

Kit testé : Kit RealStar® Hantavirus-HFRS RT-PCR Kit RUO 1.0 (Ref : 851003, Altona Diagnostics)

Date : Février - mai 2024

Lieu : CNR Hantavirus (Institut Pasteur Paris)

Le kit RealStar® Hantavirus-HFRS RT-PCR RUO 1.0 est basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de l'ARN spécifique de quatre espèces d'hantavirus responsables de fièvre hémorragique avec syndrome rénal (HFRS): l'hantavirus Puumala (PUUV), l'hantavirus Hantaan (HTNV), l'hantavirus Seoul (SEOV) et l'hantavirus Dobrava-Belgrade (DOBV).

Le kit contient deux tests de RT-PCR indépendants : un pour l'amplification et la détection spécifique de l'ARN des hantavirus Hantaan (HTNV) et Puumala (PUUV), et un autre pour l'amplification et la détection spécifique de l'ARN des hantavirus Dobrava-Belgrade (DOBV) et Seoul (SEOV).

Nous avons réalisé une évaluation indépendante des performances du Kit RealStar® Hantavirus-HFRS RT-PCR Kit RUO 1.0 pour la détection qualitative et spécifique du virus Puumala dans des échantillons cliniques préalablement caractérisés par le CNR des Hantavirus avec une RT-PCR temps réel PUUV adaptée de la méthode de *Kramski et al., 2007* (technique de référence accréditée ISO 15189). La sensibilité du test a été évalué sur 94 sérums et plasmas provenant de patients prélevés avant le 10^{ème} jour d'évolution de la maladie, porteurs d'IgM et IgG anti-hantavirus et positifs pour l'ARN PUUV avec la technique de référence, au moment du diagnostic réalisé entre 2017 et 2023. Les 94 échantillons positifs ont été choisis au sein des 3 régions géographiques de la zone d'endémie correspondant aux 3 clusters phylogénétiques des souches PUUV circulant en France : 43 dans la partie Nord et Nord-Est, 49 dans le Sud de la zone d'endémie et 2 dans la partie Ouest de la zone d'endémie. La spécificité du test a également été évaluée sur 30 sérums et plasmas provenant de patients prélevés dans les 10 premiers jours de la maladie et pour lesquels une infection par hantavirus a été confirmée sérologiquement ou exclue sérologiquement (sur la base d'une cinétique) et négatifs pour l'ARN PUUV. La spécificité du test concernant la réactivité croisée avec d'autres hantavirus que PUUV (DOBV, Tula, Maripa, SEOV, Nova, Thailand et HTNV) ou agents pathogènes causant des symptômes similaires à ceux d'une infection par un hantavirus ou susceptibles d'être présents dans des échantillons de plasma ou sérum (souches des virus CMV, VZV, DENV 1 et 2, CHIKV, OROV, SFSV, WNV, ZIKV et de leptospires) a été également évaluée.

L'ARN viral (ou ADN bactérien) a été extrait à partir d'un volume de 150 µL de plasma, sérum ou surnageant de culture avec le kit Nucleospin Virus Dx de Macherey-Nagel (Allemagne) et élué sous 50 µL. Un contrôle interne (CI), celui du kit RealStar® Hantavirus-HFRS ou le virus Sigma (virus de drosophile) pour la technique de référence, a été utilisé comme contrôle de l'étape d'extraction des acides nucléiques et d'inhibition de la RT-PCR. Dix µL d'extrait ARN (ou ADN bactérien) ont été ensuite analysés dans un volume réactionnel total de 30 µL pour le test RealStar® Hantavirus-HFRS et 2,5 µL dans un volume réactionnel total de 20 µL pour la technique de référence. Les amplifications ont été réalisées sur deux CFX96™ Real-Time PCR Detection System de BioRad.

Pour l'analyse des résultats, les 94 échantillons positifs ont été classés en 3 groupes en fonction du Ct détecté au moment du diagnostic afin d'évaluer la sensibilité

analytique : $29 \leq Ct \leq 32 = 6$ (5 de la partie Nord-Est, 1 de la partie Sud), $32 < Ct \leq 36 = 48$ (22 partie Nord-Est, 25 partie Sud et 1 partie Ouest) et $Ct > 36 = 40$ (16 partie Nord-Est, 23 partie Sud, et 1 partie Ouest de la zone d'endémie). Seuls les échantillons avec une valeur de $Ct \geq 36$ ont été analysés en duplicate (nombre d'essais limité).

Les résultats sont les suivants :

Groupes Valeur de Ct	Technique de référence			RealStar® Hantavirus-HFRS PUUV			
	POS	NEG	DTX	POS	Moyenne Ct PUUV	NEG	DTX
$29 \leq x \leq 32$	6	0	0	6	27,4	0	0
$32 < x \leq 36$	48	0	0	45	28,1	1	2
> 36	40	0	0	35	29,0	2	3
NEG	0	30	0	0	--	30	0
TOTAL	94	30	0	86	--	33	5

Les échantillons avec des valeurs de $Ct < 10$ et des courbes d'amplification non exponentielles ont été classés comme douteux (CI conforme).

Par ailleurs, deux échantillons positifs ($Ct > 36$) détectés négatifs et trois échantillons positifs (Ct 35, 38 et 39) classés comme douteux avec le kit Altona ont été détectés négatifs ou douteux avec le test de référence lors de cette nouvelle analyse (CI conforme).

Ainsi, le pourcentage global de résultats concordants entre le kit RealStar® Hantavirus-HFRS RUO 1.0 et la technique de référence du CNR au moment du diagnostic est de 91,7% (86/94) pour la détection du virus Puumala. Les résultats faux-négatifs ou douteux obtenus lors de cette analyse dans des échantillons de faible charge virale sont le fait d'une dégradation du matériel génétique par suite de processus de congélation-décongélation.

Aucun résultat faux positif pour PUUV n'a été observé sur les échantillons négatifs, ni sur le panel d'échantillons positifs pour des hantavirus autre que PUUV ou autres agents pathogènes. La spécificité du kit RealStar® Hantavirus-HFRS RUO 1.0 est de 100%.

Aucune amplification n'a également été observée dans le canal de détection HTNV pour l'ensemble des échantillons analysés à l'exception du puits contenant le virus HTNV (souche Souche 76-11).

Le CNR des Hantavirus recommande le kit RealStar® Hantavirus-HFRS RT-PCR RUO 1.0 (Altona Diagnostics) pour la détection du virus Puumala dans des échantillons cliniques de plasma et sérum.

Conflits d'intérêts

Cette étude a été réalisée en totale indépendance dans le cadre des missions du CNR. Le CNR des Hantavirus et ses membres n'ont reçu aucun versement financier de la part d'Altona Diagnostics et le CNR a pris en charge l'intégralité des coûts engendrés par cette étude, notamment le coût des kits et réactifs.