement une fraction d'entre elles sont déclarées.

### **4.3 Nombre d'analyses prévues et de patients visés**

Selon le demandeur, le CHU Sainte-Justine effectue annuellement environ 300 recherches antigéniques de rotavirus et d'adénovirus pour la gastro-entérite virale lors d'éclosions, ou fait appel au Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) afin d'identifier la présence d'entéropathogènes viraux (environ 1 700 analyses en 2015). La totalité de ces analyses pourrait être effectuées par PCR multiplexe.

### **4.4 Situation actuelle**

Selon les experts consultés<sup>5</sup>, plusieurs centres effectuent la détection antigénique pour le rotavirus et l'adénovirus. Cette méthode comporterait toutefois une sensibilité discutable.

Certains centres font appel au LSPQ pour une détection d'entéropathogènes viraux par technique d'amplification des acides nucléiques (TAAN). Toutefois, les temps de réponse (deux à trois semaines) ne permettent pas d'assurer une prise en charge optimale des cas vulnérables et des épidémies.

---

<sup>1</sup> Mayo Clinic. Viral gastroenteritis (stomach flu) [site Web], disponible à : <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/viral-gastroenteritis/basics/risk-factors/con-20019350> (consulté le 6 novembre 2017).

<sup>2</sup> Agence de la santé publique du Canada (ASPC). Norovirus [site Web], disponible à : <http://www.phac-aspc.gc.ca/fs-sa/fs-fi/norovirus-fra.php> (consulté le 6 novembre 2017).

<sup>3</sup> Santé Montréal. Gastroentérite virale [site Web], disponible à : <https://www.santemontreal.qc.ca/population/conseils-et-prevention/gastroenterite-virale/>.

<sup>4</sup> Ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). Situation dans les réseaux territoriaux de services (RTS). Chapitre 3 - Des actions à mener sur plusieurs fronts contre les maladies infectieuses [site Web], disponible à : <http://www.msss.gouv.qc.ca/statistiques/rapport-dnsp/index.php?choixEtab%5B%5D=4&choixSujet%5B%5D=20> (consulté le 15 septembre 2017).

<sup>5</sup> Information obtenue auprès du D<sup>r</sup> Christian Renaud, pédiatre microbiologiste infectiologue au CHU Sainte-Justine (demandeur), D<sup>r</sup> Jean Longtin, microbiologiste en chef au LSPQ-INSPQ et M. Hugues Charest, biologiste moléculaire au LSPQ.

#### 4.5 Données médico-administratives

Il s'agit d'une nouvelle analyse non incluse au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Le tableau 1 présente les données relatives aux analyses, effectuées au CHU Sainte-Justine et au Québec, qui pourraient être remplacées par l'introduction de la PCR multiplexe permettant la détection d'entéropathogènes viraux.

**Tableau 1** Portrait des analyses actuellement réalisées au CHU Sainte-Justine qui figurent au *Répertoire* et qui pourraient être remplacées par la détection d'entéropathogènes viraux par PCR multiplexe

| CODE   | ANALYSE*                                                             | VOLUMÉTRIE |       | VP   | COÛTS (\$) |         |
|--------|----------------------------------------------------------------------|------------|-------|------|------------|---------|
|        |                                                                      | CHUSJ      | QC    |      | CHUSJ      | QC      |
| 40 599 | Adénovirus (Détection rapide sur spécimen clinique) (selles) (ELISA) | 541        | n. d. | 16,6 | 8 981      | n. d.   |
| 41 370 | Rotavirus (détection rapide) (ELISA)                                 | 553        | 3 728 | 17   | 9 401      | 63 376  |
| 41 401 | Virus spécimen gastro-intestinal (Culture cellulaire)                | 478        | 3 254 | 65   | 31 070     | 211 510 |

Abréviations : CHUSJ : CHU Sainte-Justine; ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (de l'anglais *enzyme-linked immunosorbant assay*); n. d. : données non disponibles; QC : province de Québec; VP : valeur pondérée

\*Aucune analyse ne figure actuellement au *Répertoire* pour la détection de l'astrovirus, du norovirus et du sapovirus.

Il est également prévu par le demandeur que les analyses de détection du norovirus qu'il achemine annuellement au Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) soient rapatriées à son établissement.

#### 4.6 Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, les avantages cliniques du développement d'une PCR multiplexe pour la détection des entéropathogènes viraux sont les suivants :

- Faciliter le transfert de certaines analyses vers les centres serveurs en améliorant le temps de réalisation et la sensibilité de détection.
- Identifier une cause infectieuse chez certains patients tout en évitant des examens plus invasifs.
- Limiter les coûts d'analyses par PCR multiplexe en évitant d'avoir recours à une trousse commerciale plus coûteuse.
- Diminuer le temps de réponse pour ainsi permettre une meilleure prise en charge des patients avec pathologies gastro-intestinales comme les maladies intestinales inflammatoires (MII) et la maladie du greffon contre l'hôte, notamment en initiant le traitement d'immunosuppression plus rapidement.

- Alléger le processus diagnostic.
- Réduire le nombre ou la durée des traitements antibiotiques en présence démontrée d'entéropathogènes viraux.

#### 4.7 Assurance qualité

Le demandeur prévoit participer aux différents programmes d'assurance qualité du College of American Pathologists (CAP) et du Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) pour lesquels il existe des échanges interétablissements et des contrôles de qualité.

## 5 DONNÉES PUBLIÉES

Une revue de la documentation scientifique a permis de recenser trois études traitant de la détection d'entéropathogènes viraux à l'aide d'une technique de PCR multiplexe en temps réel développée en laboratoire [Bennett et Gunson, 2017; Jiang *et al.*, 2014; Van Maarseveen *et al.*, 2010]. Précisons que seules les études utilisant une plateforme ouverte<sup>6</sup>, correspondant aux technologies que propose d'utiliser le demandeur, ont été retenues.

### 5.1 Valeur diagnostique

Parmi les études retenues, deux comparent la PCR multiplexe aux PCR individuelles pour la détection de virus gastro-intestinaux [Bennett et Gunson, 2017; Jiang *et al.*, 2014] et une étude compare la PCR multiplexe à l'utilisation de méthodes conventionnelles telles que l'ELISA (de l'anglais *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), le RPHA (de l'anglais *Reverse Passive Haemagglutination*) et la microscopie électronique [Van Maarseveen *et al.*, 2010] (tableau 2).

---

<sup>6</sup> Ici, « plateforme ouverte » fait référence aux technologies accessibles qui permettent aux utilisateurs de développer de nouvelles applications dérivées, sans avoir obligatoirement recours aux chimies, réactifs, services ou appareils d'un fournisseur en particulier. Ces nouvelles applications pourront être effectuées sur d'autres plateformes ou technologies dites « ouvertes » qui ne proviennent pas nécessairement du même fournisseur.

**Tableau 2 Études comparant la PCR multiplexe aux méthodes conventionnelles dans la détection d'entérovirus chez les patients suspectés de gastro-entérite virale**

| AUTEUR,<br>ANNÉE<br>(PAYS)               | ÉCHANTILLONS,<br>N | PATHOGÈNES<br>DÉTECTÉS                                                                                                                                                             | TECHNOLOGIE<br>(FOURNISSEUR)                                                               | COMPARATEUR                                                                                       |
|------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bennett<br>[2017]<br>(Royaume-<br>Uni)   | 2 420              | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sapovirus</li> <li>▪ Rotavirus A</li> <li>▪ Adénovirus</li> <li>▪ Astrovirus</li> </ul>                                                   | ABI Prism <sup>MC</sup> 7500<br>SDS (Applied<br>Biosystems)                                | PCR individuelles<br>validées pour<br>chacun des virus                                            |
| Jiang [2014]<br>(Chine)                  | 812                | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Norovirus I/II</li> <li>▪ Sapovirus<br/>I/II/IV/V</li> <li>▪ Rotavirus A</li> <li>▪ Adénovirus<br/>40/41</li> <li>▪ Astrovirus</li> </ul> | CFX96 <sup>MC</sup> Real-<br>Time PCR<br>System<br>(Bio-Rad)                               | PCR individuelles<br>commerciales                                                                 |
| Van<br>Maarseven<br>[2010]<br>(Pays-Bas) | 1 570              | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Norovirus I/II</li> <li>▪ Sapovirus</li> <li>▪ Rotavirus</li> <li>▪ Adénovirus<br/>40/41</li> <li>▪ Astrovirus</li> </ul>                 | IQ5 <sup>MC</sup> et<br>CFX96 <sup>MC</sup> Real-<br>Time Detection<br>System<br>(Bio-Rad) | Détection<br>d'antigènes<br>(Vikia <sup>MC</sup><br>Rota/Adeno)<br>et microscopie<br>électronique |

### 5.1.1 L'étude de Bennett et Gunson [2017]

Cette étude avait pour objectifs de développer et de valider une PCR multiplexe en temps réel pour la détection simultanée, à partir d'échantillons de selles, de quatre virus responsables de gastro-entérites (adénovirus, astrovirus, rotavirus et sapovirus). La performance de l'analyse multiplexe a été comparée à celle des PCR individuelles utilisées pour le diagnostic des gastro-entérites virales au West of Scotland Specialist Virology Centre (WoSSVC) depuis 12 ans (utilisées depuis 2004).

Les résultats de 137 échantillons cliniques, analysés rétrospectivement par PCR multiplexe, ont été comparés à ceux précédemment obtenus avec les PCR individuelles de routine. Ces échantillons provenaient de patients de tous les groupes d'âge, mais principalement d'enfants et de personnes âgées. Selon les analyses individuelles, 35 échantillons étaient positifs pour l'adénovirus, 34 pour l'astrovirus, 35 pour le sapovirus et 33 pour le rotavirus. Tous ont été correctement identifiés par l'analyse multiplexe (concordance de 100 %). La plupart des échantillons avaient un C<sub>T</sub> (nombre de cycles d'amplification nécessaire à la détection de l'ADN cible) comparable entre les deux approches.

Après 10 mois d'utilisation de la PCR multiplexe, en remplacement des PCR individuelles, le laboratoire avait analysé 2 420 échantillons de selles pour ces 4 virus.

De ces échantillons, 325 se sont avérés positifs. L'adénovirus était responsable de la majorité des positifs détectés (52 %), suivis du sapovirus (20 %), de l'astrovirus (16 %) et du rotavirus (12 %).

Selon la conclusion des auteurs, ces données mettent en évidence l'importance de rechercher ces pathogènes viraux. De plus, le multiplexage des analyses offertes au WoSSVC en fonction du type d'échantillons ou du syndrome a permis, selon les auteurs, de simplifier le service de routine et de réduire les coûts globaux par une diminution des investigations et de l'utilisation inutile d'antibiotiques. Aussi, cette façon de faire nécessiterait moins de personnel, de réactifs et réduirait l'utilisation des appareils, ce qui permettrait une gestion plus efficace des ressources [Bennett et Gunson, 2017; Gunson *et al.*, 2008].

### **5.1.2 L'étude de Jiang et ses collaborateurs [2014]**

L'objectif de cette étude était de développer une PCR multiplexe en temps réel hautement sensible permettant de détecter simultanément 5 entérovirus, soit le norovirus I/II, le sapovirus I/II/IV/V, le rotavirus A, l'adénovirus 40/41 et l'astrovirus. Les paramètres de performance de la RT-PCR multiplexe ont été comparés à ceux de RT-PCR individuelles.

Au total, 812 échantillons cliniques de selles ont été analysés par la RT-PCR multiplexe et les résultats ont été comparés à ceux obtenus à l'aide des PCR individuelles commerciales (ZJ Bio-Tech, Chine). Parmi les 812 échantillons, 372 étaient positifs incluant 29 co-infections. Par rapport aux PCR individuelles, la sensibilité de la PCR multiplexe variait de 75 à 100 % et la spécificité de 99 à 100 % selon le virus ciblé. Le taux de corrélation entre les deux approches variait de 97,8 % à 100 %, avec un coefficient de corrélation (kappa) de 0,85 à 1,0 (tableau 3).

**Tableau 3 Performances de la PCR multiplexe en temps réel par rapport aux PCR individuelles**

| VIRUS         | RÉSULTAT DE LA PCR MULTIPLEXE | RÉSULTAT DE LA PCR MONOPLEXE |         | SENSIBILITÉ, % | SPÉCIFICITÉ, % | CONCORDANCE, % | VALEUR KAPPA |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|---------|----------------|----------------|----------------|--------------|
|               |                               | Positif                      | Négatif |                |                |                |              |
| Sapovirus     | Positif                       | 4                            | 0       | 100,0          | 100,0          | 100,0          | 1,00         |
|               | Négatif                       | 0                            | 808     |                |                |                |              |
| Norovirus GI  | Positif                       | 6                            | 0       | 75,0           | 100,0          | 99,7           | 0,85         |
|               | Négatif                       | 2                            | 804     |                |                |                |              |
| Rotavirus A   | Positif                       | 116                          | 5       | 92,0           | 99,2           | 98,2           | 0,92         |
|               | Négatif                       | 10                           | 681     |                |                |                |              |
| Adénovirus    | Positif                       | 22                           | 1       | 95,7           | 99,9           | 99,8           | 0,98         |
|               | Négatif                       | 1                            | 788     |                |                |                |              |
| Norovirus GII | Positif                       | 190                          | 6       | 94,0           | 99,0           | 97,8           | 0,94         |
|               | Négatif                       | 12                           | 604     |                |                |                |              |
| Astrovirus    | Positif                       | 8                            | 1       | 88,9           | 99,9           | 99,8           | 0,88         |
|               | Négatif                       | 1                            | 802     |                |                |                |              |

Source : Jiang *et al.*, 2014.

Selon les auteurs, cette étude comporte une limitation majeure qui nécessitera une amélioration. Au total, 25 échantillons (2 norovirus GI, 10 rotavirus, 1 adénovirus et 12 norovirus GII) étaient positifs par PCR individuelles et négatifs par l'analyse multiplexe. Ceci serait attribuable à une dégradation des acides nucléiques avant leur analyse par la PCR multiplexe. Les auteurs mentionnent que plus d'échantillons cliniques seront collectés pour compléter la validation.

Selon la conclusion des auteurs, des méthodes de détection rapides et précises sont essentielles pour répondre aux épidémies de diarrhées virales et à la prise en charge des patients. Cette RT-PCR multiplexe a permis d'analyser plus de 90 échantillons en 3 heures. Selon les auteurs, cette méthode est simple, rapide, hautement sensible et spécifique. Elle peut être utilisée pour l'identification des agents pathogènes lors d'épidémies de maladies diarrhéiques virales et fournir les données pour les études épidémiologiques, en plus de permettre d'adapter les soins aux patients et de renforcer la santé publique.

### **5.1.3 L'étude de Van Maarseven et ses collaborateurs [2010]**

L'objectif de cette étude était de développer deux PCR multiplexes en temps réel afin d'améliorer le diagnostic simultané de cinq virus à partir d'échantillons de selles de patients suspectés de gastro-entérite virale. La validation clinique des PCR multiplexes a été effectuée rétrospectivement à partir de 239 échantillons reçus entre mars 2006 et février 2007. Une étude prospective a également été effectuée à partir de 1 570 échantillons cliniques transférés au laboratoire entre septembre 2007 et décembre 2009.

Les 239 échantillons rétrospectifs avaient été soumis à une détection antigénique de routine de l'adénovirus et du rotavirus (trousse commerciale Vikia<sup>MC</sup> Rota/Adeno). Le taux de détection des pathogènes viraux était de 14 % avec la trousse Vikia<sup>MC</sup> Rota/Adeno. Un aliquote conservé à -20 °C était disponible pour 218 des 239 échantillons. Le taux de détection était de 45 % avec les PCR multiplexes. Selon les auteurs, cette augmentation est principalement attribuable à l'inclusion du norovirus et de l'astrovirus dans les PCR multiplexes (non détectés par Vikia<sup>MC</sup> Rota/Adeno), mais la sensibilité accrue des multiplexes aurait également contribué à cette augmentation, notamment pour l'adénovirus.

Au total, 8 échantillons positifs par Vikia<sup>MC</sup> Rota/Adeno et négatifs par PCR multiplexes n'ont pu être confirmés par la PCR individuelle de confirmation ou par d'autres méthodes (culture, Rotalex<sup>MC</sup>). Selon les auteurs, ces résultats mettent en doute la spécificité du test Vikia<sup>MC</sup> Rota/Adeno telle que suggérée par les résultats d'autres études [Yan *et al.*, 2004; Rabenau *et al.*, 1998; Dennehy *et al.*, 1988]. Selon les auteurs, une dégradation des acides nucléiques est également possible pour ces échantillons rétrospectifs.

Sur les 1 570 échantillons prospectifs analysés à la suite de l'implantation du test, 486 (31 %) ont donné un résultat positif. De ces derniers, 23 (4,7 %) étaient positifs pour 2 virus et 2 (0,4 %) échantillons, provenant du même patient, étaient positifs

pour 3 virus. Le norovirus II était le plus fréquent (61,1 %), suivi par l'adénovirus (9,9 %), le rotavirus (9,3 %), l'astrovirus (6,0 %), le norovirus I (3,3 %) et le sapovirus (0,4 %).

Selon la conclusion des auteurs, ces deux PCR multiplexes en temps réel ont permis une amélioration significative du diagnostic des gastro-entérites virales. En effet, l'introduction de techniques plus sensibles permet d'augmenter significativement le taux de détection des virus entériques. Toutefois, la pertinence clinique des résultats positifs avec une valeur  $C_T$  élevée, suggérant une faible charge virale, reste à établir. Certaines études ont démontré la présence de pathogènes viraux dans des échantillons d'individus asymptomatiques, alors que les charges virales étaient plus élevées chez les patients symptomatiques [Amar *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2004; De Wit *et al.*, 2001].

## 5.2 Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

## 5.3 Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif premier de permettre le choix ou la modification d'un traitement. Toutefois, il est évident que l'identification précise des entéropathogènes responsables de l'épisode diarrhéique au moyen de la technique proposée influence les décisions thérapeutiques, notamment concernant la pertinence de la prise d'antibiotiques.

## 5.4 Validité analytique

### 5.4.1 L'étude de Bennett et Gunson [2017]

La spécificité analytique de la PCR multiplexe développée par Bennett et Gunson a été évaluée à l'aide d'un panel de 25 pathogènes communs<sup>7</sup>. Aucune réactivité croisée n'a été observée. Des témoins sans ADN (contrôles négatifs) ont également été testés pour s'assurer que l'analyse ne produisait pas de faux positifs.

---

<sup>7</sup> Incluant le virus de l'herpès humain (6 et 7), parvovirus B19, norovirus (GI et GII), entérovirus, paréchovirus, cytomégalovirus, virus Epstein-Barr, virus de la rougeole, virus des oreillons, virus de la rubéole, influenza (A et B), influenza A H1N1, influenza A H1N1 H275Y, coronavirus (229E, OC43, NL63, HKU1), parainfluenza (1 à 4), rhinovirus, virus respiratoire syncytial (A et B), métapneumovirus humain (A et B), *Treponema pallidum* (syphilis), *Pneumocystis jirovecii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Salmonella enteritidis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* et *Cyclospora*.

La sensibilité et la spécificité analytiques des deux approches ont également été comparées par l'analyse d'un panel du Quality Control for Molecular Diagnostic (QCMD)<sup>8</sup> comportant 9 échantillons de référence de norovirus, d'adénovirus, d'astrovirus, de rotavirus et de sapovirus. L'identification de tous les échantillons à une valeur  $C_T$  similaire suggère que la PCR multiplexe et les PCR individuelles comportent des sensibilités comparables.

Les limites de détection (ou LOD, de l'anglais *limit of detection*) de chacune des cibles de la PCR multiplexe ont été directement comparées à celles des PCR individuelles à l'aide d'une série de dilutions des contrôles positifs pour chacun des virus. Les LOD étaient comparables entre les deux approches. Une plus grande sensibilité a même été obtenue pour l'adénovirus et l'astrovirus avec la PCR multiplexe par rapport aux PCR individuelles (tableau 4).

**Tableau 4 Comparaison de la sensibilité analytique (LOD) de la PCR multiplexe aux PCR individuelles**

| VIRUS      | LIMITE DE DÉTECTION, DILUTION |                |
|------------|-------------------------------|----------------|
|            | PCR INDIVIDUELLES             | PCR MULTIPLEXE |
| Adénovirus | $10^{-3}$                     | $10^{-4}$      |
| Astrovirus | $10^{-3}$                     | $10^{-5}$      |
| Rotavirus  | $10^{-5}$                     | $10^{-5}$      |
| Sapovirus  | $10^{-6}$                     | $10^{-5}$      |

Source : Bennett et Gunson, 2017.

La variabilité inter- et intra-essai a été évaluée par l'analyse de 3 contrôles positifs (charge virale forte, modérée et faible) pour chacun des virus, analysé 6 fois lors d'un même test (répétabilité) et 6 fois lors de tests indépendants (reproductibilité). Sur la base des faibles valeurs de CV obtenues (tableau 5), les auteurs suggèrent que le test est robuste même à des valeurs  $C_T$  plus faibles.

<sup>8</sup> Le QCMD est une organisation internationale à but non lucratif dont la mission est d'améliorer la qualité des diagnostics moléculaires grâce aux évaluations externes de la qualité, aux tests de compétence, et à d'autres services pour la qualité des analyses moléculaires (QCMD. Quality Control for Molecular Diagnostics [site Web], disponible à : <https://www.qcmd.org/> (consulté le 16 octobre 2017)).

**Tableau 5 Évaluation de la répétabilité (variabilité intra-essai) et de la reproductibilité (variabilité inter-essai) de la PCR multiplexe**

| ANALYSE     | CHARGE VIRALE | ADÉNOVIRUS           |          | ASTROVIRUS           |          | ROTAVIRUS            |          | SAPOVIRUS            |          |
|-------------|---------------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|
|             |               | C <sub>T</sub> moyen | CV       | C <sub>T</sub> moyen | CV       | C <sub>T</sub> moyen | CV       | C <sub>T</sub> moyen | CV       |
| Intra-essai | Forte         | 22,3                 | 0,004 79 | 18,14                | 0,005 29 | 18,87                | 0,009 03 | 18,51                | 0,006 56 |
|             | Modérée       | 27,83                | 0,008 29 | 24,2                 | 0,007 88 | 24,66                | 0,015 25 | 24,16                | 0,006 12 |
|             | Faible        | 33,93                | 0,018 47 | 34,13                | 0,010 37 | 34,6                 | 0,008 87 | 30,75                | 0,011 06 |
| Inter-essai | Forte         | 22,08                | 0,023 97 | 17,9                 | 0,005 82 | 18,88                | 0,014 97 | 18,17                | 0,012 21 |
|             | Modérée       | 27,28                | 0,124 73 | 24,2                 | 0,017 27 | 24,64                | 0,031 03 | 24,07                | 0,012 48 |
|             | Faible        | 34,29                | 0,017 35 | 32,14                | 0,148 54 | 31,8                 | 0,021 64 | 30,67                | 0,013 64 |

Source : Bennett et Gunson, 2017.

\*La précision inter- et intra-essai a été évaluée par l'analyse du coefficient de variation (CV) du cycle seuil d'amplification (C<sub>T</sub>) des contrôles positifs (charge virale forte, modérée et faible) pour chacun des virus ciblés.

Trois contrôles pour chacune des cibles ont été testés en triplicata sur 12 réactions afin de déterminer la linéarité de la méthode. Selon l'analyse de la pente des courbes standards (valeurs C<sub>T</sub> en fonction de la quantité d'ADN de départ), l'efficacité de l'amplification a été évaluée à près de 100 % avec des pentes<sup>9</sup> comprises entre -3,1 et -3,6.

Selon les auteurs, le multiplexage des quatre PCR n'a eu aucun effet négatif sur la performance de l'un ou l'autre des composants individuels. L'addition de cibles pour l'astrovirus et le rotavirus n'a pas entraîné de perte de sensibilité. En fait, certains ont donné de meilleurs résultats par PCR multiplexe que par PCR individuelle. L'analyse multiplexe s'est avérée spécifique par l'évaluation de panels de contrôles de qualité et d'agents pathogènes couramment rencontrés. De plus, la performance de l'analyse multiplexe a été déterminée par l'évaluation de la sensibilité analytique, de la linéarité et de l'efficacité, de la sensibilité et la spécificité clinique de l'analyse multiplexe.

#### 5.4.2 L'étude de Jiang et ses collaborateurs [2014]

La spécificité analytique de cette PCR multiplexe a été évaluée par l'analyse de 18 espèces d'entéropathogènes<sup>10</sup>. Aucune réaction croisée n'a été observée (100 % spécificité) et les cinq virus ciblés ont été correctement identifiés par la PCR multiplexe.

Une étude de concordance a été effectuée (voir tableau 4, section 5.1.2). Le taux de corrélation entre les deux approches variait de 97,8 % à 100 % avec un coefficient de corrélation (kappa) de 0,85 à 1,0.

La limite de détection a été de 10 copies/μl pour chacun des 5 virus recherchés. La reproductibilité a été évaluée par l'analyse d'échantillons en triplicata, avec un CV des valeurs C<sub>T</sub> de 0,06 % à 2,3 %.

<sup>9</sup> Une réaction efficace à 100 % génère une pente de -3,32 [Barletta *et al.*, 2013].

<sup>10</sup> Incluant *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, l'entérovirus humain 71 (maladie pieds-mains-bouche) et 10 échantillons sélectifs de virus entériques [Jiang *et al.*, 2014].

### 5.4.3 L'étude de van Maarseveen et ses collaborateurs [2010]

La spécificité théorique des amorces et des sondes utilisées pour les deux PCR multiplexes développées par Van Maarseveen et ses collaborateurs a été vérifiée à l'aide du logiciel d'alignement de séquences BLAST (de l'anglais *Basic Local Alignment Search Tool*)<sup>11</sup>. Aucun site pouvant théoriquement mener au mauvais appariement des amorces et ainsi causer une amplification non spécifique n'a été détecté.

La spécificité analytique a été évaluée à l'aide d'un panel de 20 pathogènes (parasites, bactéries et virus)<sup>12</sup> potentiellement présents dans les selles. Aucune amplification non spécifique n'a été observée.

La sensibilité des deux PCR multiplexes et des PCR individuelles a été évaluée à partir d'acides nucléiques viraux isolés d'échantillons positifs pour les virus ciblés. La LOD des PCR multiplexes a été comparée à celles des PCR individuelles par l'analyse, en quatre copies, d'une série de dilutions d'ADNc/ADN des virus d'intérêt. Une sensibilité comparable a été observée pour tous les virus à l'exception de l'adénovirus 41, dont la plus faible dilution ( $10^{-4}$ ) a été amplifiée par la PCR individuelle uniquement (absence d'amplification dans la PCR multiplexe).

Deux contrôles internes ont été ajoutés aux échantillons cliniques afin de contrôler la procédure de purification des acides nucléiques et l'inhibition potentielle de la réaction d'amplification. Une inhibition de la réaction PCR a été observée chez 4,6 % des échantillons (11/239). Une dilution (1/10) a permis de remédier à l'inhibition pour 6 échantillons alors que 5 échantillons présentaient toujours une absence d'amplification, pour un total de 2,1 % d'inhibition non résolue.

---

<sup>11</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [site Web], disponible à : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

<sup>12</sup> Incluant *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia lamblia*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* (O157) producteur de Shiga-toxine, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, parechovirus type 1, poliovirus type 1, coxsackievirus A24, entérovirus 71 et échovirus 13 [Van Maarseveen et al., 2010].

## **5.5 Données fournies par le demandeur**

Aucune donnée provenant d'études de validation analytique n'a été fournie par le demandeur. En raison du coût élevé de ces études, le demandeur procédera à la validation seulement une fois l'aval du ministère reçu, le cas échéant.

La validation sera effectuée au CHU Sainte-Justine en collaboration avec le LSPQ et possiblement les laboratoires de santé publique d'autres provinces (dont Terre-Neuve-et-Labrador) afin d'analyser environ 200 échantillons de selles incluant une variété de pathogènes différents. Les études de validation des PCR multiplexes visant la détection des entéropathogènes viraux et bactériens seront réalisées au même moment. Une comparaison de deux techniques de PCR en temps réel pour la détection des bactéries et des virus ciblés sera effectuée, soit celle développée au Laboratoire de microbiologie et de santé publique de Terre-Neuve-et-Labrador et la technique commerciale LightMix<sup>MC</sup> (Roche).

Un plan préliminaire d'évaluation de la validité analytique a été élaboré et comporte les suggestions suivantes<sup>13</sup> :

### **5.5.1 Optimisation de la technique d'extraction d'acides nucléiques**

Comparaison de différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques (ADN et ARN) en utilisant le système d'extraction automatisé Maxwell<sup>MC</sup> de Promega pour déterminer quelle méthode permet d'obtenir la plus grande quantité d'acides nucléiques pour les entéropathogènes ciblés.

### **5.5.2 Limite de détection**

Comparaison de la limite de détection en utilisant des échantillons de selles inoculés avec des quantités connues de virus. Des souches références obtenues de l'American Type Culture and Collection (ATCC) pourront aussi être mises à contribution au besoin. La reproductibilité analytique sera intrinsèquement évaluée au cours du processus de détermination de la limite de détection qui consiste à effectuer les analyses de manière répliquative.

### **5.5.3 Vérification analytique**

Évaluation de la sensibilité et la spécificité de la technique en testant vingt échantillons positifs pour chacun des virus ciblés, incluant des co-infections. Ces échantillons seront soit des échantillons cliniques positifs identifiés par la technique utilisée actuellement au laboratoire, ou des échantillons de selles négatifs dans lesquels des quantités connues des microorganismes ciblés auront été ajoutées.

La spécificité analytique sera intrinsèquement évaluée au cours du processus de validation puisque tous les entéropathogènes analysés sont systématiquement testés par toutes les paires d'amorces.

---

<sup>13</sup> Information tirée d'une communication officielle transmise à l'INESSS, en date du 15 juin 2017, par le demandeur, D<sup>r</sup> Christian Renaud.

#### 5.5.4 Étude prospective

Aucune étude prospective ne sera effectuée pour la recherche d'entéropathogènes viraux puisque la validation analytique sera principalement effectuée avec des échantillons cliniques de patients et compte tenu de la demande plus faible de cette analyse.

## 6 IMPACTS BUDGÉTAIRES

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant la détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe au CHU Sainte-Justine. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques, ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts<sup>14</sup>.

L'évaluation des coûts est présentée au tableau 6. Les principales hypothèses émises pour les fins de l'analyse sont les suivantes :

- La détection moléculaire des entéropathogènes viraux, telle que proposée par le demandeur, ciblerait les infections entériques virales chroniques chez les patients immunosupprimés et permettrait l'identification des diarrhées virales chez les patients avec une maladie intestinale inflammatoire. Elle serait aussi réalisée chez les nouveau-nés prématurés avec une entérocolite nécroisante ainsi qu'en contexte d'éclosion virale.
- L'ajout de cette analyse au *Répertoire* permettrait le remplacement des tests utilisés pour la détection des adénovirus et des rotavirus par ELISA (codes 40599 et 41370, respectivement). Selon l'opinion d'experts, il est aussi anticipé que la moitié des cultures de selles virales (code 41401) serait remplacée.
- La détection des norovirus, des sapovirus et des astrovirus inclus dans la PCR multiplexe proposée par le demandeur ne figure pas au *Répertoire* et n'a fait l'objet d'aucun envoi hors Québec en 2015-2016.
- Toutefois, il est prévu par le demandeur que les analyses de détection du norovirus qu'il achemine annuellement au Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) soient rapatriées à son établissement. Cela représente près de 30 tests par année.
- Ainsi, il est estimé que 575 analyses seraient réalisées au CHU Sainte-Justine au cours des trois prochaines années, respectivement.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 45,17.

---

<sup>14</sup> Les experts sont D<sup>r</sup> Christian Renaud, pédiatre microbiologiste infectiologue au CHU Sainte-Justine (demandeur), D<sup>r</sup> Christian Lavallée, microbiologiste-infectiologue à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (lecteur externe), D<sup>r</sup> Jean Longtin, microbiologiste en chef au LSPQ-INSPQ et M. Hugues Charest, biologiste moléculaire au LSPQ.

**Tableau 6 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse permettant la détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe au CHU Sainte-Justine**

|                                                                                                                                               | AN 1                               | AN 2             | AN 3             | TOTAL             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| <b>Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout de l'analyse permettant la détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe</b> |                                    |                  |                  |                   |
| Analyses adénovirus (40 599)                                                                                                                  | 541                                | 541              | 541              | 1 623             |
| Coûts                                                                                                                                         | 8 981 \$                           | 8 981 \$         | 8 981 \$         | 26 943 \$         |
| Analyses rotavirus (41 370)                                                                                                                   | 553                                | 553              | 553              | 1 659             |
| Coûts                                                                                                                                         | 9 401 \$                           | 9 401 \$         | 9 401 \$         | 28 203 \$         |
| Analyses culture virale selles (41 401)                                                                                                       | 480                                | 480              | 480              | 1 440             |
| Coûts                                                                                                                                         | 31 200 \$                          | 31 200 \$        | 31 200 \$        | 93 600 \$         |
| <b>Total</b>                                                                                                                                  | <b>49 582 \$</b>                   | <b>49 582 \$</b> | <b>49 582 \$</b> | <b>148 746 \$</b> |
| <b>Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout de l'analyse permettant la détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe</b> |                                    |                  |                  |                   |
| Analyses PCR multiplexe                                                                                                                       | 575                                | 575              | 575              | 1 725             |
| Coûts                                                                                                                                         | 25 973 \$                          | 25 973 \$        | 25 973 \$        | 77 919 \$         |
| Analyse selles virales (41 401)                                                                                                               | 240                                | 240              | 240              | 720               |
| Coûts                                                                                                                                         | 15 600 \$                          | 15 600 \$        | 15 600 \$        | 46 800 \$         |
| Impact brut                                                                                                                                   | 41 573 \$                          | 41 573 \$        | 41 573 \$        | 124 719 \$        |
| <b>Impact net</b>                                                                                                                             | <b>-8 009 \$</b>                   | <b>-8 009 \$</b> | <b>-8 009 \$</b> | <b>-24 027 \$</b> |
| Analyses de sensibilité                                                                                                                       | Pour 3 ans, coûts les plus faibles |                  |                  | -18 689 \$        |
|                                                                                                                                               | Pour 3 ans, coûts les plus élevés  |                  |                  | -35 214 \$        |

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant la détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe pourrait générer une réduction de coûts d'environ 8 000 \$ par année pour un total de 24 000 \$ pour les trois premières années.

Advenant que l'analyse puisse être implantée pour répondre aux besoins de l'ensemble de la province, cela pourrait générer une réduction de coûts de près de 62 000 \$ par année, pour un total de près de 185 000 \$ pour les trois premières années.

## 7 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Les analyses moléculaires utilisant la PCR permettent de détecter de faibles quantités d'ADN, incluant celui d'organismes parfois non viables, produisant généralement plus de résultats positifs, mais d'une importance clinique incertaine (possibles faux positifs) [Freeman *et al.*, 2017; Van Lint *et al.*, 2016]. Toutefois, au Canada, la grande sensibilité de la PCR et le risque de faux positifs ne constitue pas un enjeu pour la détection des entéropathogènes. En effet, les microorganismes testés, qui sont parfois endémiques dans d'autres populations, ne font pas partie de la flore normale de la population locale et doivent être traités lorsqu'ils sont associés à des symptômes gastro-intestinaux graves. En limitant l'analyse aux patients présentant ces symptômes, le risque de faux positifs associé à une trop grande sensibilité de la méthode est négligeable<sup>15</sup>.

Aussi, bien que les séquences utilisées comme cibles sont généralement celles de régions fortement conservées de gènes de virulence, les amorces utilisées pourraient ne pas détecter de nouveaux variants de ces gènes et produire des faux négatifs [Barletta *et al.*, 2013]. Les experts responsables de ces analyses doivent donc pouvoir offrir des analyses supplémentaires en cas de résultats négatifs malgré des symptômes cliniques clairs comme la présence de sang dans les selles [Van Lint *et al.*, 2016]. De plus, aux fins de surveillance, de sécurité et de santé publique, il est impératif que les laboratoires cliniques poursuivent la soumission d'isolats et de souches d'organismes pathogènes aux autorités en santé.

## 8 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

L'Association of Public Health Laboratories (APHL, États-Unis) a publié en 2015 une liste de faits et de recommandations pour les laboratoires cliniques et les agences de santé publique concernant l'utilisation des tests moléculaires indépendants de la culture dans le diagnostic des maladies entériques et d'origine alimentaire [APHL, 2015]. Les faits suivants sont notamment mentionnés :

- Les tests moléculaires indépendants de la culture sont plus rapides et procurent des données dans des délais cliniquement plus pertinents pour le clinicien et son patient.

---

<sup>15</sup> Information partagée par le D<sup>r</sup> Yansouni, infectiologue au Centre universitaire de santé McGill, membre du Comité scientifique permanent des analyses de biologie médicale (CSABM) de l'INESSS (rencontre du 5 décembre 2017).

- Les analyses moléculaires sont basées sur une approche syndromique et permettent de détecter simultanément une large gamme de pathogènes qui, traditionnellement, requiert de multiples procédures microbiologiques.
- Les analyses moléculaires offrent de l'information sur les pathogènes qui ne sont pas cultivables comme *Cryptosporidium* et norovirus, ou des agents pour lesquels les cultures traditionnelles sont moins sensibles, complexes ou plus lentes.
- Ces analyses peuvent être plus économiques que les techniques microbiologiques classiques et requièrent moins de personnel.

Selon le Public Health England (PHE), diverses méthodes comportant des sensibilités et des spécificités variables sont disponibles pour l'analyse des matières fécales. Les méthodes moléculaires (p. ex. la PCR multiplexe) et les immunoessais enzymatiques (ELISA) peuvent être supérieures aux méthodes conventionnelles et devraient donc être considérées lorsqu'elles sont disponibles, après validation, afin d'assurer une interprétation clinique appropriée [PHE, 2013].

L'American College of Gastroenterology (ACG) recommande la recherche de l'agent étiologique de la gastro-entérite seulement chez les patients atteints d'une diarrhée modérée à sévère depuis plus de 7 jours et susceptibles de propager la maladie. Les approches technologiques favorisées sont les cultures bactériennes, la microscopie avec ou sans immunofluorescence et la détection antigénique. D'autres approches homologuées par la FDA peuvent toutefois être considérées en cas d'échec des approches traditionnelles [Riddle *et al.*, 2016].

Au West of Scotland Specialist Virology Centre (WoSSVC), afin de rationaliser le service d'analyses moléculaires, la plupart des tests reposant sur une amplification PCR ont été multiplexés en fonction du syndrome ou du type d'échantillon. Ceci a permis d'améliorer la rapidité, le coût et le débit de tests en plus de simplifier les algorithmes d'analyses [Bennett et Gunson, 2017; Gunson *et al.*, 2008].

## 9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

### Détection moléculaire des entéropathogènes viraux par PCR multiplexe

#### La recommandation de l'INESSS

- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

#### Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Cette analyse cible 2 situations particulières : personnes greffées et contexte d'éclosion.
- ✓ Les membres du comité émettent des réserves concernant la demande de hiérarchisation suprarégionale.

## ANNEXE A : Trousses commerciales homologuées par Santé Canada pour la détection d'entéropathogènes par PCR multiplexe

| TROUSSE<br>(FOURNISSEUR)                                                                                                     | NUMÉRO DE<br>L'HOMOLOGATION (DATE) | ENTÉROPATHOGÈNES DÉTECTÉS (N)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| xTAG <sup>MC</sup> Gastrointestinal<br>Panel (GPP)<br><br>(Luminex Molecular<br>Diagnostic, Toronto,<br>Canada)              | 88086<br>(18 janvier 2012)         | <p><b>Virus (3) :</b> Adenovirus (40 et 41), Norovirus (GI et GII), Rotavirus A.</p> <p><b>Bactéries (9) :</b> <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i> et <i>C. lari</i>), <i>Clostridium difficile</i> toxine A/B, <i>Escherichia coli</i> O157, <i>E. coli</i> entérotoxigénique (ETEC) LT et ST, <i>Salmonella</i>, <i>E. coli</i> producteur de Shiga-toxines (STEC) stx1 et stx2, <i>Shigella</i> (<i>S. boydii</i>, <i>S. sonnei</i>, <i>S. flexneri</i> et <i>S. dysenteriae</i>), <i>Vibrio cholerae</i> (gène de la toxine du choléra), <i>Yersinia enterocolitica</i>.</p> <p><b>Parasites (3) :</b> <i>Giardia lamblia</i>, <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Cryptosporidium</i> (<i>C. parvu</i> et <i>C. hominis</i>).</p>                                                                                                                                      |
| FilmArray <sup>MC</sup><br>Gastrointestinal (GI)<br>Panel<br><br>(BioFire Diagnostic, LLC<br>Salt Lake City, États-<br>Unis) | 95822<br>(23 septembre 2015)       | <p><b>Virus (5) :</b> Adénovirus F (40 et 41), Astrovirus, Norovirus (GI et GII), Rotavirus A, Sapovirus (I, II, IV et V).</p> <p><b>Bactéries (12) :</b> <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i> et <i>C. upsaliensis</i>), <i>Clostridium difficile</i> (toxine A et B), <i>Plesiomonas shigelloides</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Vibrio</i> (<i>V. parahaemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i> et <i>V. cholerae</i>), <i>E. coli</i> entéroaggrégative (EAEC), <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC), <i>E. coli</i> entérotoxigénique (ETEC) lt et st, <i>E. coli</i> producteur de shiga-toxines (STEC) stx1 et stx2, <i>E. coli</i> O157, <i>Shigella/E. coli</i> entéroinvasive (EIEC).</p> <p><b>Parasites (4) :</b> <i>Cryptosporidium</i>, <i>Cyclospora cayetanensis</i>, <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Giardia lamblia</i>.</p> |
| FTD <sup>MC</sup> Viral<br>Gastroenteritis<br><br>(Fast Track Diagnostics<br>Sch-Sur-Alzette,<br>Luxembourg)                 | 97 129<br>(15 juin 2016)           | <p><b>Virus (5) :</b> Norovirus (GI et GII), Adenovirus, Astrovirus, Rotavirus, Sapovirus.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

| TROUSSE<br>(FOURNISSEUR)                                                                    | NUMÉRO DE<br>L'HOMOLOGATION (DATE) | ENTÉROPATHOGÈNES DÉTECTÉS (N)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BD Max Enteric Bacterial<br>Panel<br><br>(Geneohm Sciences<br>Canada Inc., Québec)          | 93 543<br>(10 juillet 2014)        | <b>Bactéries (4) :</b> <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp./ <i>E. coli</i> entéroinvasive (EIEC), <i>Campylobacter</i> ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> et <i>C. coli</i> ), <i>E. coli</i> producteur de Shiga-toxines (STEC).                                                                                                                                                                                                        |
| BD Max Extended<br>Enteric Bacterial Panel<br><br>(Geneohm Sciences<br>Canada Inc., Québec) | 99 000<br>(20 avril 2017)          | <b>Bactéries (8) :</b> <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp./ <i>E. coli</i> entéroinvasive (EIEC), <i>Campylobacter</i> ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> et <i>C. coli</i> ), <i>E. coli</i> producteur de Shiga-toxines (STEC), <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> entérotoxigénique (ETEC), <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Vibrio</i> ( <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> et <i>V. cholerae</i> ). |
| Rida Gene Bacterial<br>Stool Panel<br><br>(R-Biopharm AG,<br>Darmstadt, Allemagne)          | 91 376<br>(23 mai 2013)            | <b>Bactéries (3) :</b> <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

## RÉFÉRENCES

- Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: Re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(5):311-23.
- Association of Public Health Laboratories (APHL). Culture-independent diagnostic tests: Paving the way for improved diagnostics and the future of foodborne disease surveillance. CIDT Fact Sheet. Silver Spring, MD : APHL; 2015. Disponible à : [https://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/FS\\_CIDTFactSheet\\_Feb2015.pdf](https://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/FS_CIDTFactSheet_Feb2015.pdf).
- Barletta F, Mercado EH, Lluque A, Ruiz J, Cleary TG, Ochoa TJ. Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *J Clin Microbiol* 2013;51(9):2822-9.
- Bennett S et Gunson RN. The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples. *J Virol Methods* 2017;242:30-4.
- De Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154(7):666-74.
- Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26(9):1630-4.
- Fletcher SM, McLaws ML, Ellis JT. Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: Systematic review and meta-analysis. *J Public Health Res* 2013;2(1):42-53.
- Freeman K, Tsertsvadze A, Taylor-Phillips S, McCarthy N, Mistry H, Manuel R, Mason J. Agreement between gastrointestinal panel testing and standard microbiology methods for detecting pathogens in suspected infectious gastroenteritis: Test evaluation and meta-analysis in the absence of a reference standard. *PLoS One* 2017;12(3):e0173196.
- Gunson RN, Bennett S, Maclean A, Carman WF. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. *J Clin Virol* 2008;43(4):372-5.
- Jiang Y, Fang L, Shi X, Zhang H, Li Y, Lin Y, et al. Simultaneous detection of five enteric viruses associated with gastroenteritis by use of a PCR assay: A single real-time multiplex reaction and its clinical application. *J Clin Microbiol* 2014;52(4):1266-8.
- Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: Correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol* 2004;73(1):118-22.

- Public Health England (PHE). UK Standards for Microbiology Investigations: Gastroenteritis and diarrhoea. S7 Issue 1. Londres, Angleterre : PHE; 2013. Disponible à : [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/344110/S\\_7i1.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344110/S_7i1.pdf).
- Rabenau H, Knoll B, Allwinn R, Doerr HW, Weber B. Improvement of the specificity of enzyme immunoassays for the detection of rotavirus and adenovirus in fecal specimens. *Intervirology* 1998;41(2-3):55-62.
- Riddle MS, DuPont HL, Connor BA. ACG clinical guideline: Diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. *Am J Gastroenterol* 2016;111(5):602-22.
- Van Lint P, De Witte E, Ursi JP, Van Herendael B, Van Schaeren J. A screening algorithm for diagnosing bacterial gastroenteritis by real-time PCR in combination with guided culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;85(2):255-9.
- Van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen AC, Claas EC. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *J Clin Virol* 2010;49(3):205-10.
- Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi* 2004;78(8):699-709.

**Institut national  
d'excellence en santé  
et en services sociaux**

**Québec** 

#### Siège social

2535, boulevard Laurier, 5<sup>e</sup> étage  
Québec (Québec) G1V 4M3  
418 643-1339

#### Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12<sup>e</sup> étage, bureau 1200  
Montréal (Québec) H3A 2S9  
514 873-2563

[inesss.qc.ca](http://inesss.qc.ca)

