



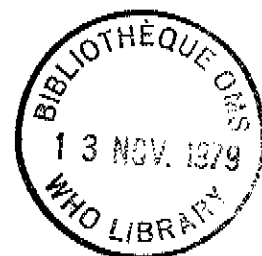
LE FACTEUR RHUMATOÏDE  
CAUSE DE NON-SPECIFICITE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE ANTI-IGM DANS LA TOXOPLASMOSE

par

Pierre Ambroise-Thomas,<sup>1</sup> Jean Francesio,<sup>1</sup> Josiane Simon,<sup>1</sup>  
Claude Micouin<sup>2</sup> et Yves Pierson<sup>1</sup>

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. Introduction .....	2
2. Matériel et méthodes .....	2
2.1 Sérums étudiés .....	2
2.2 Tests sérologiques .....	2
2.3 Techniques d'absorption .....	3
3. Résultats .....	4
4. Discussion .....	4
5. Conclusions .....	5
Summary .....	6
Références bibliographiques .....	6
Tableaux .....	7



<sup>1</sup> Service de Parasitologie, Centre hospitalier régional et universitaire de Grenoble, Grenoble, France.

<sup>2</sup> Service d'Immunologie, Centre de Transfusion sanguine, Grenoble, France.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

## 1. INTRODUCTION

L'immunofluorescence aux anti-IgM marquées (IF-IgM ou test de Remington) est l'un des moyens les plus simples de mise en évidence d'anticorps IgM antitoxoplasmes (IgM-toxo). Dans les toxoplasmoses acquises, ce test n'est normalement positif qu'au cours des 3 à 5 mois suivant l'infestation. Il apporte donc une notion d'évolution particulièrement précieuse lorsqu'on suspecte une séro-conversion toxoplasmique chez une femme enceinte. Chez le nouveau-né sérologiquement suspect, l'IF-IgM permet de reconnaître précocement les toxoplasmoses congénitales en les distinguant des simples transmissions materno-foetales d'anticorps IgG antitoxoplasmes (IgG-toxo).

Le test de Remington n'est certes pas exempt d'erreurs. Les unes n'ont pu être mises en évidence que par l'étude de grandes séries de résultats (Ambroise-Thomas, 1975). Elles relèvent de variations individuelles ou de causes pathologiques : présence anormalement fugace (1 à 2 mois) ou longue persistance (30 mois ou plus) d'IgM-toxo dans des toxoplasmoses acquises; négativité du test de Remington dans des toxoplasmoses congénitales ou, au contraire, erreurs par excès dans des cas de transfusion materno-foetale. D'autres erreurs sont imputables à des causes techniques découlant du principe même de l'immunofluorescence indirecte. Parmi ces dernières, Camargo et al. ont signalé en 1972 le rôle possible du facteur rhumatoïde (FR) ce qu'ont en partie confirmé depuis les travaux de Hyde et al. (1975) et ceux de Yeni et al. (1978).

Normalement, ces fausses positivités de l'IF-IgM s'observeraient chez des sujets possédant à la fois du FR et des IgG-toxo. Cependant, Hyde et al. (1975) ont obtenu des tests de Remington positifs pour 3 sérums FR+ mais totalement dépourvus d'IgG-toxo et ces auteurs ont discuté l'éventuelle fixation du FR sur des anticorps antinucléaires présents dans les sérums. Par ailleurs, d'après Camargo et al. (1972) et Hyde et al. (1975), l'absorption préalable des sérums par des globulines agrégées par la chaleur supprime toute fausse positivité de l'IF-IgM bien qu'elle soit sans effet sur le FR. L'ensemble de ces résultats contient donc différents éléments contradictoires qui nous ont incités à reprendre cette étude.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Sérums étudiés

Il s'agit de : 85 sérums positifs en latex (sérums FR+), et de 15 sérums faiblement positifs en test de Remington (sérums IF-IgM+) et qui étaient tous positifs en immunofluorescence IgG de la toxoplasmose (IF-IgG+).

### 2.2 Tests sérologiques

#### a) Toxoplasmose

La réaction d'immunofluorescence IgG a été conduite suivant les modalités classiques (Ambroise-Thomas, 1963) avec une contre-coloration par le bleu d'Evans à 1/10 000 dans une solution tamponnée au phosphate (PBS), cette solution de bleu d'Evans servant à diluer le conjugué fluorescent.<sup>1</sup> Les lectures sont réalisées avec un filtre d'émission BG 12/6 mm. Tous les sérums ont été titrés jusqu'à extinction, au 1/20, 1/40, 1/80, etc., et, parallèlement, on a établi leur teneur en unités internationales (UI) par rapport au sérum de référence OMS.

Le test de Remington a été effectué également avec une contre-coloration par le bleu d'Evans à 1/10 000 dans lequel on a dilué le conjugué fluorescent.<sup>2</sup> Les sérums ont été étudiés aux dilutions 1/20, 1/40 et 1/80.

<sup>1</sup> Anti-immunoglobulines IgG humaines conjugué à la fluorescéine. Laboratoire Hyland, lot N° 2201 A 002AA. Dilution d'emploi déterminé par titrages : 1/30.

<sup>2</sup> Conjugué fluorescent anti-IgM humaines. Laboratoire Hyland, lot N° 2211 P006A. Dilution d'emploi 1/50.

## b) Facteur rhumatoïde

Le test d'agglutination de particules de latex<sup>1</sup> et le test de Waaler Rose<sup>2</sup> ont été pratiqués en tubes de Kahn avec comme gamme de dilutions 1/80, 1/160 ... 1/5120 pour le test au latex et 1/20, 1/40 ... 1/1280 pour le Waaler Rose.

Dans tous les cas, les titrages comparatifs en IF et en FR, avant et après absorption sur différents supports, ont été répétés de façon à être réalisés au cours de la même série d'exams. En IF-IgM les lectures ont été faites indépendamment par deux observateurs différents.

### 2.3 Techniques d'absorption

Elles ont été conduites face à trois absorbants différents :

#### IgG agrégées par la chaleur

Suivant la technique de Camargo, on utilise des IgG humaines<sup>3</sup> en solution (10 mg/ml) dans du PBS à pH 7,2 et qui sont chauffées 10 minutes à 63°C. Une première dilution (1/10) des sérums est faite avec du PBS puis les dilutions suivantes (1/20, 1/40, etc.) sont réalisées avec la solution d'IgG agrégées par la chaleur.

Après incubation (1 heure 1/2 à 37°C, sous agitation) on centrifuge pendant 5 minutes à 2000 tours/minute et les surnageants sont repris pour les contrôles sérologiques.

#### IgG polymérisées par le glutaraldéhyde

A 5 ml d'une solution d'IgG humaine (50 mg/ml) dans une solution tamponnée au phosphate à 0,1 M, pH 7,2 on ajoute lentement 1 ml de glutaraldéhyde (2,5 %). Le mélange est laissé trois heures à la température ambiante. Un gel se forme. Il est homogénéisé dans un tube de Potter, centrifugé et lavé trois fois avec du PBS avant d'être remis en suspension dans 12 ml de PBS additionné de merthiolate (1/10 000). Ces 12 ml sont répartis dans les tubes (1 ml) et stockés à +4°C.

Au moment de l'utilisation, le tube est centrifugé (15 minutes à 1000 tours/minute). On enlève le surnageant et on ajoute au culot de globulines polymérisées 1 ml de sérum dilué au 1/10. Le mélange est maintenu 1 heure à température ambiante sous agitation lente.

Pour les dosages sérologiques on utilise le surnageant obtenu après centrifugation.

#### Particules de latex sensibilisées par les IgG

Il s'agit du réactif utilisé pour le test au latex dans le dosage du FR. Ces particules sont sensibilisées par des IgG humaines. Pour les techniques d'absorption, elles sont concentrées 10 fois par centrifugation. L'absorption est effectuée en diluant les sérums avec la solution concentrée de particules sensibilisées. Après un contact de 1 heure 30 à 56°C, sans agitation, on centrifuge comme précédemment avant de contrôler sérologiquement les surnageants.

<sup>1</sup> Particules de latex pour titrage des facteurs antiglobuliniques. Institut Pasteur.

<sup>2</sup> Hémagglutinines de lapin lyophilisées anti-humaines pour réaction de Waaler Rose. Institut Pasteur.

<sup>3</sup> On a successivement utilisé :

- Gamma TS. Immunoglobulines plasmatiques polyvalentes, préparées par les centres de transfusion sanguine.

- Veino-globulines Institut Mérieux. Il s'agit de gamma-globulines humaines d'origine placentaire lyophilisées et destinées aux injections intra-veineuses.

### 3. RESULTATS

- 1) Dans une première série d'examen, on s'est attaché à reconnaître tous les sérums donnant une fluorescence même très faible en IF-IgM. Sur 112 sérums FR+(latex et Waaler Rose), 61 étaient positifs en IF-IgG (1/20 à 1/200 soit 8 à 80 UI) avec, parmi ces derniers sérums, 15 positifs en IF-IgM et 12 "douteux" en test de Remington (tableau 1).
- 2) Inversement, sur 15 sérums d'adultes jeunes, faiblement positifs en IF-IgM à 1/20 et en IF-IgG entre 1/20 et 1/3200 (8 à 1280 UI), 1 seul sérum (8 %) était faiblement FR+ (tableau 2). Pour ce sérum, la positivité de l'IF-IgM était bien non spécifique, comme l'a montré l'évolution sérologique ultérieure de la patiente.
- 3) En mélangeant à parties égales, d'une part des sérums IgG-toxo+, FR et IgM-toxo- (sérums A) avec, d'autre part, des sérums IgG et IgM-toxo- et FR+ (sérums B), on obtient dans 3 cas sur 4 de faibles positivités en IF-IgM (tableau 3), les titres en IF-IgG et en latex étant normalement deux fois moins élevés que les titres avant mélange des sérums A ou B.
- 4) En faisant successivement intervenir, en immunofluorescence à trois couches, des sérums IgG-toxo+, IgM-toxo- et FR- (sérums A), puis des sérums IgG et IgM-toxo- et FR+ (sérums B) et enfin du conjugué anti-IgG ou anti-IgM, on a retrouvé inchangés les titres d'IgG-toxo des sérums A et obtenu dans 6 cas sur 6 une faible positivité au 1/20 en IF-IgM.
- 5) L'absorption par des IgG plasmatiques agrégées par la chaleur ne modifie qu'insconstamment les titres en latex et en Waaler-Rose (tableau 4) et, dans un cas sur 4 seulement (sérum N° 3), provoque une diminution de l'IF-IgM qui, au 1/20, devient à peine décelable. En revanche, des IgG placentaires agrégées par la chaleur ne modifient pas les titres en latex mais négativent totalement l'IF-IgM (tableau 5). Paradoxalement, l'IF-IgG se trouve augmentée après l'absorption des sérums. Ce phénomène est en relation avec la présence d'IgG spécifiquement antitoxoplasmes dans la solution de globulines placentaires utilisées. Inversement, l'absorption sur ces mêmes globulines placentaires de 10 sérums FR- et IgM-toxo+ ne modifie en rien les titres du test de Remington. Enfin, des sérums FR- et IgM- le demeurent après absorption par les globulines placentaires.
- 6) L'absorption par des IgG polymérisées par le glutaraldéhyde provoque une très forte diminution des titres d'anticorps en latex et en Waaler-Rose et surtout une complète négativation de l'IF-IgM (tableau 6).
- 7) L'absorption par des particules de latex sensibilisées avec des IgG humaines a, avec le même type de réactifs mais à quelques mois de distance, conduit à deux séries contradictoires de résultats :
  - pour une première série de 4 sérums, chute des titres en latex et en Waaler-Rose avec négativation totale du test de Remington;
  - au contraire, pour 3 autres sérums fortement positifs en latex et en IF-IgM, l'absorption avec un autre lot de particules de latex sensibilisées n'a provoqué aucune modification des titres.

### 4. DISCUSSION

En présence d'IgG antitoxoplasmes, le facteur rhumatoïde (FR) peut donc être une cause d'erreur pour le test de Remington. Ceci est confirmé par l'ensemble de notre étude et les résultats obtenus à partir de mélanges ou par actions successives de sérums indiquent bien le mécanisme de cette non-spécificité.

La fréquence de ces fausses positivités en IF-IgM est très inégale suivant les auteurs : 91,7 % pour Camargo et al. (1972), 35 % (8/30) d'après Hyde et al. (1975), 85 % pour Yeni et al. (1978). Des différences aussi importantes ne peuvent pas être seulement imputables à des

variations de technique (tests pratiqués avec ou sans contre-coloration par le bleu d'Evans) ou de recrutement des malades examinés.

Il semble qu'interviennent surtout les conditions de lecture et l'on doit distinguer les non-spécificités de réactions indiscutablement positives (15 sérums sur 61, soit 25 % dans l'ensemble de notre étude) et les cas où l'on observe des toxoplasmes plus verdâtres que réellement fluorescents. Ces résultats "douteux" ont été obtenus dans 20 % des cas (12 sérums sur 61) et ils peuvent constituer une cause d'erreur, surtout pour des observateurs peu entraînés.

De toute façon, l'IF-IgM est parfois totalement négative avec sérums renfermant à la fois des IgG antitoxoplasmes et du FR. C'est que probablement le FR est alors constitué d'IgG et non pas d'IgM anti-IgG.

Par ailleurs, les effets des absorptions par différents supports doivent être interprétés avec prudence. Avec des IgG polymérisés par le glutaraldéhyde, on a obtenu, dans une seule série d'exams, des résultats parfaitement cohérents (diminution des titres en FR, disparition des fausses positivité de l'IF-IgM) et qui recourent ceux de Yeni et al. (1978). En revanche, l'absorption par des particules de latex sensibilisées a conduit à deux séries de résultats parfaitement contradictoires bien que les réactifs utilisés aient été chaque fois du même type. Il semble en fait que ce type d'absorption ne soit efficace que pour les sérums où la présence de FR conduit à des tests de Remington "douteux" et non pas fortement positifs. Enfin, suivant leur provenance, des globulines humaines agrégées par la chaleur (tableau 4) peuvent faire en partie disparaître le FR et laisser persister les IF-IgM non spécifiques (globulines plasmatiques) ou, au contraire (tableau 5) - et comme l'ont signalé Camargo et al. (1972) puis Hyde et al. (1975) - éliminer les fausses positivité du test de Remington en laissant inchangés les titres de FR (globulines placentaires).

Ces résultats paradoxaux traduisent sans doute une affinité plus ou moins grande des différents absorbants pour les IgM dosables en FR ou par le test de Remington. Ces observations suggèrent en outre que le FR n'est probablement pas la seule cause de non-spécificité pour le test de Remington mais que peuvent également intervenir des anticorps plus ou moins régulièrement associés au FR mais qui en sont distincts.

D'un point de vue théorique, la connaissance précise de ce phénomène nécessitera l'étude de fractions sériques obtenues par centrifugation en gradient de saccharose ou après passage sur sephadex G 200 à pH 4 (Yeni et al., 1978).

## 5. CONCLUSIONS

Le facteur rhumatoïde (FR) peut être une cause de non-spécificité du test de Remington, pour des sérums contenant par ailleurs des IgG antitoxoplasmes. Suivant les conditions de lecture, ce risque d'erreur varie entre 20 et 25 % des cas. Pour y échapper, il ne nous paraît pas justifié de procéder à une absorption préalable de tous les sérums, comme l'ont proposé Camargo et al. (1972). En effet, la proportion de tests de Remington positifs est très faible en France (environ 1,5 pour 1000 sérums examinés) si bien que cette absorption conduirait à des manipulations inutiles dans la plupart des cas. C'est au contraire le contrôle inverse que nous proposons : pour tout sérum donnant un test de Remington positif, vérifier la présence de FR et procéder à un nouveau dosage des IgM antitoxoplasmes, après absorption sur des globulines humaines d'origine placentaire polymérisées par la chaleur.

## SUMMARY

This paper confirms the finding that rheumatoid factor (RF) can cause non-specific fluorescence in fluorescent-antibody tests for toxoplasmosis carried out with IGM antiserum (Remington test). There is a 20 to 25% risk of such error, depending on the conditions under which the test is read. Elimination of the risk by the subjection of all sera to preliminary absorption, as proposed by Camargo et al., does not seem justified as the proportion of positive Remington tests is very low in France (approximately 1.5 of every 1000 sera tested) and the work involved would be wasted in most cases. What is proposed here is to tackle the problem at the other end by taking every serum with a positive response to the Remington test, testing it for RF, absorbing it on heat-aggregated human globulin of placental origin, and determining its IgM Toxoplasma antibody titre again.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas, P. (1963) L'immunofluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses. Applications à la toxoplasmose (Thèse Médecine, Lyon)
- Ambroise-Thomas, P. (1975) L'immunofluorescence aux anti-IgM marquées dans le dépistage précoce de la toxoplasmose acquise ou congénitale. Bilan de 24 000 examens. In : Compte rendu d'un Colloque sur la Sérologie de l'Infection toxoplasmique, Lyon, Fondation Mérieux, Ed., pp. 131-139
- Camargo, M. E., Leser, P. G. & Rocca, A. (1972) Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescent test. A technique for specific results, Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 14, 310-313
- Hyde, B., Barnett, E. V. & Remington, J. S. (1975) Method for differentiation of non specific Toxoplasma IgM fluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor, Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 148, 1134-1188
- Yeni, P., Segond, P., Massias, P. & Pillot, J. (1978) False positive IgM anti-Toxoplasma fluorescence test due to rheumatoid factor, Lancet, 1, 219

TABLEAU 1. IMMUNOFLUORESCENCE DE LA TOXOPLASMOSE (IF-IgG et IF-IgM)  
PRATIQUÉE SUR DES SERUMS POSITIFS EN FACTEUR RHUMATOÏDE

112 sérums	
Latex+	1/20 à 1/2560
Waler Rose+	1/20 à 1/1280



61 sérums	
IgG-toxo+	1/20 à 1/200 (8 à 80 UI)



15 sérums	
IgM-toxo+	1/20 à 1/80
12 sérums	
IgM-toxo+	à 1/20

TABLEAU 2. FACTEUR RHUMATOÏDE DANS 15 SERUMS POSITIFS  
EN IF-IgG et IF-IgM DE LA TOXOPLASMOSE

15 sérums	
IgM-toxo+	1/20
IgG-toxo+	1/20 à 1/3200 (8 à 1280 UI)



1 sérum	
FR+	
Latex	1/80
Waler Rose	1/20

TABLEAU 3. FACTEUR RHUMATOIDE (LATEX) IF-IgG ET IF-IgM-TOXO  
SUR DES MELANGES DE SERUMS IgG-TOXO+ AVEC DES SERUMS FR+

Mélange N°	Sérums A			Sérums B			Mélanges A + B		
	IgG- toxo	IgM- toxo	Latex	IgG- toxo	IgM- toxo	Latex	IgG- toxo	IgM- toxo	Latex
1	800 <sup>a</sup>	0	0	0	0	320	800	20	160
2	400	0	0	0	0	320	200	0	160
3	800	0	0	0	0	160	400	20	80
4	400	0	0	0	0	160	400	20	160

<sup>a</sup> - Inverses des titres.

TABLEAU 4. RESULTATS DE L'ADSORPTION PAR DES  
GLOBULINES PLASMATIQUES AGREGEES PAR LA CHALEUR

Sérum N°	Avant adsorption				Après adsorption			
	Latex	Waller- Rose	IgG-Toxo	IgM-Toxo	Latex	Waller- Rose	IgG-Toxo	IgM-Toxo
1	640	160	20	20	80	40	20	20
2	320	640	20	20	320	320	40	20
3	1 280	320	20	20	640	160	20	+ 20
4	640	20	20	20	40	20	20	20

TABLEAU 5. RESULTATS DE L'ABSORPTION PAR DES GLOBULINES  
PLACENTAIRES AGREGÉES PAR LA CHALEUR

Sérums N°	Avant absorption			Après absorption		
	Latex	IgG	IgM	Latex	IgG	IgM
1	640	20	20	640	200	0
2	320	20	20	320	200	0
3	1 280	20	20	1 280	200	0
4	640	20	20	640	200	0
5	2 560	20	40	2 560	200	0
6	80	20	20	80	200	0
7	2 560	200	80	2 560	400	0
8	2 560	20	40	2 560	200	0
9	160	20	20	160	200	0
10	80	20	20	80	200	0
11	320	20	20	320	200	0
12	640	20	20	640	200	0
13	2 560	20	40	2 560	200	0

TABLEAU 6. ABSORPTION PAR DES GLOBULINES POLYMERISEES PAR LE GLUTARALDEHYDE

Sérums N°	Avant absorption				Après absorption			
	Latex	Waler-Rose	IgG-toxo	IgM-toxo	Latex	Waler-Rose	IgG-toxo	IgM-toxo
1	640	160	20	20	80	40	20	0
2	320	640	20	20	160	80	20	0
3	1 280	320	20	20	320	80	20	0
4	640	20	20	20	160	20	20	0

= = =