

Etude d'évaluation du kit ELISA Bordier Anisakidae

Object

L'anisakidose est l'infestation de l'homme par des larves de nématodes de la famille des Anisakidés, parasites à l'état adulte du tube digestif de mammifères marins tels que les cétacés (dauphins, marsouins...) et les pinnipèdes (phoques). La contamination humaine se produit après ingestion de poisson de mer cru ou mal cuit. Chez l'Homme, les larves ne peuvent plus évoluer chez cet hôte inhabituel (elles sont en impasse parasitaire) mais leur présence provoque des manifestations digestives aiguës (douleurs épigastriques, simulant un ulcère, provoquées par la fixation à la muqueuse gastroduodénale d'une larve quelques heures après la contamination) ou chroniques (granulome éosinophile autour d'une larve enchâssée dans l'intestin et simulant une tumeur intestinale) et allergiques (choc anaphylactique, oedème de Quincke, urticaire aiguë récidivante ou chronique, asthme, oedème segmentaire de l'intestin pouvant conduire à une occlusion) [1,2].

Le diagnostic de l'anisakidose est difficile : D'une part, la clinique est non spécifique. D'autre part, la sérologie est peu contributive dans le diagnostic de la forme digestive. Les techniques utilisées en routine jusqu'alors sont des techniques « maisons » peu sensibles (IFI) ou peu spécifiques (IEP). Le diagnostic de certitude est apporté par l'isolement de la larve [1-4]. La sérologie est plus contributive dans le diagnostic de la forme allergique par la détection des IgE anti-*Anisakis*. Cependant, il existe de multiples réactions croisées selon l'allergène utilisé et le multi-test ImmunoCAP® ISAC, utilisant la fraction antigénique très spécifique (rAni s 1), est d'un coût élevé [1,5].

La société Bordier Affinity Products a développé un kit ELISA pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-Anisakidae dans le sérum humain pour le dépistage sérologique de l'anisakidose digestive.

L'étude consiste 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 Anisakidae réf. 9800 pour le diagnostic sérologique d'anisakidose par le dosage des IgG. Définir la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives (PPV, NPV). Valider le seuil du kit.

Matériel

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

Groupe 1 : 38 échantillons choisis parmi des patients ayant un diagnostic confirmé d'anisakidose [1-4]. La parasitose a été classée d'une part en :

- anisakidose digestive (15), définie par l'identification d'un ver dans un prélèvement digestif, des manifestations douloureuses épigastriques ou abdominales après

consommation de poisson cru et la présence de précipitines anti-Anisakis ou d'IgG4 anti-Anisakis.

- anisakidose allergique (16), définie par l'apparition de manifestations allergiques aiguës suivant l'ingestion de poisson, associées à la présence d'IgE anti-Anisakis.
- anisakidose digestive et allergique (7), associant les 2 premières formes.

Les cas d'anisakidose digestive sont définis comme certain si un vers est isolé dans un prélèvement digestif, sinon comme probable.

La parasitose a été classée d'autre part en :

- anisakidose récente (37), lorsque la symptomatologie au moment du diagnostic est compatible avec la parasitose.
- anisakidose ancienne (1), lorsque la symptomatologie au moment du diagnostic n'est pas compatible avec la parasitose, mais que dans les antécédents il existe une symptomatologie compatible.

Groupe 2 : 43 échantillons choisis parmi des patients soumis à une demande de sérologie anisakidose.

Groupe 3 : 47 échantillons choisis parmi des patients souffrant d'autres maladies parasitaires ou d'autres pathologies (**Tableau 1**). Selon la littérature, la plupart des réactions croisées sont rencontrées avec la bilharziose, la distomatose et la filariose. Les antigènes d'*Anisakis simplex* sont connus pour réagir de manière croisée avec d'autres allergènes provenant, par ex. d'autres nématodes (*Ascaris*, filaires), d'autres parasites (*Shistosomes*, douves) et avec des molécules d'acariens, de crustacés et de mollusques [5].

Tableau 1 : Sérums de patients souffrant d'autres maladies parasitaires ou d'autres pathologies

Parasitoses	Nb de sérums
Schistosomose	9
Distomatose	3
Filariose	3
Anguillulose	4
Toxocarose	9
Echinococcose cystique (hydatidose)	3
Echinococcose alveolaire	2
Trichinellose	4
Cysticercose	1
Leishmaniose	1
Amibiase hépatique	1
Toxoplasmose	1
Aspergillose	1
Giardiose	1
Blastocystose	1
MICI	2
Tuberculose	1

Méthode

La technique ELISA Bordier Anisakidae 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)

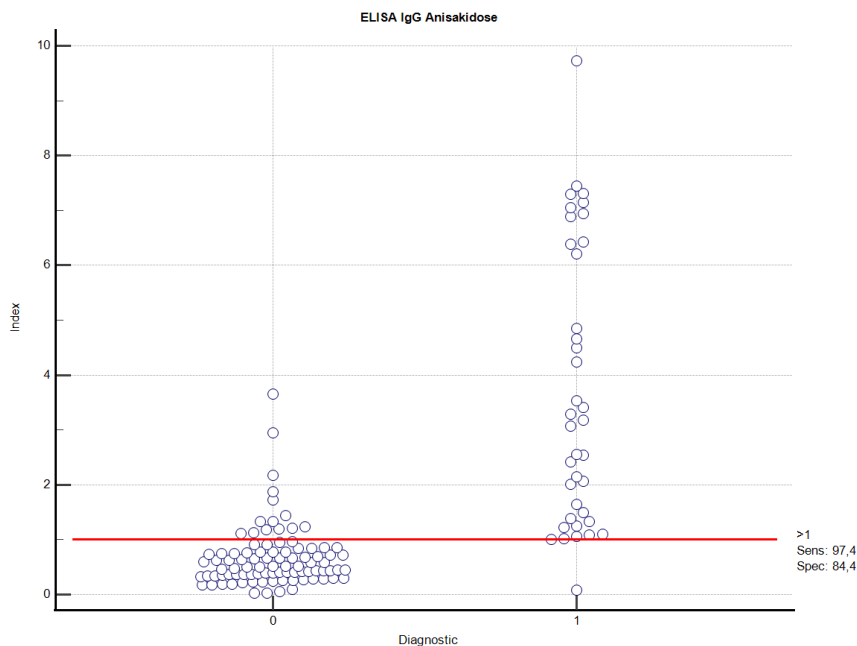
En utilisant le seuil du fabricant (index ≥ 1), les résultats des 128 sérums sont les suivants :

Groupe	Sérums positifs	Sérums négatifs	Total
1	37	1	38
2	6	37	43
3	9	38	47

La sensibilité est de 97,4% (IC95 : 86,2 - 99,9), la spécificité de 84,4% (IC95 : 75,3 - 91,2) et les VPP et VPN de 71,2% et 98,7%, respectivement.

Les sérums de patients avec une anisakidose (groupe 1) donnent un index compris entre 0,076 et 9,724 (moyenne 3,710; écart-type 2,534) (**Fig. 1**). 1 sérum d'anisakidose digestive (avec rejet de larves de parasite dans une expectoration) est négatif (index 0,076).

Fig. 1 : Index des sérums de patients atteints d'anisakidose et des patients contrôles



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

Les sérums de contrôles (groupes 2 et 3) donnent un index compris entre 0,024 et 3,660 (moyenne 0,674 ; écart-type 0,567) (Fig. 1). 15 sérums sont positifs avec un index compris entre 1,120 et 2,952. Ils proviennent de 6 patients ayant eu une demande de sérologie anisakidose, mais chez qui la maladie a été cliniquement exclue et de 9 patients atteints d'une autre parasitose (2 distomatoses, 2 filarioses à *Loa loa*, 2 anguilluloses, une toxocarose, une échinococcose alvéolaire et une trichinellose) (**Tableau 2**).

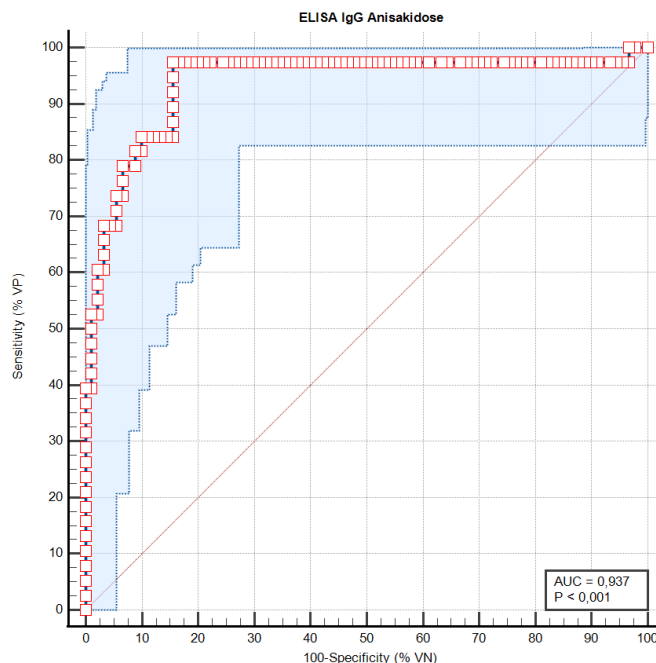
Tableau 2 : Résultat des sérums de patients souffrant d'autres maladies parasitaires ou d'autres pathologies

Parasitoses	Nb de sérums positifs (%)	Nb de sérums total
Schistosomose	0 (0)	9
Distomatose	2 (40)	5
Filariose	2 (50)	4
Anguillulose	2 (50)	4
Toxocarose	1 (12,5)	8
Echinococcose cystique (hydatidose)	0	4
Echinococcose alvéolaire	1 (50)	2
Trichinellose	1 (25)	4
Cysticercose	0 (0)	1
Leishmaniose	0 (0)	1
Amibiase hépatique	0 (0)	1
Aspergillose	0 (0)	1
Giardiose	0 (0)	1
Blastocystose	0 (0)	1
MICI	0 (0)	1
Tuberculose	0 (0)	1

La spécificité est de 86,1% (IC95 : 75,7-96,4) dans le groupe de patients ayant eu une demande de sérologie anisakidose. Elle est de 80,9% (IC95 : 69,6-92,1) dans le groupe de patients atteints d'une autre parasitose ou d'une autre pathologie.

Analyse de la courbe ROC ou courbe de sensibilité / spécificité

Fig. 2 : Courbe ROC



La courbe ROC permet de déterminer la sensibilité et la spécificité selon le seuil. Elle permet aussi de définir les meilleures performances du test (point le plus près de la coordonnée 0, 100 correspondant à aucun faux positif et aucun faux négatif).

Tableau 2 : Sensibilité et spécificité selon le seuil de positivité

Seuil (index)	Sensibilité (IC95) %	Spécificité (IC95) (%)
> 0,024	100,0 (90,7 – 100,0)	0,0 (0,0 - 4,0)
> 0,511	97,37 (86,2 - 99,9)	50,0 (39,3 - 60,7)
>0,967	97,37 (86,2 - 99,9)	84,44 (75,3 - 91,2)
>1,003	94,74 (82,3 - 99,4)	84,44 (75,3 - 91,2)
>1,015	92,11 (78,6 - 98,3)	84,44 (75,3 - 91,2)
>1,099	84,21 (68,7 - 94,0)	84,44 (75,3 - 91,2)
>1,203	84,21 (68,7 - 94,0)	90,00 (81,9 - 95,3)
>1,242	81,58 (65,7 - 92,3)	91,11 (83,2 - 96,1)
>1,435	73,68 (56,9 - 86,6)	94,44 (87,5 - 98,2)

L'aire sous la courbe (0,937) proche de 1 indique que le test a une bonne capacité à discriminer les sérums de patients avec une anisakidose des sérums des contrôles.

Précision

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums dans 16 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant 2 sérums lors de 6 essais différents. Les résultats ont été analysés en utilisant l'index ou la DO.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 1	Sérum 2
Moyenne (Index)	0,736	4,117	0,698	1,443
Ecart-type (Index)	0,106	0,588	0,051	0,212
Coefficient de variation (%)	14,45	14,29	7,35	14,70

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 1	Sérum 2
Moyenne (DO)	0,222	1,369	0,238	0,494
Ecart-type (DO)	0,062	0,229	0,018	0,073
Coefficient de variation (%)	27,76	16,76	7,34	14,70

En utilisant l'index (recommandation du fabricant), les coefficients de variation sont inférieurs à 15%. La technique est répétable et reproductible.

Discussion

Le diagnostic sérologique de l'anisakidose était difficile : La sérologie était peu contributive dans le diagnostic de la forme digestive, les techniques utilisées en routine jusqu'alors étant

des techniques « maisons » peu sensibles (IFI) ou peu spécifiques (IEP) [1,2]. Le diagnostic de certitude est apporté par l'isolement de la larve [3,4]. La sérologie est plus contributive dans le diagnostic de la forme allergique par la détection des IgE anti-*Anisakis*. Cependant, il existe de multiples réactions croisées selon l'allergène utilisé et le multi-test ImmunoCAP® ISAC, utilisant la fraction antigénique très spécifique (rAni s 1), est d'un coût élevé [1,5].

Le kit ELISA Bordier Anisakidae a été évalué comme un test de dépistage pour le diagnostic de l'anisakidose digestive humaine. Les tests ont été réalisés sur l'automate d'immunoanalyse Evolis (Bio-Rad). Le protocole a été facilement adapté sur l'automate.

Les performances diagnostiques du kit sont bonnes. Le seuil de positivité avec un index à 1.0 (fixé par le fabricant) permet d'obtenir les meilleurs performances (Tableau 2). La sensibilité est de 97,4% (IC95 : 86,2 - 99,9), la spécificité de 84,4% (IC95 : 75,3 - 91,2) et les VPP et VPN de 71,2% et 98,7%, respectivement. La spécificité est légèrement augmentée (86,1% ; IC95 : (IC95 : 75,7-96,4) dans le groupe de patients suspects d'anisakidose. Ces patients présentent des troubles digestifs et parfois une hyperéosinophilie associés à une consommation de poisson peu cuit. La spécificité est légèrement diminuée (80,9% ; IC95 : 69,6-92,1) dans le groupe de patients atteints d'une autre parasitose ou d'une autre pathologie.

Le test permet donc une bonne discrimination des patients ne souffrant pas d'anisakidose (bonne VPN 98,7%).

Dans cette étude, des réactions croisées ont été observées avec des sérums de patients atteints de filariose à *Loa loa*, anguillulose, échinococcose alvéolaire (50%), distomatose (40%), trichinellose (25%) et toxocarose (12,5%). L'anisakidose peut provoquer des troubles gastro-intestinaux, des œdèmes et une hyperéosinophilie sanguine. Le risque de survenue de réactions croisées avec des sérums de patients présentant ces parasitoses est donc possible. Cependant, les contextes épidémiologiques de ces parasitoses diffèrent de celui de l'anisakidose. De plus, des techniques de confirmation (immunoblot ou mise en évidence du parasite) existent pour ces parasitoses. En cas de réactions croisées avec ces parasitoses, l'étude du contexte épidémiologique et la réalisation de techniques de confirmation permettront de confirmer leur diagnostic. Le diagnostic d'anisakidose pourrait être porté par exclusion.

Pour le diagnostic et la classification des anisakidoses, la détection des IgG4, des précipitines ou des IgE anti-*Anisakis* étaient nécessaires jusqu'alors [1,2]. Nos résultats montrent que le kit ELISA Bordier Anisakidae permet le dépistage des formes digestives et allergiques. Il devrait être plus sensible que l'IFI, plus spécifique que l'IEP et plus accessible que le multi-test ImmunoCAP® ISAC. Nous proposons qu'il soit utilisé en première intention et en cas de positivité, il devra être confirmé par le dosage des IgG4 ou des IgE anti-*Anisakis*, tout en permettant aussi la classification du cas. Cette nouvelle démarche diagnostique devra être étudiée et validée de façon prospective.

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

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, Touabet-Azouzi N, Fréalle E, Van Cauteren D, Yera H, Moneret-Vautrin A. Incidence de l'anisakidose en France. Enquête rétrospective 2010-2014. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 2016;5-6: 64-70. http://www.invs.sante.fr/beh/2016/5-6/2016_5-6_1.html
- [2] Yera H, Fréalle É, Dutoit E, Dupouy-Camet J. A national retrospective survey of anisakidosis in France (2010-2014): decreasing incidence, female predominance, and emerging allergic potential. Parasite. 2018;25:23. doi: 10.1051/parasite/2018016. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29637891; PMCID: PMC5894341.
- [3] Brunet J, Pesson B, Royant M, Lemoine JP, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Yera H, Fréalle E, Dupouy-Camet J, Merino-Espinosa G, Gómez-Mateos M, Martin-Sanchez J, Candolfi E. Molecular diagnosis of *Pseudoterranova decipiens* s.s in human, France. BMC Infect Dis. 2017 Jun 6;17(1):397. doi: 10.1186/s12879-017-2493-7. PMID: 28583155; PMCID: PMC5460327.
- [4] Yera H, Fréalle E, Dupouy-Camet J. Molecular confirmation of *Anisakis pegreffii* as a causative agent of anisakidosis in France. Dig Liver Dis. 2016 Aug;48(8):970. doi: 10.1016/j.dld.2016.04.003. Epub 2016 Apr 14. PMID: 27133969.
- [5] Mehrdana F, Lavilla M, Kania PW, Pardo MÁ, Audicana MT, Longo N, Buchmann K. Evidence of IgE-Mediated Cross-Reactions between *Anisakis simplex* and *Contracaecum osculatum* Proteins. Pathogens. 2021 Jul 28;10(8):950. doi: 10.3390/pathogens10080950. PMID: 34451414; PMCID: PMC8399947.