

LE DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE DE L'ONCHOCERCOSE
REVUE CRITIQUE DES METHODES EN USAGE

par

A. PROST (1) et J. PROD'HON (2)

(1) Parasitologue, programme de lutte contre l'onchocercose, O.M.S., Ouagadougou.

(2) Helminthologiste de l'O.R.S.T.O.M., médecin-chef de la section parasitologie du Centre Muraz, Bobo-Dioulasso (Mission O.R.S.T.O.M. auprès de l'O.C.C.G.E.).

22 DEC. 1978

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° AT 9516 (Ext. Rév.)

SUMMARY

PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS OF ONCHOCERCIASIS A CRITICAL REVIEW OF PRESENT METHODS

The different methods used for the parasitological diagnosis of onchocerciasis are compared to test their reliability, sensitivity and practicability under field conditions in the Sudan-Savanna area. Two skin snips taken from both iliac crests with a sclerocorneal punch give the best results during large scale field surveys.

The incubation of biopsies in normal saline solution is the most sensitive technique and the results may be further improved by filtration on millipore filter-paper and collagenase digestion. However, counting microfilariae emerged after 30 minutes in distilled water is the easiest method and gives a reasonably good reliability for comparison of the results in space and time. The lack of sensitivity can be compensated for by incubation of the negative specimen during 24 hours in saline solution.

I. - INTRODUCTION

L'un des progrès majeurs réalisé au cours des dernières années dans le diagnostic de l'onchocercose fut l'introduction en pratique courante des méthodes quantitatives pour apprécier l'intensité du parasitisme proposées par DUKE (17) puis par PICQ (59, 60). Il est apparu que le dénombrement des microfilaries au cours d'un examen standardisé permettait la détermination d'une charge parasitaire dont la valeur était corrélée dans certaines limites avec l'existence de complications oculaires ou cutanées et avec des niveaux moyens de transmission estimés par les entomologistes (80).

Dès lors, la notion de "densité microfilarienne moyenne" dans une communauté s'imposait à la fois

comme un index de gravité et comme un facteur de risque.

La mise sur pied du programme régional de lutte contre l'onchocercose dans le bassin de la Volta (OCP) a été l'occasion d'étudier comparativement en fonction de cette donnée nouvelle toutes les méthodes de diagnostic proposées et de déterminer quelles sont celles qui présentent la plus grande fiabilité, qui sont aisément praticables en examen de masse, dont les résultats sont reproductibles par un second observateur et de définir les limites de confiance de chacune.

S'agissant de quantifier une charge parasitaire, nous ne discuterons que celles qui permettent la mise en évidence du parasite, sous sa forme adulte ou microfilarienne, et ne citerons que pour mémoire les autres techniques utilisées. L'essentiel de la discussion sera consacré aux modalités de la biopsie cutanée qui est apparue comme la méthode de choix en Afrique de l'Ouest et plus particulièrement dans l'aire d'OCP et dans les Etats membres de l'Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (O.C.C.G.E.).

II. - METHODES DE MISE EN EVIDENCE INDIRECTE DU PARASITE

— L'épreuve de Mazzotti

L'administration de 25 à 50 mg de diéthylcarbazine (D.E.C.) à un onchocercien provoque dans un délai de 15 minutes à 25 heures une réaction prurigineuse due au phénomène de migration et de destruction des microfilaries.

Ce phénomène peut constituer un moyen de diagnostic si le parasite n'a pu être mis en évidence (42, 12, 49, 38, 7), en particulier dans les infections légères. Bien qu'il soit le plus souvent mal accepté par les populations, ce moyen d'investigation a été employé lors d'enquêtes de masses (66).

L'absence d'indication précise sur l'intensité de l'infection nous a fait écarter cette méthode qui ne se prête pas à des comparaisons de résultats à intervalles réguliers. De plus, sa fiabilité n'est pas totale : erreurs par défaut dues au fait qu'un certain nombre d'onchocerciens ne réagissent pas à la D.E.C. (2 p. cent environ selon PICQ, comm. pers.) dont les porteurs de lésions cutanées du type Sowda (19) ; erreurs par excès telles que celles observées en Haute-Volta où le test de Mazzotti a élevé la prévalence de 25,5 p. 100 à 65,8 p. 100 dans des villages manifestement hypoendémiques (48), ou telles que celles de la clinique dermatologique d'Abidjan qui constate 11,8 p. 100 de positifs à la biopsie cutanée exsanguine pour 84,5 p. 100 de positifs au test de Mazzotti dans un échantillon (53). Dans ces deux cas, les résultats de l'une des deux techniques sont manifestement erronés.

Cette épreuve doit donc être réservée à l'identification d'infections latentes concurremment avec les méthodes classiques de mise en évidence du parasite.

— Les lésions cutanées et ophtalmologiques

Il s'agit toujours de complications de l'onchocercose dont certaines peuvent subsister après guérison parasitologique. Il est donc utile de les rechercher pour apprécier la gravité de l'affection et son retentissement général. Mais elles ne peuvent pas servir à l'estimation de la prévalence du parasite dans la population.

De même l'éosinophilie est un symptôme constant mais non pathognomonique.

— L'immunodiagnostic

Nous n'avons pas utilisé les méthodes sérologiques en enquête de masse, aucune n'étant encore aisément praticable et suffisamment fiable. L'absence d'antigènes spécifiques, la réactivité croisée avec d'autres méthodes rendent difficiles la détermination des positivités vraies.

L'immunofluorescence indirecte ou le test "Elisa" sont prometteurs, mais restent du domaine de la recherche et ont une valeur encore faible lors des études épidémiologiques.

III. - METHODES DE MISE EN EVIDENCE DIRECTE DU PARASITE

— Découverte du ver adulte

La recherche des onchocercomes (ou kystes sous-cutanés ou nodules onchocerciens) dans lesquels sont pelotonnés un ou plusieurs couples d'*Onchocerca volvulus*, Leuckart 1893, est la plus ancienne des méthodes de diagnostic et est encore une pratique de routine au cours de la plupart des enquêtes.

Outre les ganglions et les rares nodules d'étiologie différente, la principale erreur par excès vient du fait que la palpation d'un kyste ne signifie pas que celui-ci soit forcément un signe d'onchocercose active. 10 p. cent environ de la population de vers adultes sont normalement morts, dégénérés ou calcifiés et quelques kystes sont vides de tout parasite, bien que la trace de leur présence y reste visible (72). A moins de dissection puis de digestion des tissus à la collagénase (73) la seule présence des kystes ne peut constituer un moyen d'appréciation dans le temps des résultats d'une campagne de lutte ni donner autre chose qu'une grossière estimation de la prévalence du parasitisme.

Si la majorité des kystes siège en regard des plans osseux au niveau sous-cutané, d'autres sont profonds et non palpables : localisations dans l'orbite (20), dans l'articulation coxofémorale (18). Un certain nombre d'adultes sont libres dans les tissus sous-cutanés (52), où ils ont pu être mis en évidence lors d'opérations de hernie (6), voire dans le pus d'abcès (56).

La palpation des nodules garde un intérêt épidémiologique si le taux des porteurs de kystes est en relation constante avec le taux réel de malades.

Une première grille avait été proposée pour la Côte-d'Ivoire par RIVES (66) : nous en avons confirmé les grandes lignes par une étude de corrélation dans 32 villages de savane (soit 64 échantillons, chaque sexe étant traité séparément ; tous les taux utilisés sont ajustés pour l'âge par référence à une population standard pour les rendre comparables).

Il en ressort qu'il existe une relation linéaire entre le taux de porteurs de kystes que nous appellerons x et le taux de porteurs de microfilaries que nous appellerons y . Le coefficient de corrélation entre les deux séries $r = 0,82$ est satisfaisant.

Les valeurs s'ordonnent autour d'une droite de régression empirique dont la représentation graphique passe par les valeurs mathématiques qui la définissent :

1. Le centre de gravité des données $G(\bar{x}, \bar{y})$. Dans notre série, il correspond à 72,7 p. 100 de porteurs de microfilaries (valeur \bar{y}) pour 40 p. 100 de porteurs de kystes (valeur \bar{x}).

2. L'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées (valeur de y pour $x = 0$) qui donne le pourcentage théorique de porteurs de microfilaries en l'absence de porteurs de kystes. Ici pour $x = 0$, $y = 40,8$ p. cent.

Un exemple soulignera l'inconstance de la mise en évidence des vers adultes, et l'ampleur des erreurs de diagnostic par défaut auxquelles elle peut conduire : dans le foyer hyperendémique du Haut-Sassandra, en Côte-d'Ivoire, sur 1.388 sujets examinés, 1.169 ont été trouvés porteurs de microfilaries dermiques et 747 porteurs de kystes. Sur ces 747 porteurs de kystes, six seulement ont présenté une biopsie négative. Par contre, sur les 1.169 sujets présentant une biopsie positive, 428 ne présentaient pas de kyste décelable à l'examen clinique.

— Découverte de la microfilaire

a) XÉNODIAGNOSTIC

Il s'agit de la découverte de microfilaries d'*O. volvulus* dans le repas sanguin d'une similie fraîchement gorgée sur un patient suspect.

Même si la similie manifeste une habileté particulière pour absorber des microfilaries chez des sujets faiblement parasités, cette technique est suffisamment complexe pour rester du domaine de la recherche et être réservée aux études de transmission.

b) MICROFILAIRES DANS LES MILIEUX AUTRES QUE LA PEAU

Des microfilaries d'*O. volvulus* ont été trouvées dans la plupart des tissus ou des milieux : localisation dans les tissus profonds (67), dans le sang et la lymphe (29, 46, 30, 15, 25, 26), dans le liquide céphalo-rachidien (45, 22, 13), dans les crachats et les larmes (2), dans les sécrétions gynécologiques (16, 78).

Ces localisations, souvent consécutives à l'administration de médicaments filaricides, n'ont pas de valeur épidémiologique. Deux milieux méritent toutefois une mention particulière :

— l'urine, où la présence de microfilaries a été détectée depuis longtemps (46, 63) mais où ce symptôme n'a acquis que récemment une valeur épidémiologique (11, 10, 62, 2, 4). Dans la zone du programme OCP, en hyperendémie, la microfilarurie est présente chez 1,8 p. 100 à 36,5 p. 100 de la population des villages, avec une moyenne de 18,6 p. 100 chez les hommes et 9,1 p. 100 chez les femmes. Mais ce symptôme a toujours été associé à un fort degré de parasitisme cutané et n'a jamais été observé isolément. Son association significative avec la présence d'autres complications graves d'onchocercose, cutanées ou oculaires, en font un témoin de la gravité de la maladie ;

— l'œil, où, selon enquêtes, le parasite est présent dans des proportions allant jusqu'à 60 p. 100 de la population de plus de 5 ans. Il existe quelques cas où le parasite est présent dans l'œil sans qu'il soit possible de le mettre en évidence dans la peau par les méthodes les plus sensibles. Sur un échantillon de 7.584 individus examinés parmi lesquels 4.566 présentaient des biopsies dermiques positives, 30 n'ont été trouvés porteurs de microfilaries que dans l'œil. Si la prévalence de la maladie dans l'échantillon n'en a été que peu affectée (60,6 p. 100 au lieu de 60,2 p. 100), ceci permet d'affirmer que l'ophtalmologiste peut détecter 1 p. 100 de malades parmi les sujets à biopsie négative (30 pour 3.018).

c) MICROFILAIRES DERMIIQUES

La couche superficielle du derme constitue le lieu d'élection des microfilaries d'*O. volvulus* (36) et la recherche des microfilaries dermiques est toujours la méthode de diagnostic la plus précise de la maladie. Deux procédés sont concurremment employés : la scarification et la biopsie cutanée exsanguée.

La scarification

Préconisée par d'HOOGHE en 1934 pour la première fois, son efficacité a été appréciée par de nombreux auteurs (33, 83, 44, 47, 5, 55, 66). Elle est actuellement recommandée par l'école belge qui l'a normalisée : pratiquer quatre incisions de 8 mm de long espacées de 2 mm à la face supéro-externe du bras ; après dix secondes, pincer la peau et recueillir le suc dermique mélangé de sang par apposition à cinq ou six reprises d'une lame porte-objet ; après séchage, colorer la lame au Giemsa (24, 23, 85).

Cette technique a l'avantage de permettre en Afrique Centrale le diagnostic différentiel sur lame colorée de *Tetrapetalonema streptocerca*.

Après plusieurs essais, nous avons écarté cette méthode pour les motifs suivants :

a) toutes les recherches de *T. streptocerca* en zone de savane d'Afrique de l'Ouest ont jusqu'ici été négatives. PRISTER (58) est le seul à signaler en Haute-Volta 5 cas importés. Le diagnostic différentiel des deux espèces de microfilaries dermiques ne paraît donc pas s'imposer ici de façon systématique ;

b) en zone de savane, la recherche des microfilaries dans la région scapulaire est moins sensible qu'en d'autres sites ;

c) la pratique des scarifications est douloureuse et mal acceptée partout où nous l'avons testée ;

d) cette technique se prête mal à la quantification ;

e) la sensibilité de la biopsie est plus grande (35) ; sur un échantillon d'une équipe OCP, l'ordre de

grandeur était de 74,4 p. 100 de positifs par biopsie pour 23,3 p. 100 par scarification, et au Cameroun de 91 p. 100 contre 48 p. 100 (65).

La biopsie cutanée exsangue

D'usage aussi ancien que la scarification, elle est directement dérivée des travaux de MONTPELLIER et LACROIX (50) qui travaillaient sur des fragments cutanés fixés pour examen anatomo-pathologique.

Elle consiste à exciser un lambeau de peau de 1 à 2 mg englobant les couches superficielles du derme et à le placer dans de l'eau distillée ou physiologique. Les microfilaires émises sont observées à l'état frais au microscope ou à la loupe binoculaire (43, 17, 40, 39, 59, 60, 61).

Cette technique a été proposée pour toutes les enquêtes épidémiologiques en zone de savane ouest-africaine (64, 51). Ce sont ses modalités pratiques que nous allons développer ici.

VI. - LA BIOPSIE CUTANÉE EXSANGUE OU "SNIP"

Les paramètres à prendre en considération sont les suivants : le site, le nombre et la dimension des biopsies, le mode et l'horaire de prélèvement, les milieux d'incubation, les temps de lecture, la reproductibilité des résultats.

Site et nombre des biopsies

Les sites anatomiques habituellement considérés sont : l'épaule (région deltoïdienne ou pointe de l'omoplate), la crête iliaque, le mollet et plus accessoirement la marge externe de l'œil. Le choix n'en est pas indifférent, les variations interindividuelles liées au site étant très importantes (68). La ceinture pelvienne est significativement plus sensible que le mollet [PICQ et JARDEL (61) : risque inférieur à 1 pour 1.000], celui-ci donnant des résultats supérieurs à ceux obtenus au niveau de l'omoplate. Il est de plus exceptionnel qu'un malade soit négatif au niveau de la crête iliaque et positif en un autre site.

On ne peut pas mettre en évidence de différence entre les localisations droite et gauche de la ceinture pelvienne (61). Nos résultats sont comparables à ceux de PICQ et JARDEL : il existe une excellente corrélation quantitative entre les effectifs microfilariens dénombrés de chaque côté (tableau I). En moyenne, 60 p. 100 des lectures se rangent de chaque côté dans la même classe numérique ; 1,06 p. 100 du total des lectures (2,3 p. 100 des lectures positives) seulement diverge de façon importante (le résultat n'est situé ni dans la classe concordante, ni dans la voisine la plus proche).

L'analyse qualitative des mêmes données (tableau II) montre que la pratique d'un second snip à la crête iliaque est de nature à modifier significativement les résultats par rapport à la biopsie unique :

TABLEAU I

Corrélations quantitatives entre snip droit et gauche (localisation crête iliaque) chez 38.878 sujets examinés ; lecture effectuée selon la méthodologie OMS/OCP.

Snip 2	Snip 1	Négatif	1 à 9 mf	10-49 mf	50-99 mf	100-199 mf	200 + mf
Négatif		20.825 94,7 %	1.170	75	7	—	—
1 à 9 mf		1.018	3.833 64,2 %	1.055	35	12	—
10-49 mf		63	942	4.357 68,1 %	858	76	5
50-99 mf		2	42	888	1.673 56,8 %	350	18
100-199 mf		1	5	57	336	936 65,9 %	84
200 et + mf		—	—	2	11	49	93 53,2 %

Droite de corrélation et % moyens de concordance.

le gain de prévalence est en moyenne de 5,3 p. 100 dans l'échantillon examiné, ce qui légitime l'usage de la double biopsie.

TABLEAU II

Corrélations qualitatives entre snip droit et gauche à la crête iliaque.

Snip 2	Snip 1	Négatif	Positif
Négatif		20.825	1.252 5,7 %
Positif		1.084 4,9 %	15.717

Par contre, l'emploi d'une troisième ou d'une quatrième biopsie n'est pas significativement plus sensible et ne se justifie pas, à *fortiori* si elle siège à l'omoplate ou au mollet.

La concentration des microfaires dans la peau de la commissure temporale des paupières (*outer canthus*) serait, selon les ophtalmologistes, en relation avec l'intensité du parasitisme oculaire et pourrait être un indicateur précoce du degré de risque encouru par l'œil (31, 32, 1, 27). En matière de diagnostic de la maladie, cet examen nous est apparu constamment moins sensible que les biopsies en d'autres sites : en hyperendémie, il n'est positif que chez 30 p. 100 des sujets environ. Il s'agit donc non d'une méthode de diagnostic, mais d'un élément d'information supplémentaire sur la maladie dont nous ne discuterons pas ici la valeur.

Mode de prélèvement et dimensions des biopsies

Les techniques usuelles consistaient à provoquer une ischémie locale en pinçant la peau dans une pince à forcipression ou en la soulevant à la pointe d'une aiguille. Un fragment était alors détaché soit aux ciseaux, soit avec une lame de rasoir. Cette biopsie devait être exsangue pour éviter la contamination par microfaires sanguines et intéresser une épaisseur de derme égale à 6 ou 8 fois celle de l'épiderme au moins (23). Les fragments obtenus variaient en taille et en poids, d'où la nécessité de les peser (17, 86), voire de les mesurer (8, 9, 76) pour ramener le total des microfaires dénombrées à une unité standard de poids, de volume ou de surface.

Depuis quelques années s'est imposé l'usage d'une pince emporte-pièce à sclérectomie introduite en 1968 par SCHEFFEL et généralisée par TOUFIC (81, 82).

Elle présente l'avantage, tout en facilitant le prélè-

vement, de recueillir des fragments cutanés de poids et taille plus homogènes que le rasoir ou les ciseaux.

Il en existe deux types et plusieurs modèles : le type Walzer, calibre 1,8 mm ou 3 mm (Moria) ou calibre 2,3 mm (Klein) et le type Holth, de diamètre 2 mm (Storz).

La pince de calibre 1,8 mm est à écarter. Elle ne peut prélever une profondeur suffisante de derme et donne de multiples erreurs par défaut.

La pince Walzer 2,3 mm donne à la crête iliaque des biopsies de poids moyen 1,85 mg [déviatoin standard $S_x = 0,014$, Brinkmann (9)], 1,52 mg [déviatoin standard = 0,07, Rougomont (64)] et 1,4 mg [Fuglsang et Anderson (27)], ce qui est assez homogène et limite à des faibles effectifs les valeurs extrêmes. La surface moyenne est de 6,01 mm² [déviatoin standard = 0,09, Brinkmann (9)].

La pince Holth 2 mm donne des biopsies de poids moyen plus élevé : 2,84 mg, déviatoin standard = 0,16 (57, 64).

Aucun des modèles n'est supérieur aux autres en précision : le coefficient de variation pondérale est d'environ 30 p. 100 dans tous les cas, quels que soient la pince ou le site, mais les différences de poids ou taille n'influent pas sur le diagnostic d'intensité de l'infestation et "lorsqu'on prend en considération le dénombrement des microfaires issues de snips de poids connu, leur nombre moyen, pour un groupe donné de population, n'est pas proportionnel au poids moyen des snips" (64). D'autres auteurs avaient obtenu les mêmes résultats (78, 79).

Nous avons nous-mêmes cherché à vérifier si le nombre de microfaires dénombrées dans un snip variait suivant que celui-ci était obtenu avec la pince Walzer 2,3, ou avec la pince Holth dont on vient de voir la tendance à prélever des fragments plus lourds. Deux biopsies ont donc été effectuées successivement chez le même individu à 1 cm d'écart sur la crête iliaque droite, l'une avec une pince Klein, l'autre avec une pince Holth, et examinées en eau distillée après 30 minutes.

Sur 120 paires de snips, 58 comptages ont été plus élevés pour le prélèvement avec "Holth", 56 pour le prélèvement avec "Klein", et 6 ont donné des chiffres semblables. Il n'y a donc pas de biais systématique en faveur de l'un des instruments et le coefficient de corrélation entre les valeurs des deux séries de lecture est $r = 0.84$. L'usage de l'une ou l'autre pince semble donc indifférent.

Périodicité du parasite

Par analogie avec les espèces de microfaires sanguicoles, a été recherchée dans l'onchocercose l'éventualité d'une périodicité des microfaires. Les diffé-

rents travaux effectués n'ont pu démontrer l'existence d'un véritable cycle ni au cours des heures diurnes, ni au cours des 24 heures (36, 61), mais certains auteurs ont mis en évidence des variations d'amplitude de la densité microfilarienne au cours de la journée (41, 76, 21, 84, 2).

On a suggéré la possibilité d'une variation saisonnière (28). Nous avons noté nous-mêmes des différences sensibles entre les densités microfilariennes moyennes observées lors de nos passages successifs dans un village, mais celles-ci ne sont pas plus significatives si le second passage se déroule à une autre saison que le premier plutôt qu'à la même (Tableau III).

TABLEAU III

Variations de la densité microfilarienne moyenne d'un échantillon entre deux passages.

Moulé (Haute-Volta) 27 supets	Bémakaba (Côte-d'Ivoire) 170 sujets	Pérou (Mali) 57 sujets	Dan (Haute-Volta) 72 sujets
Fév. 75 : 36,3	Avril 75 : 53,5	Février 76 : 22,6	Juin 75 : 34,8
Sept. 75 : 28,9	Mars 76 : 71,8	Nov. 76 : 32,1	Février 78 : 50,2
Mars 76 : 20,4			
Avril 77 : 53,1			

N.B. : Villages sous contrôle antisimulidien : transmission résiduelle très faible sauf à Bémakaba.

Les variations observées entre plusieurs enquêtes ne paraissent donc pas liées à un rythme saisonnier.

Nous pensons que dans l'état actuel de nos connaissances, rien ne peut imposer de procéder aux biopsies à des époques préférentielles de l'année ou à des heures particulières de la journée.

Milieux d'incubation et temps de lecture

Après prélèvement, la biopsie cutanée est placée dans un liquide d'incubation sans être dilacérée. Les analyses comparatives ont montré que, quelles que soient les modalités d'incubation ou de lecture, les microfilaries émergent toujours en plus grand nombre dans le cas de biopsies non dilacérées (77, 35, 34).

Les liquides d'incubation proposés sont l'eau distillée, l'eau physiologique (9 ou 7 pour mille), et plus récemment le NCTC 135 en solution de Hanks (14).

Ce dernier milieu, normalement utilisé pour certaines cultures de tissus, a donné des résultats significativement meilleurs que l'eau distillée ou physiologique. Ne pouvant en envisager l'emploi sur le terrain en Afrique, nous avons testé comparativement la

solution balancée de Hanks et l'eau distillée. 148 paires de biopsies prélevées au même niveau ont été placées dans l'eau distillée pour le premier fragment, la solution de Hanks pour le second, et les résultats lus après 30 minutes d'incubation. Les microfilaries ont émergé plus nombreuses en solution de Hanks dans 114 cas, et en eau distillée dans 31 cas (3 résultats semblables). Le coefficient de corrélation entre les deux séries de lectures quantitatives est $r = 0,71$. Cette supériorité toute relative de la solution de Hanks ne compense pas les inconvénients majeurs de son utilisation sur le terrain (approvisionnement difficile, durée de conservation brève, nécessité de conservation à $+ 4^{\circ}$).

Les autres méthodes proposées combinent à des titres divers le facteur temps et les différents milieux. Ce sont :

— LA MÉTHODE DITE "DE DUKE" (17) :

Les biopsies sont placées dans une goutte d'eau physiologique sur une lame porte-objet, dilacérées à l'aiguille, conservées en chambre humide et la numération des microfilaries faite après 10 à 15 minutes.

— LA MÉTHODE DITE "DE PICQ" (59, 60, 61) :

Les biopsies sont placées sur une lame porte-objet dans une goutte d'eau distillée et la numération faite 30 minutes après le prélèvement.

— LA MÉTHODE DITE "DE NELSON" (54) :

Les biopsies sont placées dans 0,2 ml d'eau physiologique dans les puits d'un plateau de microtitration et la numération faite à l'examen direct sur lame après 24 h d'incubation. Si l'on veut éviter de faire cet examen dans les conditions de terrain, l'adjonction d'une goutte de formol après 24 heures permet la conservation des parasites jusqu'au retour au laboratoire.

— LA MÉTHODE DITE "DE SCHEIBER" (69, 70) :

Elle dérive de la précédente. Au lieu de procéder à l'examen direct sur lame du liquide d'incubation, celui-ci est filtré sur un filtre millipore et les microfilaries comptées après coloration.

— LA MÉTHODE DE DIGESTION DES SNIPS PAR LA COLLAGÉNASE (71) :

Elle ne laisse subsister après 48 heures que la couche cornée de l'épiderme. C'est la plus satisfaisante en principe puisque la charge parasitaire par biopsie ne dépend plus de facteurs d'émergence multiples et mal connus, mais confine à l'absolu.

Dans le cadre de nos enquêtes épidémiologiques, nous avons successivement utilisé ces différentes méthodes ou leurs variantes et les avons jugées du

double point de vue de leur fiabilité et de leur praticabilité sur le terrain en enquête de masse.

La plus séduisante est la technique de digestion à la collagénase. Mais elle reste une méthode très coûteuse, d'un maniement délicat, et ne donne que des résultats retardés (48 h ou 72 h), ce qui est un handicap sur le terrain. Nous manquons encore de l'expérience de ce procédé, mais il ne paraît pas qu'il puisse jamais constituer une méthode de grande diffusion pour des campagnes de masse. Par contre, il doit dès à présent s'imposer lors de travaux particuliers dont l'objectif nécessite une sensibilité maximale (expérimentations thérapeutiques, détection des infections récentes ou latentes).

La technique préconisée par SCHEIBER permet la coloration des spécimens, la numération des microfilières avec une faible marge d'erreur et son contrôle par un second technicien. Mais sa supériorité sur l'examen direct s'arrête là : il n'y a pas évidence que la filtration détecte plus de microfilières ; les opérations de filtrage, nettoyage, sont longues et délicates (une enquête selon cette méthode demande trois fois plus de temps qu'avec tout autre procédé et les risques d'erreurs sont multipliés dans les mêmes proportions). L'avantage relatif de la précision des résultats a disparu depuis qu'elle a été surclassée par l'utilisation de la collagénase.

La méthode préconisée par DUKE est d'un maniement délicat en savane sèche. L'obligation de conserver les prélèvements en chambre humide impose matériel et manipulations supplémentaires et ne suffit pas toujours à empêcher une dessiccation partielle de la goutte qui rend la lecture très difficile. Le standard temps serait à préciser, DUKE fixant la sortie de 90 p. 100 des microfilières du fragment dès la cinquième minute alors que KALE pense que ce taux n'est atteint qu'après une heure. Le comptage est rendu difficile par les mouvements rapides des parasites. De toutes façons, cette méthode est moins sensible que celle que préconise NELSON et d'un maniement moins facile que celle de PICQ.

Les deux méthodes de choix sur le terrain paraissent donc être celles de PICQ et de NELSON. Ce sont

des éléments d'appréciation et de comparaison que nous apportons ici.

L'émergence des microfilières en eau distillée en fonction du temps

PICQ (60), comparant le nombre de microfilières sorties à 30 et 120 minutes en eau distillée avait conclu qu'à 30 minutes, 50 p. 100 en moyenne des microfilières avaient émergé de la biopsie (temps de sortie 50 p. 100 - TS 50), la totalité des microfilières étant obtenue après 120 minutes.

Au cours d'une étude sur le terrain, nous avons effectué 302 biopsies cutanées au niveau des crêtes iliaques droite et gauche de 151 sujets à l'aide d'une pince à sclérectomie de type Holth, et décompté le nombre de microfilières sorties à 30, 60 et 120 minutes. Nos résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus par PICQ : à 30 minutes, nous observons une émergence moyenne de 71,2 p. 100 des microfilières (tableau IV).

TABLEAU IV

Nombres et pourcentages cumulés de microfilières émergées après 30, 60 et 120 minutes (302 biopsies cutanées).

Temps (minutes)	Total cumulé des microfilières sorties	Pourcentages cumulés de microfilières sorties
30	34.497	71,2 %
60	45.266	93,4 %
120	48.448	100 %

La représentation graphique en coordonnées cartésiennes permet de tracer la courbe d'émergence des microfilières en fonction du temps (fig. 1). Les points intermédiaires ont été obtenus par des lectures à 15, 25 et 35 minutes (pour 43 biopsies), 45 et 90 minutes (pour 28 biopsies). Cette courbe diffère de celle obtenue par PICQ aux temps de lecture inférieurs à 100 minutes.

TABLEAU V

Répartition du nombre des biopsies en fonction du pourcentage d'émergence des microfilières après 30 et 60 minutes d'incubation en eau distillée (302 biopsies).

Classes de pourcentages Temps	— de 49,9 à 100 %											
	de 49,9	50 % à 54,9	55 % à 59,9	60 % à 64,9	65 % à 69,9	70 % à 74,9	75 % à 79,9	80 % à 84,9	85 % à 89,9	90 % à 94,9	95 % à 99,9	100 %
30 minutes	15	4	12	31	47	56	44	35	27	15	2	14
60 minutes			1	2	1	1	3	5	35	92	100	62

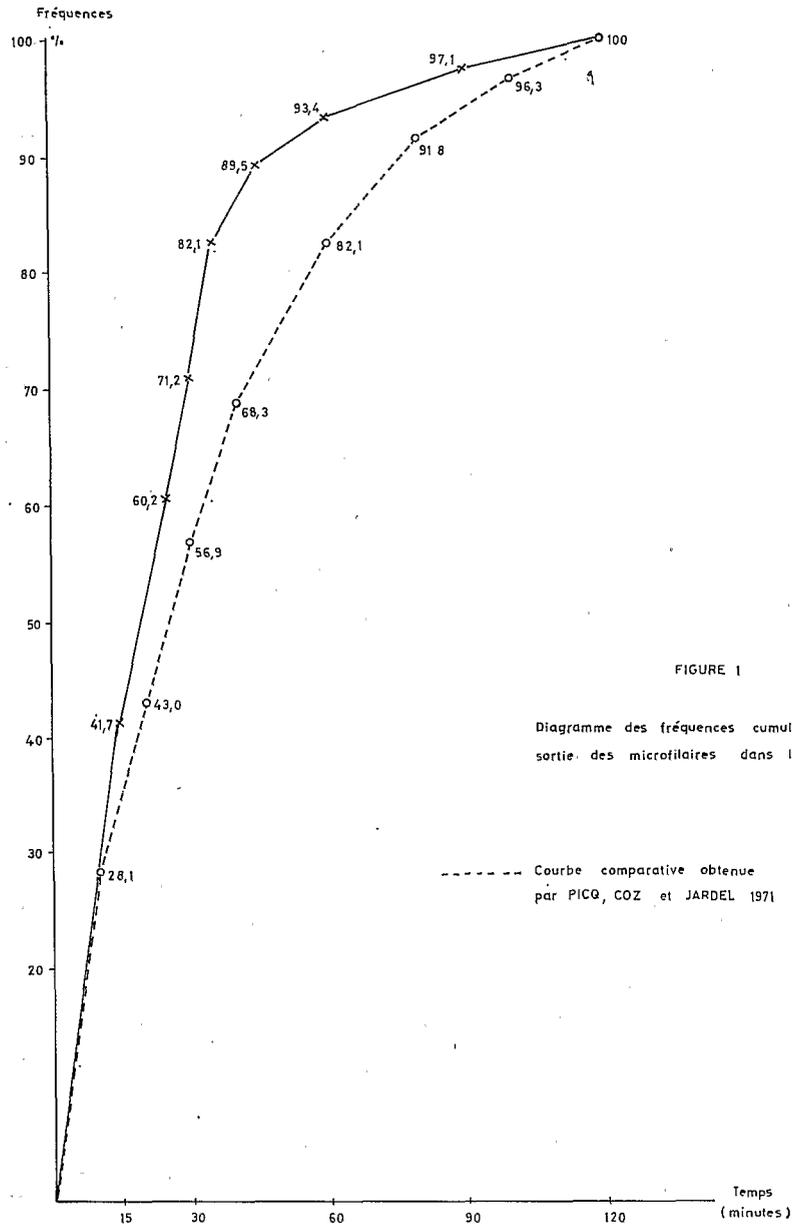


FIGURE 1

Diagramme des fréquences cumulées de sortie des microfaires dans le temps

--- Courbe comparative obtenue par PICO, COZ et JARDEL 1971

Nous donnons (tableau V) la répartition du nombre de biopsies en fonction du pourcentage d'émergence observé après 30 et 60 minutes d'incubation en eau distillée.

Nous étudierons les caractéristiques de dispersion de cette répartition en déterminant aux temps principaux le 10^e percentile (P10), c'est-à-dire la valeur du pourcentage des microfaires émergées qui regroupe 90 p. 100 des résultats observés.

A 30 minutes, le P10 est à 60 p. 100, ce qui signifie que dans 90 p. 100 des cas, à cet instant, 60 p. 100 ou plus du total des microfaires ont

émergé. A 60 minutes, le P10 est à 89 p. 100, ce qui signifie qu'au bout d'une heure d'incubation en eau distillée, dans 90 p. 100 des biopsies, environ 90 p. 100 des microfaires qui devaient émerger l'ont fait.

Nous constatons aussi qu'il y a relation directe entre la densité microfilarienne et la vitesse d'émergence des microfaires. Celle-ci est d'autant plus rapide que la charge parasitaire est faible : sur 22 biopsies de densité inférieure à 10 mf., la totalité des microfaires dénombrées avait émergé dès la 30^e minute (12 cas) ou la 60^e minute (8 cas). A l'inverse,

sur les 31 biopsies où le taux d'émergence n'avait pas atteint 60 p. 100 à la 30^e minute, 16 étaient très fortement chargées (plus de 100 mf.).

En conclusion, la lecture à 30 minutes en eau distillée constitue un standard pratique et constant sur le terrain, donnant dans 90 p. 100 des cas un résultat quantitatif représentant au moins 60 p. 100 des microfilaries devant émerger de la biopsie par cette méthode. Les lectures éventuelles après une ou deux heures modifient la densité microfilarienne observée mais rarement la prévalence de la maladie dans l'échantillon. Sur le terrain, en enquête de masse, il est indispensable de fixer un étalon "temps" qui ne saurait être inférieur à 30 minutes ; la prolongation du délai d'incubation au-delà de ce chiffre ne procure pas d'avantage tel qu'on puisse en recommander la pratique.

La différence entre nos résultats et ceux de PICQ peut être due à des conditions d'expérimentation non comparables ou à l'observation d'un nombre plus élevé de biopsies : 302 contre 96. Il ne semble pas que la température ambiante, plus élevée sur le terrain qu'au laboratoire, puisse être mise en cause (75).

Emergence comparée des microfilaries entre la 30^e minute en eau distillée et la 24^e heure en eau physiologique (valeur quantitative)

Nous avons essayé de déterminer la relation éventuelle entre les charges parasitaires évaluées par la méthode de PICQ et par celle de NELSON.

677 biopsies positives ont été transférées en eau physiologique après avoir incubé 30 minutes en eau distillée. Le nombre de microfilaries restant sur la lame ("charge initiale") a été comparé au total obtenu après addition des microfilaries supplémentaires sorties en 24 heures dans l'eau physiologique (tableau VI).

La corrélation entre les deux séries de lectures est excellente ($r = 0,99$) et correspond à une relation

linéaire. Le calcul mathématique de la droite de régression montre qu'elle n'a pas pour origine l'intersection des axes des coordonnées. Si x représente la charge microfilarienne en eau distillée (30 minutes), et y la charge en eau physiologique (24 h) :

- I. Pour $x = 0$, la valeur théorique de y est 1,97. Il y a donc une constante à ajouter au facteur de correction.
- II. Le facteur de correction byx est de 2,36 pour obtenir la valeur de y en partant de x , et de 0,43 pour ramener à x la valeur de y .
- III. On peut donc affirmer sur cette série d'observations que : la charge microfilarienne totale est $y = (x \times 2,4) + 2$; la charge microfilarienne en eau distillée à 30 minutes est $x = (y \times 0,43) - 2$.

Il existe donc une relation constante entre les charges parasitaires évaluées par la méthode de PICQ et par celle de NELSON. La lecture en eau distillée peut être un standard comparatif valable lors d'une surveillance longitudinale : la numération des microfilaries après 30 minutes d'incubation des biopsies en eau distillée représente de façon constante 40 p. 100 du total de celles qui auraient émergé après incubation de 24 heures dans l'eau physiologique (avec des valeurs extrêmes variant de 36,4 à 43,8 p. 100 suivant la densité microfilarienne).

Comparaison de la valeur qualitative des méthodes de Picq et de Nelson

L'eau physiologique est un milieu plus favorable aux microfilaries que l'eau distillée : elles y émergent plus vite et en plus grand nombre. Chez des sujets faiblement parasités, un résultat trouvé négatif en eau distillée peut être positif en eau physiologique : SOWA (74), comparant les deux milieux sur 68 examens a trouvé 20 p. 100 de faux résultats négatifs en eau distillée, ce qui selon nous est excessif et ne s'explique que par la très faible taille de son échantillon.

TABLEAU VI

Emergence comparée des microfilaries entre la 30^e minute en eau distillée et la 24^e heure en eau physiologique.

Classe de densité initiale (N. de mf. 30 ^e minute)	1-3	4-9	10-32	33-99	100 +	Total
Nombre de snips examinés	44	58	172	316	87	677
Total des mf obtenues à la 30 ^e minute (eau distillée) (valeur x)	85	384	3508	18938	11644	34559
Total des mf émergées après 24 h (addition des 2 lectures) (valeur y)	228	877	9643	45927	27507	84182
Valeur proportionnelle de la charge initiale	37,3	43,8	36,4	41,2	42,3	41,0

Pour définir le plus précisément possible l'erreur par défaut dont est grevée la technique de Picq, nous avons systématiquement transféré en eau physiologique et examiné après 24 heures d'incubation les biopsies trouvées négatives en eau distillée. Le tableau VII donne les résultats de cet essai :

TABLEAU VII

Variation de la prévalence après relecture à la 24^e heure en eau physiologique des biopsies trouvées négatives par la méthode de Picq.

	Population examinée	Négatifs 30 mn eau distillée	Positifs après 24 h en eau physiologique	Modification de prévalence dans l'échantillon
Villages de prévalence inférieure à 50 %	3.067	2.293	91	+ 3 %
Villages de prévalence supérieure à 50 %	5.706	2.007	145	+ 2,3 %

L'examen des charges microfilarieuses des faux négatifs montre que nous avons détecté ainsi des

infections légères : 200 biopsies sur 236 (84,7 p. 100) ont donné un résultat inférieur à 4 microfilaires (fig. 2). Les très rares cas de très fortes charges sont peut-être dus à une omission du microscopiste lors de la première lecture.

L'analyse par âge des cas d'infection légère ainsi détectés montre qu'ils ne prédominent pas chez les enfants. Leur nombre croît régulièrement avec l'âge en proportion directe de la prévalence du groupe considéré.

CONCLUSION

La revue critique des méthodes de diagnostic parasitologique permet les conclusions suivantes :

- Les méthodes quantitatives en usage sont nécessairement un standard de mesure et ne peuvent prétendre à l'absolu : la totalité des microfilaires n'émerge pas d'une biopsie, sauf digestion du derme par la collagénase.
- La répartition des microfilaires dans la peau n'étant homogène ni dans le temps ni dans l'espace, un examen n'est jamais strictement reproductible. Il n'est donc pas utile d'exiger de la

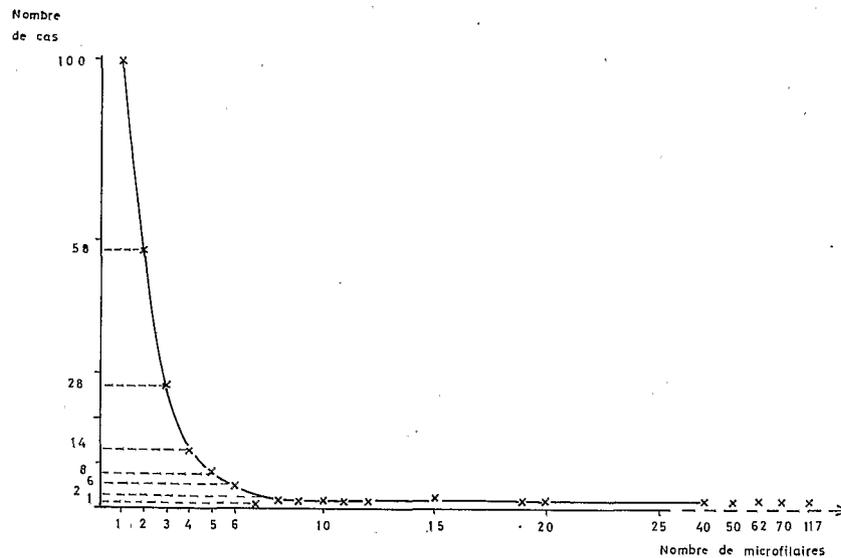


Fig 2. — Distribution des densités microfilarieuses observées après 24 heures en eau physiologique de 236 biopsies négatives après examen à 30 minutes en eau distillée

(D'après MOREAU, PROD'HON ET PROST 1977)

technique d'examen une précision extrême compte tenu de l'amplitude des variations individuelles.

- c) La biopsie cutanée exsangue normalisée paraît en zone de savane la méthode la plus pratique et la plus fiable pour la quantification de l'infestation.

Au cours de nos enquêtes, le grand nombre d'examen à réaliser et leur périodicité régulière au sein de l'échantillon constitué nous ont imposé de choisir la technique comportant le moins de manipulations, donc le moins de risque d'erreur, et possédant les caractères suivants :

- donner des résultats immédiats pour qu'un résultat aberrant puisse être contrôlé et au besoin corrigé avant que l'équipe ne quitte le village ;
- donner des résultats quantitatifs qui, sans chercher à être une valeur maxima, soient un standard comparatif fiable ;
- avoir par contre la sensibilité la plus fine au point de vue qualitatif pour pouvoir détecter les cas positifs avec la plus faible marge d'erreur.

Nous utilisons donc la double biopsie prélevée à la pince emporte-pièce au niveau des crêtes iliaques droite et gauche, la lecture se faisant après 30 minutes sur lame en eau distillée et étant contrôlée après

30 minutes sur lame en eau distillée et étant contrôlée après 24 heures d'incubation en eau physiologique si le résultat est négatif. L'adjonction de collagénase à ce milieu est à l'étude pour tenter d'éliminer tous les faux négatifs parasitologiques. Les tests de reproductibilité sont satisfaisants. Ce choix n'exclut pas que dans l'avenir des modifications ou des examens supplémentaires soient ajoutés à ce schéma de base.

RÉSUMÉ

La revue critique des méthodes de diagnostic parasitologique de l'onchocercose permet de conclure que, dans l'état actuel de nos connaissances, la mise en évidence des microfilières dermiques d'*Onchocerca volvulus* Leuckart, 1893, par biopsies cutanées exsangues prélevées aux deux crêtes iliaques à l'aide d'une pince emporte-pièce constitue la méthode de choix lors d'enquêtes de masse en zone de savane d'Afrique de l'Ouest.

Bien que l'utilisation de l'eau physiologique comme milieu d'incubation, couplée à des techniques telles que la filtration sur filtre millipore ou la digestion à la collagénase, donne des résultats de plus grande précision, la numération des microfilières après 30 minutes d'incubation en eau distillée est un bon standard de mesure, pratique et constant. Le contrôle des résultats négatifs par immersion complémentaire des biopsies durant 24 heures en eau physiologique permet de corriger l'erreur par défaut de la technique la plus pratique et d'allier la sensibilité à la simplicité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — ANDERSON J., FUGLSANG H., HAMILTON P.J.S. et MARSHALL (T.F. de C.) — The prognostic value of head nodules and microfilariae in the skin in relation to ocular onchocerciasis — *Tropenmed. Parasit.*, 1975, 26, 191-195.
- 2 — ANDERSON R.I., FAZEN L. et BUCK A.A. — Onchocerciasis in Guatemala. 2 - Microfilariae in urine, blood and sputum after DEC — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1975, 1, 58-61.
- 3 — ANDERSON R.I., FAZEN L. et BUCK A.A. — Onchocerciasis in Guatemala. 3 - Daytime periodicity of microfilariae in skin — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1975, 1, 62-65.
- 4 — ANDERSON R.I., THOMAS D., Mc RAE A. et BUCK A.A. — Onchocerciasis : frequency of microfilaruria and other manifestations in a village of Cameroon — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1975, 1, 66-70.
- 5 — BASSET A., LARIVIERE M. et HOCQUET P. — Technique de recherche des microfilières d'onchocercos dans la peau — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1962, 55, 6, 968-970.
- 6 — BECKER C.K. — Filaires adultes (*Onchocerca volvulus*) libres dans les tissus — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1950, 30, 9-10.
- 7 — BOURREE P., PASSERON J., MOLIMARD R. et BOUVIER J.-B. — Sensibilisation du test à la notézine dans l'onchocercose (à propos de 25 cas personnels) — *Annales médecine interne* (Paris), 1976, 127, 11, 831-835.
- 8 — BRINKMANN U.K. — Quantitative measurements on skin snips of onchocerciasis patients — *Tropenmed. Parasit.*, 1973, 24, 397-403.
- 9 — BRINKMANN U.K. — The assessment of microfilarial densities in skin snips from onchocerciasis patients under field conditions — *Tropenmed. Parasit.*, 1974, 25, 160-166.
- 10 — BUCK A.A. — Microfilaruria in onchocerciasis in Africans — *Tropenmed. Parasit.*, 1973, 24, 336-338.
- 11 — BUCK A.A., ANDERSON R.I., CONSTON (Jr) J.A.C., WALLACE C.K., CAMOR D.H., HARMAN (Jr) L.E., DORMER M.W. et GAULEY J.-J. — Microfilaruria in onchocerciasis. A clinical and epidemiological follow up study in the Republic of Chad — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1971, 45, 353-369.
- 12 — BURCH T.A. — Prurit consécutif à l'emploi de l'Hetrazan, comme test de diagnostic de l'onchocercose — *Rev. Coleg. Med. Guatem.*, 1951, 2, 53-57.
- 13 — BUREAU J.-P., NOZAIS J.-P. et BOTREAU-ROUSSEL Y. — Coma léthale au cours d'un traitement à la notézine avec présence de microfilières d'*Onchocerca volvulus* dans le liquide céphalo-rachidien — *Nouv. Presse méd.*, 1976, 5, 41, 2807.

- 14 — COLLINS R.C., CAMPBELL C.C. et WILTON D.P. — The skin biopsy in the diagnosis of onchocerciasis : a comparative study of NCIC 135, saline and water — *Who/Oncho/76.128*, 1976.
- 15 — COUZINEAU P., BOURREE P. et MOLIMARD R. — Onchocercose avec microfilarémie et microfilarurie découverte au cours d'un syndrome néphrotique — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1973, 66, 4, 553-558.
- 16 — DE BORGES R. — Findings of microfilarial larval stages in gynecologic smears — *Acta cytol.* (Philadelphie), 1971, 15, 476-478.
- 17 — DUKE B.O.L. — A standard method assessing microfilarial densities in onchocerciasis surveys — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1962, 27, 629-632.
- 18 — DUKE B.O.L. — Onchocerciasis : deep worm bundles close to hip joints — *Trans. roy. Soc. trop. Méd. Hyg.*, 1970, 64, 791-792.
- 19 — DUKE B.O.L. — L'épreuve de Mazzotti — *Oncho/WP/75.9*, Angl./Fr. 6 p., 1975.
- 20 — DUKE B.O.L. — Route of entry of *Onchocerca volvulus* microfilariae into the eye — *Trans. roy. Soc. trop. Méd. Hyg.*, 1976, 70, 90-91.
- 21 — DUKE B.O.L., SCHEFFEL P.D., GUYON J. et MOORE P.J. — The concentration of *Onchocerca volvulus* microfilariae in skin snips taken over twenty-four hours — *Ann. Trop. med. parasit.*, 1967, 61, 2, 206-219.
- 22 — DUKE B.O.L., VINCELLETTE J. et MOORE P.J. — Microfilariae in the cerebro-spinal fluid and neurological complications during treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine — *Tropenmed. Parasit.*, 1976, 27, 122-132.
- 23 — FAIN A. et BASTIN J.-P. — Le diagnostic parasitologique de l'onchocercose — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1975, 55, 5, 505-515.
- 24 — FAIN A., ELSÉN P., WERY M. et MAERTENS K. — Les filarioses humaines au Mayumbé et dans les régions limitrophes (Rép. du Zaïre). Evaluation de la densité microfilarienne — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1974, 54, 1, 5-34.
- 25 — FAIN A., VANDEPITTE J. et WERY M. — Microfilarémie par *Onchocerca volvulus* — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1974, 54, 2, 121-127.
- 26 — FUGLSANG H. et ANDERSON J. — Microfilariae of *Onchocerca volvulus* in blood and urine during and after treatment with diethylcarbamazine — *J. Helminth.*, 1974, 48, 93-97.
- 27 — FUGLSANG H. et ANDERSON J. — The concentration of microfilariae in the skin near the eye as a simple measure of the severity of onchocerciasis in a community and as an indicator of danger to the eye — *Tropenmed. Parasit.*, 1977, 28, 63-67.
- 28 — FUGLSANG H., ANDERSON J., MARSHALL T., AYONGE S. et FISYI C. — Seasonal variation in the concentration of *Onchocerca volvulus* microfilariae in the skin — *Tropenmed. Parasit.*, 1976, 27, 365-369.
- 29 — FULLEBORN F. et SIMON P. — Untersuchungen über das Vorkommen der Larven von *Onchocerca volvulus* in Lymphdrüsen und in der Circulation — *Arch. Schiffsh. Trop. Hyg.*, 1913, 17, 843-844.
- 30 — GENTILINI M., LEGER N. et DIOT G. — Présence de microfilaries d'*Onchocerca volvulus* dans le sang — *Soc. de Parasitologie*, séance du 10 mai 1973, Perpignan.
- 31 — GUNDERS A.E. et NEUMANN E. — A controlled study of the ocular finding in Liberian with microfilariae of *Onchocerca volvulus* at the outer canthus of the eye — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1963, 12, 5, 761-766.
- 32 — GUNDERS A.E. et NEUMANN E. — Parasitology and diagnosis of onchocerciasis with special reference to the outer canthus of the eye — *Isr. J. Med. Sci.*, 1972, 8, 1139-1142.
- 33 — HOOGHE (d') M. — Contribution à l'étude de l'onchocercose humaine dans l'Uele — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1934, 14, 153-180.
- 34 — KALE O.O. — Standardization of techniques of assessing microfilarial densities in onchocerciasis surveys — *Tropenmed. Parasit. Sonderheft.*, 1976, 1, 41-42.
- 35 — KALE O.O., BAMMEKE A.O. et AYENI O. — An evaluation of skin snip techniques used in the quantitative assessment of microfilarial densities of *Onchocerca volvulus* — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1974, 51, 547-549.
- 36 — KERSHAW W.E., DUKE B.O.L. et BUDDEN F.H. — Distribution of microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin. Its relation to skin changes and to eye lesions and blindness — *Brit. Med. J.*, 1954, 2, 724-729.
- 37 — KERSHAW W.E., JAMISON D.G., NUGENT D. et DUKE B.O.L. — Preliminary observations on the depth distribution of the microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin and its relation to the reservoir of infection to the fly — *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1956, 50, 1, 6.
- 38 — LAGRAULET J. — Etude des biopsies cutanées et de la réaction de Mazzotti chez les onchocercariens examinés en France — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1971, 64, 231-237.
- 39 — LAGRAULET J. et BARD J. — Une méthode d'évaluation du degré d'infestation dans l'onchocercose — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1969, 62, 601-605.
- 40 — LAGRAULET J., ROBERT C. et BARD J. — Techniques des biopsies cutanées dans le diagnostic de l'onchocercose — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1967, 60, 297-300.
- 41 — LARTIGUE J.-J. — Variation du nombre de microfilaries d'*Onchocerca volvulus* contenues dans des biopsies cutanées pratiquées à différentes heures de la journée — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1967, 36, 491-494.
- 42 — MAZZOTTI L. — Posibilidad de utilizar como medio de diagnostico auxiliar en la Onchocerciasis las reacciones alérgicas consecutivas a la administración de "Hétrazan" — *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.*, 1948, 9, 235-237.
- 43 — MAZZOTTI L. — Observations based on cutaneous biopsies in onchocerciasis — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1951, 31, 624-627.
- 44 — MAZZOTTI L. — Estudio comparativo entre la biopsia y la escarificación cutanéas en el diagnostico de la onchocercosis — *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.*, 1954, 14, 19-23.
- 45 — MAZZOTTI L. — Presencia de microfilarias de *Onchocerca volvulus* en el liquido cefalo-roquides de enfermos tratados con hetrazan — *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.*, 1959, 19, 1-5.
- 46 — MAZZOTTI L. et OSORIO M.T. — Sobre la presencia de microfilarias de *Onchocerca volvulus* en la sangre y en la orina de pacientes afectados por esta filaria — *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.*, 1949, 10, 269-275.
- 47 — MILLER M.J. — An evaluation of the skin scarification technique for the recovery of microfilariae of *Onchocerca volvulus* — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 554-560.
- 48 — MONJUSIAU A. — Programme de recherche sur les aspects ophtalmologiques de l'onchocercose — Mission Afrique de l'Ouest, 1962, WHO/PA/96.63.
- 49 — MONJUSIAU A., LAGRAULET J., DURAND B. et ROBERT

- C. — Contribution à l'étude de la réaction de Mazzotti — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1964, 57, 1084.
- 50 — MONTPELLIER J. et LACROIX A. — Le crawl-craw ou gale filarienne. Son origine dans les kystes sous-cutanés à *Onchocerca volvulus* — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1920, 13, 305-315.
- 51 — MOREAU J.-P., PROD'HON J. et PROST A. — Propositions d'une méthodologie d'enquête de masse sur l'endémie onchocerquienne en Afrique de l'Ouest — *In Rapp. fin. 17^e conf. techn. OCCGE*, tome 2, 1977, 175-197.
- 52 — NNOCHIRI E. — Observations on onchocercal lesions seen in autopsy specimens in Western Nigeria — *Ann. Trop. med. parasit.*, 1964, 58, 89-93.
- 53 — NOZAIS J.-P., HEROIN P., LANGLET J. et DOUCET J. — Intérêt de l'immunologie dans le diagnostic de l'onchocercose cutanée — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1976, 69, 5, 456-466.
- 54 — O.M.S. — Rapport d'un comité d'experts — Epidémiologie de l'onchocercose — *Sér. Rapp. Techn.* n° 597, 1976.
- 55 — ONORI E. — Comparative efficiency of skin biopsy and scarification in the african onchocerciasis and on the optimum number of test to be made an evaluation of best sites to determine the microfilarial infection rate in a population during epidemiological surveys — *W. Afr. Med. J.*, 1963, 12, 3-10.
- 56 — OOMEN A.P. — Clinical manifestations of onchocerciasis — *Ethiop. Med. J.*, 1967, 5, 159.
- 57 — PAROUTY J. — Evaluation de trois modèles de pincés à sclérectomie pour le diagnostic quantitatif de l'infestation cutanée par *Onchocerca volvulus* — *Thèse de doctorat en médecine*, Marseille, 1975.
- 58 — PFISTER R. — Répartition et fréquence des filarioses en Haute-Volta et en particulier dans la région de Bobo-Dioulasso — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, 45, 92-102.
- 59 — PICQ J.-J. et COZ J. — Contribution à l'étude de l'évaluation de densités microfiliariennes chez les onchocerquiens — *Proc. 2nd Int. Congr. Parasit., Washington*, 1970, 4, 28.
- 60 — PICQ J.-J., COZ J. et JARDEL J.-P. — Une méthode d'évaluation des densités microfiliariennes d'*Onchocerca volvulus* Leuckart, 1893, chez les onchocerquiens : technique et temps de lecture des biopsies cutanées — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1971, 45, 517-520.
- 61 — PICQ J.-J. et JARDEL J.-P. — Une méthode d'évaluation des densités microfiliariennes d'*Onchocerca volvulus* Leuckart, 1893, chez des onchocerquiens. Répartition des densités microfiliariennes suivant les sites et niveau de prélèvement des biopsies cutanées. Variation des densités microfiliariennes au cours des 24 heures — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1974, 51, 145-153.
- 62 — PICQ J.-J. et ROUX J. — Faits nouveaux dans l'onchocercose : la microfilarurie. Sa répartition géographique, ses rapports avec les densités microfiliariennes cutanées, l'albuminurie et la chimiothérapie. Premiers résultats — *Méd. trop.*, 1973, 33, 451-569.
- 63 — PRICE D.L. — The occurrence of microfilariae of *Onchocerca volvulus* in urine of infected individuals — *J. Parasitol.*, 1961, 47, 572.
- 64 — PROST A., THYLEFORS B. et PAIRAULT C. — Méthodes d'évaluation épidémiologique de masse de l'onchocercose. Leur utilisation au cours d'un programme de lutte contre le vecteur — O.M.S., *Oncho/WP/75.14*, 1975, 20 p., Français/Anglais.
- 65 — RIPERT C., RIEDEL D., YANG R., FOUDA-ONANA A. et ZINFLOU I. — Etude épidémiologique de l'onchocercose dans cinq villages de la vallée de la Sanaga (Cameroun) — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1977, 70, 2, 178-186.
- 66 — RIVES M. et SERIE F. — L'onchocercose en Côte-d'Ivoire — *Méd. Afr. Noire*, 1967, 10, 483-488.
- 67 — RODHAIN J. et GAVRILOV W. — Un cas de localisation profonde de *Microfilaria volvulus* — *Ann. Soc. Belge méd. trop.*, 1935, 15, 4, 1-10.
- 68 — ROUGEMONT A., BOISSON M.-E., PAROUTY J. et PARIAUD P. — Evaluation de trois modèles de pincés à sclérectomie pour le diagnostic quantitatif de l'infestation cutanée par *Onchocerca volvulus* — *WHO/Oncho/75.117*, 1975.
- 69 — SCHEIBER P., BRAUN-MUNZIGER R.A., SOUTHGATE B.A. et AGBO K.N. — Epidemiological studies on onchocerciasis by means of a new field technique — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1976, 53, 472-475.
- 70 — SCHEIBER P., SOUTHGATE B.A. et BRAUN-MUNZIGER R. — Erste Erfahrungen mit einer neuen Method sur Ermittlung von *Onchocerca volvulus*. Mikrofilarien aus "Standard skin snips" — *Tropenmed. Parasit.*, 1976, Sonderheft 1, 42.
- 71 — SCHULZ-KEY H. — A simple technique to assess the total number of *Onchocerca volvulus* microfilariae in skin snips — *WHO/Oncho/77.141*, 1977.
- 72 — SCHULZ-KEY H. et ALBIEZ E.J. — Worm burden of *Onchocerca volvulus* in hyperendemic village of the rain forest in West-Africa — *Tropenmed. parasit.*, 1977, 28, 431-438.
- 73 — SCHULZ-KEY H., ALBIEZ E.J. et BUTTNER D.W. — Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules — *Tropenmed. Parasit.*, 1977, 28, 428-430.
- 74 — SOWA J. et SOWA S.C. — Quantitative assessment of microfilarial load in onchocerciasis — *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1975, 69, 363-364.
- 75 — TADA I. — Quantitative studies of the changes in microfilarial density in *Onchocerca volvulus* infection — *Tropenmed. Parasit.*, Sonderheft 1, 28.
- 76 — TADA I. et FIGUEROA MARROGUIN H. — The density of *Onchocerca volvulus* microfilariae in the skin at different times of the day in Guatemala — *Jap. J. Parasit.*, 1974, 23, 4, 220-225.
- 77 — TADA I., IWAMOTO I. et WONDE T. — A preliminary report on the examination of skin snips method used in the detection of *Onchocerca volvulus* microfilariae — *Trop. Med.*, 1973, 15, 121-123.
- 78 — THOMAS D.B., ANDERSON R.I. et MC RAE A.A. — Microfilariae of *Onchocerca volvulus* in a vaginal smear specimen — *Amer. J. Parasit.*, 1973, 59, 941-942.
- 79 — THOMAS D.B., ANDERSON R.I. et MC RAE A.A. — Daytime variation in the density of *Onchocerca volvulus* microfilariae in human skin — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1973, 49, 493-498.
- 80 — THYLEFORS B., PHILIPPON B. et PROST A. — Transmission potentials of *Onchocerca volvulus* and the associated intensity of onchocerciasis in a Sudan Savanna area — *Tropenmed. Parasit.*, sous presse, 1978.
- 81 — TOUFIC N. — Pratique de la biopsie cutanée dans l'onchocercose par une pince emporte-pièce — *Afr. Méd.*, 1969, 8, 72, 587-588.
- 82 — TOUFIC N. — La pince emporte-pièce dans la biopsie cutanée de l'onchocerquien — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1969, 62, 517-730.

- 83 — VAN DEN BERGHE L. et CHARDOME M. — An easier and more accurate diagnosis of malaria and filariasis through the use of the skin scarification smear — *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1951, 31, 411-413.
- 84 — WEGESA P. — Variation of microfilarial densities of *Onchocerca volvulus* in the skin with the time of the day — *Annual report 1966, East African institute of Malaria and vector borne disease, Amani, Tanzanie*, 9, 31-32.
- 85 — WERY M., MAERTENS K. et FAIN A. — La scarification dermique dans les enquêtes sur les filarioses : sept années d'utilisation au Zaïre — *In : Rapp. final 10^e conf. techn. OCEAC*, 1975, 355-359.
- 86 — WOODRUFF A.W., CHOYCE D.P., PRINGLE C., LAING A.B.G., HILS M. et WEGESA P. — Onchocerciasis in the Usumbura mountains, Tanzania : the disease, its epidemiology, and its relationship to ocular complications — *Trans. roy. soc. trop. Med. Hyg.*, 1966, 60, 695-706.