

Avis

Évaluation de cinq analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois* et système de mesure des procédures de *biologie médicale*

Transmission au ministre : 24 juillet 2015
Publication officielle : 22 septembre 2015

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

Le présent avis est produit par l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) qui assume l'entière responsabilité de sa forme et de son contenu définitifs.

Chaque analyse a été évaluée avec une approche méthodologique qui prend en considération, notamment, les facteurs suivants :

- la pertinence clinique;
- la validité clinique;
- la validité analytique;
- les conséquences prévisibles sur les ressources du système de santé et de services sociaux de l'introduction de l'analyse au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*.

Équipe de projet

Direction

Michel LeBrun, M.B.A., Ph. D.

Coordination

Éric Potvin, Ph. D.

Professionnels scientifiques

Frédéric Breton, B. Sc.

Anne Fortin, B. Pharm., M. Sc.

Geneviève Martin, Ph. D.

Elena Morarescu, M. Sc.

Éric Potvin, Ph. D.

Recherche d'information scientifique

Caroline Dion, MBSI, *bibl. prof.*

Mathieu Plamondon, MSI

Soutien documentaire

Micheline Paquin, *tech. doc.*

Édition

Responsable

Renée Latulippe

Coordination

Véronique Baril

Révision linguistique

Révision Littera Plus

Mise en pages

Marie-Andrée Houde

Vérification bibliographique

Denis Santerre

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2015

Bibliothèque et Archives Canada, 2015

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-74065-0 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2015

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Évaluation de cinq analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Québec, Qc : INESSS; 2013. 85 p.

L'Institut remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration du présent document.

Responsabilité

L'Institut assume l'entière responsabilité de la forme et du contenu définitifs du présent document. Les conclusions ne reflètent pas forcément les opinions des personnes consultées dans le cadre de ce dossier.

Déclaration d'intérêts

Tous les membres du comité scientifique ont rempli un formulaire de déclaration d'intérêts. Les conflits potentiels sont indiqués à la section 1 *Information générale* de chacun des avis (encadré).

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

François Rousseau, M.D., FRCPC

- Médecin biochimiste, CHU de Québec

Vice-président

Lambert Busque, M.D., FRCPC

- Hématologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Membres

Lorraine Caron

- Consultante en éthique

Guy Fink, Ph. D.

- Biochimiste clinique, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

Louis Gaboury, M.D., Ph. D.

- Anatomo-pathologiste, Hôtel-Dieu du CHUM

Annie-Claude Labbé, M.D., FRCPC

- Microbiologiste infectiologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

David Rosenblatt, M.D., FRCPC

- Pédiatre, généticien, Hôpital général de Montréal

Maude Saint-Jean, M.D.

- Pédiatre, microbiologiste médicale et infectiologue, maladies infectieuses, Hôpital Fleury

Membre citoyen

Suzanne K. Bédard

- Conseillère en évaluation des technologies, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

LISTE DES ANALYSES

TABLEAU-SYNTÈSE DES RECOMMANDATIONS	i
QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN — RECHERCHE DE MUTATIONS (RÉFÉRENCE – 2013.03.11)	1
ANALYSE DES DYSTROPHIES MUSCULAIRES PAR WESTERN <i>BLOT</i> (RÉFÉRENCE – 2014.02.08).....	21
DOSAGE DE LA PROTÉINE APPARENTÉE À LA PARATHORMONE PAR MÉTHODE IMMUNORADIOMÉTRIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.03.01).....	34
DÉTECTION DE <i>KINGELLA KINGAE</i> , <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> , <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> ET <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i> PAR TECHNIQUE D’AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS UN LIQUIDE ARTICULAIRE OU PLEURAL (RÉFÉRENCE – 2014.03.05).....	57
DÉPISTAGE PRÉNATAL DES STREPTOCOQUES DE GROUPE A ET B PAR TECHNIQUE D’AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES (RÉFÉRENCE – 2014.03.13).....	72

TABLEAU-SYNTÈSE DES RECOMMANDATIONS

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES ADDITIONNELS
2013.03.11	Quatre maladies récessives du Saguenay–Lac-Saint-Jean — recherche de mutations	Établie	Avis de recommandation d'introduction	Il s'agit d'une réévaluation de l'avis publié en août 2014 dans lequel l'INESSS demandait de compléter la validation de la technologie TaqMan®. Les données transmises par le centre demandeur ont été jugées satisfaisantes.
2014.02.08	Analyse des dystrophies musculaires par western blot	Établie	Avis de recommandation d'introduction	Le comité reconnaît la pertinence de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui. Relativement au diagnostic des dystrophies musculaires, le western blot utilisé en combinaison avec l'IHC comble un besoin actuellement non couvert par le <i>Répertoire</i> .
2014.03.01	Dosage de la protéine apparentée à la parathormone par méthode immunoradiométrique	Établie	Avis de recommandation d'introduction	<p>L'analyse proposée repose sur un nombre restreint de cas, mais elle comble un besoin actuellement non couvert par le <i>Répertoire</i>. Le comité reconnaît la pertinence de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui. À cet égard, le dosage de la PTHrP fait partie d'algorithmes cliniques reconnus en médecine pour le diagnostic différentiel de l'hypercalcémie.</p> <p>L'absence d'un système de contrôle de la qualité externe a été notée. Les membres du comité reconnaissent néanmoins que, en raison du contexte particulier, l'obtention des volumes d'analyse nécessaires représente, dans ce cas-ci, un défi de taille. Le comité recommande donc au centre demandeur de participer à un programme externe d'assurance qualité. De plus, un suivi du nombre de tests réalisés (volumétrie) devrait être réalisé.</p>
2014.03.05	Détection de <i>Kingella kingae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Streptococcus pyogenes</i> par technique d'amplification des acides nucléiques dans un liquide articulaire ou pleural	Établie	Avis de recommandation d'introduction	<p>L'analyse proposée concerne presque exclusivement une population pédiatrique et elle répond à un besoin actuellement non couvert par le <i>Répertoire</i>. Le comité reconnaît la pertinence de cette analyse au regard du contexte particulier, des données cliniques publiées et des recommandations d'autres organismes.</p> <p>Toutefois, les données de validité analytique fournies par le demandeur ont été jugées fragmentaires et incomplètes. Les membres du comité reconnaissent néanmoins qu'en raison d'une faible incidence ainsi que du volume limité de spécimens (liquide articulaire et pleural prélevé chez des enfants) disponible dans ce type d'infection, l'obtention d'un échantillon de grande taille pour effectuer des comparaisons entre différentes analyses représente, dans ce cas-ci, un défi majeur.</p>

	ANALYSE	TECHNOLOGIE	RECOMMANDATION	COMMENTAIRES ADDITIONNELS
				Le comité recommande donc au centre demandeur de poursuivre la comparaison PCR/culture et la collecte de données. La participation à un programme externe d'échange de spécimens est également encouragée par le comité afin d'assurer le maintien de la qualité.
2014.03.13	Dépistage prénatal des streptocoques de groupe A et B par technique d'amplification des acides nucléiques	Établie	Avis de recommandation d'introduction	<p>Le comité reconnaît la pertinence médicale de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui, mais uniquement pour le dépistage du streptocoque du groupe B (SGB). D'ailleurs, le comité recommande que cette analyse soit inscrite comme <i>Dépistage prénatal des streptocoques de groupe B par TAAN</i>.</p> <p>Concernant la validité analytique, les données fournies par le demandeur ont été jugées satisfaisantes. Toutefois, dans un contexte d'assurance qualité, le comité suggère à l'établissement demandeur de comparer les performances analytiques de son analyse maison avec celles d'une trousse commerciale homologuée par Santé Canada.</p> <p>Finalement, le comité remet en question la hiérarchisation suprarégionale du dépistage systématique du streptocoque du groupe A, telle qu'avancée par le centre demandeur. Le comité est d'avis qu'il s'agit plutôt d'une proposition de changement technologique pour une analyse dont l'utilité clinique pour le SGB est établie. Deux analyses de détection de SGB (technique d'agglutination sur bouillon de culture – code 40270; culture – code 40269) sont déjà présentes dans le <i>Répertoire</i> et utilisées par d'autres établissements. L'analyse par TAAN ne devrait pas remplacer les deux autres analyses inscrites au <i>Répertoire</i>.</p>

QUATRE MALADIES RÉCESSIVES DU SAGUENAY–LAC-SAINTE-JEAN — RECHERCHE DE MUTATIONS (RÉFÉRENCE – 2013.03.11)

Avis de réévaluation de l'avis de l'INESSS publié en août 2014

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : Centre de santé et de services sociaux (CSSS) de Chicoutimi – CHA régional

1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juillet 2015

1.3 Date de publication de l'avis : 30 septembre 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur 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

Le Dr François Rousseau du CHU de Québec n'a pas participé aux délibérations et il s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie : TaqMan®

2.2 Description brève des technologies et précisions techniques et cliniques

Le TaqMan® est utilisé pour dépister les porteurs de l'une des quatre maladies récessives suivantes :

- l'acidose lactique congénitale du Saguenay–Lac-Saint-Jean (ALC-SLSJ);
- la tyrosinémie héréditaire de type 1 (TH1);
- la neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC);
- l'ataxie récessive spastique de Charlevoix – Saguenay (ARSACS).

Cinq mutations sont recherchées pour ces quatre maladies, l'ARSACS ayant deux mutations spécifiques.

Concernant le TaqMan®, la discrimination allélique repose sur l'activité 5'-exonucléase de l'ADN polymérase Taq. La détection allélique nécessite, pour chaque mutation, la conception de deux amorces PCR non marquées et de deux sondes spécifiques à l'allèle sauvage et à l'allèle mutant, respectivement. L'extrémité 5' des sondes est marquée par un fluorophore unique. L'autre extrémité est marquée par une molécule qui masque la fluorescence selon le principe FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)¹. Au moment de l'élongation des

¹ Le principe de FRET repose sur la proximité physique entre un fluorophore rapporteur et une molécule qui masque la fluorescence (*quencher*) sur la sonde intacte.

amorces, si l'ADN polymérase rencontre une sonde TaqMan® parfaitement hybridée en aval, celle-ci sera hydrolysée. Par contre, si l'hybridation n'est pas parfaite, la sonde sera déplacée et donc conservée intacte [Livak, 1999]. L'hydrolyse de la sonde génère une fluorescence mesurable qui s'intensifie d'un cycle PCR à l'autre [De Kok *et al.*, 2002] (annexe A).

2.3 Société ou développeur

- **Trousse TaqMan® Sample-to-SNP** (Applied Biosystem, Californie, É.-U.). Tampon d'extraction d'ADN, MasterMix PCR et contrôles (n^{os} cat. 4403313, 4403081, 4403083, 4403085 ou 4403087 selon les volumes).
- **Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays** (Applied Biosystem, Californie, É.-U.). Jeu d'amorces et de sondes spécifiques aux mutations énoncées dans cet avis (n^o cat. 4331349).

2.4 **Brevet, le cas échéant** : ne s'applique pas.

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

2.6 Valeurs pondérées

- 5 mutations : 23
- 1 mutation : 11

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

3.1 Patients ciblés

- **Identification du statut de porteur en situation préconceptionnelle** : pour les personnes ou les couples âgés de 18 ans et plus qui habitent au Saguenay–Lac-Saint-Jean **et** dont au moins un des grands-parents est né dans l'une de ces régions : Saguenay–Lac-Saint-Jean, Charlevoix ou Haute-Côte-Nord.
- **Identification du statut de porteur en situation prénatale** : pour les femmes ou les couples dont la grossesse en cours est de moins de 14 semaines, qui habitent au Saguenay–Lac-Saint-Jean **et** dont au moins un des grands-parents est né dans l'une de ces régions : Saguenay–Lac-Saint-Jean, Charlevoix ou Haute-Côte-Nord.
- **Diagnostic prénatal** : lorsqu'il est confirmé que les deux parents sont porteurs de la même mutation et qu'il y a une grossesse en cours.
- **Confirmation diagnostique** : pour les personnes suspectées d'être atteintes d'une de ces quatre maladies.

3.2 Description des maladies visées

Le tableau 1 présente les faits saillants et les caractéristiques des quatre maladies dépistées.

3.2.1 L'acidose lactique congénitale type Saguenay–Lac-Saint-Jean (ALC-SLSJ)

L'ALC-SLSJ ou syndrome de Leigh avec déficience en cytochrome c oxydase (OMIM 220111) est caractérisée par une acidose métabolique chronique, une hypotonie, une dysmorphie faciale ainsi que par un retard de développement psychomoteur et une déficience intellectuelle modérée [Mootha *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 1993]. Au SLSJ, l'incidence de la maladie est de 1 naissance sur 2063 alors que la fréquence des porteurs est de 1 sur 23 [Morin *et al.*, 1993]. En 2011, une revue médicale exhaustive des 56 cas d'ALC-SLSJ reconnus avant 2007 a été publiée [Debray *et al.*, 2011]. Selon les données disponibles, les premiers symptômes surviennent vers l'âge de 5 mois et ils sont de nature variable : détresse néonatale (20 %), retard psychomoteur (45 %), retard de croissance (10 %), ataxie (4 %) et acidose métabolique aiguë (21 %) [Debray *et al.*, 2011]. Les nouveau-nés peuvent présenter de l'hypotonie (58 %), de la tachypnée transitoire (47 %), un faible réflexe de succion (44 %), des trémulations (28 %), de l'hypoglycémie (17 %) ou une crise acidotique sévère (17 %). Relativement à la survenue de crises métaboliques aiguës, 10 % (5/50) des cas n'en avaient jamais subi et étaient toujours vivants (âge moyen de 8,3 ans). Vers l'âge de 14 ou 15 mois, 68 % des patients étaient décédés des suites d'au moins une (22 enfants) ou deux (13 enfants) crises acidotiques aiguës. Globalement, 82 % des patients évalués sont décédés de la maladie. La médiane de survie était de 1,6 an [Debray *et al.*, 2011].

Le gène responsable de l'ALC-SLSJ, le LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein*), a été identifié en 2003 [Mootha *et al.*, 2003]. La mutation fréquente 1061C>T, située sur l'exon 9 du gène, cause la substitution d'un seul acide aminé (A354V) et explique plus de 98 % de tous les cas recensés en 2011 [Debray *et al.*, 2011]. Aucun traitement n'est disponible.

3.2.2 Tyrosinémie congénitale héréditaire de type 1 (TH 1), spécifique au Saguenay–Lac-Saint-Jean

La TH1 (OMIM 276700) est une maladie métabolique résultant d'un déficit de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), dernière enzyme du sentier catabolique de la tyrosine. La prévalence mondiale varie entre 1 naissance sur 1 000 000 et 1 sur 120 000 [De Braekeleer et Larochelle, 1990]. Au SLSJ, la prévalence est beaucoup plus élevée, soit de 1 cas sur 1 846 alors que 1 personne sur 20 porte un allèle muté du gène *FAH* [De Braekeleer et Larochelle, 1990]. Une seule mutation présente dans l'intron 12 (IVS12+5G>A-*splice mutation*) du gène *FAH* explique 90 % des cas au SLSJ [Poudrier *et al.*, 1996; Grompe *et al.*, 1994].

Deux formes cliniques ont été décrites. La forme aiguë, grave et fréquente, apparaît souvent dans les premières heures de vie. Elle se caractérise par une nécrose hépatocellulaire et une dysfonction rénale tubulaire qui progresse rapidement [Baumann *et al.*, 2005; Croffie *et al.*, 1999]. Lorsque la TH1 n'est pas traitée, cette détérioration rapide entraîne le décès dans les deux ans [Russo et O'Regan, 1990]. L'autre forme est chronique et touche 37 % des patients de plus de deux ans. Une cirrhose mixte et un risque élevé de carcinome hépatocellulaire la caractérisent [Russo et O'Regan, 1990; Weinberg *et al.*, 1976]. Certaines manifestations neurologiques très graves contribuent à augmenter la morbidité et la mortalité lorsque le traitement est sous-optimal [Mitchell *et al.*, 1990]. Le traitement inclut une diète pauvre en tyrosine, en phénylalanine et en méthionine. Depuis 1994, la nitisinone (Orfadin®), un médicament qui inhibe le catabolisme de la tyrosine et empêche l'accumulation des métabolites toxiques, est offerte aux patients du Québec atteints de la TH1 [Larochelle *et al.*, 2012].

Utilisée fréquemment dans le passé, la transplantation hépatique est maintenant réservée aux cas [Bartlett *et al.*, 2014; Mohan *et al.*, 1999] :

- 1) avec une cirrhose précoce sévère;
- 2) réfractaires à la nitisinone;
- 3) avec carcinome hépatique.

3.2.3 Neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux (NSM/ACC)

La NSM/ACC ou syndrome d'Andermann (OMIM 218000) est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'agénésie du corps calleux et la dégénérescence progressive des nerfs périphériques [Dupré *et al.*, 2003]. La maladie touche 1 naissance sur 2117 et la fréquence des porteurs a été calculée à 1 cas sur 23 habitants du Nord-Est québécois [De Braekeleer *et al.*, 1993a]. Les symptômes qui en résultent sont un retard de développement, de l'aréflexie, l'amyotrophie et l'hypotonie, une déficience intellectuelle variable de même que des épisodes de psychose chez certains adolescents [Dupré *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 1990]. Certains patients peuvent présenter une dysmorphie faciale. Concernant le corps calleux, une étude radiologique réalisée sur 64 cas a montré une agénésie complète ou partielle de la structure chez 58 % et 9 % de ceux-ci, respectivement [Mathieu *et al.*, 1990]. L'évolution de la maladie se caractérise par un retard important du début de la marche (vers 3,8 ans), une scoliose vers 10 ans et une perte de l'autonomie ambulatoire vers 14 ans [Howard *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 1990]. La survie globale moyenne est de 33 ans [Dupré *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2003]. Les analyses moléculaires ont démontré que tous les patients québécois atteints présentaient une mutation ponctuelle dans l'exon 18 (2436ΔG, T813fsX813) du gène *SLC12A6* codant pour un cotransporteur K⁺/Cl⁻ [Howard *et al.*, 2003; 2002]. La maladie est incurable.

3.2.4 Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix – Saguenay (ARSACS)

L'ARSACS (OMIM 270550) est une maladie neurodégénérative homogène caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce avec spasticité, un syndrome pyramidal et une neuropathie périphérique [Bouchard *et al.*, 1978]. L'incidence de la maladie est de 1 naissance sur 1 932 et la fréquence des porteurs de 1 sur 22 [De Braekeleer *et al.*, 1993b].

La maladie se manifeste entre 12 et 18 mois par un manque d'équilibre marqué à l'apprentissage de la marche et une démarche altérée [Bouchard *et al.*, 1998]. Certains signes sont précoces et s'aggravent avec le temps, tels que l'ataxie spastique des quatre membres, la dysarthrie, l'amyotrophie distale et la perte du réflexe du tendon d'Achille vers 25 ans. D'autres manifestations non progressives comme le mouvement involontaire des globes oculaires, le signe de Babinski et l'augmentation des réflexes tendineux profonds sont classiques [Bouchard *et al.*, 1998]. L'examen de la rétine montre systématiquement une hypermyélinisation des fibres nerveuses chez les patients québécois, mais sans perte de la vision [Fontaine, 2008].

L'ARSACS est due à des mutations du gène *SACS* codant pour une protéine de haut poids moléculaire nommée saccine [Engert *et al.*, 2000]. La saccine exerce une importante activité de chaperon moléculaire dans le mécanisme de défense contre l'agrégation protéique [Girard *et al.*, 2012; Kozlov *et al.*, 2011; Parfitt *et al.*, 2009]. Les deux mutations rapportées sont : 6594ΔT (majeure) et 5254C>T (mineure) et comptent pour plus de 97 % des cas d'ARSACS [Mercier *et al.*, 2001]. De plus, une douzaine de mutations supplémentaires, expliquant du même coup la variabilité clinique et l'absence d'un diagnostic précis chez certains cas d'ARSACS au Québec, ont été repérées [Thiffault *et al.*, 2013].

La maladie évolue très lentement et l'espérance de vie est d'une soixantaine d'années [Fontaine, 2008].

3.3 Nombre de patients visés

Le CSSS de Chicoutimi estime le volume annuel à environ 7 000 tests pour tout le Québec, dont 5 000 viendraient directement de la région du SLSJ.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Tous les professionnels de la santé qui participent aux suivis prénataux, dont les infirmières en obstétrique, les médecins obstétriciens (médecins de famille et spécialistes), les pédiatres et les conseillers en génétique.

3.5 Modalités d'administration du test

Prélèvement sanguin sur papier buvard ou sang total-EDTA. Dans tous les cas, les cinq mutations peuvent être analysées sur un même échantillon.

Tableau 1 Faits saillants et caractéristiques des quatre maladies

NOM DE LA MALADIE	ACIDOSE LACTIQUE CONGÉNITALE TYPE SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN (ALC-SLSJ)	TYROSINÉMIE HÉRÉDITAIRE CONGÉNITALE DE TYPE I (TH1)	NEUROPATHIE SENSITIVOMOTRICE AVEC OU SANS AGÉNÉSIE DU CORPS CALLEUX (NSM/ACC)	ATAXIE RÉCESSIVE SPASTIQUE AUTOSOMIQUE DE CHARLEVOIX – SAGUENAY (ARSACS)
INCIDENCE	1/2063 (1979-1990)	1/1846 (1970-1988)	1/2117 (1956–1985)	1/1932 (1941–1985)
FRÉQUENCE DE PORTEURS	1/23	1/20	1/23	1/22
GÈNE RESPONSABLE	<i>LRPPRC</i>	<i>FAH</i>	<i>SLC12A6 (KCC3)</i>	<i>SACS</i>
FONCTION DU GÈNE	Métabolisme des ARNm mitochondriaux (probable)	Catabolisme de la tyrosine	K ⁺ /Cl ⁻ cotransporteur, réponse aux changements osmotiques	Chaperonne moléculaire Recrutement Hsp70 (probable)
MUTATIONS DÉPISTÉES : PROPORTION	1061C>T (A354V) : 99 %	1062+5G>A (IVS12+5G>A) : 90 %	2436ΔG (T813fsX813) : > 99 %	6594ΔT (I2949FfsX) : 93,8 % 5254C>T (R2502X) : 3,4 %
CONSÉQUENCES BIOCHIMIQUES	Activité COX ↓ Acidose lactique	Activité FAH ↓ Métabolites de la tyrosine ↑	Volume neurones et cellules gliales ↑ : neuro-dégénérescence	Mécanisme de protection contre l'agrégation protéique ↓
ÂGE APPARITION	5 mois (0-24 mois)	Forme précoce : < 3 mois Forme tardive : > 1 an	< 1 an	12-18 mois
SYMPTÔMES	Retard de croissance et de développement, dysmorphie faciale, crises métaboliques et neurologiques (syndrome de Leigh)	Nécrose et carcinome hépatocellulaire, tubulopathie rénale et crises neurologiques aiguës	Neuropathie sensorimotrice progressive, hypotonie, aréflexie, amyotrophie, scoliose, dysmorphie, retard intellectuel, psychose	Ataxie, dysarthrie, nystagmus, amyotrophie distale, hyperréflexie, spasticité, pes cavus, rétinopathie
PRONOSTIC	Taux de mortalité : 82 % Incidence crises fatales : 52 % Survie : 1,6 an (5 j à > 30 ans)	Si non traitée, décès < 2 ans ou < 12 ans pour formes aiguë et chronique, respectivement	Marche vers 4 ans Arrête de marcher vers 14 ans Survie globale moyenne : 33 ans	Fauteuil roulant 41 ans [17-57] Survie < 60 ans
TRAITEMENTS	Diète spéciale	Diète, nitisinone (Orfadin®), transplantation hépatique	Symptômes seulement	Symptômes seulement

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature des technologies diagnostiques

Concernant le TaqMan® sur les cinq mutations, cette analyse n'est pas inscrite dans le *Répertoire*, mais elle a fait l'objet d'un projet pilote de dépistage génétique parrainé par le ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) et l'Agence de la santé et des services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean (ASSS 02) depuis 2009.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Il s'agit d'un dépistage simultané de quatre maladies génétiques récessives autosomiques par la technique de PCR de type TaqMan® (annexe A).

Actuellement, le CHU Sainte-Justine est désigné pour les analyses suivantes : 50010 ARSACS (VP : 21) et 50051 COX (VP : 39). La technologie employée est le TaqMan®.

Le CHU de Québec est désigné pour les analyses suivantes : 50252 NSM/ACC (VP : 31) et 50313 TH1 (VP : 31). La technologie employée est l'amplification PCR avec des amorces spécifiques aux allèles sauvages et mutés, respectivement.

4.3 Description des avantages évoqués des technologies proposées

L'essai TaqMan® s'effectue dans un seul tube au moyen d'une seule réaction enzymatique, ce qui réduit le risque de contamination croisée inhérent aux manipulations post PCR des échantillons. Le groupement moléculaire MGB (*minor-groove binder*) présent en 3' des sondes fluorogéniques augmente la stabilité du duplex sonde-gabarit [Afonina *et al.*, 1997]. Ce gain de stabilité permet l'usage de sondes plus courtes et donc plus spécifiques au mésappariement d'un seul nucléotide². De plus, le masquage de la fluorescence non spécifique est plus efficace en raison de la plus grande proximité physique entre le fluorophore et le *quencher*, ce qui augmente la sensibilité de l'essai [Kutyavin *et al.*, 2000]. Parmi les autres avantages, De la Vega et ses collaborateurs listent la flexibilité de l'essai, notamment dans le choix des amorces PCR, la facilité d'automatisation et le faible coût [De la Vega *et al.*, 2005].

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

Au Québec, les personnes nées au SLSJ ou celles dont les parents proches y sont nés présentent un risque anormalement élevé de transmettre un allèle responsable d'une des quatre maladies visées ici en raison d'un effet fondateur. En effet, quelle que soit la maladie, le statut de porteur est observé chez environ 1 personne sur 22 alors qu'environ 1 enfant sur 2 000 en est atteint [De Braekeleer *et al.*, 1993a; De Braekeleer *et al.*, 1993b; Morin *et al.*, 1993; De Braekeleer et Larochelle, 1990].

² Malgré la taille réduite des sondes TaqMan®, le gain de stabilité obtenu par l'ajout du groupement MGB permet de conserver une température de dénaturation sonde-gabarit (T_m) élevée et près de la température de polymérisation de la Taq (66-70 °C).

L'analyse proposée ici vise à mettre en évidence, chez une personne à risque, la présence d'un ou de plusieurs allèles spécifiques à ces quatre maladies autosomiques récessives afin d'établir le statut de porteur. La confirmation que les deux membres d'un couple en sont porteurs permettra un conseil génétique adéquat, que ce soit lors de la planification d'une grossesse ou au cours du premier trimestre de celle-ci. Indépendamment de la technique employée pour déceler un porteur, chacune de ces quatre maladies est grave, débilitante et annonce un pronostic très sombre en ce qui concerne la mortalité et la morbidité (tableau 1).

5.2 Validité clinique

La validité clinique d'un test génétique repose sur sa capacité à mettre en évidence la présence (sensibilité) ou l'absence (spécificité) d'un phénotype clinique observé [Zimmern et Kroese, 2007]. Or, en raison du caractère récessif des maladies visées ici, les tests proposés ont pour but d'identifier une composante moléculaire présente chez une personne qui n'a pas le phénotype clinique observable. La sensibilité clinique du test de porteur est donc tributaire de l'hétérogénéité génétique, c'est-à-dire le nombre de gènes impliqués, les mutations causales et la variabilité ethnique de la population cible [Watson *et al.*, 2004]. Concernant les quatre maladies du SLSJ, la validité clinique des tests de porteurs est bien établie, car :

- la population cible est connue et homogène;
- les gènes en cause sont connus et uniques;
- la fréquence des allèles causals est connue et élevée (tableau 2);
- le nombre de mutations responsables est restreint et leur pénétrance est élevée.

Considérant la corrélation élevée entre les génotypes recherchés et les phénotypes visés, la sensibilité du test de porteur sera surtout influencée par sa robustesse analytique, c'est-à-dire sa capacité à identifier correctement la présence ou l'absence de la bonne séquence d'ADN [Burke, 2009]. En admettant que la sensibilité analytique du test de porteur soit de 100 %, la sensibilité clinique serait théoriquement équivalente à la proportion des mutations causales couverte par le test.

Tableau 2 Corrélation entre les cinq génotypes testés et les quatre phénotypes propres à la population du SLSJ

ÉTUDE	PHÉNOTYPE	CAS (N)	MÉTHODE	GÉNOTYPE TESTÉ	PROPORTION DES MUTATIONS (%)
Debray, 2011	ALC-SLSJ	56	PCR ASO	<i>LRPPRC</i> : C1061T (A354V)	111/112 (99,1)
Mercier, 2001	ARSACS	129	PCR ASO	<i>SACS</i> : 6594ΔT (I2949FfsX) <i>SACS</i> : 5254C>T (R2502X)	196/209 (93,8) 7/209 (3,4)
Howard, 2002	NSM/ACC	81	PCR	<i>SLC12A6</i> : 2436ΔG (T813fsX813)	161/162 (99,4)
Grompe, 1994	TH1	25	PCR ASO	<i>FAH</i> : IVS12+5G>A (épissage)	45/50 (90)

Sigles et acronymes : ALC-SLSJ : acidose lactique congénitale Saguenay–Lac-Saint-Jean; ARSACS : ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay; ASO : allèle spécifique oligonucléotide; N : nombre; NSM/ACC : neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux; PCR : *polymerase chain reaction*; TH1 : tyrosinémie héréditaire de type 1.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Projet pilote (Luminex®)

Le projet pilote visant l'identification du statut de porteur d'une des quatre maladies récessives du SLSJ a été amorcé en mars 2009 et le MSSS, l'ASSS 02, le CSSS de Chicoutimi, le CHU de Québec et le CHU Sainte-Justine³ participent à la démarche. À noter que la validation clinique et analytique des résultats a été effectuée en collaboration avec trois médecins-biochimistes du CHU de Québec.

La technologie développée et utilisée reposait alors sur une amplification multiplex couplée à une détection sur la plateforme Luminex®. Les données finales concernant les performances analytiques de la plateforme Luminex® sont tirées du *Rapport final sur les activités du laboratoire de biologie moléculaire clinique du CSSS de Chicoutimi*, transmis au MSSS le 17 mai 2013⁴ (tableau 3). Ce rapport mentionne que certaines difficultés techniques, notamment en ce qui concerne les contrôles négatifs, ont généré un taux de reprises de séries complètes plus élevé qu'attendu. Malgré les améliorations significatives de la robustesse de l'analyse avec le temps, le taux de reprises complètes est demeuré élevé. En parallèle, les responsables du projet pilote ont développé et validé progressivement une technologie de remplacement plus robuste et largement utilisée en diagnostic clinique : le TaqMan®.

Projet pilote (TaqMan®)

En janvier 2014, le MSSS a confié à l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) le mandat d'étudier la pertinence et les performances analytiques du changement technologique proposé par les responsables du projet pilote. À la lumière des données disponibles au moment de son évaluation, l'INESSS a reçu favorablement le changement technologique proposé, mais il a demandé plus de détails sur la validation technique de la méthode TaqMan® maintenant utilisée depuis février 2014⁵. Les données complètes issues de la validation analytique du TaqMan® sont présentées au tableau 4⁶. Les données originales, telles qu'elles ont été transmises par le CSSS de Chicoutimi, sont présentées à l'annexe B.

³ En juillet 2014, l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) a publié un rapport d'évaluation du Projet-pilote d'offre de tests de porteur pour quatre maladies héréditaires récessives au Saguenay–Lac-Saint-Jean. Il avait pour objectif de « tracer le bilan relatif à son déroulement et d'identifier les modifications qui auraient le potentiel d'optimiser l'offre de services et les résultats obtenus dans une optique de continuité » [Pouliot, 2014].

⁴ Le rapport final de même que les deux rapports intérimaires (2009 et 2010) sur les activités de laboratoire du Projet-pilote ont été transmis à l'INESSS le 21 novembre 2014 par Mme Catherine Hamelin M. Sc., conseillère en génétique du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.

⁵ Voir Quatre maladies récessives du Saguenay–Lac-Saint-Jean – Recherche de mutations (référence 2013.03.011), disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2014/INESSS_Avis_ministre_analyses_biologie_medicale_juin_2014_2.pdf.

⁶ Ces données ont été transmises à l'INESSS, au MSSS et à l'ASSS 02 le 9 décembre 2014 par monsieur Luigi Bouchard, Ph. D., M.B.A., responsable du service de biologie moléculaire et de génétique du CSSS de Chicoutimi.

Tableau 3 Validation analytique du projet pilote de dépistage des quatre maladies héréditaires récessives du SLSJ (Luminex®)

ANNÉE	TEST (N)	SÉRIE (N)	VALIDATION ET AQ* (N)					CONCORDANCE (%)	REPRISE [§] N (%)		SE/SP (%)
			Couples porteurs	Profils atypiques [†]	Profils absents [‡]	CQ envoyés	CQ reçus		Tests	Séries	
2009-2012	2866	86	19	55	79	160	260	100	143 (5,0)	11 (12,8)	100

Sigles et acronymes : AQ : assurance qualité; CQ : contrôles de qualité; N : nombre; SE : sensibilité; SP : spécificité

* Dans le cadre du projet pilote, il y a deux indications de validation externe : couples de porteurs et fluorescence atypique. Les échantillons ont été séquencés au Laboratoire ECOGENE-21 ou envoyés aux CHU de Québec et Sainte-Justine. Un programme d'AQ a été mis sur pied entre les trois établissements. Celui-ci prévoyait l'échange d'échantillons (10 reçus et 10 envoyés aux 3 mois).

† La fluorescence atypique a été reliée à la présence d'un polymorphisme rare (rs4953042) couvert par les sondes normales et mutées du test multiplex de l'ALC. Le séquençage d'une centaine d'échantillons a permis de conclure qu'il n'y avait pas d'interférence significative avec l'interprétation des résultats selon le rapport final du 17 mai 2013.

‡ Résultats non concluants à deux reprises avec PCR multiplex (Luminex®).

§ Dans le cadre de la phase de rodage du projet pilote, un grand nombre de reprises était à prévoir en raison de l'application du « principe de prudence » tel que prévu au moment de la planification.

|| Sensibilité et spécificité à 100 % pour TH1, NSM/ACC et ARSACS 1 (en raison d'un nombre suffisant détecté d'au moins 92 porteurs; en fait, 106 porteurs ont été détectés pour ces 3 mutations). Seulement 84 porteurs ont été détectés pour ALC-SLSJ et 16 pour ARSACS 2, suggérant une sensibilité et une spécificité très élevées selon le rapport final du 17 mai 2013.

Tableau 4 Validation analytique du projet pilote de dépistage des quatre maladies héréditaires récessives du SLSJ (TaqMan®)

TECHNIQUE DE VALIDATION	ÉCHANTILLON (N)	NON PORTEUR (N)	PORTEUR (N)					CONCORDANCE (%)	REPRISE N (%)	SE/SP [‡] (%)
			ALC	TH1	NSM/ACC	ARSACS1	ARSACS2			
ECOGÈNE-21*	1410	1123	48	87	79	71	2	100	9 (0,26)	100
Luminex®	675	523	32	46	26	47	1			
CHU de Québec et Sainte-Justine [†]	1388	924	102	101	100	101	60			
Total	3473	2570	182	234	205	219	63			

Sigles et acronymes : ALC : acidose lactique congénitale; ARSACS : ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay; CHU : centre hospitalier universitaire; N : nombre; NSM/ACC : neuropathie sensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux; SE : sensibilité; SP : spécificité; TH1 : tyrosinémie héréditaire de type 1.

* La première série de validation du panel TaqMan® a été réalisée en respectant la procédure préalablement établie pour le panel Luminex® (ratio de porteurs sur non-porteurs 1 : 3).

† La validation a été effectuée à l'aveugle sur des échantillons dans lesquels le statut de porteur a été prédéterminé par une technique validée, le plus souvent celles des CHU de Québec (double ASO) et Sainte-Justine (TaqMan®), mais aussi par le panel multiplex utilisé dans le cadre du projet pilote.

‡ Plus de 92 échantillons porteurs ont été analysés et aucun résultat discordant n'a été observé : la sensibilité et la spécificité peuvent être évaluées avec confiance à 100 % pour l'ALC, la TH1, la NSM/ACC et la mutation majeure de l'ARSACS (ARSACS1) et avec un pourcentage de confiance très élevé pour la deuxième mutation (ARSACS2).

Assurance qualité

La prochaine section présente les mesures prises par le demandeur afin de réduire le nombre des erreurs de génotypes d'un essai TaqMan®.

Les demandeurs mentionnent que les mesures appliquées respectent les nouvelles normes de qualité en matière de diagnostic moléculaire du Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI, 2012]. Ces normes recommandent quatre approches possibles pour circonscrire les erreurs de génotypes lorsque le test moléculaire utilisé repose sur une amplification PCR⁷ :

- 1) la conception réfléchie des amorces et des sondes;
- 2) la validation technique à très large échelle;
- 3) la revue périodique de la littérature et des bases de données afin de répertorier les polymorphismes qui pourraient nuire à la détection des allèles;
- 4) un test systématique de chaque génotype au moyen d'une paire d'amorces différente ou d'une autre méthode.

Parmi les mesures suggérées, le laboratoire demandeur en a appliqué trois (1 à 3).

La dernière révision des bases de données a été complétée en novembre 2014 et aucun nouveau polymorphisme n'a été observé dans les régions couvertes par les amorces et les sondes TaqMan® (annexe B). Il y a quatre mutations connues dans ces régions (p.P369Q, p.N2955D, p.L2505V et p.A2519T) pour lesquelles la fréquence rapportée est de 1/5 000 (fréquence allélique minimale < 0,0002).

À cet égard, les demandeurs postulent que la fréquence allélique d'un polymorphisme inconnu est encore plus faible que le 1/5 000 rapporté pour les autres, ce qui ramènerait le risque de naissance d'un enfant atteint à moins de 1/400 000⁸.

À titre d'exemple, il a été déterminé que la variabilité génétique couverte par la mutation causale testée de la tyrosinémie est de 96 % (l'objectif du programme était de couvrir au moins 95 % de la variabilité génétique causale pour chaque maladie). Si cette mutation est portée par 1 personne sur 22, on peut postuler qu'il y a 1 personne sur 500 qui porte une autre mutation causale de cette maladie. Il y a donc un risque résiduel de 1/44 000 d'avoir un enfant atteint de cette maladie même si l'un des parents n'est pas porteur de la mutation testée. Ce risque résiduel conféré par le fait de rechercher seulement 96 % des allèles causals est beaucoup plus élevé que le risque associé à la perte allélique artéfactuelle (> 1/400 000). Le risque initial de donner naissance à un enfant atteint est d'environ 1/2 000 dans la population québécoise.

Enfin, les demandeurs rappellent que l'effet fondateur (diversité génétique moindre) observé au Saguenay–Lac-Saint-Jean ainsi que la technologie MGB de TaqMan® (qui permet de raccourcir la longueur des sondes sans changer la température d'hybridation) diminuent également le risque d'une perte allélique artéfactuelle.

⁷ Selon le CLSI, les principaux défis associés à l'assurance qualité d'un test moléculaire PCR du type TaqMan® sont le risque de perte allélique artéfactuelle (non-amplification stochastique d'un des deux allèles présents) et l'absence d'une méthode de référence.

⁸ Taux moyen de porteurs (1/20); *fréquence allélique (1/5 000); *risque si les deux parents sont porteurs (1/4).

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le *Registre des tests génétiques*⁹ approuvé par le CLIA fait mention de cinq tests effectués par TaqMan® pour des tests de porteurs pour une condition : « Thrombophilic Polymorphism Panel » au laboratoire du Cincinnati Children's Hospital Medical Center, É.-U.

Le *Répertoire* des tests diagnostiques de la Clinique Mayo aux États-Unis inclut les analyses TaqMan® offertes pour les conditions médicales suivantes :

- *JAK2 V617F* (diagnostic différentiel syndrome myéloprolifératif);
- *OPRM1 A355G* (efficacité thérapeutique du Naltrexone);
- *CYP3A5*3* (efficacité thérapeutique du Tacrolimus);
- *CYP3A4*22* (métabolisme de l'atorvastatin, du simvastatin et du lovastatin);
- *CYP2D6* (métabolisme tamoxifène, psychotropes, codéine et tramadol);
- *BCR-ABL* (détection du transcrit fusionnel, monitoring thérapeutique);
- *BRAF V600E* (efficacité thérapeutique, mélanomes sensibles aux anti-BRAF);
- *TPMT* (toxicité des thiopurines utilisées dans le traitement des leucémies et maladies auto-immunes);
- *SLCO1B1 V174A* (valeur pronostique associée à la prise de statine);
- *PTNP22* (valeur pronostique pour personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde).

Les lignes directrices du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2012, relativement aux tests de génétique moléculaire s'appuyant sur une amplification PCR initiale, soulignent l'importance de prendre en considération le phénomène de perte allélique artéfactuelle lors de la validation analytique du test [CLSI, 2012].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Le nombre d'analyses pourrait doubler, passant de 3 500 à 7 000, ce qui aurait un effet sur les ressources humaines et matérielles.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

N'ont pas été évaluées.

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

La disponibilité du dépistage systématique pour tout le Québec, et surtout pour la région du SLSJ, devrait s'accompagner de ressources possiblement accrues en conseil génétique. Les enjeux éthiques ont été abordés dans l'avis du comité d'éthique de santé publique de juillet 2007 (sensibiliser et informer la population, liberté de choix, offre de service pour les personnes atteintes et leur famille, évaluation du projet pilote, équité dans l'accès aux soins, etc.) [Comité d'éthique de santé publique (CESP), 2007].

⁹ National Center for Biotechnology Information (NCBI). Genetic Testing Registry (GTR) [site Web]. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les quatre maladies héréditaires récessives visées dans le présent avis sont spécifiques aux personnes dont les origines sont dans la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean ou de Charlevoix. Dans cette population, le statut de porteur se trouve chez 1 personne sur 20 à 23 alors que 1 enfant sur 2000 naîtra avec une de ces maladies. Le pronostic des personnes atteintes est très sombre en termes de mortalité ou de morbidité.

7.2 Validité clinique

La validité clinique des tests de porteur relativement aux quatre maladies récessives du Saguenay–Lac-Saint-Jean est bien établie, car la population cible est connue et homogène, les gènes en cause sont connus et uniques, la fréquence des allèles causals est connue et élevée et le nombre de mutations responsables est restreint et leur pénétrance est élevée.

7.3 Validité analytique

Relativement au dépistage de porteurs par la méthode TaqMan®, les demandeurs ont fourni les données de validation analytique manquantes. Les mesures de contrôle de la qualité ont fait l'objet de procédures opératoires normalisées développées par le requérant. Les contrôles de qualité interne sont décrits. Il y a concordance complète (100 %) entre les analyses effectuées dans le laboratoire du requérant et d'autres laboratoires. L'introduction de la technologie TaqMan® a réduit de façon considérable la fréquence des reprises ponctuelles ou complètes des analyses.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Selon le Genetic Testing Registry, le TaqMan® est actuellement utilisé en génétique moléculaire clinique. En effet, plusieurs tests moléculaires visant des polymorphismes précis sont réalisés par TaqMan®. Le CLSI souligne l'importance de considérer le phénomène de la perte allélique artéfactuelle lors du développement et de la validation d'un nouveau test moléculaire qui s'appuie sur une amplification initiale de l'ADN cible.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Quatre maladies du Saguenay–Lac-Saint-Jean – Recherche de mutations

Le statut de la technologie diagnostic

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

La recommandation de l'INESSS

- Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

COMMENTAIRES ADDITIONNELS

Il s'agit d'une réévaluation de l'avis publié en août 2014 dans lequel l'INESSS demandait de compléter la validation de la technologie TaqMan®. Les données transmises par le centre demandeur ont été jugées satisfaisantes.

RÉFÉRENCES

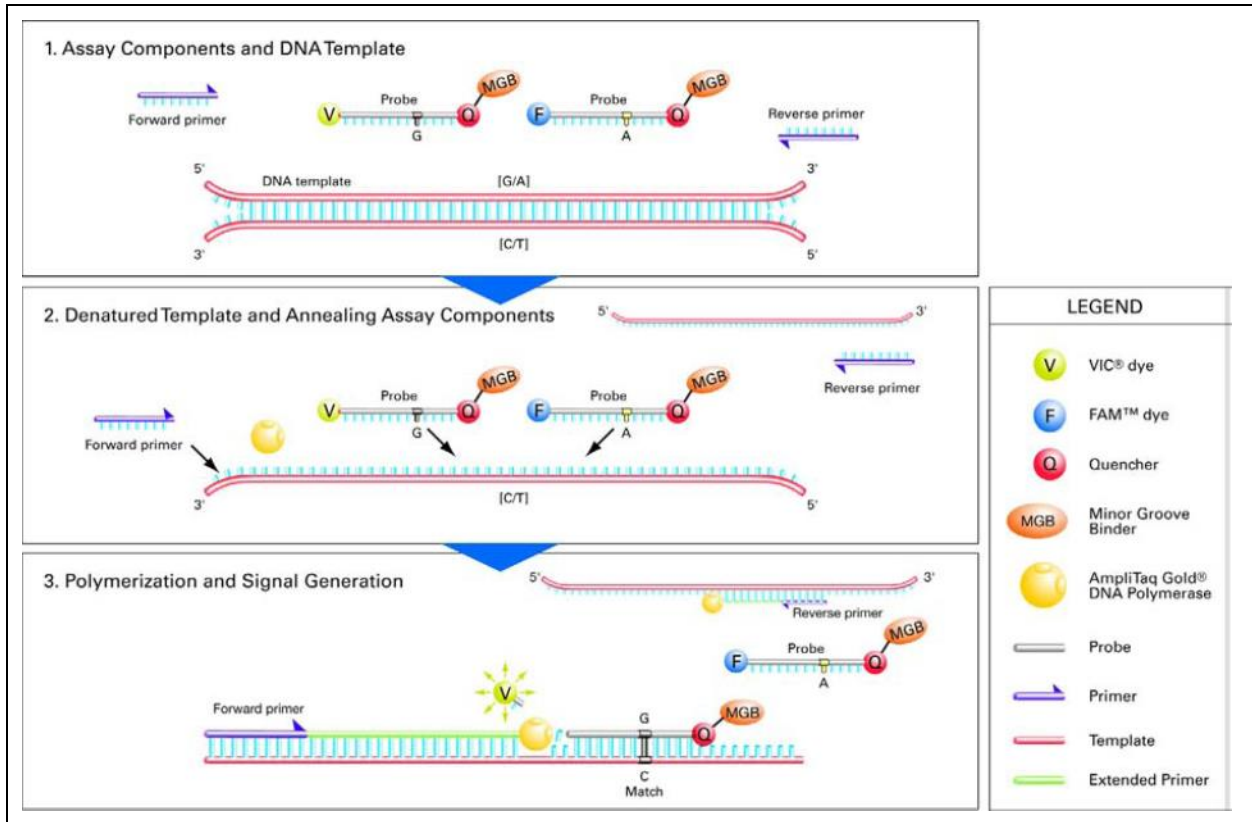
- Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997;25(13):2657-60.
- Bartlett DC, Lloyd C, McKiernan PJ, Newsome PN. Early nitisinone treatment reduces the need for liver transplantation in children with tyrosinaemia type 1 and improves post-transplant renal function. *J Inher Metab Dis* 2014;37(5):745-52.
- Baumann U, Preece MA, Green A, Kelly DA, McKiernan PJ. Hyperinsulinism in tyrosinaemia type I. *J Inher Metab Dis* 2005;28(2):131-5.
- Bouchard JP, Richter A, Mathieu J, Brunet D, Hudson TJ, Morgan K, Melancon SB. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord* 1998;8(7):474-9.
- Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* 1978;5(1):61-9.
- Burke W. Clinical validity and clinical utility of genetic tests. *Curr Protoc Hum Genet* 2009;Chapter 9:Unit 9.15.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality management for molecular genetic testing; Approved guideline. CLSI document MM20-A. Wayne, PA : CLSI; 2012.
- Comité d'éthique de santé publique (CESP). Avis sur le Projet-pilote d'offre de tests de porteur pour quatre maladies héréditaires récessives au Saguenay-Lac-St-Jean. Montréal, Qc : CESP; 2007. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/1853297>.
- Croffie JM, Gupta SK, Chong SK, Fitzgerald JF. Tyrosinemia type 1 should be suspected in infants with severe coagulopathy even in the absence of other signs of liver failure. *Pediatrics* 1999;103(3):675-8.
- De Braekeleer M et Larochelle J. Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean. *Am J Hum Genet* 1990;47(2):302-7.
- De Braekeleer M, Dallaire A, Mathieu J. Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Hum Genet* 1993a;91(3):223-7.
- De Braekeleer M, Giasson F, Mathieu J, Roy M, Bouchard JP, Morgan K. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec. *Genet Epidemiol* 1993b;10(1):17-25.
- De Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat* 2002;19(5):554-9.
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res* 2005;573(1-2):111-35.

- Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, et al. LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* 2011;48(3):183-9.
- Dupré N, Howard HC, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol* 2003;54(1):9-18.
- Engert JC, Bérubé P, Mercier J, Doré C, Lepage P, Ge B, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000;24(2):120-5.
- Fontaine B. Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay [site Web]. Orphanet; 2008. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=98.
- Girard M, Larivière R, Parfitt DA, Deane EC, Gaudet R, Nossova N, et al. Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(5):1661-6.
- Grompe M, St-Louis M, Demers SI, al-Dhalimy M, Leclerc B, Tanguay RM. A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I. *N Engl J Med* 1994;331(6):353-7.
- Howard HC, Dupré N, Mathieu J, Bouchard JP, Rouleau GA. La neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec agénésie du corps calleux. *Med Sci (Paris)* 2003; 19(4):414-6.
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 2002;32(3):384-92.
- Kozlov G, Denisov AY, Girard M, Dicaire MJ, Hamlin J, McPherson PS, et al. Structural basis of defects in the saccin HEPN domain responsible for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *J Biol Chem* 2011;286(23):20407-12.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000;28(2):655-61.
- Larochelle J, Alvarez F, Bussièrès JF, Chevalier I, Dallaire L, Dubois J, et al. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Quebec. *Mol Genet Metab* 2012;107(1-2):49-54.
- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14(5-6):143-9.
- Mathieu J, Bédard F, Prévost C, Langevin P. Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec ou sans agénésie du corps calleux : étude radiologique et clinique de 64 cas. *Can J Neurol Sci* 1990;17(2):103-8.
- Mercier J, Prévost C, Engert JC, Bouchard JP, Mathieu J, Richter A. Rapid detection of the saccin mutations causing autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Genet Test* 2001;5(3):255-9.
- Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Michaud J, Grenier A, Ogier H, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med* 1990;322(7):432-7.

- Mohan N, McKiernan P, Preece MA, Green A, Buckels J, Mayer AD, Kelly DA. Indications and outcome of liver transplantation in tyrosinaemia type 1. *Eur J Pediatr* 1999;158(Suppl 2):S49-54.
- Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(2):605-10.
- Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, De Braekeleer M. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 1993;53(2):488-96.
- Parfitt DA, Michael GJ, Vermeulen EG, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, et al. The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum Mol Genet* 2009;18(9):1556-65.
- Poudrier J, St-Louis M, Lettre F, Gibson K, Prévost C, Larochelle J, Tanguay RM. Frequency of the IVS12 + 5G-->A splice mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in carriers of hereditary tyrosinaemia in the French Canadian population of Saguenay-Lac-St-Jean. *Prenat Diagn* 1996;16(1):59-64.
- Pouliot S. Rapport d'évaluation du Projet-pilote d'offre de tests de porteur pour quatre maladies héréditaires récessives au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Québec, Qc : Institut national de santé publique du Québec (INSPQ); 2014. Disponible à : https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1764_Maladies_Hereditaires_Saguenay.pdf.
- Russo P et O'Regan S. Visceral pathology of hereditary tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1990;47(2):317-24.
- Thiffault I, Dicaire MJ, Tétreault M, Huang KN, Demers-Lamarche J, Bernard G, et al. Diversity of ARSACS mutations in French-Canadians. *Can J Neurol Sci* 2013;40(1):61-6.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6(5):387-91.
- Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr* 1976;88(3):434-8.
- Zimmern RL et Kroese M. The evaluation of genetic tests. *J Public Health (Oxf)* 2007;29(3):246-50.

ANNEXE A

Essai TaqMan®



© 2015 Thermo Fisher Scientific, Inc. Utilisé sous autorisation.

Tiré de Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping assays. Product Bulletin. 2011. Disponible à : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

ANNEXE B

Tableaux transmis par le CSSS de Chicoutimi concernant la validation technique du TaqMan®

Compte-rendu de la validation technique de la technologie TaqMan® pour le génotypage de cinq mutations associées aux quatre maladies héréditaires récessives du "projet-pilote"

Laboratoire ECOGENE-21, octobre 2009

	Nombre d'échantillons total	Nombre de non porteurs	Nombre de porteurs	Nombre de porteurs homozygotes (atteints)
Acidose lactique	282	234	48	0
Tyrosinémie	282	195	87	0
Polyneuropathie neurosensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux	282	203	79	0
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-1	282	211	70	1
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-2	282	280	2	0
Total	1410	1123	286	1

Laboratoire BIOMOL CLINIQUE, février mars 2010

	Nombre d'échantillons total	Nombre de non porteurs	Nombre de porteurs	Nombre de porteurs homozygotes (atteints)
Acidose lactique	135	103	32	0
Tyrosinémie	135	89	46	0
Polyneuropathie neurosensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux	135	109	26	0
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-1	135	88	45	2
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-2	135	134	1	0
Total	675	523	150	2

Laboratoire BIOMOL CLINIQUE, octobre novembre 2013

	Nombre d'échantillons total	Nombre de non porteurs	Nombre de porteurs	Nombre de porteurs homozygotes (atteints)
Acidose lactique	285	183	102	0
Tyrosinémie	285	184	101	0
Polyneuropathie neurosensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux	285	185	100	0
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-1	285	184	101	0
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-2*	248	188	60	0
Total	1388	924	464	0

Cumul des trois séries de validation

	Nombre d'échantillons total	Nombre de non porteurs	Nombre de porteurs	Nombre de porteurs homozygotes (atteints)
Acidose lactique	702	520	182	0
Tyrosinémie	702	468	234	0
Polyneuropathie neurosensitivomotrice avec ou sans agénésie du corps calleux	702	497	205	0
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-1	702	483	216	3
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay-2	665	602	63	0
Total	3473	2570	900	3

* Au total, 15

Tableau 2: Répertoire des polymorphismes couverts par les séquences des amorces et des sondes TaqMan

Assay name	lien séquence					
gene LRP1RC Assay name AL-1 (ABI's assay ID AHY9HXN) Fwd Primer TCCCAGATGCAATGAACCTCATTTT Rev Primer TGGGCCATCTTCCCTTTGATACG Probe 1 TTGGAAGATGTAGcGTTGCA Probe 2 TTGGAAGATGTAGgTTGCA	http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000138095;r=2:43886508-43996005					
		Hétérozygotité	MAF	Changement AA	Note	
Fwd Primer TCCCAGATGCAATGAACCTCATTTT ensembl TCCCAGATGRRRTGAACCTCATTTT	R (A/G) R (A/G)	COSM1021083 rs141065305	ND 0	ND ND	ND p.M339V	Cancer 4436 chromosomes testés = 100% A
Rev primer TGGGCCATCTTCCCTTTGATACG ensembl TKGGCCATCTTCCCTTTGATACR	K (T/G) R (A/G)	rs199733737 rs150044060	ND 0	0,0002 ND	p.P369Q p.P362P	4544 chromosomes testés = 100% G
Probe TTGGAAGATGTAGyGTTGCA ensembl TTGGAAGATGTAGYRTGCA	Y (C/T) R (A/G)	rs119466000 CMO34438	ND ND	ND ND	p.A354V ND	Mutation causale AL Ambiguïté de séquence

Assay name	lien séquence					
gene FAH Assay name TYR-1 (19pb) assay ID: AHQ9WHX Fwd Primer TGCTGCAGCAGCTCACTCA Rev Primer CGTGGCAGCCCTCAGT Probe 1 CCGGTGA _g TATCT Probe 2 CCGGTGA _a TATC	http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000103876;r=15:80152490-80186946					
		Hétérozygotité	MAF	Changement AA	Note	
Fwd Primer TGCTGCAGCAGCTCACTCA ensembl TKCTGCAGCAGCTCACTCA	K (T/G)	rs374655382	ND	ND	p.M326I	
Rev Primer CGTGGCAGCCCTCAGT ensembl CGTGGCAGCCCTCAGT	Aucun polymorphisme de répertoire					
Probe CCGGTGAR T ATCT ensembl CYRGTGAR TATCT	Y (C/T) R (A/G) R (A/G)	rs143326948 CS052046 COSM1470783	0 ND ND	ND ND ND	p.P354L ND ND	4480 chromosomes testés = 100% C Mutation causale tyrosinémie

Assay name	lien séquence					
gene SLC12A6 Assay name PNP-1 (79pb) assay ID: AHQIUN5 Fwd Primer TCCTAGAGAACCTACGGTGAAGCTTT Rev Primer CTGTAAACTGAGTTCCAATACCTCAA Probe 1 CTGCTGAGCA _g GTA Probe 2 CTGAGCA-GTAAGAGTCA	http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000140199;r=15:34229996-34333060					
		Hétérozygotité	MAF	Changement AA	Note	
Fwd Primer TCCTAGAGAACCTACGGTGAAGCTTT ensembl TCCTAGAGAACCTAC RG TGAAGCTTT	R (A/G)	rs200931772	0,002	ND	p.G756S	
Rev Primer CTGTAAACTGAGTTCCAATACCTCAA ensembl CTGTAAACTGAGTTCCAATACCTCAA		rs372153051	ND	ND	intron located	
Probe CTGCTGAGCA _g GTA ensembl CTGCTGAGCA _g GTA	G (G/-)	pas de rs répertorié	ND	ND	Cadre lecture	Déletion causale PNP

Assay name	lien séquence					
gene SACS Assay name AS-1 (ABI's assay ID AH5H8T0) Fwd Primer GTATTCCCTGGTCTGATCCAACA Rev Primer GGCTGTAGATCAAGACGGTAACTG Probe 1 CAGAACACCCCAATTCAT Probe 2 AGAACACCCCAATTCAT	http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000151835;r=13:23328823-23433728					
		Hétérozygotité	MAF	Changement AA	Note	
Fwd Primer GTATTCCCTGGTCTGATCCAACA ensembl GTAT W YCCCTGGTCTGATCCAAC R	W (A/T) Y (C/T) R (A/G)	pas de rs répertorié pas de rs répertorié pas de rs répertorié	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND	
Rev Primer GGCTGTAGATCAAGACGGTAACTG ensembl KR CTGTAGATCA K ACGGTAACTG	K (G/T) R (A/G) K (G/T)	rs368927268 pas de rs répertorié pas de rs répertorié	ND ND ND	ND ND ND	p.P2981Q ND ND	
Probe 1 CAGAACACCCCAATTCAT ensembl M AGRACACCCCAATTCAT	M (A/C) R (A/G) T (T/-)	pas de rs répertorié rs184407783 rs281865117	ND ND ND	ND 0,0002 ND	ND p.N2955D Cadre lecture	Déletion causale de l'AS

Assay name	lien séquence					
gene SACS Assay name AS-2 (ABI's assay ID AH1RD93) Fwd Primer CCCAGGGAAGTAGCAGTAAACTAG Rev Primer GTGTTGTAACACAGACATTGGATGCA Probe 1 CTTTGTGTCGCTTTGG Probe 2 CTTTGTGTC A CTTTGG	http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000151835;r=13:23328823-23433728					
		Hétérozygotité	MAF	Changement AA	Note	
Fwd Primer CCCAGGGAAGTAGCAGTAAACTAG ensembl CCCAGGGAAGTAGCAGTAAAA S TAG	S (C/G)	rs200346760	0,002	ND	p.L2505V	
Rev Primer GTGTTGTAACACAGACATTGGATGCA ensembl GTGTTGTAACACAGACATTGGATG YR	Y (C/T) R (A/G)	rs111920492 rs140034972	ND ND	0,0002 0,0002	p.A2519T p.Y2518Y	
Probe 1 CTTTGTGTCGCTTTGG ensembl CTT K TGTCR C TTTGG	K (G/T) R (A/G)	rs376944431 rs281865118	ND ND	ND ND	p.H2512Q p.R2511X	Mutation causale de l'AS

Séquence de référence: Ensembl GRCh38
 MAF = Fréquence de l'allèle rare
 AA = acide aminé

ANALYSE DES DYSTROPHIES MUSCULAIRES PAR WESTERN *BLOT* (RÉFÉRENCE – 2014.02.08)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : CHU Sainte-Justine
- 1.2 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juillet 2015
- 1.3 **Date de publication de l'avis** : 30 septembre 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur 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

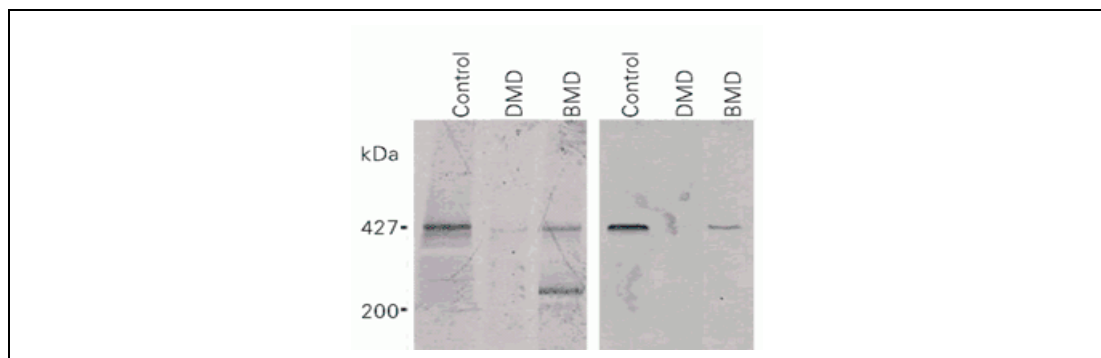
2.1 Nom de la technologie

Analyse du déficit en calpaïne-3, dysferline ou dystrophine par western *blot* relativement au diagnostic différentiel d'une dystrophie musculaire (DM).

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Le western *blot* (WB) permet de visualiser la présence ou non d'une protéine spécifique à l'intérieur d'un mélange complexe (biopsie musculaire dans ce cas-ci). Les protéines sont d'abord purifiées et séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Ensuite, elles sont transférées et fixées à une membrane par buvardage. La détection de la protéine d'intérêt est faite en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre elle. L'abondance de la protéine et de ses sous-fragments, le cas échéant, peut être évaluée semi-quantitativement. Le WB évalue le poids moléculaire et la quantité des protéines impliquées dans les dystrophies musculaires (figure 1).

Figure 1 Analyse de la dystrophine par western *blot*



Adaptée de Vainzof et Zatz, 2003.

- 2.3 Société ou développeur** : il s'agit d'une analyse maison.
- 2.4 Licence** : n'a pas été analysée.
- 2.5 Brevet, le cas échéant** : n'a pas été analysé.
- 2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)** : n'a pas été analysé.
- 2.7 Valeur pondérée** : 204,77

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

3.1 Patients ciblés

Personnes chez qui l'on soupçonne une dystrophie musculaire et dont la biopsie montre des changements histologiques compatibles avec la maladie.

Description de la maladie visée

Les dystrophies musculaires (DM) sont des troubles musculaires héréditaires, progressifs et hétérogènes des points de vue clinique, génétique et moléculaire. Les dystrophinopathies regroupent la DM de Duchenne (DMD) et la DM Becker (DMB). La DMD est la forme la plus fréquente (prévalence de 4,78 hommes sur 100 000 et une incidence de 1 naissance masculine sur 3 000). Elle est observée majoritairement chez les garçons en bas âge (de 3 à 7 ans) avec un déficit musculaire proximal (aux ceintures pelvienne et humérale), une atteinte cardiaque dans la majorité des cas et une perte d'autonomie vers 10 ans. La DMB est moins fréquente (prévalence 1,53 garçon sur 100 000 et incidence de 1 naissance masculine sur 17 000), l'âge d'apparition est plus tardif (adolescents ou jeunes adultes) et les groupes musculaires touchés sont les mêmes que dans la DMD. La gravité clinique et la progression sont variables et associées à la quantité de dystrophine observée [Mah *et al.*, 2014; Barresi et Brown, 2013; Sinnreich, 2010]. Les dystrophinopathies sont des maladies génétiques récessives, conséquence des mutations localisées sur le bras court du chromosome X, caractérisées par des protéines défectueuses et en quantité réduite (DMB) ou par l'absence de ces protéines (DMD) [Flanigan, 2014; Luce *et al.*, 2014; Van den Bergen *et al.*, 2014; Cyrulnik *et al.*, 2008].

Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD, *Limb Girdele Muscular Dystrophies*) incluent 14 troubles autosomiques récessifs et 7 troubles autosomiques dominants [Charlton *et al.*, 2009]. Les calpaïnopathies (LGMD2A) et les dysferlinopathies (LGMD2B) sont les formes les plus fréquemment observées en Amérique du Nord, avec 12 % et 18 % respectivement du total de la population ayant reçu un diagnostic de LGMD [Moore *et al.*, 2006]. Les mutations des gènes *CAPN3* et *DYSF* sont responsables de deux formes récessives des LGMD : la LGMD2A et la LGMD2B. Dans les deux types de dystrophie, l'âge de début est semblable (entre 10 et 30 ans), les mêmes groupes musculaires, scapulaires et pelviens sont touchés et l'atteinte cardiaque est rare. La gravité clinique et l'évolution de ces dystrophies varient en fonction des quantités des protéines impliquées. Celles-ci sont mises en évidence par l'IHC et le WB. Les calpaïnopathies sont plus graves que les dysferlinopathies. Par contre, l'espérance de vie des patients atteints est normale pour les deux types [Mercuri et Muntoni, 2013; Barresi, 2011; Vainzof et Bushby, 2010; Norwood *et al.*, 2009; Guglieri et Bushby, 2008; Fanin *et al.*, 2005].

Les principales caractéristiques liées aux dystrophies musculaires sont présentées en annexe.

3.2 Nombre de patients visés

Selon les prévisions du demandeur, 150 analyses seraient réalisées annuellement pour les trois prochaines années.

3.3 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Médecine de famille, neurologie, médecine interne, pédiatrie, neuropathologie, génétique.

3.4 Modalités d'administration du test

Cette technique sera utilisée à des fins diagnostiques sur des biopsies musculaires. Le demandeur travaille actuellement avec l'Hôpital Sunnybrooke de Toronto à la mise en place d'un système de contrôle de la qualité du test.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Complémentaire à l'immunohistochimie (IHC).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Les dystrophies musculaires montrent rarement des caractéristiques cliniques spécifiques à l'établissement d'un diagnostic définitif. L'IHC et le WB sont des techniques complémentaires utilisées pour évaluer semi-quantitativement et qualitativement l'expression des protéines touchées dans les cas de dystrophie musculaire. Il est recommandé de tester les biopsies musculaires avec des anticorps spécifiques à plusieurs protéines simultanément et d'interpréter les résultats dans ce contexte [Anderson et Davison, 1999]. L'étalon-or demeure l'analyse génétique. Toutefois, analyser plusieurs gènes simultanément est long et coûteux. De plus, l'association entre une mutation et une pathologie n'est pas toujours directe [Barresi, 2011].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le demandeur présente le western *blot* (WB) et l'immunohistochimie (IHC) comme deux techniques complémentaires, interdépendantes et indispensables au diagnostic des dystrophies musculaires. Le WB permet de déterminer :

- la quantité de protéine exprimée avec beaucoup plus de précision qu'avec l'IHC;
- le poids moléculaire et la quantité résiduelle de dystrophine (ce qui a une valeur pronostique pour les patients avec DMD ou DMB);
- la quantité de dystrophine exprimée après la thérapie de type saut d'exon (*exon-skipping*).

De plus, le WB permet de tester les niveaux d'expression de la calpaïne-3 (dont l'immunomarquage sur lame est souvent difficile à interpréter) et de confirmer ou d'infirmer une réduction équivoque d'expression en IHC pour la dystrophine, la dysferline, l' α -dystroglycans, la cavéoline-3, la mérosine et les sarcoglycans. Finalement, le WB permet de comparer à la fois, côte à côte, les cas et les témoins et de mettre en évidence une diminution secondaire de la dysferline causée par une calpaïnopathie.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : cette analyse ne remplace aucun autre test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Dystrophinopathies

Hoffman et ses collaborateurs ont mené une étude afin d'évaluer la corrélation entre le phénotype clinique et le niveau d'expression de la dystrophine sur 103 biopsies musculaires provenant de personnes atteintes de DMD, de DMB ou d'autres problèmes neuromusculaires. La quantité résiduelle et le poids moléculaire de la dystrophine ont été analysés à l'aide du WB. Pour les DMD graves, 92 % des cas avaient une quantité de dystrophine inférieure à 3 % de la quantité normale. Pour les cas intermédiaires, 57 % montraient une dystrophine de taille normale, mais en quantité plus faible (entre 3 % et 60 % de la quantité normale). Le deux tiers des cas présentant un phénotype Becker montraient une dystrophine réduite en taille, mais en quantité se situant à 40 % et plus de la normale. Concernant les autres problèmes neuromusculaires, 95 % des cas étaient dans la catégorie montrant une dystrophine de taille et de quantité normales. Une forte corrélation (93 %) est apparue entre les phénotypes cliniques DMD et DMB et les résultats obtenus en WB. Les auteurs affirment que le WB peut être utilisé pour prédire l'évolution clinique de l'état de chaque patient avec un haut degré d'exactitude, surtout lorsque celui-ci est très jeune [Hoffman *et al.*, 1988].

Nicholson et ses collaborateurs ont suivi une cohorte de 100 patients atteints de DMB ou de DMD. Un des objectifs de cette étude était de déterminer l'utilité de l'analyse protéique par WB relativement à l'évaluation pronostique des DM. À la fin du suivi, 40 patients masculins, dont 33 étaient atteints de DMD et 7 de DMB, avaient perdu la capacité de marcher de façon autonome. En utilisant un anticorps spécifique au domaine central de la dystrophine, les auteurs ont montré une corrélation significative entre la quantité résiduelle de la protéine sur WB et l'âge auquel ces 40 personnes avaient besoin d'utiliser un appareil d'aide à la marche ($r = 0,66$; $p < 0,00001$) [Nicholson *et al.*, 1993].

Cinquante-neuf biopsies musculaires provenant de patients atteints d'une DMB ont été analysées dans le but d'établir une corrélation entre les anomalies génétiques et l'expression de la dystrophine [Morandi *et al.*, 1995]. Au total, 6 anticorps dirigés contre 6 segments différents de la protéine ont été utilisés. Le génotype a été déterminé par l'amplification PCR multiplex de 30 exons. Sur la base des patrons d'expression de la dystrophine, observés en IHC et en WB, les auteurs ont pu distinguer les deux groupes suivants :

- 1) un marquage classique de la DMB (*patchy*) et un poids moléculaire (PM) normal ou légèrement réduit avec tous les anticorps ($n = 29$);
- 2) un marquage très faible ou absent et un PM réduit visible en WB avec un seul des 6 anticorps ($n = 30$).

Considérant la sévérité des symptômes et l'âge des patients, les auteurs ont observé un phénotype clinique plus grave pour ceux du groupe 1. Les auteurs concluent que l'analyse de la dystrophine par IHC et WB fournit davantage d'informations quant à la fonctionnalité résiduelle de la protéine, permettant ainsi de mieux prédire l'évolution de la maladie. De plus, les résultats de ces analyses fournissent des renseignements plus fiables pour le conseil génétique et une meilleure corrélation avec le phénotype que l'analyse génétique [Morandi *et al.*, 1995].

Doriguzzi et ses collaborateurs ont étudié l'expression de la dystrophine sur 201 biopsies musculaires par IHC et WB, combinée à l'analyse génétique et au suivi des patients pour une durée de 3 à 10 ans. Pour le WB, un anticorps dirigé contre la partie centrale de la dystrophine a été utilisé tandis que, pour l'IHC, un anticorps contre la partie C-terminale a été employé. L'usage combiné des deux techniques a permis de détecter 100 % des cas de dystrophinopathie avec une évolution et une expression atypique de la protéine. Cette approche a mené à la modification des diagnostics posés, avant l'usage de l'IHC et du WB, chez 17 hommes sur 152 et chez 8 femmes sur 49 [Doriguzzi *et al.*, 1997].

Calpaïnopathies

Afin de raffiner la stratégie diagnostique des calpaïnopathies, Groen et ses collaborateurs ont analysé le patron d'expression de la calpaïne-3 en WB et le statut mutationnel du gène *CAPN3* dans 49 cas. Une mutation pathogénique sur deux a été mise en évidence, un seul ou aucun des allèles du gène pour 26, 6 et 17 cas respectivement. Deux anticorps anticalpaïne-3 ont été utilisés (2C4 et 12A2). Le 2C4 détecte la protéine pleine longueur à 94 kDa et un fragment de 30 kDa alors que le 12A2 détecte la bande à 94 kDa ainsi qu'une série de fragments de dégradation autour de 60 kDa (*smear*). L'absence ou la réduction de la bande de 60 kDa confère la meilleure valeur prédictive d'une mutation sur les deux allèles de *CAPN3*, c.-à.-d. une sensibilité de 62 % et une spécificité de 94 % (voir le tableau 1 pour l'ensemble des résultats). Les auteurs considèrent que le WB est utile au diagnostic, mais ils mentionnent l'importance de considérer la quantité relative de toutes les bandes, et ce, en fonction de l'expression d'autres protéines en IHC ou WB et selon l'état de préservation du tissu. Des similarités cliniques et protéiniques entre les cas avec une seule mutation et ceux mutés sur les deux allèles (LGMD2A) ont été constatées. De ce fait, Groen et ses collaborateurs soulignent l'importance de l'analyse clinique et protéinique pour dépister les cas où l'usage d'autres méthodes serait indiqué pour détecter une deuxième mutation de *CAPN3* lorsque le séquençage n'en met qu'une seule en évidence (p. ex. le séquençage du promoteur ou MLPA pour grandes insertions-délétions [Groen *et al.*, 2007].

Tableau 1 Valeur discriminante du patron des bandes de la calpaïne-3 observées par WB relativement au diagnostic différentiel de la LGMD2A

PATRON DES BANDES OBSERVÉES	CAPN3 MUTÉ (N CAS)		SENSIBILITÉ (%)	SPÉCIFICITÉ (%)
	OUI (26)	NON (17)		
Toutes absentes	6	0	23	100
94 kDa absente	10	1	38	94
30 kDa absente	15	2	58	88
60 kDa absente	6	1	23	94
60 kDa réduite ou absente	16	1	62	94
94 kDa et 30 kDa absentes	10	1	38	94
94 kDa et 30 kDa absentes et 60 kDa pas augmentée	10	0	38	100
60 kDa et 30 kDa absentes	6	0	23	100
<i>60 kDa augmentée*</i>	<i>0</i>	<i>8</i>	<i>47</i>	<i>92</i>

*Le résultat en italique indique la valeur prédictive du WB relativement à l'absence d'une mutation sur les deux allèles de *CAPN3*, alors que les autres résultats indiquent la valeur prédictive du WB relativement à la présence d'une mutation sur les deux allèles de *CAPN3* (LGMD2A). Le tableau est adapté de Groen *et al.*, 2007.

Charlton et ses collaborateurs ont caractérisé le patron de marquage anticalpaïne-3 (2C4) en IHC sur des biopsies musculaires provenant de cas génétiquement démontrés de LGMD2A (n = 23) ou non LGMD2A (n = 32)¹⁰. L'expression de la calpaïne-3 a été analysée en fonction des changements primaires et secondaires observés en WB. Parmi les 23 cas de LGMD2A, le marquage en IHC était normal ou légèrement réduit pour 12 d'entre eux, alors qu'il était complètement absent pour 8 échantillons seulement. Le marquage de tous les échantillons non LGMD2A était normal (n = 28) ou légèrement réduit (n = 4). L'IHC seule possède une forte valeur prédictive positive de LGMD2A en l'absence de marquage, mais elle ne peut pas être utilisée seule pour exclure une mutation dans *CAPN3*. En WB, les bandes de 94 kDa et de 30 kDa étaient absentes pour 13 des 23 cas de LGMD2A. Parmi les 8 échantillons avec une quantité normale de protéine pour 1 des 2 bandes, 5 montraient également un marquage IHC normal. La corrélation entre les résultats obtenus en IHC et en WB a été calculée à 78 % (18/23) avec l'anticorps 2C4. Parmi les 32 cas non LGMD, des quantités normales de calpaïne ont été visualisées pour 12 cas seulement. La réduction ou l'absence secondaire d'au moins une des bandes a été constatée pour 13 et 7 échantillons, respectivement. Les 5 cas démontrés de dysferlinopathie (LGMD2B) montraient tous un patron de marquage calpaïne-3 normal en IHC, mais avec des quantités réduites ou absentes de la protéine en WB. Les auteurs concluent que le WB est nécessaire à la mise en évidence d'un défaut secondaire de l'expression de la calpaïne-3 et à l'identification des cas de LGMD2A dont les bandes peuvent être réduites de façon variable [Charlton *et al.*, 2009].

Fanin et ses collaborateurs ont publié les résultats d'une analyse quantitative de la calpaïne-3 sur 519 biopsies musculaires provenant de patients avec une LGMD ou une myopathie non classée. De plus, une analyse fonctionnelle de l'activité autolytique de la calpaïne-3 a été réalisée sur 108 cas de LGMD avec une quantité normale de protéines. L'analyse génotypique a permis de mettre en évidence 94 cas de LGMD2A portant 66 mutations différentes du gène *CAPN3*. Les auteurs ont montré qu'un déficit en quantité de protéine de même qu'en activité autolytique prédit la LGMD2A dans 80 % et 88 % des cas, respectivement [Fanin *et al.*, 2009].

Dysferlinopathies

Rosales et ses collaborateurs ont mené une étude sur 21 patients avec des mutations confirmées du gène *DYSF3* de la dysferline. Étant donné que la présentation clinique des dysferlinopathies est très variable et que le diagnostic moléculaire est laborieux, les chercheurs ont mis en perspective l'ensemble des informations clinico-histopathologiques disponibles dans le but d'identifier celles pouvant faciliter le diagnostic différentiel de la LGMD2B. Les données disponibles en IF, IHC et WB montrent que la réduction importante, voire l'absence totale, d'expression de la dysferline en IHC ne corrèle pas nécessairement avec une réduction concomitante en WB. En effet, 3 des 16 biopsies musculaires montraient une quantité normale ou supérieure de dysferline en WB, et ce, malgré l'absence de marquage en IHC. Les auteurs rapportent également des patrons d'expression variables pour la cavéoline-3 et l'utrophine en IHC de même que pour la calpaïne-3 en WB. Parmi les 13 biopsies musculaires avec une absence ou une réduction de la quantité de dysferline en WB, 8 ont également montré une réduction de la quantité de la calpaïne-3. Cette étude démontre l'importance d'utiliser l'IHC et le WB de manière combinée afin d'éviter une erreur de diagnostic [Rosales *et al.*, 2010].

¹⁰ Dystrophinopathie (n = 4), porteurs d'un allèle muté du gène *DMD* (n = 3), sarcoglycanopathie (n = 5), dysferlinopathie (n = 5), dystroglycanopathie (n = 7), myopathie myofibrillaire (n = 6) et LGMD1C (cavéolinopathie 3) (n = 2). Trois échantillons normaux ont été testés.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Antony et ses collaborateurs ont sélectionné 17 cas de DMB en fonction de leur génotype, c'est-à-dire une délétion sans altération du cadre de lecture et compatible avec une correction par saut d'exon (*exon-skipping*)¹¹. L'objectif de l'étude était notamment de démontrer que le WB permet de déterminer la quantité de dystrophine résiduelle, ce qui pourrait permettre son usage comme moyen de tester l'efficacité d'une thérapie par saut d'exon. Concernant la gravité des symptômes cliniques des 17 patients évalués, 12 avaient des symptômes légers, 1 des symptômes graves et 4 étaient asymptomatiques. En utilisant un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de la dystrophine (Dys2), les auteurs ont montré que les patients DMB asymptomatiques ou légèrement symptomatiques avaient un niveau de dystrophine d'au moins 40 % comparativement à des témoins. De plus, la quantité résiduelle de dystrophine quantifiable par WB variait selon le point terminal de la délétion¹² : exon 51 = 65 % ($\pm 2,1$ %), exon 53 = 77 % ($\pm 19,8$ %) et exon 55 = 83 % ($\pm 31,8$ %). Le WB est donc un outil qui peut être utilisé pour déterminer la quantité de dystrophine exprimée après une thérapie par saut d'exon [Anthony *et al.*, 2011].

5.2 Recommandations d'autres organismes

L'European Federation of Neurological Societies indique que l'analyse quantitative des protéines par WB peut être une technique supplémentaire utile pour découvrir des anomalies protéiques primaires et secondaires. Pour le diagnostic des LGMD, l'IHC et le WB doivent être faits dans des laboratoires qui ont une expertise suffisante dans la réalisation de ces tests et l'interprétation de leurs résultats [Norwood *et al.*, 2007].

Le DMD Care Considerations Working Group affirme que les critères déterminants pour le diagnostic de la DMD doivent être basés sur des analyses en IHC et WB d'une biopsie musculaire et qu'ils doivent être interprétés par un pathologiste neuromusculaire expérimenté [Bushby *et al.*, 2010a].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

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

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

N'ont pas été évaluées.

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

Un diagnostic précis est important pour le pronostic à long terme et afin que les conseils génétiques soient adéquats pour le patient et sa famille.

¹¹ Le saut d'exon (*exon-skipping*) est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'essais cliniques auprès de personnes atteintes d'une dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). La technique vise à transformer un génotype Duchenne en un génotype Becker en restaurant le cadre de lecture au moyen d'oligonucléotides antisens. Un décalage du cadre de lecture de la dystrophine est responsable de la DMD dans la majorité des cas. Des modèles visant un seul ou plusieurs exons ont été développés.

¹² Exon 51 : $\Delta 45-51$ (n = 3) et $\Delta 48-51$ (n = 5); Exon 53 : $\Delta 42-53$ (n = 1); $\Delta 45-53$ (n = 3) et $\Delta 52-53$ (n = 1); Exon 55 : $\Delta 45-55$ (n = 4).

7 EN BREF

7.1 Valeur diagnostique

Le WB contribue au diagnostic des dystrophies musculaires qui présentent rarement des caractéristiques cliniques spécifiques pour un diagnostic définitif. Plus précisément, le WB :

- permet de corrélérer la quantité résiduelle et le poids moléculaire de la dystrophine avec les phénotypes cliniques des DMD et DMB, avec une précision de 93 %;
- permet de détecter 100 % des cas de dystrophinopathie lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'IHC;
- confère la meilleure valeur prédictive d'une mutation sur les deux allèles de *CAPN3* dans le diagnostic des calpainopathies;
- met en évidence les défauts secondaires de l'expression de la calpaïne-3;
- identifie des cas de LGMD2A dont les bandes peuvent être réduites de façon variable;
- permet de diminuer les erreurs diagnostiques relatives à la dysférlinopathie lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'IHC.

7.2 Valeur pronostique

Le WB peut être utilisé pour prédire avec un haut degré d'exactitude l'évolution de l'état clinique d'un patient atteint de DMD ou de DMB, surtout lorsque ce patient est très jeune. De plus, le WB permet d'estimer l'âge auquel les patients perdront la capacité de marcher de façon autonome. Il peut également fournir des informations plus fiables pour le conseil génétique.

7.3 Valeur thérapeutique

Le WB permet de déterminer la quantité de dystrophine résiduelle, ce qui pourrait permettre l'usage de cette analyse comme moyen de tester l'efficacité de la thérapie par saut d'exon (*exon-skipping*).

7.4 Recommandations d'autres organismes

Les différents organismes qui ont pris position au regard de l'usage du WB pour diagnostiquer les dystrophies musculaires reconnaissent l'utilité du test WB. L'European Federation of Neurological Societies indique que le WB est une technique supplémentaire utile pour découvrir des anomalies protéiques primaires et secondaires. Le DMD Care Considerations Working Group affirme que les critères déterminants pour le diagnostic de la DMD doivent être basés sur des analyses en IHC et WB effectuées sur une biopsie musculaire.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Analyse des dystrophies musculaires par western *blot*

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 d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

COMMENTAIRES ADDITIONNELS

Le comité reconnaît la pertinence de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui. Relativement au diagnostic des dystrophies musculaires, le western *blot* utilisé en combinaison avec l'IHC comble un besoin actuellement non couvert par le *Répertoire*.

ANNEXE A

Principales caractéristiques de quatre formes de dystrophie musculaire

NOM DE LA MALADIE	DM DE DUCHENNE (OMIM 310200)	DM DE BECKER (OMIM 300376)	LGMD2A (OMIM 253600)	LGMD2B
Prévalence	Dystrophinopathies confirmées au Canada entre 2000 et 2009 1,5 garçon sur 10 000 âgés de 0-24 ans (68 % DMD, 18 % DMB et 14 incertains)		UK : 0,6/100 000	UK : 0,13/100 000
Gène (transmission)	<i>DMD</i> (XR)		<i>CAPN3</i> (AR)	<i>DYSF</i> (AR)
Mutations	Délétions larges 60 %, duplications 10 %, substitutions nucléotides 30 % ~1/3 mutations de novo avec interruption du CDL en ~ 96 %	Délétions larges intragéniques 80 %, duplications 10 % et substitutions nucléotides 10 % ; 70 % sans changement du CDL et 16 % avec interruption du CDL	Mutations « privées » faux-sens ou non-sens, insertion-délétion, distribuées sur toute la longueur du gène	Mutations faux-sens ou non-sens, surtout « privées », distribuées sur toute la longueur du gène, y compris les introns
IHC	Absence de dystrophine	Absence ou la réduction variable de la dystrophine	Absence d'expression de la calpaïne-3 démontrée par usage des anticorps dirigés contre ses 4 sous-unités	Absence ou diminution d'expression de la dysférline, accumulation intracytoplasmatique de la dysférline, amyloïde sur artérioles
WB	Absence quasi complète de la dystrophine	Réduction variable de la quantité et du poids moléculaire de la dystrophine	Considérer la quantité relative des 3 bandes de calpaïne	Absence complète ou partielle de la dysférline, réduction secondaire de la calpaïne-3
Âge d'apparition	Petite enfance	Enfance ou âge adulte	Adolescence ou chez les jeunes adultes (Majorité < 20 ans)	Adolescence ou chez les jeunes adultes
Perte de l'autonomie ambulatoire	Âgés de < 13 ans	Âgés de > 16 ans	10 à 30 ans après l'apparition des symptômes	10 à 30 ans après l'apparition des symptômes
Cardiomyopathie	Observée dans 90 % des cas et cause la mort dans 20 % des cas	Observée dans 90 % des cas et cause la mort dans 50 % des cas	Rare (forme grave)	Rare

NOM DE LA MALADIE	DM DE DUCHENNE (OMIM 310200)	DM DE BECKER (OMIM 300376)	LGMD2A (OMIM 253600)	LGMD2B
Atteintes respiratoires	Syndrome restrictif causé par la scoliose et la faiblesse des muscles respiratoires	Rare	Rare (fonctions respiratoires conservées en général)	Rare
Créatine kinase (CK) élevée	50 à 100 X (pic à 2 ans)	5 à 10 X	8 à 80 X	10 à 72 X
Atteinte cognitive	Troubles d'apprentissage, du comportement, de la mémoire et retard mental	Possible	Non	Non
Pronostic	Défavorable, sauf s'il y a une prise en charge multidisciplinaire, ce qui peut améliorer les fonctions, la qualité de vie et l'espérance de vie (jusqu'à 40 ans)	Variable	Évolution clinique très variable, mais toujours progressive; espérance de vie normale dans la majorité des cas	
Traitements	Palliatifs : pharmacothérapie (corticothérapie), physiothérapie, traitements orthopédiques (orthèse, chirurgie scoliose), gastro-intestinaux, cardiopulmonaires (IECA*, β-bloqueurs, ventilation assistée), nutritionnels et psychosociaux	Prise en charge variable selon la gravité clinique et les besoins de chaque cas	Physiothérapie pour la prévention des contractures spécifiques et chirurgie pour leur traitement	Physiothérapie pour prévenir la baisse de la force musculaire, orthèses pour le pied tombant et chirurgie des contractures

* IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine anti-hypertenseur.

Références : Mah *et al.*, 2014; Van den Bergen *et al.*, 2014; Anthony *et al.*, 2011; Barresi, 2011; Bushby *et al.*, 2010b; Sinnreich, 2010; Vainzof et Bushby, 2010; Rosales *et al.*, 2010; Cyrulnik *et al.*, 2008; Groen *et al.*, 2007; Norwood *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2006; Fanin *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 1988.

RÉFÉRENCES

- Anderson LV et Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999;154(4):1017-22.
- Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, et al. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: Implications for clinical trials. *Brain* 2011;134(Pt 12):3547-59.
- Barresi R. From proteins to genes: Immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* 2011;1(1):24.
- Barresi R et Brown SC. Dystrophin and its associated glycoprotein complex. Dans : Goebel HH, Sewry CA, Weller RO, réd. *Muscle disease: Pathology and genetics*. Second edition. Chichester, Royaume-Uni : Wiley-Blackwell; 2013 : 95-101.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: Diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010a;9(1):77-93.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: Implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol* 2010b;9(2):177-89.
- Charlton R, Henderson M, Richards J, Hudson J, Straub V, Bushby K, Barresi R. Immunohistochemical analysis of calpain 3: Advantages and limitations in diagnosing LGMD2A. *Neuromuscul Disord* 2009;19(7):449-57.
- Cyrulnik SE, Fee RJ, Batchelder A, Kiefel J, Goldstein E, Hinton VJ. Cognitive and adaptive deficits in young children with Duchenne muscular dystrophy (DMD). *J Int Neuropsychol Soc* 2008;14(5):853-61.
- Doriguzzi C, Palmucci L, Mongini T, Chiado-Piat L, Maniscalco M, Restagno G. Systematic use of dystrophin testing in muscle biopsies: Results in 201 cases. *Eur J Clin Invest* 1997;27(4):352-8.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Eur J Hum Genet* 2009;17(5):598-603.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disord* 2005;15(3):218-24.
- Flanigan KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin* 2014;32(3):671-88.
- Groen EJ, Charlton R, Barresi R, Anderson LV, Eagle M, Hudson J, et al. Analysis of the UK diagnostic strategy for limb girdle muscular dystrophy 2A. *Brain* 2007;130(Pt 12):3237-49.
- Guglieri M et Bushby K. How to go about diagnosing and managing the limb-girdle muscular dystrophies. *Neurol India* 2008;56(3):271-80.
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988;318(21):1363-8.

- Luce LN, Ottaviani D, Ferrer M, Szijan I, Cotignola J, Giliberto F. Molecular diagnosis of dystrophinopathies using a multi-technique analysis algorithm. *Muscle Nerve* 2014;49(2):249-56.
- Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2014;24(6):482-91.
- Mercuri E et Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet* 2013;381(9869):845-60.
- Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(10):995-1003.
- Morandi L, Mora M, Confalonieri V, Barresi R, Di Blasi C, Brugnoli R, et al. Dystrophin characterization in BMD patients: Correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* 1995;132(2):146-55.
- Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3. Differential diagnosis and prognosis. *J Med Genet* 1993;30(9):745-51.
- Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: In-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain* 2009;132(Pt 11):3175-86.
- Norwood FL, de Visser M, Eymard B, Lochmuller H, Bushby K. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol* 2007;14(12):1305-12.
- Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, Vinod M, Thrush DL, Astbury C, et al. Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve* 2010;42(1):14-21.
- Sinnreich M. Chapter 10. Dystrophinopathies. Dans : Karpati G, Hilton-Jones D, Bushby K, Griggs RC, éd. *Disorders of voluntary muscle*. 8^e éd. Cambridge, Royaume-Uni : Cambridge University Press; 2010 : 205-29.
- Vainzof M et Bushby K. Chapter 11. Muscular dystrophies presenting with proximal muscle weakness. Dans : Karpati G, Hilton-Jones D, Bushby K, Griggs RC, éd. *Disorders of voluntary muscle*. 8^e éd. Cambridge, Royaume-Uni : Cambridge University Press; 2010 : 230-56.
- Vainzof M et Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(5):543-55.
- Van den Bergen JC, Wokke BH, Janson AA, van Duinen SG, Hulsker MA, Ginjaar HB, et al. Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85(7):747-53.

DOSAGE DE LA PROTÉINE APPARENTÉE À LA PARATHORMONE PAR MÉTHODE IMMUNORADIOMÉTRIQUE (RÉFÉRENCE – 2014.03.01)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) - Hôpital Saint-Luc
- 1.2 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 30 juillet 2015
- 1.3 **Date de publication de l'avis** : 30 septembre 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur 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

Le D^r Louis Gaboury du CHUM n'a pas participé aux délibérations et il s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

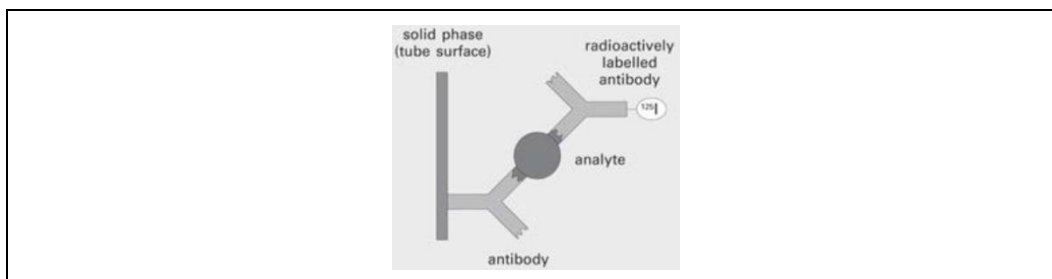
2.1 Nom de la technologie

Essai immunoradiométrique (IRMA) pour doser la protéine apparentée à la parathormone (PTHrP) dans le plasma.

2.2 Description brève de la technologie, précisions techniques et cliniques

L'IRMA est un essai d'immunodétection de type « sandwich » où deux anticorps polyclonaux dirigés contre deux épitopes différents de la même protéine (ici la PTHrP) sont utilisés. Le premier anticorps est préalablement fixé à un support solide. Les échantillons ou les calibrateurs sont incubés en présence de ce dernier et, par la suite, en présence d'un deuxième anticorps marqué à l'iode 125. Après chaque incubation, les réactifs libres sont enlevés au moyen de lavages. La quantité de radioactivité émise par l'anti-PTHrP radiomarqué lié est directement proportionnelle à la concentration de PTHrP présente dans l'échantillon. La courbe standard est élaborée selon le protocole décrit dans la trousse commerciale et bonifiée d'un sixième calibrateur à 10 pg/ml (0, 10, 20, 130, 680 et 2 100 pg/ml). Les valeurs inconnues de PTHrP sont obtenues par extrapolation à partir de la courbe standard. Le manuel du fabricant est présenté à l'annexe A.

Figure 1 Illustration du principe associé aux essais immunoradiométriques



Source : http://www.euroimmun.com/index.php?id=radioimmuntests_ria_irma&L=1

2.3 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.4 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

La trousse Active® PTHrP IRMA de Beckman Coulter n'est pas homologuée par Santé Canada comme instrument médical de classe II¹³ ni par la Food and Drug Administration américaine¹⁴.

2.5 Valeur pondérée : 60,01.

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

3.1 Patients ciblés : l'analyse est effectuée chez des patients hypercalcémiques.

3.2 Description de la maladie visée

L'hypercalcémie correspond à une calcémie totale (> 10,2 mg/dl) ou à une calcémie ionisée (> 5,2 mg/dl) [Fritchie *et al.*, 2009]. Elle est habituellement consécutive à une résorption osseuse excessive. L'hypercalcémie symptomatique inclut la polyurie, la constipation, la faiblesse musculaire, la confusion et parfois même le coma. Son traitement consiste à augmenter l'excrétion du calcium plasmatique et à réduire la résorption osseuse par différents moyens tels la perfusion de sérum physiologique, la diurèse saline et l'administration de bisphosphonates tels que le pamidronate. Les principales causes de l'hypercalcémie sont l'hyperparathyroïdisme primaire (HPTp), l'intoxication par la vitamine D et le cancer [Porter et Kaplan, 2014]. À eux seuls, l'HPTp et le cancer seraient responsables de 80 % à 90 % des cas d'hypercalcémie [Lafferty, 1991].

L'HPTp est une affection généralisée découlant de la sécrétion excessive de l'hormone parathyroïdienne (PTH) par une ou plusieurs glandes parathyroïdes. L'incidence augmente avec l'âge et elle est plus élevée chez la femme ménopausée.

L'hypercalcémie est souvent asymptomatique, mais la lithiase urinaire peut survenir dans les cas d'hypercalcémie de longue date. Dans la grande majorité des cas, l'examen histologique révèle la présence d'un adénome parathyroïdien (bénin). Une tumeur maligne se manifeste dans moins de 1 % des cas [Porter et Kaplan, 2014].

¹³ Homologation des instruments médicaux : <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/md-im/applic-demande/guide-ld/index-fra.php> ; base de données concernant la liste des instruments médicaux homologués en vigueur (MDALL) : <http://webprod5.hc-sc.gc.ca/mdll-limh/prepareSearch-preparerRecherche.do?type=active&lang=fra>.

¹⁴ Food and Drug Administration (FDA). 510(k) Premarket Notification [site Web]. Disponible à : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm>.

Le cancer est une cause fréquente d'hypercalcémie (nommée hypercalcémie humorale cancéreuse ou HHC) chez les patients hospitalisés. L'HHC survient le plus souvent chez les cas avec des tumeurs avancées du sein, du poumon, du rein, de l'ovaire, du pancréas ou un myélome [McCauley et Martin, 2012; Mundy, 2002].

3.3 Nombre de patients visés

Selon les statistiques cumulées par le CHUM, environ 120 analyses de la PTHrP devraient être effectuées annuellement. Pour les années 2012-2013, 2013-2014 et 2014-2015, le CHUM rapporte avoir réalisé 110, 118 et 116 analyses respectivement¹⁵.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Endocrinologie, hématologie, gynécologie, obstétrique et néphrologie.

3.5 Modalités d'administration du test

L'analyse est réalisée à partir d'un prélèvement sanguin. Les échantillons sont centrifugés dans les deux heures suivant le prélèvement et mesurés immédiatement ou ils sont conservés à une température de - 70 °C.

Les instructions du fabricant concernant l'analyse de la PTHrP sont présentées à l'annexe A. Les demandeurs suivent le protocole de la compagnie, à l'exception des deux éléments suivants :

- ajout d'un point de calibration additionnel (10 pg/ml);
- pour le prélèvement, remplacement du tube recommandé par la compagnie (tube p100 - inhibiteurs de protéases) par un tube EDTA.

Le coût des tubes p100 s'élève à 20 \$ l'unité et leur usage crée parfois de l'hémolyse, ce qui rend les échantillons non utilisables. Des tests comparatifs ont été réalisés au CHUM : les taux de PTHrP ont été mesurés à partir d'échantillons provenant de tubes EDTA et p100. Les résultats étaient semblables, peu importe le type de tube de prélèvement utilisé¹⁶.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Il s'agit d'une nouvelle analyse. Elle pourrait être complémentaire au dosage de la parathormone (PTH) figurant déjà au *Répertoire* (code 30244; valeur pondérée : 5,1).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Initialement, les dosages de PTHrP étaient effectués au Calcium Research Laboratory de l'Hôpital Royal Victoria.

En 2004, plusieurs médecins du CHUM ont observé des délais de plus de trois mois pour des dosages de PTHrP. La possibilité d'effectuer le dosage de la PTHrP au CHUM à l'aide d'une trousse commerciale a donc été considérée.

¹⁵ Communications personnelles avec Mme Caroline Albert, Ph. D., biochimiste clinique au CHUM (5 novembre 2014).

¹⁶ *Id.*

L'analyse est disponible en clinique depuis juillet 2011 et un dosage aux 4 à 6 semaines est réalisé. Selon le demandeur, le CHUM serait le seul laboratoire clinique québécois à offrir le test de la PTHrP.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Le dosage de la PTHrP aide à confirmer l'étiologie de l'hypercalcémie [Lafferty, 1991]. Il fait d'ailleurs partie d'algorithmes diagnostiques de l'hypercalcémie que l'on trouve dans certains ouvrages de référence en médecine (annexe B). Lorsque le test de la PTHrP est positif en présence d'hypercalcémie, une HHC est suspectée [Clines, 2011; Santaripa *et al.*, 2010; Fritchie *et al.*, 2009; Ratcliffe *et al.*, 1992].

De nombreux essais radio-immunométriques (RIA classiques) ont été développés et la majorité de ceux-ci étaient dirigés contre la portion N-terminale de la protéine. Il a été démontré que la PTHrP subit différentes modifications entraînant la sécrétion de divers fragments dont l'activité biologique diffère [Orloff *et al.*, 1994]. Toutefois, il semblerait que ce soit le dosage de la forme intacte (1-86 acides aminés) de la protéine qui possède la meilleure valeur diagnostique discriminatoire de l'HHC [De Miguel *et al.*, 1998; Segura Dominguez *et al.*, 1996; Orloff *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 1993; Pandian *et al.*, 1992; Ratcliffe *et al.*, 1991; Burtis *et al.*, 1990]. Selon les demandeurs, le dosage de la PTHrP, dans certains cas, pourrait servir de marqueur biologique pour suivre l'évolution sous traitement du processus tumoral.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Cette analyse ne remplace aucun test existant.

5.1.2 Valeur diagnostique

Le tableau 1 présente une comparaison des indices biochimiques permettant de distinguer l'HPTp de l'HHC.

Tableau 1 Particularités biochimiques de l'hyperparathyroïdie primaire et de l'hypercalcémie humorale cancéreuse

MESURE	HYPERCALCÉMIE HUMORALE CANCÉREUSE (HHC)	HYPERPARATHYROÏDIE PRIMAIRE (HPTp)
Calcémie	> 13 mg/dl	< 12 mg/dl
Calciurie	Normale/Élevée	Normale/Élevée
Phosphatémie	Normale/Basse	Basse (excrétion rénale élevée)
PTH	Basse	Élevée
PTHrP	Élevée	Faible

Source : adapté de Porter et Kaplan, 2014, et de Horwitz et Bilezikian, 1994.

On observe que, dans les cas d'HHC, la calciurie est habituellement normale ou élevée, la PTH est souvent diminuée ou indétectable et le PO_4 est souvent diminué. À cela s'ajoute régulièrement une alcalose métabolique, une hypochlorémie et une hypoalbuminémie. Ainsi, le diagnostic d'HHC peut être confirmé lorsque sont démontrées des concentrations sériques élevées de PTHrP [Ratcliffe *et al.*, 1992; 1991]. Le tableau 2 illustre comment le dosage de la PTHrP par la méthode IRMA aide au diagnostic différentiel de l'hypercalcémie. À cet égard, Ratcliffe et ses collaborateurs [1991] ont montré que le fragment 1-86 était détectable et plus élevé chez 35 des 37 (95 %) patients avec l'HHC.

Tableau 2 Diagnostic différentiel de l'hypercalcémie au moyen du dosage de la PTHrP par essais immunoradiométriques

CONDITION	N	CALCÉMIE mmol/l	PTH pmol/l	PTHrP 1-86 pmol/l	TYPE TUMORAL ET PTHrP ÉLEVÉE						
					POUMON	PANCRÉAS	SEIN	OVAIRE	VESSIE	REIN	AUTRES
HHC	37	3,45 (2,58-4,46)	< 0,5 (n : 36) 1,19 (n : 1)	7,4 (0,46-24,7) (n : 35) < 0,5 (n : 2)	11/12	4/4	1/2	1/1	1/1	3/3	13/14
NCC	16	2,45 (2,25-2,63)	1,56 (< 0,5-3,0)	< 0,5 (n : 15) 2,1 (n : 1)	0/3	s.o.	s.o.	0/3	1/2	s.o.	0/6
Contrôles	38		0,9-4,0	< 0,5 (n : 38)	s. o.						
HypoparaT.	10	2,40 (1,67-3,30)	< 0,5-0,73	< 0,5	s. o.						
IRC	23	2,22 (1,33-2,73)	22,1 (3,1-86)	0,58-6,8 (n : 5)	s. o.						
HPTp	23	2,94 (2,70-3,63)	26,1 (2,7-179)	< 0,5	s. o.						
HPT malin	3	3,70 (3,12-4,35)	29,5 (5,9-39,4)	< 0,5	s. o.						

Source : adapté de Ratcliffe et ses collaborateurs, 1991.

Sigles et acronymes : HHC : hypercalcémie humorale cancéreuse; HPT : hyperparathyroïdisme; HPTp : hyperparathyroïdisme primaire; HypoparaT : hypoparathyroïdisme; IRC : insuffisance rénale chronique; n : nombre; s. o. : sans objet; NCC : cancer normocalcémique; PTH : parathormone; PTHrP : protéine apparentée à la parathormone.

D'autres études ont également démontré qu'une PTHrP élevée est présente chez la plupart des patients hypercalcémiques avec des tumeurs solides [Segura Dominguez *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1993; Pandian *et al.*, 1992; Ratcliffe *et al.*, 1992; Burtis *et al.*, 1990].

Un niveau augmenté de PTHrP chez un patient avec un taux de calcium sanguin élevé est fortement significatif de l'existence d'un cancer sous-jacent [Fritchie *et al.*, 2009]. À cet égard, des études ont démontré des cas avec hypercalcémie et anémie chez qui une PTHrP élevée a permis le diagnostic de tumeurs occultes [Fernandez-Real *et al.*, 1994].

5.1.3 Valeurs pronostique et prédictive

L'apparition de l'HHC est en soi un facteur de mauvais pronostic. Ralston et ses collaborateurs [1990] ont démontré que l'apparition de l'hypercalcémie chez des personnes atteintes de cancer était associée à une survie globale médiane réduite, soit environ 30 jours, même si un traitement actif est utilisé pour contrer l'hypercalcémie [Ralston *et al.*, 1990].

Truong et ses collaborateurs [2003] ont réalisé une étude prospective entre novembre 1995 et janvier 1998 à l'Hôpital Royal Victoria de Montréal. L'objectif de cette étude était d'évaluer la valeur pronostique associée à un haut taux circulant de PTHrP chez 102 patients avec hypercalcémie et un diagnostic de cancer avancé. La PTHrP a été mesurée par IRMA en utilisant les essais INCSTAR (1-86) ou NICHOLS (1-72). Une forte corrélation entre les résultats issus des deux types d'analyse a été obtenue ($r = 0,9$; $P < 0,01$). Les concentrations de PTHrP mesurées chez 40 volontaires sains étaient < 1 pmol/l. Au total, la valeur pronostique de la PTHrP a été évaluée à partir des données cliniques de 76 patients (26 cas ont été exclus). Une PTHrP ≥ 1 pmol/l a été mesurée chez 41 d'entre eux (54 %). Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes (PTHrP élevée et PTHrP normale), sauf pour la réponse aux traitements de chimiothérapie, la présence de métastases osseuses et l'intensité du prétraitement antihypercalcémique (tableau 3).

Tableau 3 Caractéristiques cliniques et biochimiques stratifiées en fonction de la PTHrP mesurée par immunoradiométrie

CARACTÉRISTIQUE	PTHrP < 1 pmol/l (N = 35)	PTHrP ≥1 pmol/l (N = 41)	VALEUR P
	N (%) OU MOY. ± EC		
Âge (années)	62 ± 12	61 ± 13	0,8
Sexe féminin	18 (51)	23 (56)	0,8
Réponse à la chimiothérapie*	6 (17)	1 (3)	0,05
Stade au diagnostic de l'hypercalcémie			0,4
▪ Stade 3	4 (11)	3 (7)	
▪ Stade 4	31 (89)	38 (93)	
Métastases osseuses	34 (97)	32 (78)	0,02
Métastases viscérales	23 (66)	34 (83)	0,1
Calcémie normale post-traitement antihypercalcémique [†]	26 (84)	26 (65)	0,1
Calcémie prétraitement (mg/dl)	11,9 ± 1,7	12,9 ± 2,2	0,03
Calcémie post-traitement (mg/dl) [‡]	9,6 ± 0,8	9,9 ± 1,3	0,3
PTH intacte (pmol/l)	1,3 ± 1,3	1,1 ± 0,2	0,3

Source : adapté de Truong et ses collaborateurs, 2003.

* Basé sur 75 patients (40 avec taux élevé de PTHrP); [†] Basé sur 71 patients (40 avec taux élevés de PTHrP); [‡] Calcium sérique après hydratation ou post-traitement anti-hypercalcémique.

Après un suivi maximal allant jusqu'à 1 500 jours postdiagnostic d'hypercalcémie, 50 décès ont été constatés, tous reliés au cancer. Plusieurs paramètres ont été significativement associés à la mortalité, dont la PTHrP, la calcémie prétraitement, le taux de phosphatase alcaline ainsi que l'absence de réponse aux traitements antihypercalcémique et chimiothérapeutique (tableau 4).

Tableau 4 Comparaison des patients en fonction de l'issue de la maladie à la fin de la période de suivi

CARACTÉRISTIQUE	SURVIVANT (n = 26)	DÉCÉDÉ (n = 50)	VALEUR P
	N (%) OU MOY. ± EC		
PTHrP ≥ 1 pmol/l	10 (38)	31 (62)	0,01
Concentration PTHrP élevée (pmol/l)	0,8 ± 1,2	3,4 ± 5,2	< 0,001
Concentration calcium prétraitement (mg/dl)	11,3 ± 1,1	13,0 ± 2,2	< 0,001
Phosphatase alcaline (U/l)	94 ± 55	168 ± 173	0,003
Phosphore (mmol/l)	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,7
Créatinine moyenne (mmol/l)	138 ± 129	114 ± 71	0,3
Types de cancer			0,6
▪ Solides	18 (69)	38 (76)	
▪ Hématologiques	7 (27)	10 (20)	
▪ Autres	1 (4)	1 (4)	
Métastases osseuses	23 (88)	43 (86)	0,9
Métastases des tissus mous (viscérales)	17 (65)	40 (80)	0,1
Réponse à la chimiothérapie*	8 (32)	0	0,002
Calcémie normale post-traitement antihypercalcémique†	22 (96)	18 (38)	< 0,001

Source : adapté de Truong et ses collaborateurs [2003].

* Basé sur 75 patients (dont 25 survivants); † Basé sur 71 patients (dont 23 survivants).

Une analyse multivariée de la survie a démontré que la mortalité liée au cancer était significativement plus élevée chez les personnes présentant une hypercalcémie prétraitement plus importante, et ce, tant chez les personnes âgées de plus de 65 ans que chez les personnes de moins de 65 ans (on note une augmentation du risque de mortalité de 30 % pour chaque mg/dl supplémentaire). Après un suivi allant jusqu'à 1 500 jours postdiagnostic de l'HHC, un taux de PTHrP élevé a été associé à un risque de mortalité augmenté d'un facteur de près de 4, et ce, uniquement chez les patients âgés de moins de 65 ans (tableau 5).

Tableau 5 Caractéristiques associées à la mortalité durant la période de suivi : analyses multivariées de Cox

SOUS-GROUPE DE PATIENTS	RAPPORT DES RISQUES INSTANTANÉS (<i>hazard ratios</i>) (IC 95 %)	VALEUR P
Âge > 65 ans (n = 30)		
▪ Calcémie prétraitement (mg/dl)	1,5 (1,2-1,8)	< 0,001
▪ PTHrP élevée	0,7 (0,3-1,9)	0,51
Âge ≤ 65 ans (n = 46)		
▪ Calcémie prétraitement (mg/dl)	1,3 (1,1-1,5)	0,003
▪ PTHrP élevée	3,8 (1,6-8,8)	0,002

Source : adapté de Truong et ses collaborateurs, 2003.

Papworth et ses collaborateurs [2005] ont réalisé une étude visant à vérifier la relation entre la concentration sérique de calcium et de PTHrP auprès de 243 patients atteints d'un carcinome rénal. La PTHrP a été détectée au moyen d'un essai IRMA dans 37 des 243 sérums alors que l'hypercalcémie était présente chez 32 des 220 cas évalués. Bien qu'une corrélation positive ($r = 0,326$; $p < 0,01$) ait été observée entre les deux paramètres, aucune différence relative à la survie n'a été démontrée sur la base d'une PTHrP, détectable ou non. Une analyse multivariée a révélé que le stade tumoral et l'hypercalcémie étaient des facteurs indépendants de mauvais pronostic.

Savvari et ses collaborateurs [2009] ont réalisé une revue systématique de tous les cas documentés de tumeur gynécologique avec HHC. Parmi les 22 patientes présentant une tumeur de l'ovaire, une PTHrP élevée a été associée à une survie globale plus courte (19 mois c. 36 mois). Toutefois, la différence n'était pas statistiquement significative.

Il existe également un bon nombre d'études de cas qui montrent que ce sont les cellules cancéreuses qui produisent la PTHrP et que l'élévation du taux sérique marque souvent la récurrence ou la progression de la maladie, et ce, avec ou sans hypercalcémie [Dharmaraj *et al.*, 2006; Schöttker *et al.*, 2006; Ueno *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2000]. De ce fait, le dosage de la PTHrP sérique peut être utilisé comme marqueur prédictif d'une HHC imminente, tel qu'avancé par Nagasaki et ses collaborateurs [1996]. Ces derniers ont étudié le parcours clinique de deux cas de carcinome œsophagien et ils ont montré que la PTHrP sérique devenait détectable au moins 30 jours avant l'élévation de la calcémie à un niveau anormal [Nagasaki *et al.*, 1996].

5.2 Validité clinique

Une étude rétrospective réalisée dans un laboratoire clinique aux États-Unis a évalué les résultats d'analyses de laboratoire obtenus pour le calcium et la PTH dans 123 cas également évalués pour la PTHrP [Fritchie *et al.*, 2009].

Les résultats ont montré une élévation de la PTHrP chez 20 patients ($5,17 \pm 3,17$ pmol/l), alors que les valeurs étaient normales pour les 103 autres patients ($0,44 \pm 0,34$ pmol/l). Une différence statistiquement significative de la calcémie a été constatée entre les patients avec PTHrP élevée ($3,10 \pm 0,58$ mmol/l) et ceux avec PTHrP normale ($2,84 \pm 0,51$ mmol/l). De plus, la concentration de PTH mesurée s'est avérée significativement plus faible pour les cas avec PTHrP élevée ($25,6 \pm 69,2$ ng/l) et ceux avec une PTHrP normale ($94,8 \pm 332$ ng/l). Parmi les 20 patients présentant une PTHrP élevée, 19 (95 %) avaient une concentration de PTH ≤ 26 ng/ml. Une seule personne présentait des valeurs élevées de PTHrP et de PTH (11,8 pmol/l et 318 ng/l, respectivement), mais sans hypercalcémie (1,87 mmol/l).

Dix-neuf dosages de la PTHrP ont été réalisés en l'absence d'hypercalcémie; 7 (37 %) des patients concernés avaient un diagnostic de cancer (tableau 6). Pour deux de ces patients, dont un présentant un cancer du sein avancé et l'autre avec un lymphome, la PTHrP était élevée. Chez les 104 patients avec une hypercalcémie, 47 (45 %) avaient un diagnostic de cancer. Chez 15 de ceux-ci (32 %), la PTHrP était élevée (tableau 6). L'hypercalcémie des 57 autres patients a été attribuée à une cause autre qu'une tumeur maligne (insuffisance rénale, cirrhose avancée du foie, HPTp, etc.).

Tableau 6 Résultats du dosage de la PTHrP en fonction de la calcémie et de la présence d'une tumeur chez 123 cas révisés

TOTAL (N)	CALCÉMIE	TUMEUR MALIGNE	PTHrP	
			ÉLEVÉE	NORMALE
104	Élevée	Oui 47 (45 %)	15 (32 %)	32 (68 %)
		Non 57 (55 %)	3 (5 %)	54 (95 %)
19	Normale	Oui 7 (37 %)	2 (29 %)	5 (71 %)
		Non 12 (63 %)	0 (0 %)	12 (100 %)

Source : Fritchie et ses collaborateurs, 2009.

Si on considère les 104 patients hypercalcémiques, ceux avec une PTHrP élevée avaient majoritairement un diagnostic de cancer : 83 % (15/18) contre 17 % (3/18), $p = 0,0005$. La situation opposée est également vraie; l'hypercalcémie des patients avec une PTHrP normale était majoritairement reliée à une cause non cancéreuse : 63 % (54/86) contre 37 % (32/86), $p = 0,0005$.

Les auteurs ont donc calculé l'ampleur du bénéfice clinique associé à l'usage de la PTHrP pour confirmer ou exclure le diagnostic d'HHC. La sensibilité clinique a été établie à 32 % (IC 95 % : 19-47) et la spécificité à 95 % (IC 95 % : 85-99). La valeur prédictive positive était de 83 % (IC 95 % : 59-96) et la valeur prédictive négative était de 63 % (IC 95 % : 52-73), respectivement. Les auteurs concluent qu'une concentration de PTH d'au moins 26 ng/ml mesurée en présence d'hypercalcémie prédit une PTHrP basse dans 100 % des cas.

Il serait donc plus approprié de faire le dosage de la PTHrP après celui de la PTH. Le dosage de la PTHrP a une valeur ajoutée uniquement lorsque les niveaux de PTH se situent sous les valeurs normales [Fritchie *et al.*, 2009].

5.3 Validité analytique ou technique

Les données de validité analytique de la trousse, telles qu'avancées par le fabricant, sont détaillées à l'annexe A.

Voici un résumé des principales données :

- Sensibilité :
 - Sensibilité analytique ou limite de détection : 8,5 pg/ml;
 - Sensibilité fonctionnelle ou limite de quantification : 10,1 pg/ml;
- Précision :
 - Intraessai : les coefficients de variation sont $\leq 11,4$ %;
 - Interessai : les coefficients de variation sont $\leq 14,8$ %;
- Exactitude :
 - Les pourcentages de recouvrement varient entre 78,2 % et 96,1 %;
- Spécificité :
 - La spécificité des anticorps a été évaluée. Aucune réaction croisée n'a été détectée avec la trousse ($< 0,01$ %) entre les anticorps et les éléments suivants : portion C-terminale et moyenne de la PTH, PTH (39-84), PTH intacte, SHBG, ostéocalcine, calcitonine, insuline, érythropoïétine et $\beta 2$ microglobuline.

Le tableau 7 résume les coefficients de variation rapportés par le fabricant ainsi que ceux obtenus par le CHUM.

Tableau 7 Reproductibilité de l'immunoradiométrie de la PTHrP (coefficients de variation comparés)

	COMPAGNIE BECKMAN COULTER	CHUM (HÔPITAL SAINT-LUC)
INTRAESSAI	11,4 % (PTHrP = 62,8 pg/ml)	18 % (PTHrP = 10 pg/ml) 12 % (PTHrP = 55 pg/ml)
INTERESSAI	14,8 % (PTHrP = 62,8 pg/ml)	4,9 % (PTHrP = 113 pg/ml) 4,2 % (PTHrP = 424 pg/ml)

Les certificats d'analyse de la trousse sont disponibles sur le site Web du fabricant¹⁷.

Le tableau 8 présente les principales études répertoriées dans la littérature concernant les principaux paramètres de validité analytique.

¹⁷ Beckman Coulter Inc. Immunoassay Systems Test Menu [site Web]. Disponible à : <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/immunoassay/immunoassay-systems-test-menu/index.htm>.

Tableau 8 Études comparatives - dosage immunoradiométrique de la PTHrP

ÉTUDE	TECHNIQUE	MATRICE	BRÈVE DESCRIPTION ET PARTICULARITÉS DE L'ANALYSE	SENSIBILITÉ ANALYTIQUE OU LIMITE DE DÉTECTION	VARIABILITÉ INTRAESSAI	VARIABILITÉ INTERESSAI
Blind <i>et al.</i>, 1993 17 patients HHC; 11 patients normocalcémiques avec cancer et 21 sujets normaux	IRMA (trousse commerciale Nichols)	Plasma humain	La méthode de dosage IRMA utilise deux antisérums polyclonaux (chèvre et mouton) purifiés et dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (60-72).	0,3 pmol/l (0,3 à 2,6 pmol/l)	2,9 à 9,5 % (9,4 - 1,1 pmol/l)	5,3 à 5,6 % (3,5 - 7,3 pmol/l)
	RIA	Plasma humain	Le RIA utilise de l'antisérum de chèvre dirigé contre la PTHrP (53-84)	5 pmol/l (5 à 21 pmol/l)	4,3 à 12,6 % (à 59 et 18 pmol/l)	4,2 à 20,3 % (à 76 et 9,7 pmol/l)
Burtis <i>et al.</i>, 1990 60 sujets normaux; 23 patients normocalcémiques avec cancer; 13 patients avec HPTp; 4 patients avec hypercalcémie; 3 avec hypoparathyroïdisme; 15 avec insuffisance rénale et 38 patients avec HHC	IRMA	Plasma humain	La méthode de dosage IRMA utilise deux anticorps dirigés contre les épitopes PTHrP (1-36) et PTHrP (37-74) (anticorps radioactif).	1 pmol/l	6,6 %	13,1 %
	RIA	Plasma humain	Le radioligand utilisé est le Tyr ¹⁰⁹ - PTHrP (109-138)	2 pmol/l	9,5 %	16,4 %
De Miguel <i>et al.</i>, 1998 25 patients avec tumeurs et hypercalcémie; 20 patients cancéreux normocalcémiques et 10 sujets normaux	IRMA (trousse commerciale Nichols c. Incstar)	Sang humain	L'essai Nichols utilise deux anticorps purifiés et dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (60-72) respectivement.	0,3 pmol/l	< 10 %	< 10 %
			L'essai Incstar utilise deux anticorps purifiés et dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (57-80) respectivement.	0,2 pmol/l	< 10 %	< 10 %
Segura Dominguez <i>et al.</i>, 1996 6 patients cancéreux avec hypercalcémie, 56 patients cancéreux avec normocalcémie	IRMA (trousse commerciale Nichols)	Plasma humain	La méthode de dosage IRMA utilise deux antisérums polyclonaux (chèvre et mouton) purifiés et dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (60-72).	0,3 pmol/l	2,9 % (à 9,4 pmol/l)	5,6 % (à 7,3 pmol/l)
Dunne <i>et al.</i>, 1993 41 patients avec cancer dont 18 hypercalcémiques et 23 normocalcémiques)	IRMA	Plasma humain	N/D	0,23 pmol/l	N/D	11,1 %

ÉTUDE	TECHNIQUE	MATRICE	BRÈVE DESCRIPTION ET PARTICULARITÉS DE L'ANALYSE	SENSIBILITÉ ANALYTIQUE OU LIMITE DE DÉTECTION	VARIABILITÉ INTRAESSAI	VARIABILITÉ INTERESSAI
Fraser <i>et al.</i>, 1993 60 sujets normaux, 20 patients HPTp et 95 hypercalcémiques qui ont une tumeur	IRMA (trousse commerciale Nichols)	Plasma humain	La méthode de dosage IRMA utilise deux anticorps polyclonaux (chèvre et mouton) purifiés et dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (60-72).	0,7 pmol/l	N/D	N/D
Lee <i>et al.</i>, 1997 178 patients hypercalcémiques	IRMA (trousse commerciale Nichols)	Plasma humain	L'essai utilise deux anticorps purifiés dirigés contre les épitopes PTHrP (1-40) et PTHrP (60-72).	0,3 pmol/l	< 10 %	5,6 % (7,3 pmol/l)
Motellon <i>et al.</i>, 2000 105 patients avec cancer confirmé (60 hypercalcémiques et 45 normocalcémiques)	IRMA (trousse commerciale Nichols)	Plasma humain	N/D	0,3 pmol/l	N/D	< 10 %
Pandian <i>et al.</i>, 1992 46 patients hypercalcémiques avec cancer non hématologique	IRMA	Plasma humain	La méthode utilise deux anticorps dirigés contre les épitopes PTHrP (1-36) et PTHrP (37-74)	0,1 pmol/l	4,4 %	12 % (0,2 pmol/l)
Ratcliffe <i>et al.</i>, 1991 16 patients normocalcémiques et différents cancers et 38 sujets normaux	IRMA	Plasma humain	La méthode utilise deux anticorps (souris et lapin) dirigés contre les épitopes PTHrP (1-34) et (37-67)	0,23 pmol/l	N/D	11,1 %

Sigles et acronymes : HHC : hypercalcémie humorale cancéreuse; HPTp : hyperparathyroïdisme primaire; IRMA : essai immunoradiométrique double épitope; N/D : non disponible; RIA : essai immunoradiométrique simple épitope

5.4 Recommandations d'autres organismes

Aucune mention de recommandations concernant cette analyse n'a été répertoriée par des organismes ou sociétés savantes comme la Canadian Society of Endocrinology and Metabolism (CSEM), l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), l'American Society of Clinical Oncology (ASCO), le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) de même que l'Oxford Center for Diabetes, Endocrinology & Metabolism (OCDEM).

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

L'analyse est offerte depuis juillet 2011. Un dosage aux 4 à 6 semaines est effectué. Toutefois, aucun effet majeur n'est à prévoir si les volumes avancés par les demandeurs se maintiennent avec le temps.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

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

Diagnostiquer ou prévenir correctement l'hypercalcémie humorale cancéreuse pourrait certainement favoriser le maintien d'une meilleure qualité de vie pour les personnes en soins palliatifs, car l'hypercalcémie entraîne une dégradation importante de celle-ci.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Une PTHrP élevée permet de confirmer que l'hypercalcémie est associée à un cancer qui est soit avancé, soit en progression, soit occulte. À cet égard, il a été démontré que la PTHrP possède une valeur pronostique, mais uniquement chez les personnes âgées de moins de 65 ans. Plusieurs études de cas montrent une corrélation entre le taux de PTHrP et l'évolution tumorale.

7.2 Validité clinique

Le dosage de la PTHrP seulement par la méthode IRMA a une sensibilité clinique faible relativement au repérage de l'hypercalcémie humorale cancéreuse, mais il a une grande spécificité clinique. Il semble important de considérer également le dosage de la PTH. Le dosage de la PTHrP a une valeur ajoutée uniquement lorsque les niveaux de PTH se situent sous les valeurs normales.

7.3 Validité analytique

Les données de validité analytique suggèrent que l'IRMA est une méthode fiable et établie pour quantifier la PTHrP dans le plasma.

7.4 Recommandations d'autres organismes : aucune recommandation n'a été repérée.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dosage de la PTHrP par méthode immunoradiométrique

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 d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

COMMENTAIRES ADDITIONNELS

L'analyse proposée repose sur un nombre restreint de cas, mais elle comble un besoin actuellement non couvert par le *Répertoire*. Le comité reconnaît la pertinence de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui. À cet égard, le dosage de la PTHrP fait partie d'algorithmes cliniques reconnus en médecine pour le diagnostic différentiel de l'hypercalcémie.

L'absence d'un système de contrôle de la qualité externe a été notée. Les membres du comité reconnaissent néanmoins que, en raison du contexte particulier, l'obtention des volumes d'analyse nécessaires représente, dans ce cas-ci, un défi de taille. Le comité recommande donc au centre demandeur de participer à un programme externe d'assurance qualité. De plus, un suivi du nombre de tests réalisés (volumétrie) devrait être réalisé.

ANNEXE A

Manuel du fabricant



Direction for use

ENGLISH

RUO

ACTIVE® PTHrP IRMA

REF

DSL8100

IMMUNORADIOMETRIC KIT FOR THE QUANTITATIVE MEASUREMENT OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE (PTHrP) IN HUMAN PLASMA FOR RESEARCH USE ONLY-NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

1. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The 2-site immunoradiometric (IRMA) assay for parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) is a sandwich-type assay. In the kit, polyclonal antibodies directed against two different epitopes of PTHrP are used. Samples or calibrators are incubated in tubes pre-coated with one polyclonal antibody, and with a second liquid ¹²⁵I-labeled polyclonal antibody. After incubation, unbound reagents are removed by washing the tubes. The amount of ¹²⁵I-labeled anti-PTHrP bound to the tube is directly proportional to the concentration of PTHrP present in the sample. A standard curve is constructed and unknown PTHrP values are obtained from the curve by interpolation.

For Summary and Exploration of the Test see APPENDIX.

2. REAGENTS PROVIDED

All unopened reagents in the kit are stable until the expiration date indicated on the kit label, when stored at 2-8°C. Expiry dates printed on vial labels apply to the long-term storage of components by the manufacturer only, prior to assembly of the kit. Do not take into account.

Storage conditions for reconstituted reagents are indicated in appropriate paragraphs.

2.1 Anti-PTHrP antibody coated tubes: 2x50 tubes (ready-to-use)

Plastic tubes with anti-human PTHrP antibody immobilized to the inside wall of each tube.

Note: The process which is used to coat the tubes with antibody sometimes causes a crystalline substance to form on the inside walls of the tubes. This will not affect the performance of the assay in any way.

2.2 ¹²⁵I-labeled anti-PTHrP tracer (YELLOW): one 11 mL vial (ready-to-use)

At the time of manufacture, the vial contains 370 kBq (<10 µCi) of ¹²⁵I-labeled anti-PTHrP antibody in buffer with proteins, sodium azide (<0.1%, see Warnings and Precautions) and a dye.

2.3 Calibrators: five vials labelled 0-4 (lyophilized)

The calibrator vials contain from 0 to 2000 pg/mL (0 to 202 pmol/L) of PTHrP (1-86) in buffer with proteins and sodium azide (<0.1%, see Warnings and Precautions). The exact concentration is indicated on each vial label. The volume for reconstitution is indicated on the vial label. Use immediately. Discard after use.

The calibrator values were established using an internal standard.

2.4 Controls: two vials labelled 1,2 (lyophilized)

The vials contain PTHrP in buffer with proteins and sodium azide (<0.1%, see Warnings and Precautions). The expected values are indicated in a supplement found in the kit. The volume for reconstitution is indicated on the vial label. Use immediately. Discard after use.

3. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- 12 x 75 mm plastic uncoated test tubes for Total counts.
- Test tube rack for 12 x 75 mm tubes.
- Deionized water.
- Precision micropipets (100 µL, 200 µL).
- Semi-automatic pipets (100 µL, 3 mL).
- Vortex type mixer.
- Shaker capable of ≥180 rpm.
- A sponge rack or similar device for decantation.
- Absorbent material for blotting tubes.
- Gamma counter set for 125 iodine.
- Log-log graph paper or computer with IRMA data analysis program.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1 General remarks:

- For research use only-not for use in diagnostic procedures
- Bring all reagents to room temperature before pipetting.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- Do not use any component beyond the expiration date shown on its label.
- A standard curve must be established with each assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Calibrators and controls should be mixed before use by inverting or swirling gently.

4.2 Basic rules of radiation safety

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians, clinical laboratories, research institutions, or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the

material, or its radiation to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and a general license of the NRC or of a state with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority. To minimize the risk of radiation exposure, handle radioactive materials as recommended by appropriate regulatory standards and in "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," 1999, published by the International Atomic Energy Agency.

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should take place in the presence of radioactive materials.
- No pipeting by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and lab coat.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate location, away from corridors and other busy areas.
- Radioactive materials should be stored in the container provided and in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

4.3 Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal of liquids, flush with a large volume of water to prevent azide build-up [1].

4.4 Human plasma

Patient samples and blood-derived products may be routinely processed with minimum risk using the procedure described. However, handle these products as potentially infectious according to universal precautions and good clinical laboratory practices, regardless of their origin, treatment, or prior certification. Use an appropriate disinfectant for decontamination. Store and dispose of these materials and their containers in accordance with local regulations and guidelines.

The Materials Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request.

5. SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING AND STORAGE

- Plasma is the recommended sample type.
- Blood samples should be collected in the presence of protease inhibitors. The following combination of protease inhibitors has been shown to be effective [8]:

aprotinin	500 kU/L
leupeptin	2.5 mg/L
EDTA	100 mmol/L
- Blood samples should be separated by centrifugation within two hours of collection and the plasma should be immediately assayed or frozen and stored at -70 °C or lower. It is recommended to prepare aliquots to avoid repeated freezing and thawing.
- Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.
- Plasma samples stored at -70 °C should be assayed within 30 days of the collection date [9].
- Do not use hemolyzed or lipemic specimens

6. ASSAY PROCEDURE

6.1 Preparation of reagents

Let all the reagents come to room temperature and mix them thoroughly by gentle inversion before the use.

6.1.1 Reconstitution of calibrators and control sera

The content of the vials is reconstituted with the volume of distilled water indicated on the vial label. Mix gently to avoid foaming before dispensing. After reconstitution, use immediately. Discard after use.

6.2 Assay procedure (see table next page)

PI-DSL8100-2012-01-26 RUO

7. RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve is used for the determination of PTHrP concentrations in samples measured at the same time as the calibrators.

7.1 Standard curve

The results below were calculated by plotting the data on a log vs. log scale using a linear curve fit with cpm on the vertical axis and the PTHrP concentration of the calibrators on the horizontal axis (pg/mL). Other data reduction methods may give slightly different results.

Total activity: 142,102 cpm			
Calibrators	PTHrP (pg/mL)	cpm (n=2)	B/I (%)
0	0	496	---
1	20	1,294	0.56
2	130	3,638	2.21
3	680	12,917	8.74
4	2,100	25,257	17.42

(Example of standard curve, do not use for calculation)

7.2 Samples

For each sample locate the cpm on the vertical axis of the standard curve and read off the corresponding PTHrP concentration of the sample on the horizontal axis in pg/mL.

To convert concentrations from pg/mL to pmol/L, multiply results by 0.101

8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples be used regularly to ensure the quality of the results obtained. The controls must be processed exactly in the same way as the patient samples, and it is recommended that their results be analyzed using appropriate statistical methods.

Failure to obtain the appropriate values for controls may indicate imprecise manipulations, improper sample handling or deterioration of reagents.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following E-mail address: immunochem@beckman.com
In the US, contact the Customer Assistance Center at 1-800-854-3633; or by email at: immunoassay@beckman.com

9. EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own reference ranges.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(For more details, see APPENDIX)

10.1 Sensitivity:

10.1.1 Analytical sensitivity: 8.5 pg/mL

10.1.2 Functional sensitivity: 10.1 pg/mL

10.2 Specificity

The antibodies used in the immunoassay are highly specific for PTHrP.

10.3 Precision

10.3.1 Intra-assay

Samples were assayed 25 times in the same run. The coefficients of variation were ≤ 11.4 %.

10.3.2 Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 10 different runs. The coefficients of variation were ≤ 14.8 %.

10.4 Accuracy

10.4.1 Dilution test

The dilution of patient's samples is not recommended. Results may be affected by poor stability of PTHrP. Moreover, dilution can be non-linear in some samples.

10.4.2 Recovery test

Three plasma samples were spiked with different amounts of elevated sample and assayed. The recovery percentages ranged from 78.2% to 96.1%.

10.5 Measurement range (from analytical sensitivity to highest calibrator):

8.5 – 2,000 pg/mL.

11. LIMITATION OF THE METHOD

- Failure to follow these instructions for use (IFU) may significantly affect results.
- Failure to blot tubes adequately following decantation may result in poor replication and spurious values.
- Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- Hemolyzed and lipemic specimens may give false values and should not be used.
- The possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays. Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

6.2 ASSAY PROCEDURE

Run calibrators, controls and patient samples in duplicate.

Step 1 Additions *	Step 2 Incubation	Step 3 Washing & Counting
<p>To antibody coated tubes successively add:</p> <p>200 µL of calibrator, control or sample and immediately add 100 µL of tracer.</p> <p>Vortex gently 1-2 seconds</p>	<p>Incubate 16 - 22 hours at room temperature (18 - 25°C) on a shaker set at ≥180 rpm</p>	<p>Aspirate all tubes or decant (except «total cpm» tubes) by simultaneous inversion with a sponge rack into a radioactive waste receptacle. After decanting strike the tubes sharply on absorbent material to facilitate complete drainage and then allow them to drain on the absorbent material for 1-2 minutes. Blot the tubes.</p> <p>Wash three times with 3 mL of deionized water (except «total cpm» tubes). Aspirate or decant and blot after each wash step.</p> <p>Count bound cpm (B) and total cpm (T) for 1 minute.</p>

* Add 100 µL of tracer to 2 additional tubes to obtain total cpm.



IMMUNOTECH s.r.o. - Radiová 1 - 102 27 Prague 10 - Czech Republic - Phone. +420-272017444 – Fax : +420-272017385

PI-DSL8100-2012-01-26 RUO



APPENDIX

RUO

ACTIVE® * PTHrP IRMA

REF

DSL8100

IMMUNORADIOMETRIC KIT FOR THE QUANTITATIVE MEASUREMENT OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE (PTHrP) IN HUMAN PLASMA FOR RESEARCH USE ONLY-NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

Performance characteristics

*ACTIVE® is a trademark of BECKMAN COULTER Inc. and its subsidiaries.

A. Summary and explanation of the test

Parathyroid hormone (PTH) acts directly on bone to promote resorption and upon the kidney to decrease calcium excretion, thereby raising calcium levels. It is also known to cause increased renal production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which often occurs in patients with low or undetectable plasma PTH levels. Thus, when studies revealed that PTH sometimes could not be detected in either plasma or tumor extracts of a number of hypercalcemic patients whose tumor extracts resorbed bone *in vitro*, it was established that the tumors were producing something which was not PTH itself, but which had remarkably similar effects to PTH [2]. Also, because of evidence that PTH, itself, is often not responsible for hypercalcemia of malignancy (HM), peptides with PTH-like activity were implicated as possible mediators of HM [4]. The resulting search for such a substance led to the discovery of PTH-like biological activity in extracts of tumors of patients with HM, in culture medium from a tumor cell culture of such a patient, and in extracts of cancers from animal models of the syndrome [2]. Thus, parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) was discovered. PTHrP is produced by a variety of cancers and is thought to be responsible for the clinical syndrome of HM [4]. PTHrP and PTH are homologous in that eight of the first thirteen amino acid residues are identical, but, thereafter, PTHrP is unique [5]. This homology allows PTHrP to act via the parathyroid hormone receptor [6]. The PTH-like bioactivity of PTHrP, like that of PTH, is contained within the first 34 amino acids [3]. Based on chromosomal localization data and shared organizational features, the PTH and PTHrP genes appear to have arisen via an ancient duplication event and to represent members of a gene family. After this duplication event, the two genes have clearly evolved separately, and the PTHrP gene has developed an organization that is considerably more complex than is that of the PTH gene [7]. PTHrP appears to be involved in several different aspects of the reproductive process. There is evidence that PTHrP may help to regulate calcium metabolism during fetal development and adult life in man. In the fetus, PTHrP has been identified in epithelium from many sites and in parathyroid glands [8]. It has also been shown to be capable of stimulating the placental calcium pump that maintains the calcium gradient which is required for normal mineralization of the fetal skeleton [7]. Studies with a fetal lamb suggest that PTHrP is responsible for maintenance of this placental calcium gradient [2]. Tissues in which PTHrP has been identified include kidney, bone, smooth and skeletal muscle in the fetus, placenta, lactating breast, brain, pancreas, ovary, uterus, testis, and spleen [8].

B. Specificity

Data on cross-reactivity with several compounds are presented in the following table:

COMPOUND	% CROSS-REACTIVITY
C-Terminal PTH	ND
Mid-Molecule PTH	ND
Sex Hormone Binding Globulin	ND
Osteocalcin	ND
Calcitonin	ND
Insulin	ND
Erythropoietin	ND
PTH (39-84)	ND
Intact PTH	ND
Beta-microglobulin	ND

ND = Non-detectable (< 0.01%)

C. Precision

Intra-assay

The intra-assay precision was determined from the mean of 25 replicates each.

Sample	N	Mean (pg/mL)	Coefficient of variation (%)
I	25	44.3	11.4
II	25	119.3	3.6
III	25	328.0	4.9

Inter-assay

The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for 10 separate runs.

Sample	N	Mean (pg/mL)	Coefficient of variation (%)
I	10	34.0	14.8
II	10	286.2	7.8
III	10	584.7	5.6

D. Accuracy

Recovery test

Three samples containing different levels of endogenous PTHrP were spiked with different amounts of an elevated sample and assayed.

Sample	Endogenous (pg/mL)	Added (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Recovery (%)
I	62.8	31.8	94.6	79.3	83.8
	62.3	63.2	125.5	98.1	78.2
	63.0	198.0	261.9	206.3	79.1
II	132.4	52.8	185.1	145.8	78.8
	130.8	104.3	235.1	190.1	80.9
	133.1	329.1	462.3	363.2	78.6
III	173.2	77.8	251.0	203.8	81.2
	175.6	198.0	373.6	358.9	96.1
	175.3	296.4	471.7	431.2	91.4

E. REFERENCES











- DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
- Marin T. Properties of parathyroid hormone-related protein and its role in malignant hypercalcemia. Quarterly Journal of Medicine 76(280):771, 1990.
- Rakcliffe W, et al. Development and validation of an immunoradiometric assay of parathyrin-related protein in unextracted plasma. Clin Chem 37(5):678, 1991.
- Fenton A, et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein, PTHrP [107-111]. Endocrinology 129(6):3424, 1991.
- Burris W, et al. Immunohistochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. The New England Journal of Medicine 322:1106, 1990.
- PTHrP: Endocrine and autocrine regulator of calcium. The Lancet 337:146, 1991.
- Stewart A, Broadus A. Clinical Review 16: Parathyroid hormone-related proteins: Coming of age in the 1990s. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 71(6):1410, 1990.
- Thurston A, et al. Purification and properties of parathyroid hormone-related peptide isolated from milk. Endocrinology 126(2):1183, 1990.
- Pandian MR, Morgan CH, Carlton E, Segre GV. Modified immunoradiometric assay of parathyroid-hormone-related protein: Clinical application in the differential diagnosis of hypercalcemia. Clin Chem 38:282-288, 1992.
- Ann Clin Biochem. 1994. Jan;31 (Pt 1):35-9
- Burris CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1984, p.1821.

F. ¹²⁵I Characteristics

T_{1/2} (¹²⁵I) = 1443 h = 60.14 d

¹²⁵ I	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25

PI-DSL8100-2012-01-26RUO

-  Use by ...
-  For research use only
-  Catalogue Number
-  Batch code
-  Caution, see instructions for use
-  Consult Instructions for Use
-  Temperature limitation
-  Radioactive
-  For XX tests
-  Manufacturer

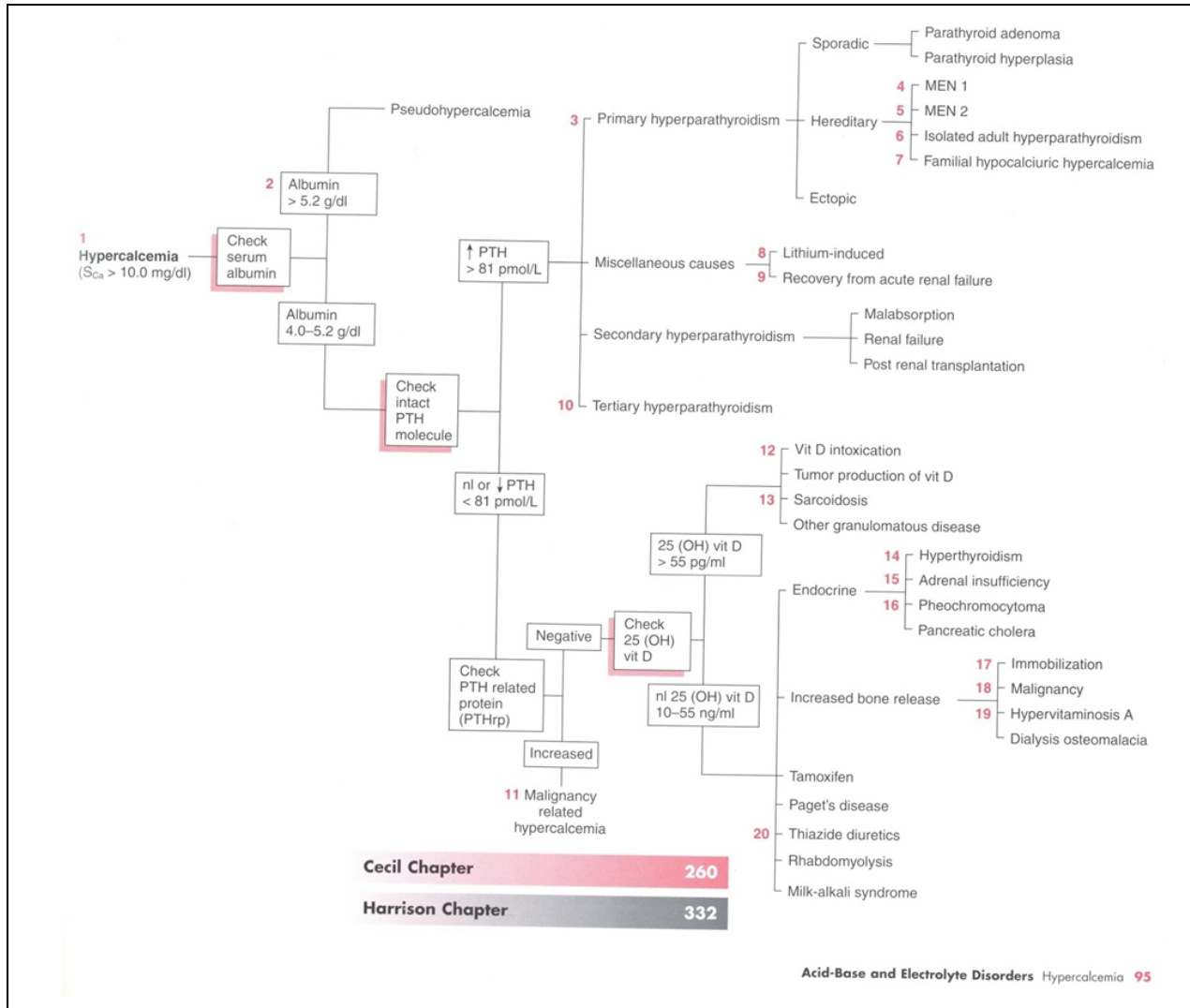


IMMUNOTECH s.r.o. - Radiová 1 - 102 27 Prague 10 - Czech Republic - Phone. +420-272017444 – Fax : +420-272017385

PI-DSL8100-2012-01-26 RUO

ANNEXE B

Algorithme diagnostique de l'hypercalcémie



Source : Healey PM et Jacobson EJ. Common medical diagnoses: An algorithmic approach. 4^e éd. Philadelphie, PA : Saunders Elsevier; 2006.

RÉFÉRENCES

- Blind E, Raue F, Meinel T, Bucher M, Manegold C, Ebert W, et al. Levels of parathyroid hormone-related protein in hypercalcemia of malignancy: Comparison of midregional radioimmunoassay and two-site immunoradiometric assay. *Clin Investig* 1993;71(1):31-6.
- Burtis WJ, Brady TG, Orloff JJ, Ersbak JB, Warrell RP Jr, Olson BR, et al. Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N Engl J Med* 1990;322(16):1106-12.
- Clines GA. Mechanisms and treatment of hypercalcemia of malignancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18(6):339-46.
- De Miguel F, Motellon JL, Hurtado J, Jimenez FJ, Esbrit P. Comparison of two immunoradiometric assays for parathyroid hormone-related protein in the evaluation of cancer patients with and without hypercalcemia. *Clin Chim Acta* 1998;277(2):171-80.
- Dharmaraj P, Ball S, Johnstone H, Bailey S, Clifford SC, Hale J, Cheetham TD. Hypercalcaemia in relapsed medulloblastoma 8 years post-diagnosis; evidence to support PTHrP production by medulloblastoma cells. *Horm Res* 2006;66(6):268-72.
- Dunne FP, Lee S, Ratcliffe WA, Hutchesson AC, Bundred NJ, Heath DA. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression in solid tumours associated with normocalcaemia and hypercalcaemia. *J Pathol* 1993;171(3):215-21.
- Fernandez-Real JM, Villabona C, Soler J. Oesophageal carcinoma presenting as isolated malignant hypercalcaemia. *Postgrad Med J* 1994;70(828):765-6.
- Fraser WD, Robinson J, Lawton R, Durham B, Gallacher SJ, Boyle IT, et al. Clinical and laboratory studies of a new immunoradiometric assay of parathyroid hormone-related protein. *Clin Chem* 1993;39(3):414-9.
- Fritchie K, Zedek D, Grenache DG. The clinical utility of parathyroid hormone-related peptide in the assessment of hypercalcemia. *Clin Chim Acta* 2009;402(1-2):146-9.
- Horwitz MJ et Bilezikian JP. Primary hyperparathyroidism and parathyroid hormone-related protein. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6(3):321-8.
- Lafferty FW. Differential diagnosis of hypercalcemia. *J Bone Miner Res* 1991;6(Suppl 2):S51-9.
- Lee JK, Chuang MJ, Lu CC, Hao LJ, Yang CY, Han TM, Lam HC. Parathyroid hormone and parathyroid hormone related protein assays in the investigation of hypercalcemic patients in hospital in a Chinese population. *J Endocrinol Invest* 1997;20(7):404-9.
- McCauley LK et Martin TJ. Twenty-five years of PTHrP progress: From cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res* 2012;27(6):1231-9.
- Motellon JL, Javort Jimenez F, de Miguel F, Jaras MJ, Diaz A, Hurtado J, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein, parathyroid hormone, and vitamin D in hypercalcemia of malignancy. *Clin Chim Acta* 2000;290(2):189-97.
- Mundy GR. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):584-93.

- Nagasaki K, Otsubo K, Kajimura N, Tanaka R, Watanabe H, Tachimori Y, et al. Circulating parathyroid hormone-related protein (109-141) in malignancy-associated hypercalcemia. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26(1):6-11.
- Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: Posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 1994;15(1):40-60.
- Pandian MR, Morgan CH, Carlton E, Segre GV. Modified immunoradiometric assay of parathyroid hormone-related protein: Clinical application in the differential diagnosis of hypercalcemia. *Clin Chem* 1992;38(2):282-8.
- Papworth K, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Parathyroid hormone-related protein and serum calcium in patients with renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2005;26(4):201-6.
- Porter RS et Kaplan JL. Le manuel Merck de diagnostic et de thérapeutique. 5^e éd. française. Paris, France : Éditions de médecine; 2014.
- Ralston SH, Gallacher SJ, Patel U, Campbell J, Boyle IT. Cancer-associated hypercalcemia: Morbidity and mortality. Clinical experience in 126 treated patients. *Ann Intern Med* 1990;112(7):499-504.
- Ratcliffe WA, Hutchesson AC, Bundred NJ, Ratcliffe JG. Role of assays for parathyroid-hormone-related protein in investigation of hypercalcaemia. *Lancet* 1992;339(8786):164-7.
- Ratcliffe WA, Norbury S, Heath DA, Ratcliffe JG. Development and validation of an immunoradiometric assay of parathyrin-related protein in unextracted plasma. *Clin Chem* 1991;37(5):678-85.
- Santarpia L, Koch CA, Sarlis NJ. Hypercalcemia in cancer patients: Pathobiology and management. *Horm Metab Res* 2010;42(3):153-64.
- Savvari P, Peitsidis P, Alevizaki M, Dimopoulos MA, Antsaklis A, Papadimitriou CA. Paraneoplastic humorally mediated hypercalcemia induced by parathyroid hormone-related protein in gynecologic malignancies: A systematic review. *Onkologie* 2009;32(8-9):517-23.
- Schöttker B, Heinz W, Weissinger F, Sözener K, Eck M, Seufert J. Parathyroid-hormone-related-protein-associated hypercalcemia in a patient with CLL-type low-grade leukemic B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006;91(12 Suppl):ECR45.
- Segura Dominguez A, Andrade Olivie MA, Rodriguez Sousa T, Terron Alvarez ML, Rodriguez Perez D, Alvarez Novoa R, Garcia-Mayor RV. Plasma parathyroid hormone related-protein levels in patients with cancer, normocalcemic and hypercalcemic. *Clin Chim Acta* 1996;244(2):163-72.
- Truong NU, deB Edwardes MD, Papavasiliou V, Goltzman D, Kremer R. Parathyroid hormone-related peptide and survival of patients with cancer and hypercalcemia. *Am J Med* 2003;115(2):115-21.
- Ueno M, Tokonabe S, Kuroda I, Tsukamoto T, Deguchi N. Hypercalcemia upon recurrence of renal cell carcinoma producing parathyroid hormone-related protein. *Scand J Urol Nephrol* 2003;37(3):265-8.
- Ueno M, Ban S, Nakanoma T, Tsukamoto T, Nonaka S, Hirata R, et al. Hypercalcemia in a patient with renal cell carcinoma producing parathyroid hormone-related protein and interleukin-6. *Int J Urol* 2000;7(6):239-42.

DÉTECTION DE *KINGELLA KINGAE*, *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ET *STREPTOCOCCUS PYOGENES* PAR TECHNIQUE D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS UN LIQUIDE ARTICULAIRE OU PLEURAL (RÉFÉRENCE – 2014.03.05)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine
- 1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juillet 2015
- 1.3 Date de publication de l'avis : 30 septembre 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur 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

2.1 Nom de la technologie

Détection simultanée de 4 bactéries dans un liquide articulaire ou pleural, par technique d'amplification des acides nucléiques (TAAN) en temps réel.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Il s'agit d'une technique d'amplification des acides nucléiques de *Kingella kingae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* qui vise à diagnostiquer les infections ostéo-articulaires¹⁸ et les empyèmes pleuraux¹⁹. Des liquides biologiques qui proviennent d'autres sites anatomiques que les articulations ou la plèvre pourraient être utilisés dans un contexte infectieux, mais l'analyse serait limitée aux échantillons prélevés à l'occasion de ponctions.

La technologie employée est une réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en temps réel exécutée avec un mélange de sondes TaqMan®.

¹⁸ Après *Staphylococcus aureus*, les bactéries *Kingella kingae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus agalactiae* ont été celles les plus fréquemment isolées dans les cultures employées afin de diagnostiquer des infections ostéo-articulaires [Moumille et al., 2005].

¹⁹ Les agents étiologiques communs des pneumonies avec épanchement pleural ou empyème sont *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *S. aureus* [Poulter et al., 2005].

Chacune de ces sondes est spécifique à une séquence d'ADN de l'une des 4 bactéries recherchées²⁰. De plus, chaque sonde porte un fluorophore et une molécule qui masque la fluorescence (*quencher*). Ainsi, lors de l'amplification de l'ADN bactérien par PCR, si la polymérase rencontre une sonde TaqMan® parfaitement hybridée en aval, cette sonde est hydrolysée. À ce moment, le fluorophore de la sonde hydrolysée n'est plus masqué; il est alors excité par la source lumineuse de l'appareil analyseur et de la fluorescence est émise (voir le schéma à l'annexe A). La longueur d'onde de la fluorescence qui est mesurée indique quel fluorophore a été excité et donc quelle séquence d'ADN bactérien a été détectée parmi les 4 recherchées dans l'échantillon. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN détecté. Quatre fluorophores distincts sont utilisés : la fluorescéine (*6-carboxyfluorescein*), le vert d'indocyanine, la cyanine 5 et le rouge 610. Chacun sert à rapporter l'une des 4 bactéries recherchées.

2.3 Société ou développeur

L'analyse est une PCR maison dont le protocole a été développé par l'équipe du demandeur. À cet égard, signalons qu'il n'existe pas de trousse commerciale de PCR spécifique à *K. kingae* [Basmaci *et al.*, 2013]. Il est précisé dans la demande que les séquences d'ADN bactérien *rtxA* et *cfb* sont des cibles qui ont été validées par d'autres auteurs (respectivement Lehours et ses collaborateurs [2011]²¹ et Gillespie et Oliver [2005]²²), tandis que *lytA* et *spy* sont des cibles qui ont été validées et qui sont recommandées par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC)²³. Les concentrations d'amorces et de sondes ont été optimisées à l'interne afin de maximiser la sensibilité de la PCR. Cette dernière a été validée à l'interne sur 56 liquides articulaires et 52 liquides pleuraux, et ce, en comparant les résultats avec ceux de la culture.

2.4 Licence : ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ne s'applique pas. Le demandeur est d'avis qu'il n'existe pas de test approuvé par Santé Canada qui serait similaire.

2.7 Valeur pondérée : 17,84.

²⁰ La séquence *rtxA* (*repeats in toxin A*, *rtxA*) est présente dans l'ADN de *K. nogae*; la séquence *cfb* (*Christie-Atkins Munch-Peterson factor*, *cfb*) se trouve dans l'ADN de *S. agalactiae* qui est un streptocoque du groupe B de Lancefield; et la séquence *lytA* (*lytic amidase*, *lytA*) fait partie de l'ADN de *S. pneumoniae* qui est le pneumocoque. La séquence *spy* désigne le cadre de lecture ouvert SPy1258 identifié par le séquençage complet du génome de *S. pyogenes* M1 SF370 et dont la fonction probable est de réguler la transcription.

²¹ Lehours et ses collaborateurs [2011] énoncent que la PCR uniplexe en temps réel, qu'ils ont effectuée avec des sondes TaqMan® et qui avait pour cible la séquence *rtxA* de *K. kingae*, est **spécifique** et hautement **sensible**. Ils réitèrent ainsi que la séquence *rtxA* est une cible qu'il est pertinent de viser lors du diagnostic moléculaire des infections ostéo-articulaires.

²² Gillespie et Oliver [2005] affirment que la PCR multiplexe en temps réel, qu'ils ont effectuée avec des sondes TaqMan® et qui avait notamment pour cible la séquence *cfb* de *S. agalactiae*, est **spécifique** à 99,6 % et **sensible** à 95,5 %. Ils sont d'avis qu'elle a le potentiel d'être une méthode diagnostique valable afin d'identifier simultanément, et directement dans le lait, les trois bactéries qu'ils ont étudiées (*S. agalactiae*, *S. aureus* et *S. uberis*).

²³ Information tirée du document « Real-time PCR targets for Streptococcus species detection and antibiotic susceptibility in SPN » du CDC et disponible à : <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-realtime-target.pdf> (consulté le 12 mai 2015).

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

3.1 Patients ciblés

Patients de tout âge chez qui on soupçonne une infection ostéo-articulaire ou un empyème pleural et chez qui une ponction articulaire ou pleurale a été pratiquée.

3.2 Description des maladies visées

Dans une étude qui portait sur 401 cas adultes d'infection invasive à streptocoque du groupe B, les infections ostéo-articulaires étaient les deuxièmes les plus fréquemment observées [Tazi *et al.*, 2011]. Les infections ostéo-articulaires peuvent avoir de graves conséquences comme une septicémie (à streptocoque du groupe A ou à *Staphylococcus aureus*), des séquelles articulaires (dus à l'arthrite septique) et la stérilisation du cartilage de croissance (associée à l'ostéomyélite) [Lorrot *et al.*, 2011]. *K. kingae* est notamment responsable des deux dernières [Dubnov-Raz *et al.*, 2010]. Le traitement des infections ostéo-articulaires est pharmacologique (antibiotiques), voire chirurgical dans certains cas [Dodwell *et al.*, 2013].

L'empyème pleural est une infection qui se situe dans la cavité pleurale²⁴ et qui constitue une complication grave de la pneumonie contractée dans la communauté. L'empyème pleural cause en effet une morbidité significative chez les enfants [Strachan *et al.*, 2011a]. Le traitement de l'empyème pleural est fait notamment avec des antibiotiques, un drainage intercostal ou une chirurgie [Roxburgh et Youngson, 2007]²⁵. Une récente étude menée au Québec montre que l'incidence de l'empyème pleural dans la population pédiatrique (6 mois à 14 ans) a augmenté de 0,23 cas sur 100 000 en 1990 à 4,01 cas sur 100 000 en 2007. L'analyse par groupes d'âge montre que l'augmentation est plus marquée chez les plus jeunes. Aucune cause particulière n'a toutefois pu être reconnue [Deceuninck *et al.*, 2014].

3.3 Nombre de patients visés

Selon l'information fournie par le demandeur, le nombre total d'échantillons serait d'environ 600 par année, minimalement (dont environ 300 uniquement dans la population actuellement servie par le CHU Sainte-Justine).

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Microbiologie-infectiologie, orthopédie, pédiatrie, médecine interne et pneumologie.

3.5 Modalités d'administration du test

L'information incluse dans la demande indique que, pour les patients du CHU Sainte-Justine, le prélèvement serait fait par ponction en salle d'opération à l'unité clinique ou en salle de radiologie. Ensuite, l'échantillon serait immédiatement acheminé au laboratoire de bactériologie du CHU Sainte-Justine où l'on procéderait à son analyse dès son arrivée.

²⁴ Information tirée du site Web « L'infection de la cavité pleurale (empyème pleural) » du Service de chirurgie thoracique et vasculaire du Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV) et disponible à : <http://www.chuv.ch/ctv/ctv-empyeme-pleural-detaille.htm> (consulté le 13 janvier 2015).

²⁵ Roxburgh et Youngson [2007] indiquent par ailleurs, dans leur étude qui portait sur 28 enfants admis pour cause d'empyème pleural, que la durée d'hospitalisation a varié entre 2 et 35 jours (moyenne de 11,4 jours) et que 12 des participants à l'étude ont eu besoin de soins intermédiaires (*high dependency setting*) d'une durée variant entre 2 et 17 jours (moyenne de 7,1 jours).

L'analyse serait amorcée en même temps que les analyses 40267 et 40165 décrites à la section 4.1. Dans l'éventualité où l'échantillon ne serait pas analysé dès sa réception, il devrait être conservé à 4 °C. Un maximum de deux échantillons par patient serait accepté. De plus, le demandeur spécifie dans sa procédure qu'un échantillon serait rejeté si le patient a eu un résultat positif au cours des 7 derniers jours.

Les échantillons provenant d'autres établissements devraient être conservés à 4 °C et être acheminés dans les 4 jours au laboratoire de bactériologie du CHU Sainte-Justine. Si le délai de transport est supérieur à 4 jours, les échantillons devraient être conservés à -70 °C et transportés sur glace sèche. L'analyse serait faite une fois par jour, du lundi au vendredi, et le délai de réponse serait inférieur à 48 heures.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

La nouvelle analyse est complémentaire à l'analyse PCR nommée *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (TAAN sur spécimen clinique) qui porte le code 40267 dans le *Répertoire*. Il est précisé dans la demande que cette analyse cible les gènes *nuc*, *mecA* et *mecC* et qu'elle inclut un contrôle interne.

Elle serait aussi complémentaire à l'analyse nommée Liquide biologique (autre que LCR²⁶) (culture) qui porte le code 40165 dans le *Répertoire*. En effet, de l'avis du demandeur, la culture bactérienne est tout de même utile, car elle permet de détecter des bactéries qui ne sont pas visées par la PCR et de déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'étalon-or des analyses microbiologiques pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires et des empyèmes pleuraux est la culture. En cas de suspicion d'une infection ostéo-articulaire, bien que le diagnostic repose aussi sur d'autres paramètres (examen clinique, bilan inflammatoire et examens d'imagerie) que les analyses microbiologiques [Roblot *et al.*, 2007], ces dernières semblent très importantes. Il a en effet été observé que *K. kingae* génère des réponses cliniques et inflammatoires qui sont légères ou modérées et que cette bactérie a des effets visibles à l'imagerie, qui sont moins prononcés que les effets d'autres germes [Ceroni *et al.*, 2010] et qui sont, par conséquent, moins évocateurs. Or, il arrive que la bactérie *S. pneumoniae* ne soit pas détectée en culture, car elle possède une enzyme qui provoque sa propre lyse [Ploton *et al.*, 2006]. De plus, de façon générale, la culture de bactéries est négative si l'inoculum est insuffisant, si les conditions de croissance ne sont pas respectées, si des substances inhibitrices sont présentes dans l'échantillon (elles touchent particulièrement *K. kingae*) ou si une antibiothérapie est en cours.

Les procédures actuelles, que le demandeur a transmises, consistent à utiliser le liquide articulaire ou pleural afin de faire une coloration de Gram, ainsi qu'à ensemercer des bouillons, des géloses et des bouteilles d'hémoculture (si l'échantillon est suffisamment volumineux). Selon le demandeur, dans la majorité des cas, aucune croissance bactérienne n'est observée sur les géloses et il faut alors attendre 7 jours avant de pouvoir confirmer le résultat négatif. Par contre, s'il y a croissance, la bactérie peut être identifiée en 48 heures dans le meilleur des cas. Elle peut toutefois être difficile à cultiver ou à identifier par les tests biochimiques classiques et n'être identifiée qu'après 7 à 10 jours.

²⁶ Liquide céphalo-rachidien.

Il existe actuellement un code dans le *Répertoire* pour la détection de *S. pneumoniae* et de *S. agalactiae* par PCR (code 40166).

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

D'une part, la PCR permet de détecter des bactéries même si elles sont non viables [Poulter *et al.*, 2005]. Le demandeur énonce d'autre part que, comparativement à la culture, la PCR est rapide (elle prend 3 heures) et elle permet au clinicien d'entreprendre un traitement mieux adapté. De plus, le demandeur est d'avis que la rapidité de la PCR multiplexe permettrait de diminuer le risque que le patient souffre de séquelles associées aux infections, comme un handicap physique à long terme. Enfin, le demandeur précise que l'identification du germe permettrait de passer d'un traitement intraveineux à un traitement oral, ce qui atténuerait les effets indésirables pour le patient.

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

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

L'analyse ne remplacerait pas un autre test.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

Fréquence de détection des bactéries

Bien qu'il ne s'agisse pas de résultats de sensibilité ou de spécificité clinique, les résultats suivants portent sur la fréquence de détection des 4 bactéries qui nous préoccupent (tableau 1).

Le demandeur a analysé 108 échantillons (56 liquides articulaires et 52 liquides pleuraux) : la PCR qu'il a développée a permis la **détection** d'au moins 1 des 4 bactéries visées dans 28,70 % des 108 échantillons et la culture a permis une telle détection dans 4,60 % des échantillons.

Liquides pleuraux

Une étude qui a porté sur l'analyse de 56 échantillons de liquides pleuraux prélevés sur des enfants, à l'aide de diverses PCR uniplexes en temps réel qui ciblaient notamment *lytA* et *spy*, a révélé que les PCR **détectent** des pathogènes dans un plus grand nombre d'échantillons que la culture (respectivement 82 % et 25 %, $p < 0,0001$). La plus grande différence a été observée pour *S. pneumoniae* (respectivement 62 % et 14 %, $p < 0,0001$), suivie du streptocoque du groupe A (respectivement 16 % et 9 %, $p = 0,12$). Au moment de l'admission, la majorité des cas avait été prétraités par antibiothérapie [Pernica *et al.*, 2014].

Picazo et ses collaborateurs [2013] ont utilisé une PCR qui ciblait *lytA* afin d'analyser 199 échantillons (une majorité de liquide pleural et une minorité de LCR) prélevés sur des enfants²⁷. La PCR a permis la **détection** de la bactérie dans 74,8 % des échantillons et la culture dans 18,1 %.

²⁷ La PCR a été utilisée comme test de référence relativement à la détermination des performances diagnostiques d'un test de détection rapide d'antigènes.

Strachan et ses collaborateurs [2011a] ont utilisé une PCR avec une sonde TaqMan® qui ciblait *lytA* dans des échantillons de liquides pleuraux d'enfants. La PCR a permis la **détection** de cette bactérie dans 49,6 % des 137 échantillons analysés, tandis que la culture a permis de détecter la bactérie dans 8,1 % des échantillons²⁸.

Dans une autre étude [Strachan *et al.*, 2011b] qui portait sur 174 enfants, la même PCR a permis la **détection** de *S. pneumoniae* dans 51,0 % des 145 échantillons de liquides pleuraux analysés par cette méthode, alors que la culture a permis de détecter la bactérie dans 7,5 % des 160 échantillons de liquides pleuraux analysés de la sorte.

Hernandez-Bou et ses collaborateurs [2009] ont analysé 134 échantillons de liquides pleuraux au moyen d'une culture bactérienne et 111 avec la PCR spécifique à *S. pneumoniae* (*lytA*). Le pourcentage de **détection** a été de 64,9 % par PCR *lytA* et de 20,2 % par culture. Les souches identifiées à partir d'une culture de liquide pleural ont été *S. pneumoniae* (n = 25), *S. pyogenes* (n = 3), *Peptostreptococcus* (n = 1) et *Streptococcus mitis* (n = 1) [Hernandez-Bou *et al.*, 2009]²⁹.

Liquides articulaires

Ceroni et ses collaborateurs [2010] ont réalisé une étude prospective dont l'objectif était de décrire les caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques d'enfants atteints d'une infection ostéo-articulaire à *K. kingae*. Au total, 43 cas consécutifs ont été évalués.

La culture d'un échantillon de sang ou de liquide articulaire a permis de **détecter** un agent étiologique pour 6 des 43 cas testés (14,6 %), dont un seul cas de *K. kingae*, les autres bactéries étant *S. pneumoniae* (4 cas) et *S. pyogenes* (1 cas). L'amplification par PCR en temps réel et spécifique à *rtxA* a permis de **détecter** *K. kingae* chez 23 des 31 cas testés (74 %).

Williams et ses collaborateurs [2014] ont pour leur part **détesté** *K. kingae* par PCR (*rtxA*) dans 27 des 68 échantillons de liquides articulaires (39,71 %) et par culture dans 2 de ces échantillons (2,94 %).

En conclusion, le taux de détection est plus élevé avec la PCR qu'avec la culture.

²⁸ *Id.*

²⁹ *Id.*

Tableau 1 Résumé des résultats de la détection de *K. kingae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* par PCR quantitative et par culture

ÉTUDE	ÉCHANTILLON	BACTÉRIE DÉTECTÉE (CIBLE)	FRÉQUENCE DES RÉSULTATS POSITIFS	
			rt-PCR	CULTURE
Résultats non publiés du demandeur	Liquide articulaire (n = 56) et liquide pleural (n = 52)	<i>K. kingae</i> (<i>rtxA</i>)	10,2 %	0,9 %
		<i>S. agalactiae</i> (<i>cfb</i>)	0,9 %	0,0 %
		<i>S. pyogenes</i> (<i>spy</i>)	10,2 %	3,7 %
		<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>)	7,4 %	0,0 %
Pernica <i>et al.</i> , 2014	Liquide pleural (n = 56)	<i>S. pyogenes</i> (<i>spy</i>) Limite de détection : 100 bactéries	16,0 %	9,0 %
		<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>) Limite de détection : 10 bactéries	62,0 %	14,0 %
Picazo <i>et al.</i> , 2013	Liquide pleural en majorité et LCR en minorité (n = 199)	<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>) Limite de détection : 0,4 pg/μl	74,8 %	18,1 %
Strachan <i>et al.</i> , 2011a	Liquide pleural rt-PCR : n = 137 culture : n = 135	<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>) Limite de détection : 6 ufc/ml	49,6 %	8,1 %
Strachan <i>et al.</i> , 2011b	Liquide pleural rt-PCR : n = 145 culture : n = 160	<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>)	51,0 %	7,5 %
Hernandez-Bou <i>et al.</i> , 2009	Liquide pleural rt-PCR : n = 111 culture : n = 134	<i>S. pneumoniae</i> (<i>lytA</i>)	64,9 %	20,2 %
Williams <i>et al.</i> , 2014	Liquide articulaire (n = 68)	<i>K. kingae</i> (<i>rtxA</i>)	39,7 %	2,9 %
Ceroni <i>et al.</i> , 2010	Liquide articulaire rt-PCR : n = 31 culture : n = 41	<i>K. kingae</i> (<i>rtxA</i>)	74,1 %	7,3 %

Sigles et acronymes : LCR : liquide céphalo-rachidien; n : nombre d'échantillons; ND : non disponible; PCR : *Polymerase Chain Reaction*; pg/μl : picogrammes par microlitre; rt-PCR : PCR en temps réel; ufc/ml : unités formant des colonies par millilitre.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Le résultat de l'analyse permet de mieux cibler le traitement. Le demandeur précise que l'antibiothérapie antistaphylocoque (cloxacilline, céfazolin) habituellement donnée en cas d'infection ostéo-articulaire serait remplacée par la pénicilline dans les cas de résultat de PCR positif pour *S. pyogenes* et par l'ampicilline (ou le ceftriaxone) dans les cas de résultat de PCR positif pour *K. kingae*.

À cet égard, Cherkaoui et ses collaborateurs [2009] ont présenté deux cas cliniques qui démontrent comment le diagnostic d'une infection ostéo-articulaire à *K. kingae*, obtenu uniquement par rt-PCR, a contribué à la prise en charge globale de ces cas.

Concernant les cas pédiatriques d'épanchement pleural avec empyème, il semble que l'échec diagnostique de la culture sur liquide pleural corrèle avec la prise antérieure d'antibiotiques au moment de l'admission [Menezes-Martin *et al.*, 2005]. En appui à ce constat, Hernandez-Bou et ses collaborateurs [2009] ont analysé 111 échantillons de liquides pleuraux au moyen d'une culture bactérienne de routine et de la PCR spécifique à *S. pneumoniae* (*lytA*). L'approche moléculaire a permis une augmentation significative de la fréquence diagnostique de 39,7 % lorsque comparée à l'utilisation de la culture seule (64,9 % c. 25,2 %; $P = 0,008$). Cette augmentation variait entre 23,8 % pour les cas sans antibiothérapie préalable à 49,3 % pour les cas déjà traités. Pour les 51 cas avec empyème spécifiquement, chez qui la PCR a été réalisée sur le liquide pleural, le taux de positivité était de 84,3 % [Hernandez-Bou *et al.*, 2009]. L'information clinique pertinente présentée par ces auteurs et d'autres est résumée au tableau 2.

Tableau 2 Exemples de la contribution de la PCR en temps réel au diagnostic moléculaire et à la prise en charge globale d'une infection ostéo-articulaire ou d'un empyème pleural

ÉTUDE	CAS, SEXE, ÂGE	EXAMEN CLINIQUE À L'ADMISSION	IMAGERIE ET AUTRES	CULTURE	RT-PCR	TRAITEMENT
<i>Infections ostéo-articulaires</i>						
Cherkaoui <i>et al.</i> , 2009	F, 2 ans	Douleur locale au pied gauche, sans œdème visible, difficultés à marcher, fièvre	RX, IRM et drainage chirurgical de LA	Négative	<i>rtxA</i> + (<i>Kk</i>)	Céfuroxime i.v. Céfuroxime axétil p.o.
	M, 23 mois	Douleur locale au coude droit, avec œdème visible, mouvements restreints, fièvre	RX, IRM, drainage de LA, arthrotomie	Négative	<i>rtxA</i> + (<i>Kk</i>)	Céfuroxime/amoxicilline i.v. Amoxicilline p.o.
Ceroni <i>et al.</i> , 2010	43 cas M (56 %) 18,4 mois	Douleur locale, enflure et mouvements restreints, fièvre	RX et IRM	14,6 % (6/43) <i>Spn</i> (4), <i>Spy</i> (1), <i>Kk</i> (1)	<i>rtxA</i> + (<i>Kk</i>) 74,1 % (23/31)	Régime i.v. empirique Céfuroxime/ampicilline p.o.
Ceroni <i>et al.</i> , 2014	14 cas M (21 %) 27,8 mois	Fièvre à l'admission 14 %, œdème 7 %, mouvements restreints 100 %	RX, IRM et drainage de LA	7 % (1/14) SARM	<i>rtxA</i> + (<i>Kk</i>) 89 % (8/9)	Céfuroxime i.v. et p.o. Aucune complication après suivi moyen de 34 mois
<i>Pneumonie avec empyème pleural</i>						
Poulter <i>et al.</i> , 2005	F, 4 ans	Fièvre 1 semaine pic 39,5 °C, difficulté respiratoire, hépato splénomégalie	RX, tomographie, drainage de LP, thoracentèse	Négative	<i>lytA</i> + (<i>Spn</i>)	Céfotaxime/vancomycine i.v., congé hospitalier 12 jours après admission
Hernandez-Bou <i>et al.</i> , 2009	190 cas M (53 %) 4,8 ans	Antibiothérapie préalable 57 %, difficulté respiratoire 63 %	Drainage LP et thoracentèse	22 % (30/134) <i>Spn</i> (25), <i>Spy</i> (3), autres (2)	<i>lytA</i> + (<i>Spn</i>) 65 % (72/111)	Régime empirique i.v. Céfotaxime (50 %), amoxicilline/clavulanate (38 %), ampicilline p.o. Résorption des symptômes pour tous les cas

Sigles et acronymes : F : féminin; IRM : imagerie par résonance magnétique; i.v. : intraveineux; *Kk* : *Kingella kingae*; LA : liquide articulaire; LP : liquide pleural; M : masculin; p.o. : *per os* (par voie orale); RX : radiographie; SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline; *Spn* : *Streptococcus pneumoniae*; *Spy* : *Streptococcus pyogenes*.

5.2 Validité analytique (ou technique)

Aucune limite de détection n'a été présentée par le demandeur.

Pernica et ses collaborateurs [2014] rapportent une **limite de détection** de 10 bactéries pour *S. pneumoniae* et de 100 bactéries pour *S. pyogenes*.

Picazo et ses collègues [2013] ont établi la **limite de détection** de *S. pneumoniae* à 0,4 pg/μl.

Strachan et ses collaborateurs [2011a] ont utilisé une PCR avec une sonde TaqMan® qui ciblait *lytA* dans des échantillons de liquides pleuraux prélevés sur des enfants. Ils rapportent une **limite de détection** de *S. pneumoniae* de 6 ufc/ml³⁰.

Haldar et ses collaborateurs [2014] ont développé une PCR en temps réel afin de détecter des bactéries, dont *K. kingae*, dans du liquide articulaire. Ils ont ainsi obtenu une **limite de détection** de 56 femtogrammes d'ADN de *K. kingae* et une **limite de détection** de $1,5 \times 10^4$ ufc/ml pour *rtxA*.

Strachan et ses collaborateurs [2011a] rapportent que la PCR qu'ils ont utilisée est **spécifique** à *S. pneumoniae*.

Rappelons d'une part que Lehours et ses collaborateurs [2011] mentionnent que leur PCR uniplexe en temps réel, qu'ils ont effectuée avec des sondes TaqMan® et qui avait pour cible la séquence *rtxA* de *K. kingae*, est **spécifique** et hautement **sensible**. D'autre part, Gillespie et Oliver [2005] affirment que la PCR multiplexe en temps réel, qu'ils ont effectuée avec des sondes TaqMan® et qui avait notamment pour cible la séquence *cfb* de *S. agalactiae*, est **spécifique** à 99,6 % et **sensible** à 95,5 %.

5.3 Recommandations d'autres organismes

Selon les lignes directrices conjointes de la Pediatric Infectious Diseases Society (PIDS) et de l'Infectious Diseases Society of America (IDSA), qui portent sur la prise en charge de la pneumonie contractée dans la communauté chez les enfants de plus de 3 mois, il est fortement recommandé que les liquides pleuraux soient analysés à l'aide de la coloration de Gram et de la culture bactérienne (forte recommandation avec une preuve de haute qualité). De plus, l'analyse des antigènes ou l'amplification des acides nucléiques par la PCR augmentent la détection des pathogènes dans ces liquides, et ces méthodes peuvent être utiles pour la prise en charge (forte recommandation avec une preuve de qualité moyenne) [Bradley *et al.*, 2011]. Aucune recommandation n'a été trouvée concernant les méthodes à utiliser pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires.

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

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

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

N'ont pas été analysées.

³⁰ ufc/ml : unités formant des colonies/millilitre.

- 6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)**
N'ont pas été analysés.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

La PCR permettrait d'ajuster l'antibiothérapie en fonction des bactéries qu'elle détecterait. Ainsi, de l'avis du demandeur, la PCR permettrait le passage d'un traitement intraveineux à un traitement oral, évitant ainsi des effets indésirables au patient, sans compter que la rapidité de la détection par PCR pourrait diminuer le risque de séquelles.

7.2 Validité clinique

La PCR détecte les bactéries dans une plus grande proportion d'échantillons que la culture.

7.3 Validité analytique

Les rares données disponibles montrent que la PCR est sensible et spécifique.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Selon les lignes directrices conjointes de la PIDS et de l'IDSA, l'amplification des acides nucléiques par la PCR augmente la détection des pathogènes dans les liquides pleuraux et cette méthode peut être utile pour la prise en charge de patients (forte recommandation).

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Détection de *K. kingae*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* par technique d'amplification des acides nucléiques dans un liquide articulaire ou pleural

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 d'introduction (voir commentaires additionnels)
- Avis de refus d'introduction
- Avis de réévaluation

COMMENTAIRES ADDITIONNELS

L'analyse proposée concerne presque exclusivement une population pédiatrique et elle répond à un besoin actuellement non couvert par le *Répertoire*. Le comité reconnaît la pertinence de cette analyse au regard du contexte particulier, des données cliniques publiées et des recommandations d'autres organismes.

Toutefois, les données de validité analytique fournies par le demandeur ont été jugées fragmentaires et incomplètes. Les membres du comité reconnaissent néanmoins qu'en raison d'une faible incidence ainsi que du volume limité de spécimens (liquide articulaire et pleural prélevé chez des enfants) disponible dans ce type d'infection, l'obtention d'un échantillon de grande taille pour effectuer des comparaisons entre différentes analyses représente, dans ce cas-ci, un défi majeur. Le comité recommande donc au centre demandeur de poursuivre la comparaison PCR/culture et la collecte de données. La participation à un programme externe d'échange de spécimens est également encouragée par le comité afin d'assurer le maintien de la qualité.

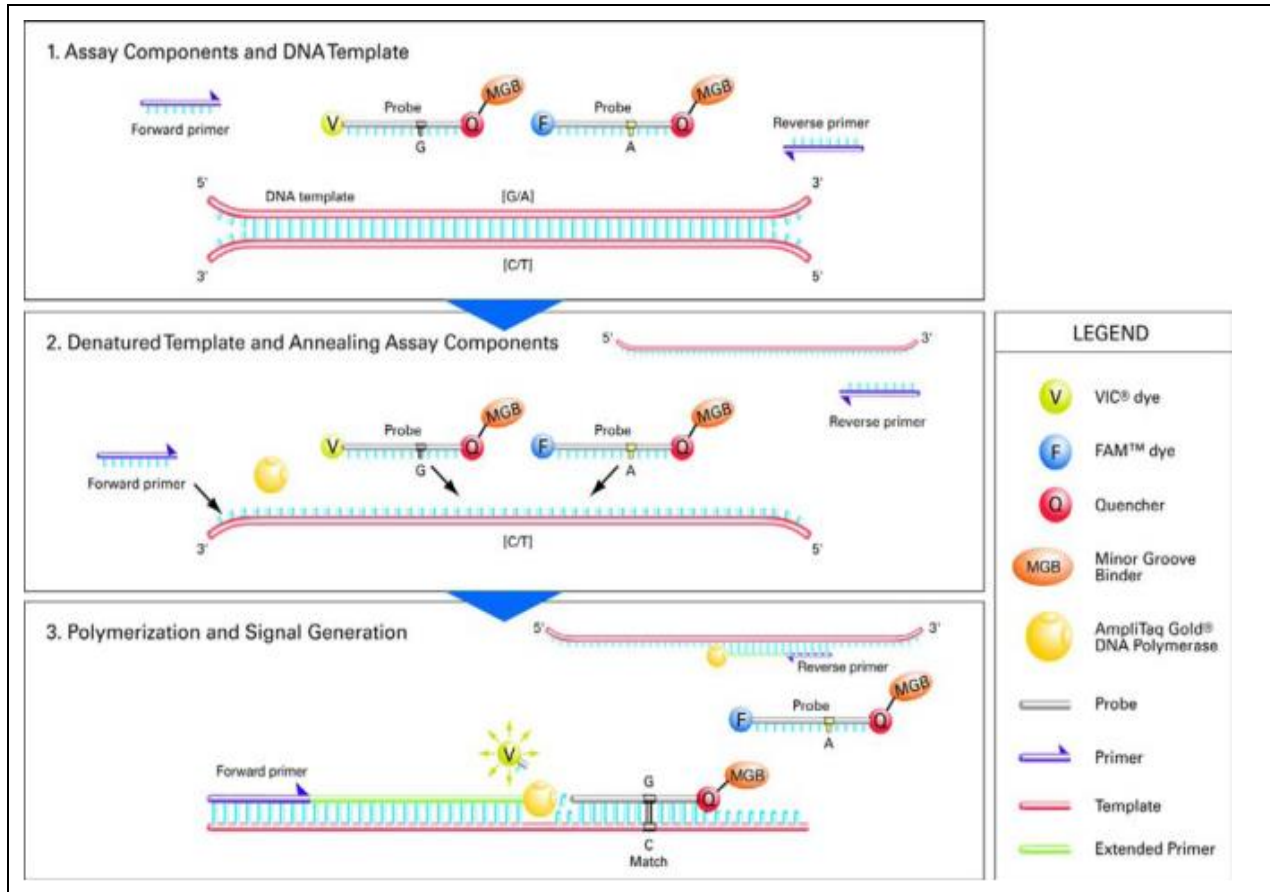
RÉFÉRENCES

- Basmaci R, Bidet P, Bonacorsi S. *Kingella kingae*, premier germe des infections ostéo-articulaires de l'enfant. *Feuillets de Biologie* 2013;(315):15-23.
- Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;53(7):e25-76.
- Ceroni D, Belaieff W, Cherkaoui A, Lascombes P, Schrenzel J, de Coulon G, et al. Primary epiphyseal or apophyseal subacute osteomyelitis in the pediatric population: A report of fourteen cases and a systematic review of the literature. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(18):1570-5.
- Ceroni D, Cherkaoui A, Ferey S, Kaelin A, Schrenzel J. *Kingella kingae* osteoarticular infections in young children: Clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis. *J Pediatr Orthop* 2010;30(3):301-4.
- Cherkaoui A, Ceroni D, Emonet S, Lefevre Y, Schrenzel J. Molecular diagnosis of *Kingella kingae* osteoarticular infections by specific real-time PCR assay. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 1):65-8.
- Deceuninck G, Quach C, Panagopoulos M, Thibeault R, Côté-Boileau T, Tapiéro B, et al. Pediatric pleural empyema in the province of Quebec: Analysis of a 10-fold increase between 1990 and 2007. *J Ped Infect Dis* 2014;3(2):119-26.
- Dodwell ER. Osteomyelitis and septic arthritis in children: Current concepts. *Curr Opin Pediatr* 2013;25(1):58-63.
- Dubnov-Raz G, Ephros M, Garty BZ, Schlesinger Y, Maayan-Metzger A, Hasson J, et al. Invasive pediatric *Kingella kingae* Infections: A nationwide collaborative study. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29(7):639-43.
- Gillespie BE et Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 2005;88(10):3510-8.
- Haldar M, Butler M, Quinn CD, Stratton CW, Tang YW, Burnham CA. Evaluation of a real-time PCR assay for simultaneous detection of *Kingella kingae* and *Staphylococcus aureus* from synovial fluid in suspected septic arthritis. *Ann Lab Med* 2014;34(4):313-6.
- Hernandez-Bou S, Garcia-Garcia JJ, Esteva C, Gené A, Luaces C, Muñoz Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: Epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatr Pulmonol* 2009;44(12):1192-200.
- Lehours P, Freydière A-M, Richer O, Burucoa C, Boisset S, Lanotte P, et al. The rtxA toxin gene of *Kingella kingae*: A pertinent target for molecular diagnosis of osteoarticular infections. *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1245-50.
- Lorrot M, Doit C, Ilharreborde B, Vitoux C, Le Henaff L, Sebag G, et al. Antibiothérapie des infections ostéo-articulaires de l'enfant : ce qui a changé. *Arch Pediatr* 2011;18(9):1016-8.

- Menezes-Martins LF, Menezes-Martins JJ, Michaelsen VS, Aguiar BB, Ermel T, Machado DC. Diagnosis of parapneumonic pleural effusion by polymerase chain reaction in children. *J Pediatr Surg* 2005;40(7):1106-10.
- Moumile K, Merckx J, Glorion C, Pouliquen JC, Berche P, Ferroni A. Bacterial aetiology of acute osteoarticular infections in children. *Acta Paediatr* 2005;94(4):419-22.
- Pernica JM, Moldovan I, Chan F, Slinger R. Real-time polymerase chain reaction for microbiological diagnosis of parapneumonic effusions in Canadian children. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2014;25(3):151-4.
- Picazo JJ, Contreras JR, Rios E, Culebras E, Rodriguez-Avial I, Mendez C, Betriu C. Rapid diagnosis of invasive pneumococcal disease in pediatric population. *J Microbiol Methods* 2013;93(2):116-20.
- Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, Bendridi N, Mazzocchi C, Bellon G, Vandenesch F. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: Rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54(8-9):498-501.
- Poulter MD, Deville JG, Cherry JD, Shapiro AM, McAvin JC. Real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) identification of *Streptococcus pneumoniae* from pleural fluid and tissue. *Scand J Infect Dis* 2005;37(5):391-2.
- Roblot F, Salmon F, Le Breton C, Rottmann M. Moyens diagnostiques des infections ostéo-articulaires. *Rev Prat* 2007;57(9):947-57.
- Roxburgh CS et Youngson GG. Childhood empyema in North-East Scotland over the past 15 years. *Scott Med J* 2007;52(4):25-7.
- Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, Gulliver T, Martin A, McDonald T, et al. A bedside assay to detect *Streptococcus pneumoniae* in children with empyema. *Pediatr Pulmonol* 2011a;46(2):179-83.
- Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, Gulliver T, Martin A, McDonald T, et al. Bacterial causes of empyema in children, Australia, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011b;17(10):1839-45.
- Tazi A, Morand PC, Réglie-Poupet H, Dmytruk N, Billoët A, Antona D, et al. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). *Clin Microbiol Infect* 2011;17(10):1587-9.
- Williams N, Cooper C, Cundy P. *Kingella kingae* septic arthritis in children: Recognising an elusive pathogen. *J Child Orthop* 2014;8(1):91-5.

ANNEXE A

Essai TaqMan®



© 2015 Thermo Fisher Scientific, Inc. Utilisé sous autorisation.

Tiré de Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping assays. Product Bulletin. 2011. Disponible à : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

DÉPISTAGE PRÉNATAL DES STREPTOCOQUES DE GROUPE A ET B PAR TECHNIQUE D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES (RÉFÉRENCE – 2014.03.13)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine

1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 30 juillet 2015

1.3 Date de publication de l'avis : 30 septembre 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur 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

2.1 Nom de la technologie

Détection simultanée des streptocoques de groupe A (SGA-*Streptococcus pyogenes*) et B (SGB-*Streptococcus agalactiae*) sur un spécimen vagino-rectal par une technique d'amplification des acides nucléiques (TAAN) en temps réel.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

L'analyse proposée permet le dépistage prénatal des SGA et SGB présents dans la flore vagino-rectale des femmes enceintes entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse. Actuellement, seul *S. agalactiae* (SGB) fait l'objet d'un dépistage prénatal.

Les prélèvements sont incubés de 8 à 24 heures dans un bouillon d'enrichissement sélectif LIM³¹. Une portion du bouillon est utilisée pour l'analyse moléculaire multiplexe.

La technologie employée est une réaction en chaîne par polymérase [*Polymerase Chain Reaction* (PCR)] en temps réel exécutée avec un mélange de sondes TaqMan[®]. Chacune de ces sondes est spécifique à une séquence d'ADN de l'une des deux bactéries recherchées³². Les sondes TaqMan[®] sont liées à un agent fluorescent et à un agent inhibiteur de fluorescence (*quencher*). Lors de l'amplification de l'ADN, si la polymérase rencontre une sonde TaqMan[®] parfaitement hybridée en aval, celle-ci est hydrolysée. À ce moment, le fluorophore de la sonde hydrolysée n'est plus masqué et la fluorescence émise est mesurée au moyen d'un appareil LightCycler 480 de Roche. Le mélange réactionnel contient également un contrôle interne d'amplification.

31 Bouillon de base Todd Hewitt supplémenté de colistine et d'acide nalidixique.

32 Le gène *cfb* qui code pour le facteur CAMP (*Christie-Atkins Munch-Peterson*) se trouve dans l'ADN de *S. agalactiae* et la séquence *spy* désigne le cadre de lecture ouvert SPy1258 identifié par le séquençage complet du génome de *S. pyogenes* M1 SF370 et dont la fonction probable est de réguler la transcription.

2.3 Société ou développeur

Le protocole est fourni par le demandeur qui a adapté la technique de PCR classique basée sur le gène *cfb* qu'il avait déjà validée [Rallu *et al.*, 2006]. Il est également précisé dans la demande que la séquence d'ADN bactérien *spy* est une cible qui a été validée et qui est recommandée par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC)³³.

2.4 **Licence** : ne s'applique pas.

2.5 **Brevet, le cas échéant** : ne s'applique pas.

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

2.7 **Valeur pondérée** : 9,31.

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

3.1 Patientes ciblées

Les Québécoises enceintes constituent la clientèle cible. Au Québec, les femmes enceintes font systématiquement l'objet d'un dépistage pour *S. agalactiae* entre les semaines 35 et 37, à l'occasion d'un rendez-vous de suivi de la grossesse.

3.2 Description de la maladie visée

Streptococcus pyogenes et *Streptococcus agalactiae*, communément appelés streptocoques β -hémolytiques de groupe A et B selon la classification de Lancefield, sont des bactéries à Gram positif qui ont toutes deux un pouvoir pathogène important chez l'humain.

SGB : *S. agalactiae*

S. agalactiae peut causer une maladie invasive chez l'enfant, chez la femme enceinte ante partum et post partum ainsi que chez les personnes âgées [Phares *et al.*, 2008]. Chez le nouveau-né, le streptocoque engendre le plus souvent une bactériémie, une pneumonie ou une méningite. Lorsqu'un nouveau-né développe l'infection, on la qualifie de précoce si elle survient à l'intérieur des 6 premiers jours suivant la naissance et de tardive si elle se déclare entre 7 et 89 jours suivant la naissance. La mortalité liée à l'infection précoce par *S. agalactiae* est de 4 % à 7 % (2 % à 3 % chez les nouveau-nés à terme et 20 % chez les prématurés) [Phares *et al.*, 2008].

Le *S. agalactiae* colonise la flore vaginale ou rectale chez environ 20 % (10 % à 30 %) des femmes enceintes [Regan *et al.*, 1991]. La colonisation présente au moment de l'accouchement est le principal facteur de risque pour le nouveau-né de développer une infection précoce à *S. agalactiae*. Ce risque est 25 fois plus élevé lorsque *S. agalactiae* est présent dans la flore vagino-rectale de la femme enceinte [Boyer et Gotoff, 1985]. À défaut d'une intervention préventive, on estime que la proportion d'enfants nés d'une mère ayant répondu positivement au test et qui développent une infection précoce à *S. agalactiae* se situe entre 1 % et 2 % [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996]. Une antibioprophylaxie perinatale permet de prévenir 86 % des cas d'infection précoce par le *S. agalactiae* chez le nouveau-né [Lin *et al.*, 2001].

³³ Information tirée du document « Real-time PCR targets for Streptococcus species detection and antibiotic susceptibility in SPN » du CDC et disponible à : <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-realtime-target.pdf> (consulté le 13 mai 2015).

SGA : *S. pyogenes*³⁴

Cette bactérie est responsable d'un grand nombre d'infections. Elle peut causer l'angine streptococcique caractérisée par de la fièvre, une hypertrophie des amygdales, un exsudat amygdalien, une sensibilité des ganglions lymphatiques cervicaux et une sensation de malaise. La scarlatine (éruption de coloration rose ou rouge et fièvre), l'impétigo (infection des couches superficielles de la peau) et la pneumonie sont également causés par cette bactérie. Bien que cela soit plus rare, *S. pyogenes* peut également causer une septicémie, une otite moyenne, une mastite, une cellulite, un érysipèle, une myosite, une ostéomyélite, une arthrite septique, une méningite, une endocardite, une péricardite ou des infections néonatales. Certaines des complications graves associées aux infections à *S. pyogenes* comprennent le syndrome de choc toxique streptococcique, la fièvre rhumatismale aiguë (inflammation des articulations, cardite et complications du système nerveux central), la glomérulonéphrite post-streptococcique (inflammation, hématurie, fièvre, œdème, hypertension, anomalies du sédiment urinaire et douleurs rénales intenses) et la fasciite nécrosante (infection rapide et progressive du tissu sous-cutané, inflammation massive générale, bulles hémorragiques, crépitation et destruction tissulaire).

3.3 Nombre de patients visés

Le CHU Sainte-Justine a effectué 3 176 dépistages de *S. agalactiae* en 2012 et 2 902 en 2013. Le dépistage de *S. agalactiae* prénatal représente 97 000 analyses par année au Québec³⁵.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Obstétrique, néonatalité, infectiologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Un écouvillon est utilisé pour prélever un spécimen de sécrétion d'abord au niveau vaginal, puis au niveau rectal (vagino-rectal). Le spécimen est transféré dans un bouillon d'enrichissement et il est incubé pendant 8 à 24 heures. Ensuite, une fraction est analysée par qPCR multiplexe.

Il s'agit d'une analyse effectuée chaque jour (ouvrable) avec un temps de réponse de 24 à 72 heures.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Le test proposé est unique quant à la recherche du *S. pyogenes* chez la femme enceinte. Le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* présente une analyse nommée « Streptocoque du groupe A (Détection d'antigène) (Test rapide sur spécimen clinique) » (code 40268). Toutefois, celle-ci est prévue pour la détection du *S. pyogenes* dans des spécimens de la gorge.

³⁴ Agence de santé publique du Canada. Streptococcus pyogenes [site Web]. Disponible à : <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/strep-pyogenes-fra.php>.

³⁵ Cumul des analyses 40269 et 40270 effectuées au Québec en 2013-2014. Données fournies par madame Johanne Nicole du ministère de la Santé et des Services sociaux.

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

L'étalon-or pour le dépistage du *Streptococcus agalactiae* chez la femme enceinte est la culture précédée d'un enrichissement sur un spécimen vagino-rectal prélevé entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse. Le spécimen est mis en culture dans un bouillon sélectif. À partir du bouillon, le CDC recommande quatre méthodes différentes pour continuer l'analyse : la culture sur milieu solide, l'agglutination au latex, l'hybridation d'ADN ou l'amplification des acides nucléiques [Verani *et al.*, 2010].

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

Selon le demandeur, la sensibilité supérieure de la PCR permettra d'offrir l'antibioprophylaxie à un plus grand nombre de femmes enceintes pendant l'accouchement. Ainsi, une réduction du nombre d'infection néonatale précoce à *S. agalactiae* pourrait être anticipée.

L'ajout du dépistage prénatal systématique de *S. pyogenes* pourrait également diminuer le nombre d'infections invasives post partum causées par cette bactérie présente chez la mère.

L'analyse proposée représente une économie comparativement à la méthode d'agglutination au latex actuellement employée (valeurs pondérées : 9,31 unités c. 10,2 unités) et elle inclut le dépistage du *S. pyogenes* dont la contribution à la valeur pondérée est établie à 0,45.

4.4 Coût de la technologie et des options : n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test

Pour l'établissement demandeur, le test proposé remplacerait la technique d'agglutination au latex sur bouillon de culture (code du Répertoire : 40270). La culture (code du Répertoire : 40269) est utilisée pour déterminer la sensibilité du *S. agalactiae* aux antibiotiques dans les cas d'allergie à la pénicilline.

5.1.2 Valeur diagnostique ou pronostique

S. pyogenes

L'information repérée dans la littérature indique qu'un dépistage vagino-rectal du *S. pyogenes* a peu de valeur pour la prévention de l'infection invasive post partum à *S. pyogenes*. À cet égard, Mead et Winn ont démontré par culture du *S. pyogenes* un taux de colonisation de 0,03 % (2 patientes) chez un groupe de 6 944 femmes enceintes qui avaient subi un dépistage entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse. Les deux femmes ont reçu une antibioprofylaxie perinatale standard à la pénicilline. Aucune des mères et aucun des nouveau-nés n'a développé d'infection. Selon les auteurs, le faible taux de colonisation par *S. pyogenes* observé dans cette étude est un argument en défaveur de l'instauration d'un dépistage systématique du *S. pyogenes* chez la femme enceinte [Mead et Winn, 2000].

Saab et ses collaborateurs ont réalisé une étude qui a également vérifié si la colonisation par le *S. pyogenes* chez les femmes enceintes pouvait être responsable de l'augmentation des cas

de fièvre puerpérale observée dans trois hôpitaux australiens. Les résultats ont démontré une colonisation à *S. pyogenes* chez 0,06 % des femmes enceintes (une patiente sur 1 600).

L'auteur conclut qu'une telle prévalence n'est pas suffisante pour recommander l'implantation d'un dépistage prénatal de routine du *S. pyogenes* et qu'il est improbable que la colonisation vaginale soit la cause des cas de fièvre puerpérale observés [Saab *et al.*, 2012].

La prévalence du *S. pyogenes* dépisté chez les femmes enceintes au CHU Sainte-Justine est de 0,03 % depuis l'instauration de la méthode PCR sur bouillon d'enrichissement sélectif le 25 février 2014, soit 1 spécimen positif sur 3 845. Une sous-culture du bouillon a également permis la mise en évidence du SGA³⁶.

Tableau 1 Fréquence de la colonisation à *S. pyogenes* observée au dépistage vagino-rectal entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse

ÉTUDE	DURÉE	MÉTHODE D'IDENTIFICATION	SPÉCIMEN	FRÉQUENCE DE COLONISATION
Saab <i>et al.</i> , 2012 (Australie)	0,5 an	Culture et agglutination	1 600	0,06 % (1)
Mead et Winn, 2000 (États-Unis)	3 ans	Culture et agglutination	6 944	0,03 % (2)
CHU Sainte Justine	Depuis fév. 2014	Culture et TAAN <i>spy</i>	3 845	0,03 % (1)

S. agalactiae

L'instauration du dépistage chez les femmes enceintes et du traitement antibiotique pernatal dans les années 1990 a permis de réduire le nombre d'infections néonatales précoces à *S. agalactiae* de 1,7 à 0,34 cas par 1 000 naissances aux États-Unis [Verani *et al.*, 2010].

Une étude évaluant le dépistage prénatal universel du *S. agalactiae* a compilé les données de surveillance provenant de 10 États américains entre 2003 et 2004. Parmi les 189 enfants nés à terme qui ont contracté une infection à *S. agalactiae*, 61,4 % sont nés d'une mère chez qui le dépistage prénatal entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse était négatif [Van Dyke *et al.*, 2009]. L'une des raisons avancées par les auteurs afin d'expliquer cette proportion de faux négatifs est le caractère transitoire de la colonisation par le *S. agalactiae* chez la femme enceinte.

Il a également été démontré que la présence du *S. agalactiae* cultivable entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse prédit sa présence au moment de l'accouchement dans 87 % des cas [Yancey *et al.*, 1996].

³⁶ Communication électronique avec monsieur Fabien Rallu, Ph. D., Département de microbiologie du CHU Sainte-Justine, le 6 mai 2015.

Depuis l'instauration du test par TAAN *cfb* au CHU Sainte-Justine le 25 février 2014, 3 845 spécimens ont été testés par cette méthode (en date du 6 mai 2015). Parmi ceux-ci, 735 spécimens étaient positifs pour *S. agalactiae*. La prévalence ainsi obtenue est de 19,1 %³⁷.

5.1.3 Valeur thérapeutique

Comme prévu avec la méthode actuelle, un résultat positif de colonisation vagino-rectale par *S. agalactiae* est une indication d'antibioprophylaxie périnatale. Concernant l'éventualité d'un résultat positif de colonisation par *S. pyogenes*, le demandeur mentionne l'importance de pouvoir alerter les cliniciens à propos de la présence d'un SGA pour ainsi favoriser un traitement optimal rapide en cas d'infection post partum.

5.2 Validité clinique

***Streptococcus agalactiae* TAAN *cfb* comparativement à l'agglutination au latex entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse**

Rallu et ses collaborateurs ont évalué les performances diagnostiques de la culture, de l'agglutination au latex et du TAAN *cfb* sur 605 prélèvements. Tous les échantillons positifs en culture (n = 96) l'étaient également avec le test au latex et le test moléculaire. L'utilisation de l'agglutination au latex et du TAAN *cfb* directement sur le bouillon d'enrichissement LIM a permis de mettre en évidence 132 et 171 cas positifs, respectivement. Deux cas positifs avec le test au latex se sont révélés négatifs avec le TAAN *cfb*. Selon les critères employés pour définir un cas vrai positif, les performances diagnostiques varient (tableau 2). Ainsi, comparativement à l'agglutination au latex ou à la culture, la PCR *cfb* confère une augmentation de sensibilité de 24 % et de 44 %, respectivement, et ce, en conservant une spécificité supérieure à 99,5 % [Rallu *et al.*, 2006].

L'étude de Konikkara et ses collaborateurs a été réalisée dans des conditions semblables à celle de Rallu et ses collaborateurs [Konikkara *et al.*, 2014]. Parmi les 50 échantillons évalués, les taux de positivité de la culture, de l'agglutination au latex et du TAAN *cfb* étaient de 16 %, 22 % et 62 %, respectivement (tableau 2). Tous les échantillons positifs en culture l'étaient également avec les deux autres méthodes. Aucun échantillon positif avec le test au latex n'était négatif avec le TAAN *cfb*. Les auteurs ont considéré la culture comme étalon-or, entraînant ainsi une réduction importante de la spécificité (45,2 %) et de la valeur prédictive positive (VPP) (25,8 %) de la PCR *cfb*, et ce, en conservant une sensibilité et une valeur prédictive négative (VPN) de 100 %. L'écart entre la fréquence de positivité avec le TAAN (62 %) et les autres méthodes contribue également à accentuer cette différence de spécificité. Les auteurs ne donnent d'ailleurs aucune information pour expliquer ce taux de détection élevé. En appliquant le raisonnement de Rallu et ses collaborateurs aux données de Konikkara et ses collaborateurs, c'est-à-dire en utilisant les données moléculaires comme étalon-or, le scénario inverse se présente également : la sensibilité et la VPN de la culture chutent à 26 % et à 45 %, respectivement, alors que la spécificité et la VPP demeurent à 100 %.

Avant l'instauration du dépistage du *S. agalactiae* par qPCR multiplex, le laboratoire du CHU Sainte-Justine utilisait l'agglutination sur bouillon de culture. Une comparaison entre cette méthode et le TAAN *cfb* multiplex a donc été réalisée par le demandeur (tableau 2). Des données concernant 263 spécimens évalués avec les deux tests ont été fournies.

³⁷ *Id.*

Comparativement à la méthode au latex, une augmentation de 6,8 % de la fréquence de tests positifs chez les femmes testées pour le SGB a été constatée en employant la méthode moléculaire (24,7 % c. 17,9 %; $p < 0,0001^{38}$). Considérant que 46 et 197 échantillons étaient respectivement positifs et négatifs pour les deux tests et qu'un spécimen était négatif en TAAN et positif en agglutination au latex, les performances diagnostiques ont été calculées et les résultats obtenus sont comparables à ceux publiés en 2006 par le demandeur [Rallu *et al.*, 2006].

Tableau 2 Performances diagnostiques de la culture, de l'agglutination au latex et du TAAN *cfb* relativement au dépistage vagino-rectal du *S. agalactiae* entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse

ÉTUDE	ÉCHANTILLON VR, AP (N)	MÉTHODE		PERFORMANCE (%)					COMPARATEUR
		LIM	CONFIRMATION	FP	SN	SP	VPP	VPN	
Rallu <i>et al.</i> , 2006	605	18 h	Latex	21,8	100	92,9	72,7	100	Culture N = 96
			TAAN <i>cfb</i>	28,3	100	84,9	56,1	100	
			Culture	15,9	72,7	100	100	92,9	Latex N = 132
			TAAN <i>cfb</i>	28,3	98,5	91,3	76,0	99,5	
			Culture	15,9	56,1	100	100	85,3	TAAN <i>cfb</i> N = 171
			Latex	21,8	76,0	99,5	98,5	91,3	
Konikkara <i>et al.</i> , 2014	50	24 h	Latex	22	100	92,9	72,7	100	Culture N = 8
			TAAN <i>cfb</i>	62	100	45,2	25,8	100	
			Culture	16	72,7	100	100	92,9	Latex N = 11
			TAAN <i>cfb</i>	62	100	48,7	35,5	100	
			Culture	16	25,8	100	100	45,2	TAAN <i>cfb</i> N = 31
			Latex	22	35,5	100	100	48,7	
CHU Sainte- Justine	263	18 h	Latex	17,9	70,8	99,5	97,9	91,2	TAAN <i>cfb</i> N = 65
			TAAN <i>cfb</i>	24,7	97,9	91,2	70,8	99,5	Latex N = 47

Sigles et acronymes : AP : *ante partum*; FP : fréquence de positivité; h : heure; N : nombre; SN : sensibilité; SP : spécificité; TAAN : technique d'amplification des acides nucléiques; VPN : valeur prédictive négative; VPP : valeur prédictive positive; VR : vagino-rectal.

D'autres études ayant fourni des données relatives à la performance clinique de l'utilisation d'une méthode PCR suivant un enrichissement pour la détection prénatale du *S. agalactiae* dans la flore vagino-rectale ont été repérées. Ces études sont résumées au tableau 3.

³⁸ Selon le test McNemar réalisé par l'INESSS au moyen de SAS, version 9.2 (21 mai 2015).

Tableau 3 Performance diagnostique de la culture et du TAAN *cfb* relativement au dépistage vagino-rectal du *S. agalactiae* entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse

ÉTUDE	ÉCHANTILLON VR, AP (N)	MÉTHODE		PERFORMANCE (%)				
		LIM	CONFIRMATION	FP	SN	SP	VPP	VPN
Goodrich et Miller, 2007	200	4 h	Culture	26,5	Comparateur			
			BD GeneOhm	30,0	92,5	92,5	81,7	97,1
Scicchitano et Bourbeau, 2009	498	18 h	Culture	28,3	Comparateur			
			BD GeneOhm	28,9	96,5	97,8	94,4	98,6
Jordan <i>et al.</i> , 2010	306	18-24 h	Culture	24,5	Comparateur			
			Smart GBS	31,4	98,8	90,4	77,1	99,5
Riedlinger <i>et al.</i> , 2010	601	18-24 h	Culture	23,3	Comparateur			
			BD Max GBS	24,6	95,0	96,7	88,3	98,1
El Aila <i>et al.</i> , 2011	100	18 h	Culture	22	Comparateur			
			Maison <i>cfb</i> ou <i>sip</i>	33*	95,4	84,6	63,6	98,5
Schwartz <i>et al.</i> , 2012	270	18-24 h	Culture	19,3	Comparateur			
			BD Max GBS	20,7	100	98,2	92,8	100
Couturier <i>et al.</i> , 2014	314	18-24 h	Culture	15,2	Comparateur			
			BD Max GBS	22,9	100	90,9	66,7	100
			BD GeneOhm	22,9	100	90,9	66,7	100
Buchan <i>et al.</i> , 2015	826	16-24 h	Culture	23,1	Comparateur			
			Xpert GBS	28,7	99,0	92,4	79,8	99,7
			Smart GBS	26,1	96,8	95,5	86,8	99,0

Sigles et acronymes : AP : *ante partum*; FP : fréquence de positivité; h : heure; N : nombre; SN : sensibilité; SP : spécificité; TAAN : technique d'amplification des acides nucléiques; VPN : valeur prédictive négative; VPP : valeur prédictive positive; VR : vagino-rectal.

Globalement, l'usage du bouillon d'enrichissement sélectif LIM avant l'étalement sur milieu solide permet de mettre en évidence la colonisation vagino-rectale par le SGB chez 15,2 % à 28,3 % des femmes enceintes qui ont subi le dépistage entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse. Tous les protocoles de culture incluaient l'étalement d'une aliquote du bouillon enrichi sur géloses au sang, sauf celui d'El Aila et ses collaborateurs [2011] qui utilisait un milieu chromogénique.

Selon les études retenues, l'usage du TAAN *cfb* a permis de mettre en évidence une colonisation vagino-rectale par le SGB dans une proportion variant entre 20,7 % et 33 % de femmes enceintes qui ont subi le test entre la 35^e et la 37^e semaine de grossesse. L'augmentation absolue des fréquences de positivité entre la culture et le TAAN *cfb* varie entre 0,6 % et 11 %. Toutefois, l'étude d'El Aila et ses collaborateurs a combiné les résultats moléculaires obtenus pour les cibles *cfb* et *sip* [El Aila *et al.*, 2011].

Streptococcus pyogenes

Aucune publication n'a été repérée concernant la validité clinique d'une méthode PCR pour le dépistage du *S. pyogenes* sur des spécimens vaginaux ou vagino-rectaux.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Streptococcus pyogenes

Aucune publication concernant la validité analytique d'une méthode PCR pour le dépistage du *S. pyogenes* par PCR sur des spécimens vaginaux ou vagino-rectaux n'a été repérée.

Streptococcus agalactiae

Parmi les études consultées, quelques-unes ont présenté des données concernant la limite de détection. En raison des divergences constatées entre les diverses méthodes existantes et compte tenu des unités de mesure utilisées, il est difficile de comparer ces études entre elles par rapport à la sensibilité analytique (tableau 4).

Tableau 4 Seuils de détection du *S. agalactiae* établis pour différentes méthodes PCR

ÉTUDE	MÉTHODE TAAN CFB	LLD	PRÉCISION INTRAESSAIS	PRÉCISION INTERESSAIS	RÉACTIVITÉ CROISÉE
Park <i>et al.</i> , 2013*	Xpert GBS	270 ufc/rxn	6 répétitions/essai 100 % positifs Ct : 38,3 ± 1,6 CV = 4,2 %	6 jours différents 100 % positifs Ct : 38,6 ± 0,9 CV = 2,2 %	Non (19 espèces)
Goodrich et Miller, 2007	BD GeneOhm	18 000 ufc/ml 1,4 ufc/rxn	5 répétitions/essai 100 % positifs Valeurs Ct impossibles à calculer	5 jours différents 100 % positifs Valeurs Ct impossibles à calculer	Non (12 espèces)
El Aila <i>et al.</i> , 2011	Maison	100 génomes/rxn	s. o.	s. o.	s. o.
Riedlinger <i>et al.</i> , 2010	BD Max GBS	200 ufc/ml	s. o.	s. o.	Non (119 espèces)
CHU Sainte-Justine	Maison	100 ufc/rxn	s. o.	s. o.	Non (6 espèces)

Sigles et acronymes : Ct : *threshold cycle* (nombre de cycles PCR requis pour produire un résultat positif); CV : coefficient de variation; LLD : limite de détection (*lower limit of detection*); ufc : unités formant des colonies; rxn : réaction; s. o. : sans objet.

* Bien que Park et ses collaborateurs aient présenté des données de performances cliniques pour le test Xpert GBS, celles-ci ne sont pas présentées au tableau 3, car ce test n'a pas été réalisé sur un prélèvement d'abord enrichi en bouillon sélectif.

Spécificité analytique

Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les microorganismes testés :

- *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Staphylococcus aureus*, staphylocoque à coagulase négative, entérocoque β -hémolytique, *Enterococcus sp.*, entérocoque résistant à la vancomycine, *Enterococcus faecalis* [Goodrich et Miller, 2007].
- 119 organismes différents parmi les genres *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cryptococcus*, *Deinococcus*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mobiluncus*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Plesiomonas*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Trichomonas*, *Ureaplasma*, *Vibrio* et *Yersinia* [Riedlinger et al., 2010].

Effet de la matrice

Jordan et ses collaborateurs ont déterminé que les performances diagnostiques du test Smart GBS LB n'étaient pas influencées par un échantillon contaminé avec des fèces, du sang, du mucus ou encore un agent lubrifiant [Jordan et al., 2010].

5.4 Recommandations d'autres organismes

Aucun organisme ne recommande de dépister le *Streptococcus pyogenes* chez la femme enceinte.

Le CDC recommande différentes méthodes pour le dépistage prénatal du *S. agalactiae* dont la culture, l'agglutination au latex et la PCR [Verani et al., 2010].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

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

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

N'ont pas été évaluées.

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

N'ont pas été évalués.

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

S. pyogenes

La prévalence de la colonisation chez des femmes enceintes (0,03 % à 0,06 %) et l'absence de concordance entre la colonisation vagino-rectale des femmes enceintes et le développement des infections invasives post partum à *S. pyogenes* n'appuient pas l'instauration d'un dépistage systématique prénatal du *S. pyogenes* chez la femme enceinte.

S. agalactiae

Le repérage prénatal du *S. agalactiae* par PCR à la suite d'un enrichissement augmente la sensibilité du test comparativement à la culture, et le CHU Sainte-Justine a démontré à ce propos une augmentation de la fréquence de positivité de 6,8 % par rapport à la méthode d'agglutination au latex utilisée localement.

7.2 Validité clinique

S. pyogenes

Aucune information quant à la validité clinique d'un dépistage vagino-rectal du *S. pyogenes* chez la femme enceinte n'a été repérée.

S. agalactiae

Comparativement à la méthode d'agglutination au latex, le dépistage du *S. agalactiae* par PCR sur les spécimens vagino-rectaux présente :

- une sensibilité de 97,9 % à 100 %;
- une spécificité de 48,7 % à 91,3 %;
- une valeur prédictive positive de 35,5 % à 76,0 %;
- une valeur prédictive négative de 99,5 % à 100 %.

7.3 Validité analytique

S. pyogenes

Aucune information concernant la validité analytique de la détection du *S. pyogenes* dans des prélèvements vagino-rectaux par une méthode PCR n'a été repérée dans la littérature.

S. agalactiae

La détection du *S. agalactiae* par PCR montre :

- un coefficient de variation intraessai de 4,2 % et interessai de 2,2 %;
- une limite de détection de 100 unités formatrices de colonies par réaction;
- une absence de réactivité croisée avec plusieurs microorganismes plus ou moins rapprochés testés dans différentes études.

La valeur pondérée de l'analyse proposée (9,31 unités) est plus basse que celle de l'agglutination au latex (10,2 unités).

7.4 Recommandations d'autres organismes

Le CDC recommande entre autres l'usage de la PCR pour le dépistage prénatal du *Streptococcus agalactiae*.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Dépistage prénatal des streptocoques de groupe A et B par technique d'amplification des acides nucléiques

<p>Le statut de la technologie diagnostique</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Établie</p> <p><input type="checkbox"/> Innovatrice</p> <p><input type="checkbox"/> Expérimentale (pour la recherche uniquement)</p> <p><input type="checkbox"/> Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète</p> <p>La recommandation de l'INESSS</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)</p> <p><input type="checkbox"/> Avis de refus d'introduction</p> <p><input type="checkbox"/> Avis de réévaluation</p>
--

COMMENTAIRES ADDITIONNELS

Le comité reconnaît la pertinence médicale de l'analyse proposée au regard des données cliniques publiées et présentées en appui, mais uniquement pour le dépistage du streptocoque du groupe B (SGB). D'ailleurs, le comité recommande que cette analyse soit inscrite comme *Dépistage prénatal des streptocoques de groupe B par TAAN*.

Concernant la validité analytique, les données fournies par le demandeur ont été jugées satisfaisantes. Toutefois, dans un contexte d'assurance qualité, le comité suggère à l'établissement demandeur de comparer les performances analytiques de son analyse maison avec celles d'une trousse commerciale homologuée par Santé Canada.

Finalement, le comité remet en question la hiérarchisation suprarégionale du dépistage systématique du streptocoque du groupe A, telle qu'avancée par le centre demandeur. Le comité est d'avis qu'il s'agit plutôt d'une proposition de changement technologique pour une analyse dont l'utilité clinique pour le SGB est établie. Deux analyses de détection de SGB (technique d'agglutination sur bouillon de culture – code 40270; culture – code 40269) sont déjà présentes dans le *Répertoire* et utilisées par d'autres établissements. L'analyse par TAAN ne devrait pas remplacer les deux autres analyses inscrites au *Répertoire*.

RÉFÉRENCES

- Boyer KM et Gotoff SP. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections. *Antibiot Chemother* (1971) 1985;35:267-80.
- Buchan BW, Faron ML, Fuller D, Davis TE, Mayne D, Ledebor NA. Multicenter clinical evaluation of the Xpert GBS LB assay for detection of group B Streptococcus in prenatal screening specimens. *J Clin Microbiol* 2015;53(2):443-8.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: A public health perspective. *MMWR Recomm Rep* 1996;45(RR-7):1-24.
- Couturier BA, Weight T, Elmer H, Schlager R. Antepartum screening for group B Streptococcus by three FDA-cleared molecular tests and effect of shortened enrichment culture on molecular detection rates. *J Clin Microbiol* 2014;52(9):3429-32.
- El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Deschaght P, Decat E, et al. Comparison of culture with two different qPCR assays for detection of rectovaginal carriage of Streptococcus agalactiae (group B streptococci) in pregnant women. *Res Microbiol* 2011;162(5):499-505.
- Goodrich JS et Miller MB. Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B Streptococcus during antepartum screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(1):17-22.
- Jordan JA, Hall G, Davis T. Multicenter study evaluating performance of the Smart Group B Streptococcus (GBS) assay using an enrichment protocol for detecting GBS colonization in patients in the antepartum period. *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3193-7.
- Konikkara KP, Baliga S, Shenoy S, Bharati B. Evaluation of culture, antigen detection and polymerase chain reaction for detection of vaginal colonization of group B streptococcus (GBS) in pregnant women. *J Clin Diagn Res* 2014;8(2):47-9.
- Lin FY, Brenner RA, Johnson YR, Azimi PH, Philips JB 3rd, Regan JA, et al. The effectiveness of risk-based intrapartum chemoprophylaxis for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(6):1204-10.
- Mead PB et Winn WC. Vaginal-rectal colonization with group A streptococci in late pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8(5-6):217-9.
- Park JS, Cho DH, Yang JH, Kim MY, Shin SM, Kim EC, et al. Usefulness of a rapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization. *Ann Lab Med* 2013;33(1):39-44.
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008;299(17):2056-65.
- Rallu F, Barriga P, Scivo C, Martel-Laferrère V, Laferrère C. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):725-8.

- Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol* 1991;77(4):604-10.
- Riedlinger J, Beqaj SH, Milish MA, Young S, Smith R, Dodd M, et al. Multicenter evaluation of the BD Max GBS assay for detection of group B streptococci in prenatal vaginal and rectal screening swab specimens from pregnant women. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4239-41.
- Saab J, Bell SM, Lahra MM. Vaginal carriage rate of streptococcal pyogenes in 1600 pregnant women. *Pathology* 2012;44(6):567-8.
- Schwartz J, Robinson-Dunn B, Makin J, Boyanton BL Jr. Evaluation of the BD MAX GBS assay to detect *Streptococcus* group B in LIM broth-enriched antepartum vaginal-rectal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(1):97-8.
- Scicchitano LM et Bourbeau PP. Comparative evaluation of the AccuProbe Group B *Streptococcus* Culture Test, the BD GeneOhm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2009;47(9):3021-3.
- Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, Thomas AR, Arnold KE, Craig AS, et al. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* 2009;360(25):2626-36.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59(RR-10):1-32.
- Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol* 1996;88(5):811-5.