

## Etude d'évaluation du kit ELISA Bordier *Trichinella spiralis*

### Object

La société Bordier Affinity Products a développé un kit ELISA pour la détection d'anticorps anti-*Trichinella spiralis* dans le sérum humain pour le dépistage sérologique de la trichinellose. L'étude consistait à évaluer les performances du kit dans le Service de Parasitologie, Mycologie de l'Hôpital COCHIN avec les échantillons de leur sérothèque.

### Type d'étude

L'étude est diagnostique et rétrospective sur des échantillons de sérum archivés et bien caractérisés.

### Objectifs de l'étude

Evaluer les performances du kit ELISA Bordier *Trichinella spiralis* réf. 9750 pour le diagnostic sérologique de la trichinellose. Définir la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives (PPV, NPV). Valider le seuil du kit.

### Matériel

161 sérums ont été testés. Ils se répartissent en 3 groupes :

Groupe 1 : 55 échantillons choisis parmi des patients ayant un diagnostic confirmé de trichinellose selon l'algorithme de Dupouy-Camet et Bruschi [1]. 36 échantillons de trichinellose récente prélevés lors d'épidémies et 19 échantillons de trichinellose ancienne prélevés plusieurs années après une première infection.

Algorithme diagnostic des trichinelloses chez l'homme [1]

Groupe	Caractéristiques
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fièvre</li> <li>• Œdème de la face et périorbitaire</li> <li>• Myalgies</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Signes neurologiques</li> <li>• Signes cardiaques</li> <li>• Conjonctivite</li> <li>• Hémorragie subungéale</li> <li>• éruptions cutanées (<i>rash</i> maculopapulaire)</li> <li>• Diarrhée</li> </ul>
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eosinophilie (&gt; 1G/L) et/ou élévation des IgE totale</li> <li>• Elévations des enzymes musculaires (CPK, Aldolase)</li> </ul>
D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sérologie positive avec présence d'anticorps spécifique</li> <li>• Séroconversion</li> <li>• Biopsie musculaire positive</li> </ul>

Le diagnostic de trichinellose est :

peu probable	lors de l'association d'un signe A ou d'un signe B ou d'un signe C.
suspect	lors de l'association d'un signe A ou de deux signes B et d'un signe C.
hautement probable	lors de l'association de trois signes A et de deux signes C.
certain	lors de l'association de 3 signes A, deux C et un D ou lors de l'association de quelques signes A ou B, d'un C et un D.

Groupe 2 : 62 échantillons choisis parmi des patients soumis à une demande de sérologie pour la trichinellose, mais pour lesquels la maladie a été cliniquement exclue.

Groupe 3 : 44 échantillons choisis parmi des patients souffrant d'autres maladies parasitaires. Selon la littérature, la plupart des réactions croisées sont rencontrées avec la bilharziose, la distomatose et la filariose. Mais d'autres parasitoses ont été sélectionnées.

Parasitoses	Nb de sérums
Angiostrongylose	1
Cysticercose	1
Anguillulose	2
Amibiase (hépatique)	3
Anisakidose	3
<b>Distomatose (fasciolose)</b>	<b>3</b>
<b>Filariose (loase)</b>	<b>4</b>
Echinococcose :	4
hydatidoses	3
échinococcose alvéolaire	1
Leishmaniose	3
Toxoplasmose	4
<b>Schistosomiase</b>	<b>7</b>
Toxocarose	9

Au total, 55 patients et 106 contrôles ont été testés.

### Méthode

La technique ELISA Bordier *Trichinella spiralis* a été adaptée sur l'automate d'immuno-analyse Evolis (Bio-Rad) selon le protocole recommandé par le fabricant. Le protocole de la technique sur l'automate est disponible sur demande.

### Résultat

#### **Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives (PPV, NPV)**

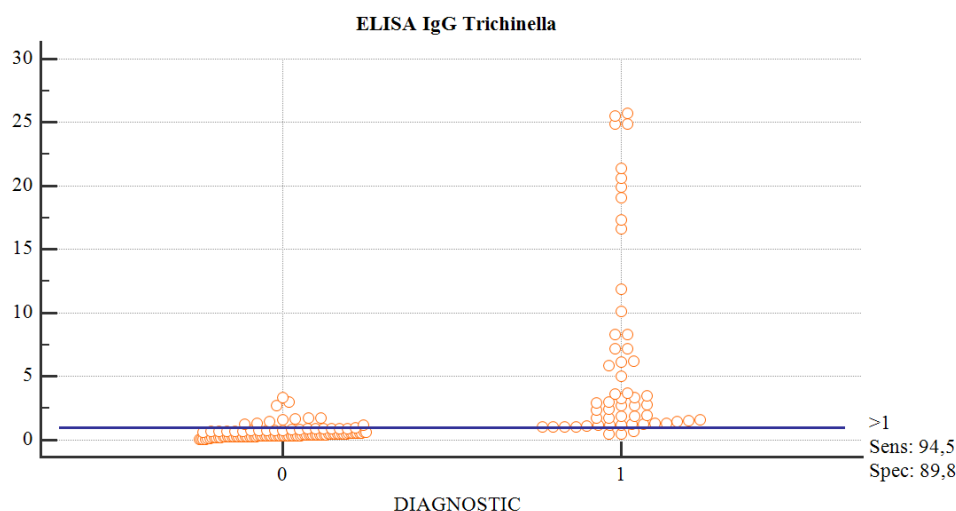
En utilisant le seuil du fabricant ( $\text{index} \geq 1$ ), les résultats des 161 sérums sont les suivants :

Groupe	Sérums positifs	Sérums négatifs
<b>1</b>	52	3
<b>2</b>	6	56
<b>3</b>	3	41

La sensibilité est de 94,55% (IC95 : 85,15-98,51), la spécificité de 91,51% (IC95 : 84,65%-95,47) et les VPP et VPN de 85,25% et 97,00%, respectivement.

Les sérums de patients (groupe 1) donnent un indice compris entre 0,467 et 25,751 (moyenne 6,522; écart-type 7,7182) (Fig. 1). 24 sérums sur 36 (67%) ont un indice supérieur à 2. Les sérums de trichinellose récente ont en moyenne un indice plus élevé : 8,841 (min 1,056 – max 25,751) que les sérums de trichinellose ancienne : 2,128 (min 0,467 – max 6,140). 3 sérums de trichinellose ancienne sont négatifs (index 0,523 ; 0,467 ; 0,697).

Fig. 1



0 : sérums contrôles, 1 : sérums de patients avec une trichinellose

Les sérums de contrôles (groupes 2 et 3) donnent un indice compris entre 0,092 et 3,339 (moyenne 0,594 ; écart-type 0,546) (Fig. 1). 9 sérums sont positifs avec un indice compris entre 1,157 et 3,339. Ils proviennent de 6 patients ayant eu une demande de sérologie pour la trichinellose, mais chez qui la maladie a été cliniquement exclue et de 3 patients atteints d'une autre parasitose (une anisakidose, une amibiase hépatique et une leishmaniose).

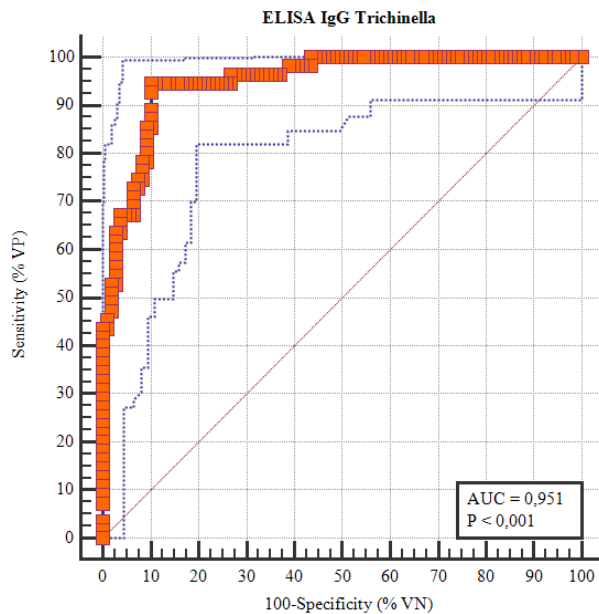
Parasitoses	Sérums positifs	Sérums négatifs
Angiostrongylose	0	1
Cysticercose	0	1
Anguillulose	0	2
<b>Amibiase (hépatique)</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Anisakidose</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Distomatose (fasciolose)	0	3
Filariose (loase)	0	4
Echinococcose :	0	4
hydatidoses	0	3
échinococcose alvéolaire	0	1
<b>Leishmaniose</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Toxoplasmose	0	4
Schistosomiase	0	7
Toxocarose	0	9

La spécificité est de 90,32% (IC95 : 76,66-100) dans le groupe de patients ayant eu une demande de sérologie pour la trichinellose, mais chez qui la maladie a été cliniquement

exclue. Elle est de 93,18% (IC95 : 81,54-100) dans le groupe de patients atteints d'une autre parasitose.

## Analyse de la courbe ROC

Fig. 2



La courbe ROC permet de déterminer la sensibilité et la spécificité selon le seuil :

Seuil (indice)	Sensibilité (IC95) %	Spécificité (IC95) (%)
> 0,515	98,18 (90,3 - 100,0)	61,11 (51,3 - 70,3)
>0,977	94,55 (84,9 - 98,9)	89,81 (82,5 - 94,8)
>1,056	92,73 (82,4 - 98,0)	89,81 (82,5 - 94,8)
>1,060	89,09 (77,8 - 95,9)	89,81 (82,5 - 94,8)
>1,219	80,00 (67,0 - 89,6)	90,74 (83,6 - 95,5)
>1,272	78,18 (65,0 - 88,2)	91,67 (84,8 - 96,1)
>1,459	70,91 (57,1 - 82,4)	93,52 (87,1 - 97,4)
>1,95	58,18 (44,1 - 71,3)	97,22 (92,1 - 99,4)

## Précision

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant ces 2 sérums lors de 4 essais différents.

Les résultats ont été analysés en utilisant l'indice ou la DO.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 1 (4)	Sérum 2 (4)
<b>Moyenne (Indice)</b>	0,0839	6,926	0,0775	11,245
<b>Ecart-type (Indice)</b>	0,0182	0,383	0,0223	3,173
<b>Coefficient de variation (%)</b>	21,71	5,54	28,86	28,22

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 1 (4)	Sérum 2 (4)
<b>Moyenne (DO)</b>	0,0148	1,745	0,016	1,799
<b>Ecart-type (DO)</b>	0,0032	0,0968	0,00081	0,600
<b>Coefficient de variation (%)</b>	21,65	5,548	5,10	33,37

## Discussion

Un diagnostic rapide de trichinellose est impératif afin de traiter le malade et d'identifier un processus épidémique permettant la détection et le traitement des autres cas même s'ils ne sont pas encore symptomatiques. Il peut être évoqué dans trois types de situation : devant une symptomatologie clinique (l'association diarrhée - fièvre - myalgies - œdème de la face est caractéristique), devant une hyperéosinophilie (très évocatrice si elle est accompagnée de myalgies fébriles) et dans un contexte épidémique (où seront considérés comme cas potentiels tous les sujets ayant partagé le repas incriminé avec un ou des cas avérés). La vérification des enzymes musculaires et le sérodiagnostic permet de conforter le diagnostic [1]. Le sérodiagnostic utilise en pratique un test ELISA pour le dépistage et un test Western-Blot en confirmation [2].

Le kit ELISA Bordier *Trichinella spiralis* a été évalué sur l'automate d'immunoanalyse Evolis (Bio-Rad). Le protocole a été facilement adapté sur l'automate.

**Les performances diagnostiques du kit sont bonnes. La sensibilité est de 94,55% (IC95 : 85,15-98,51), la spécificité de 91,51% (IC95 : 84,65%-95,47) et les VPP et VPN de 85,25% et 97,00%, respectivement.** La spécificité est légèrement diminuée (90,32% ; IC95 : 76,66-100) dans le groupe de patients ayant eu une demande de sérologie pour la trichinellose, mais chez qui la maladie a été cliniquement exclue. Ces patients présentent une hyperéosinophilie sanguine, des œdèmes et ou des myalgies.

Dans cette étude, des réactions croisées ont été observées avec des patients atteints d'amibiase tissulaire, de leishmaniose et d'anisakidose. Dans la littérature, des réactions croisées sont également rapportées avec l'amibiase et l'anisakidose [3]. L'amibiase et la leishmaniose sont des protozooses, elles ne provoquent ni hyperéosinophilie sanguine, ni œdème, ni myalgie. Le risque de survenue de réactions croisées avec des sérums de patients présentant ces deux parasitoses est faible ; en effet ces patients bénéficiant peu de recherche de trichinellose. L'anisakidose peut provoquer une hyperéosinophilie sanguine et des œdèmes. Le risque de survenue de réactions croisées avec des sérums de patients présentant cette parasitose est donc possible. Un plus grand nombre de sérums d'anisakidose pourrait être testé.

Selon la littérature, la plupart des réactions croisées sont rencontrées avec la bilharziose, la distomatose et la filariose [3]. Notre évaluation n'a pas montré de réactions croisées avec ces parasitoses. Cependant, d'une part, nous n'avons testé que quelques sérums de filarioses (3) et quelques sérums de distomatose (4), essentiellement de fasciolose. D'autre part, les sérums de shistosomoses provenaient de patients en phase d'état. Il serait pertinent de tester des sérums de patients en phase d'invasion, ces derniers présentant une hyperéosinophilie.

Nous n'avons pas observé à l'usage du kit de problème particulier.

Sur l'automate Evolis (Bio-Rad), des DO au-dessus de 3 sont observables cependant elles ne sont pas interprétables. En effet, la DO maximale mesurable est de 3.

**Dans la perspective d'une utilisation sur un automate d'immuno-analyse, des volumes plus importants de conjugué, d'enzyme et de solution stop seraient nécessaires.**

### Références

- [1] Dupouy-Camet J, Bruschi F. Management and diagnosis of human trichinellosis, in: FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Dupouy-Camet J. Murrell K.D. (eds) , World Organisation for Animal Health Press, Paris, France, 2007, 37–68.
- [2] Haute Autorité de Santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la trichinellose. Juin 2018. [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-07/argumentaire\\_trichinellose.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-07/argumentaire_trichinellose.pdf)
- [3] Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):793-6.