

Une méthode d'évaluation des densités microfilariennes d'*Onchocerca volvulus* Leuckart, 1893 chez des onchocercuiens : technique et temps de lecture des biopsies cutanées

par J.-J. PICQ,¹ J. COZ² & J. P. JARDEL³

Onchocerca volvulus à l'état adulte comme à l'état larvaire est un parasite du tissu sous-cutané de l'homme, et la majorité des auteurs s'accordent à l'heure actuelle à penser que la meilleure méthode de diagnostic parasitologique de l'onchocercose humaine est la biopsie cutanée exsangue ou « snipping » ou « snip ».

Il paraît par ailleurs logique de considérer que le nombre de larves filariennes ou microfilaires qui infiltrent le revêtement cutané est en rapport direct avec l'importance de la population filarienne elle-même.

D'où l'idée de substituer au « snip qualitatif », qui traduit simplement la présence ou l'absence de microfilaires, le « snip quantitatif » qui, par numération des microfilaires issues du fragment biopsié, pourrait permettre une évaluation du degré d'infection, de la charge ou fardeau filarien (Comité OMS d'experts de l'Onchocercose, 1966).

Quelques auteurs se sont attachés à ce problème mais leurs méthodes d'évaluation restent d'application délicate car les biopsies réalisées aux ciseaux courbes ou à la lame de rasoir sont généralement de taille et de forme inégales, d'où la nécessité de ramener le nombre de microfilaires à l'unité de poids (Duke, 1962; Kershaw et al., 1954; Woodruff et al., 1966) ou de surface (Lagraulet & Bard, 1969).

Nous avons été guidé par le souci de mettre au point une technique qui, tout en étant suffisamment fidèle et sensible, reste simple et facilement reproductible pour être praticable en tous lieux et notamment dans les conditions de travail sur le terrain.

¹ Médecin Chef, Section Parasitologie, Centre Muraz, Organisation de Coopération et de Coopération pour la Lutte contre les grandes Endémies (OCCGE), Bobo-Dioulasso, Haute-Volta.

² Entomologiste de l'Office de la Recherche scientifique et technique Outre-Mer (ORSTOM), Section Entomologie, Centre Muraz.

³ Statisticien, Assistant à l'École nationale de Santé publique, Rennes, France.

Cette technique repose essentiellement sur l'utilisation, pour les biopsies, d'une pince emporte-pièce et sur l'emploi de l'eau distillée pour l'étude de la sortie des microfilaires des fragments cutanés, étude qui a permis le choix raisonné d'un temps de lecture des numérations microfilariennes.

Cette technique est susceptible d'un certain nombre d'applications qui seront évoquées en conclusion.

Matériel et méthode

La pince emporte-pièce utilisée était employée primitivement par les ophtalmologistes pour l'opération du glaucome (Toufic, 1969).

Cette pince permet une biopsie rapide, quasi indolore, exsangue pour l'ensemble des peaux, qu'il s'agisse d'une peau d'enfant, d'adulte ou de vieillard, d'homme ou de femme; quelques secondes après le prélèvement, on peut voir sourdre une légère rosée sanglante.

De plus, la cicatrisation de la petite plaie est excellente; la reconstitution de l'épithélium se fait en 5 à 7 jours et la repigmentation en 1 à 2 mois.

Ces caractéristiques font que les biopsies répétées et le cas échéant multiples sont bien acceptées par le malade.

D'un intérêt plus grand encore est le fait que cette pince permet d'obtenir des snips de formes sensiblement identiques et de tailles sensiblement égales. Les fragments de peau, une fois dépliés à la pointe de deux vaccinostyles, apparaissent ronds ou ovalaires et d'un diamètre moyen de 3 mm; leur poids est voisin de 0,7 mg.

Afin de procéder à la numération des microfilaires, les snips sont placés sur une lame porte-objet et recouverts d'une goutte d'eau distillée.

L'emploi de l'eau distillée en lieu et place de l'eau physiologique se justifie pour les raisons suivantes: les mouvements des microfilaires y sont plus lents et elles n'ont pas tendance à s'agglomérer en paquets comme elles le font parfois en eau physiologique.

Dès lors les numérations peuvent se faire à l'état frais à un faible grossissement du microscope et avec un minimum d'erreur.

De plus la sortie des microfilaries issues naturellement des fragments biopsiés en fonction du temps revêt une allure intéressante que nous avons étudiée sur 96 snips pratiqués chez 32 sujets d'âges et de sexes différents et présentant des taux divers d'infection; tous les sujets étaient des onchocercariens originaires des savanes voltaïques.

Les snips ont été prélevés au niveau de la ceinture pelvienne dans le cadran supéro-externe de la région fessière.

Les numérations des microfilaries issues naturellement des fragments biopsiés placés en eau distillée ont été faites au bout de 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 et 120 minutes.

Résultats

Dans les conditions ci-dessus, on observe que le nombre de microfilaries croît avec le temps et se stabilise au bout de 120 minutes et on peut admettre qu'alors 95% environ des microfilaries sont sorties du fragment (tableau 1).

Le tableau 1 fournit, dans la colonne 2, le nombre cumulé des microfilaries sorties à chaque temps de la mesure. On en déduit, dans la colonne 1, le nombre de microfilaries sorties entre deux mesures, tandis que les colonnes 3 et 4 représentent les pourcentages

Tableau 1. Répartition dans le temps des sorties de microfilaries sur l'ensemble de 96 snips

Temps (minutes) t à t+h	Nombre total de microfilaries sorties entre t et t+h (1)	Nombre cumulé de microfilaries sorties à t+h (2)	Pourcentages de microfilaries sorties entre t et t+h (3)	Pourcentages cumulés (4)
0-9	1710	1710	28,1	28,1
10-19	903	2613	14,9	43,0
20-29	847	3460	13,9	56,9
30-39	693	4153	11,4	68,3
40-59	840	4993	13,8	82,1
60-79	587	5580	9,7	91,8
80-99	276	5856	4,5	96,3
100-119	223	6079	3,7	100,0
Total	6079		100,0	

correspondant à ces deux séries (on a admis dans ce cas, pour la simplification du calcul, que non plus 95% des microfilaries mais 100% sont sorties au bout de 120 minutes).

La représentation graphique en coordonnées cartésiennes des données de ce tableau 1 (fig. 1) visualise l'allure du phénomène, d'une part sous la forme d'un histogramme de répartition des sorties de microfilaries dans le temps, d'autre part sous la forme du diagramme des fréquences cumulées correspondantes.

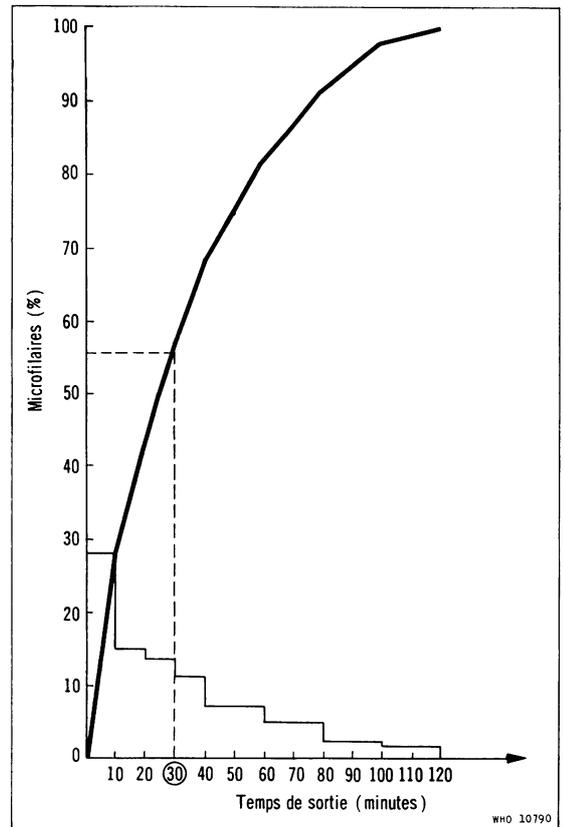


Fig. 1. Histogramme de répartition des sorties de microfilaries dans le temps et diagramme de fréquences cumulées correspondantes

De plus, en portant sur papier semi-logarithmique en abscisse le temps de sortie des microfilaries et en ordonnée le logarithme des fréquences relatives (fig. 2), les points obtenus s'ordonnent sensiblement suivant une droite et l'allure du phénomène évoque une distribution exponentielle décroissante.

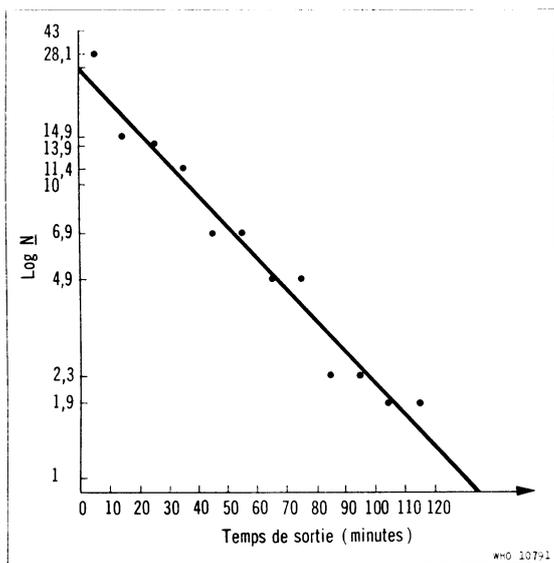


Fig. 2. Courbe de sortie des microfilaries en fonction du temps avec en ordonnée le logarithme des fréquences relatives

Mais quelle que soit l'interprétation que l'on donne du phénomène, on est tenté de choisir le point 30 minutes pour l'appréciation de la charge microfilarienne. En effet ce point correspond au moment où plus de 50% des microfilaries sont

sorties en moyenne: c'est le temps de sortie 50% des microfilaries ou TS_{50} . Ce point peut être trouvé par le calcul ou estimé graphiquement sur la figure 1.

Enfin la comparaison du nombre des microfilaries sorties à 30 minutes et à 120 minutes, établie sous forme d'un tableau de corrélation (tableau 2), à partir de l'observation de 48 doubles snips, met en évidence une liaison très nette entre les deux variables. Cette liaison est confirmée par un coefficient de corrélation de rang de Spearman égal à 0,89 et très significativement différent de 0.

Discussion

L'évaluation des densités microfariennes a été volontairement et essentiellement abordée sous l'angle de l'étude statistique de leurs numérations dans les conditions bien précises de la technique proposée.

Notre but n'était pas de connaître le nombre exact de microfilaries contenues dans un fragment de peau, mais de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une liaison entre temps de sortie des microfilaries et nombre de microfilaries, corrélation susceptible de donner un reflet suffisamment fidèle de la véritable densité microfilarienne. C'est pourquoi nous avons écarté des manœuvres qui rendaient la technique plus complexe, telle que la dilacération du fragment (Duke, 1962) ou le séjour en eau physiologique pendant une nuit suivi d'une filtration et d'une centrifugation (Nelson et al., 1966).

Tableau 2. Corrélation entre les nombres de microfilaries sorties à 30 et à 120 minutes ^a

	Nombre de microfilaries sorties à 120 minutes							Total
	1-19	20-99	100-199	200-299	300-399	400-499	500 et +	
Nombre de microfilaries sorties à 30 minutes								
0-9	12	1						13
10-49	1	16	1					18
50-99		1						1
100-149			2	3				5
150-199				2	3	1		6
200-249					3			3
250-299					1	1		2
300 et +								
Total	13	18	3	5	7	2		48

^a Les observations portent sur 48 paires de snips.

Conclusion

Nous proposons une méthode standardisée d'évaluation des densités microfilariennes d'*O. volvulus* chez des onchocerciens. Cette méthode simple est utilisable notamment lors d'enquêtes sur le terrain.

Elle repose essentiellement sur l'usage d'une pince emporte-pièce ophtalmologique et l'emploi d'eau distillée en lieu et place de l'eau physiologique pour l'examen des biopsies cutanées.

La numération des microfilaires issues naturellement des snips est faite au bout de 30 minutes, temps qui correspond au moment où 50% des microfilaires sont sorties en moyenne (temps de sortie 50% ou TS₅₀).

Ce travail préliminaire, complété par l'étude de la répartition des microfilaires en différents points de la surface cutanée et par l'étude de leurs variations éventuelles au cours du nyctémère, doit conduire à un certain nombre d'applications telles que:

— l'évaluation de la charge microfilarienne d'une collectivité donnée à un moment donné;

— l'évaluation du degré de l'infection onchocercienne chez l'individu;

— l'étude des variations des densités microfilariennes comme critère d'action d'un médicament macro- ou microfilaricide. Nous verrons ultérieurement que les résultats obtenus dans ces applications permettent de préciser la valeur et les limites de la technique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Budden, F. H. (1963) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **57**, 64-70
- Comité OMS d'experts de l'Onchocercose (1966) *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, N° 335
- Duke, B. O. L. (1962) *Bull. Org. mond. Santé*, **27**, 632-639
- Kershaw, W. E., Duke, B. O. L. & Budden, F. H. (1954) *Brit. med. J.*, **2**, 724-729
- Lagraulet, J. & Bard, J. (1969) *Bull. Soc. Path. exot.*, **62**, 601-605
- Nelson, G. S., Amin, M. A., Blackie, E. J. & Robson, N. (1966) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **60**, 17
- Toufic, N. (1969) *Afr. méd. (Dakar)*, **8**, 587-588
- Woodruff, A. W., Choyce, D. P., Pringle, C., Laing, A. B. C., Hills, M. & Wegesa, P. (1966) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **60**, 695-706

Contribution à l'étude des variations d'adaptation et d'ubiquité de la souche ouest-africaine de *Trichinella spiralis**

par S. GRÉTILLAT¹

Depuis les travaux de Nelson & Mukundi (1963) sur la souche kényenne de *Trichinella spiralis* qu'ils ont isolée à partir d'un serval, on sait maintenant que ce nématode, pourtant très ubiquiste, peut présenter des souches véritablement inféodées aux carnivores, alors que les rongeurs et le porc domestique sont peu ou pas réceptifs.

Des caractères identiques ont été mis en évidence chez la souche ouest-africaine de *T. spiralis* isolée en 1967 par Grétilat & Vassiliadès sur chacal et phacochère, puis testée au laboratoire sur plusieurs mammifères: chat, chien, porc, rat, souris, lapin, cobaye, chacal, phacochère, genette, rat de Gambie,

hérisson (Grétilat & Vassiliadès, 1968; Grétilat & Chevalier, 1971).

A l'heure actuelle, les réservoirs de parasites sont, en Afrique de l'Ouest, les carnivores sauvages et accessoirement le phacochère (Grétilat & Chevalier, 1971).

Les rongeurs (lapin, souris, rat) sont très peu sensibles et peu réceptifs. Les kystes larvaires sont détruits par calcification avec mort de la larve quelques jours après son arrivée dans les muscles. Chez la souris, ce processus est tellement rapide et précoce que lors des autopsies un peu tardives (30 à 35 jours) on ne peut plus retrouver les formes larvaires. Chez cette espèce, il existe en outre une auto-défense de l'organisme dès les premiers jours suivant le repas infestant avec destruction d'un très grand nombre de vers adultes au niveau de l'intestin grêle.

Le porc domestique a un comportement sensiblement identique à celui de la souris, la destruction

* Les subsides qui ont permis cette étude ont été en partie fournis par l'Organisation mondiale de la Santé.

¹ Attaché de recherches au Laboratoire de Parasitologie, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 94 Maisons-Alfort, France.