

OCP/STAC.6.4.

PROGRAMME DE LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE
DANS LA REGION DU BASSIN DE LA VOLTA

ORIGINAL : FRANCAIS

COMITE CONSULTATIF SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Sixième réunion

Genève, 8-10 novembre 1977

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

par

A. PROST* et J. PROD'HON**

* Parasitologue, unité d'évaluation épidémiologique, OMS/OCP,
Ouagadougou.

** Helminthologiste de l'ORSTOM, Médecin-Chef de la section parasitologie, Centre Muraz, Organisation de Coordination et de Coopération pour la Lutte contre les Grandes Endémies (O.C.C.G.E.), Bobo-Dioulasso, "et mission ORSTOM auprès de l'OCCGE". 30 DEC. 1977

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

Collection de Référence

n° B8949 Exp. 7bd.

- RESUME -

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 microfilaires 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, donne des résultats de plus grande précision, la numération des microfilaires 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.

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 différents auteurs : (Duke 1962; Ovazza, 1966; Picq et al., 1971). 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 (Thylefors et Prost, 1977). 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 Coopération et de Coopération pour la Lutte Contre les Grandes Endémies (O.C.C.G.E.).

1 - METHODES DE MISE EN EVIDENCE INDIRECTE DU PARASITE

1.1. -- 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 24 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 (Mazzotti, 1948; Burch 1951; Monjusiau et al., 1964; Lagraulet, 1971) 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 par certains auteurs lors d'enquêtes de masse (Rives et Série, 1967).

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'onchocerci ne réagissent pas à la D.E.C. (2 % environ selon Picq, comm. pers.) ainsi que les porteurs de lésions cutanées du type Sowda (Duke, 1975); erreurs par excès telles que celles observées en Haute-Volta où le test de Mazzotti a élevé la prévalence de 25,5 % à 65,8 % dans des villages manifestement hypoendémiques (Monjusiau, 1963), ou telles que celles de la clinique dermatologique d'Abidjan qui constate 11,8 % de positifs à la biopsie cutanée exsangue pour 84,5 % de positifs au test de Mazzotti dans un échantillon (Nozais et al., 1976). Dans ces deux cas les résultats de l'une des deux techniques comparées sont manifestement erronées.

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

1.2. - Les lésions cutanées et ophtalmologiques

Il s'agit de complications de l'onchocercose et non d'un signe de la maladie. 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 seules à l'estimation de la prévalence du parasite dans la population.

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

1.3. - 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 nématodes rendent difficile la détermination des positivité vraies.

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

2 - LE DIAGNOSTIC DIRECT DU PARASITE

2.1. - Découverte du ver adulte

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

Outre les ganglions ou 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. Il peut ne contenir que des vers morts ou calcifiés (Israël, 1959). A moins de dissection longue et délicate, la seule présence des kystes ne peut constituer un moyen d'appréciation longitudinale dans le temps des résultats d'une campagne de lutte.

Si la majorité des kystes siège en regard des plans osseux au niveau sous-cutané, un certain nombre sont profonds et non palpables: localisations dans l'orbite (Duke, 1976), dans l'articulation coxo-fémorale (Duke, 1970). Un certain nombre d'adultes, au stade précoce, sont libres dans les tissus-sous-cutanés (Nnochiri, 1964), ou ont pu être mis en évidence lors d'opérations de hernie (Becker, 1950), voire dans le pus d'abcès (Oomen, 1967).

La palpation des nodules a toutefois 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 (Rives et Série, 1967) et 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 microfilaires que nous appellerons y .

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

$$\begin{aligned} \text{pour } x &= 40 \% , y &= 72,7 \% \\ \text{pour } x &= 0 , y &= 40,8 \% \end{aligned}$$

Le coefficient de corrélation entre les deux séries de valeurs, $r = 0,82$, est satisfaisant.

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 un foyer hyperendémique de Côte-d'Ivoire (PROD'HON et al., 1977) sur 1388 sujets examinés, 1169 ont été trouvés porteurs de microfilaires dermiques et 747 porteurs de kystes. Sur ces 747 porteurs de kystes, six seulement ont présenté une biopsie négative. Par contre sur les 1169 sujets présentant une biopsie positive 428 ne présentaient pas de kystes décelables à l'examen clinique.

2.2 - Découverte de la microfilaire

2.2.1. Xénodiagnostic

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

Même si la simule manifeste une habileté particulière pour absorber des microfilaires chez des sujets faiblement parasités, cette technique est suffisamment complexe pour rester exceptionnelle et être réservée aux études de transmission.

2.2.2. Microfilaires dans les milieux autres que la peau

Des microfilaires d'O. volvulus ont été trouvées dans la plupart des tissus ou des milieux: localisation dans les tissus profonds (Rodhain et Gavrilov, 1935), dans le sang et la lymphe (Fulleborn et al., 1913; Mazzotti et Osorio, 1949; Gentilini et al., 1973; Couzineau et al., 1973; Fain et al., 1974 b; Fuglsang et Anderson, 1974; Anderson et al., 1975 b), dans le liquide céphalo-rachidien (Mazzotti, 1959; Duke et al., 1976), dans les crachats et les larmes

(Anderson et al., 1975 b), dans les sécrétions gynécologiques (De Borges 1971, Thomas et al., 1973 a). Ces localisations, souvent conséquences de traitements à la diéthylcarbamazine ou à la suramine, n'ont pas de valeur épidémiologique. Deux milieux méritent toutefois une mention particulière :

- L'urine où la présence de microfilaires a été détectée depuis longtemps (Mazzotti et Osorio, 1949; Price, 1961) mais où ce symptôme n'a acquis que récemment une valeur épidémiologique (Buck et al., 1971; Buck, 1973; Picq et Roux, 1973; Anderson et al., 1975 b et 1975 d). Dans la zone du programme OCP, en hyperendémie, la microfilarurie est présente chez 1,8 % à 36,5 % de la population des villages, avec une moyenne de 18,6 % chez les hommes et 9,1 % chez les femmes (Brinkmann, 1977). 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 et les recherches en ce sens se poursuivent.

- L'oeil, où, selon nos enquêtes, le parasite est présent dans des proportions allant jusqu'à 60 % de la population de plus de 5 ans. A l'inverse de la microfilarurie, il existe des cas où le parasite est présent dans l'oeil sans qu'il soit possible de le mettre en évidence dans la peau par les méthodes les plus sensibles. Sur un échantillon de 7584 individus examinés parmi lesquels 4566 présentaient des biopsies dermiques positives, 30 n'ont été trouvés porteurs de microfilaires que dans l'oeil. Si la prévalence de la maladie dans l'échantillon n'en a été que peu affectée (60,6 % au lieu de 60,2 %), ceci permet d'affirmer que l'ophtalmologiste détecte 1 % de malades parmi les sujets à biopsie négative (30 sur 3018).

2.2.3. Les microfilaires dermiques

Depuis les travaux de Montpellier et Lacroix (1920) on sait que la couche superficielle du derme constitue le lieu d'élection des microfilaires d'O. volvulus (Kershaw et al., 1956). La recherche des microfilaires dermiques a depuis lors été considérée comme 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 (Van den Berghe et Chardome, 1951; Mazzotti, 1954; Miller, 1958; Basset et al., 1962; Onori, 1963; Laflaquière cité par Rives et Série, 1967). Elle est actuellement très utilisée 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 (Fain et al., 1974 a; Fain et Bastin, 1975; Wéry et al., 1975).

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. Pfister (1952) est le seul à signaler en Haute-Volta 5 cas importés. Le diagnostic différentiel des deux espèces de microfilaires dermiques ne paraît donc pas s'imposer ici de façon systématique;
- b) - en zone de savane la recherche des microfilaires dans la région scapulaire est moins sensible qu'en d'autres sites (cf. paragraphe 3.1);
- 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 (Kale et al., 1974); sur un échantillon, l'ordre de grandeur était de 74,4 % de positifs par biopsie pour 23,3 % par scarification (Brinkmann, 1976).

La biopsie cutanée exsanguie

D'usage aussi ancien que la scarification, elle est directement dérivée des travaux de Montpellier et Lacroix (1920) 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 (Mazzotti, 1951; Duke, 1962; Lagraulet et al., 1967; Lagraulet et Bard, 1969; Picq et Coz, 1970; Picq et al., 1971; Picq et Jardel, 1974).

Cette technique a été proposée pour toutes les enquêtes épidémiologiques en zone de savane ouest-africaine (Prost et al., 1975; Moreau et al., 1977). Ce sont ses modalités pratiques que nous allons développer ici.

3 - 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.

3.1. - 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'oeil. Le choix n'en est pas indifférent, les variations interindividuelles liées au site étant très importantes (Rougemont et al., 1975). La ceinture pelvienne est significativement plus sensible que le mollet (Picq et Jardel, 1974 : 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 (Picq et Jardel, 1974). 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 % des lectures se rangent de chaque côté dans la même classe numérique; 1,06 % du total des lectures (2,3 % 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).

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 1 \ Snip 2	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
corréla-
tion et %
moyens de
concor-
dance.

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 : le gain de prévalence est en moyenne de 5,3 % 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 1 \ Snip 2	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 microfilaires dans la peau de la commissure temporale des paupières (outer canthus) serait, selon les ophtalmologistes, en relation constante avec l'intensité du parasitisme oculaire et pourrait être un indicateur précoce du degré de risque encouru par l'oeil (Gunders et Neumann, 1963 et 1972; Anderson et al., 1975 a; Fuglsang et Anderson, 1977). 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 % 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.

3.2. - 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 microfilaires sanguines et intéresser une épaisseur de derme égale à 6 ou 8 fois celle de l'épiderme au moins (Fain et Bastin, 1975). Les fragments obtenus variaient en taille et en poids, d'où la nécessité de les peser (Duke, 1962; Woodruff et al., 1966) voire de les mesurer (Brinkmann, 1973 et 1974; Tada et Figueroa-Marroquin, 1974) pour ramener le total des microfilaires 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 (Scheffel, 1968 com. pers.; Toufic, 1969 a et b).

Elle présente l'avantage, tout en facilitant le prélèvement, de recueillir des fragments cutanés de poids et taille plus homogène 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 (déviatión standard $S_x = 0,014$, Brinkmann, 1974), 1,52 mg (déviatión standard = 0,07, Rougemont et al., 1975) et 1,4 mg (Fuglsang et Anderson, 1977), ce qui est assez homogène et limite à des faibles effectifs les valeurs extrêmes. La surface moyenne est de 6,01 mm² (déviatión standard = 0,09, Brinkmann, 1974).

La pince Holth 2 mm donne des biopsies de poids moyen plus élevé : 2,84 mg, déviatión standard = 0,16 (Rougemont et al., 1975, Parouty, 1975).

Aucun des modèles n'est supérieur aux autres en précision : le coefficient de variation pondérale est d'environ 30 % 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 microfilaires issues de snips de poids connu, leur nombre moyen, pour un groupe donné de population, n'est pas proportionnel au poids moyen des snips" (Rougemont et al., 1975). D'autres auteurs avaient obtenu les mêmes résultats (Thomas et al., 1973 a et b).

Nous avons nous-mêmes cherché à vérifier si le nombre de microfilaires 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 gros et 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.

3.3. - Périodicité du parasite

Par analogie avec les espèces de microfilaires sanguicoles a été recherchée dans l'onchocercose l'éventualité d'une périodicité des microfilaires. Les différents travaux effectués n'ont pu démontrer l'existence d'un véritable cycle ni au cours des heures diurnes ni au cours des 24 heures (Kershaw et al., 1954; Picq et Jardel, 1974) mais certains auteurs ont mis en évidence des variations d'amplitude de la densité microfilarienne au cours de la journée (Lartigue, 1967; Tada et Figueroa-Marroquin, 1974; Duke et al., 1967; Wegesa, 1966 et Anderson et al., 1975 b).

Certains auteurs ont suggéré la possibilité d'une variation saisonnière (Fuglsang et al., 1976). Nous avons noté nous même 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. Variations de la densité microfilarienne moyenne d'un échantillon entre deux passages.

<u>Moulé</u> (Haute-Volta) 29 sujets	<u>Bémakaha</u> (Côte-d'Ivoire) 170 sujets	<u>Pérou</u> (Mali) 57 sujets	<u>Molli</u> (Niger) 35 sujets
Fév. 75 : 37,9	Avril 75 : 53,5	Fév. 76 : 22,6	Fév. 76 : 27,1
Sept. 75 : 31,3	Mars 76 : 71,8	Nov. 76 : 32,1	Mars 77 : 57,0
Mars 76 : 22,4			
Avril 77 : 57,7			
<u>N.B.</u> : Villages sous contrôle anti-simulidien : transmission résiduelle très faible à Moulé et Pérou, élevée à Bémakaha. Molli était hors zone de contrôle entre les deux enquêtes. Les examens ont tous été effectués par la même équipe (OMS-OCP) hormis Moulé/Février 75 (Rolland-GOM, Haute-Volta) et Molli/Février 76 (Prod'hon-OCCGE).			

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.

3.4. - 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 microfilaires émergeaient toujours en plus grand nombre dans le cas de biopsies non dilacérées (Tada et al., 1973; Kale et al., 1974 et Kale, 1976).

Les liquides d'incubation proposés sont l'eau distillée, l'eau physiologique (9 pour mille ou 7 pour mille), et plus récemment le NCTC 135 en solution de Hanks (Collins et al., 1976).

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 microfilaires 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°).

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

- la méthode dite "de Duke" (1962) : 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 microfilaires faite après 10 à 15 minutes.

- la méthode dite "de Picq" (Picq et Coz, 1970; Picq et al., 1971; Picq et Jardel, 1974) : 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" (OMS-Rapport d'un comité d'experts 1976) : 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 heures 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" (Scheiber et al., 1976 a et b) 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 microfilaires comptées après coloration.

Il est à noter qu'aucune technique n'assure l'émergence de la totalité des microfilaires du fragment ainsi que le confirment des coupes histologiques (Pr. Bonucci, Institut d'anatomopathologie, Rome, travail en cours).

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.

Il est certain que la technique préconisée par Scheiber est la plus sensible. Le nombre de microfilaires obtenu est plus élevé qu'avec aucune autre méthode. La coloration peut permettre un éventuel diagnostic différentiel d'espèce. La numération des parasites fixés se fait avec une faible marge d'erreur et peut être contrôlée par un second observateur. Mais les manipulations sont longues et complexes, le rinçage du filtre doit être soigneux entre chaque opération. Selon notre expérience, elle demande trois fois plus de temps que les autres méthodes de lecture (100 sujets par jour au maximum, soit 200 biopsies, alors que les autres méthodes permettent l'examen de 300 sujets par jour). Nous la considérons comme la meilleure technique dans le cadre d'un laboratoire bien équipé, en milieu hospitalier par exemple.

Elle s'impose lorsque les examens doivent être très précis, (expérimentation thérapeutique par exemple).

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 % des microfilaires du fragment dès la cinquième minute alors que Kale et al., (1974) pensent 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.

3.4. 1. - L'émergence des microfilaires en eau distillée en fonction du temps.

Picq et al., (1971) comparant le nombre de microfilaires sorties à 30 et 120 minutes en eau distillée avaient conclu que 30 minutes était le temps de sortie 50 % (TS 50) soit le moment où 50 % en moyenne des microfilaires ont émergé de la biopsie si l'on considère qu'à 120 minutes la totalité des microfilaires ont émergé.

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 microfilaires 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 % des microfilaires (tableau IV).

Tableau IV : Nombres et pourcentages cumulés de microfilaires émergées après 30, 60 et 120 minutes (302 biopsies cutanées).

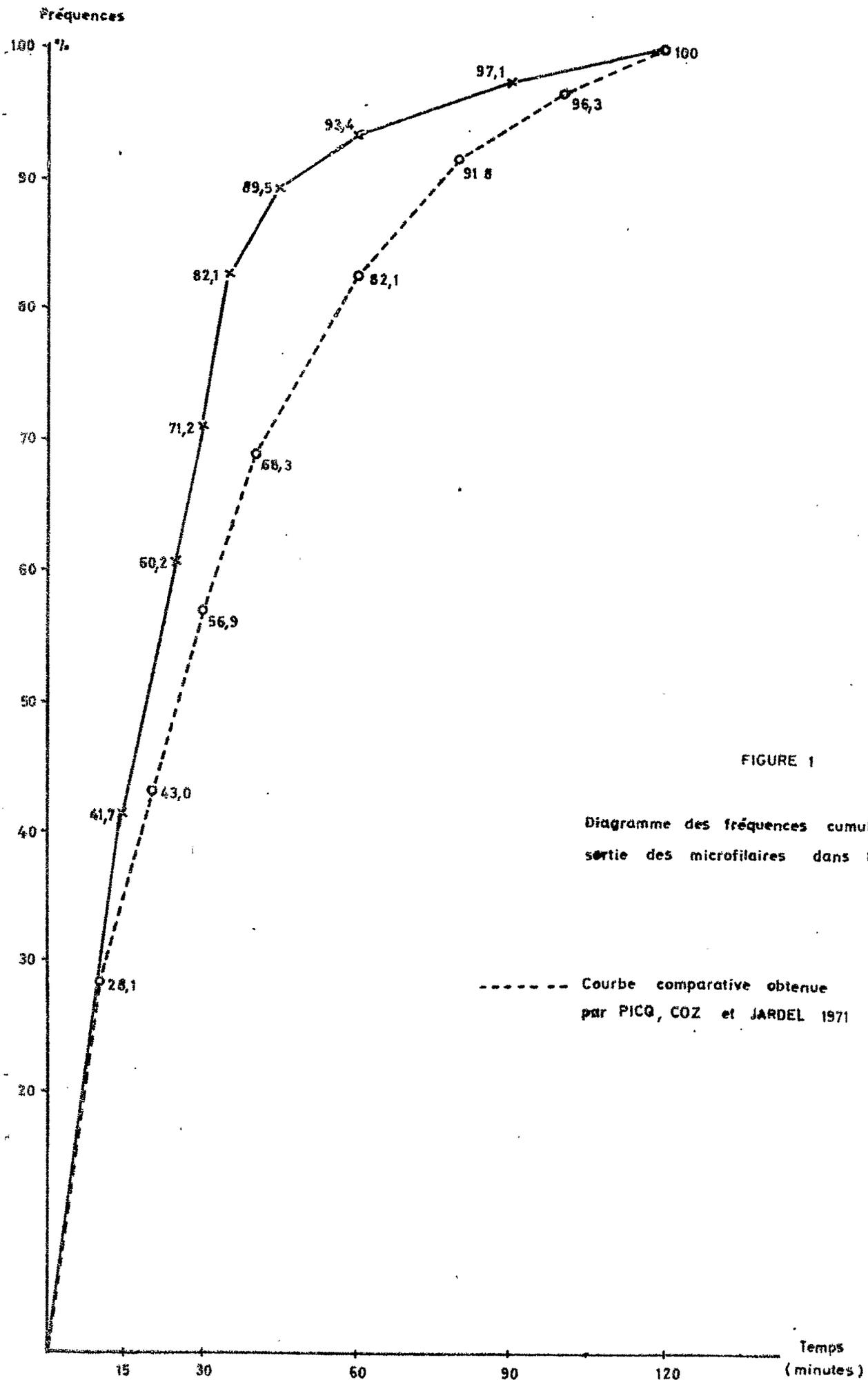
Temps (minutes)	Total cumulé des microfilaires sorties	Pourcentages cumulés de microfilaires sorties
30	34.497	71,2 %
60	45.266	93,4 %
120	48.448	100 %

La représentation graphique en coordonnées cartésiennes permet de tracer la courbe d'émergence des microfilaires 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 et al., (fig. 1) aux temps de lecture inférieurs à 100 minutes.

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.

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

Classes de pourcentages Temps	- de 49,9	50 %	55 %	60 %	65 %	70 %	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %	100 %
		à 54,9	à 59,9	à 64,9	à 69,9	à 74,9	à 79,9	à 84,9	à 89,9	à 94,9	à 99,9	
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



Nous étudierons les caractéristiques de dispersion de cette répartition en déterminant à 30 et 60 minutes le 10^e percentile* (P 10) soit la valeur du pourcentage telle que 10 % des observations lui soient inférieures.

A. 30 minutes le P 10 est à 60 %, ce qui signifie qu'après 30 minutes d'incubation en eau distillée nous pouvons considérer que pour 90 % des biopsies le pourcentage d'émergence des microfilaires est égal ou supérieur à 60 %.

A. 60 minutes le P 10 est voisin de 90 % (88,9 %) : après 60 minutes d'incubation en eau distillée nous pouvons considérer que pour 90 % des biopsies le pourcentage d'émergence des microfilaires est égal ou supérieur à 90 %.

Nous constatons aussi qu'il y a relation directe entre la densité microfilarienne et la vitesse d'émergence des microfilaires en eau distillée. Celle-ci est d'autant plus rapide que la densité microfilarienne est faible : sur 22 biopsies de densité inférieure à 10 mf la totalité des microfilaires a émergé pour 12 d'entre elles dès la 30^e minute et pour 8 autres à 60 minutes.

Sur les 31 biopsies dont le pourcentage d'émergence est inférieur à 60 % après 30 minutes d'incubation, plus de la moitié (16) est constituée par des biopsies dont les densités microfariennes sont supérieures à 100 mf, les biopsies de faible densité (inférieure à 10 mf) étant rares: 3 cas. Quant à la dispersion des pourcentages d'émergence après 60 minutes d'incubation, elle est une translation de celle des pourcentages après 30 minutes : les biopsies dont le pourcentage d'émergence a été le plus faible après 30 minutes sont aussi celles dont le pourcentage d'émergence est le plus faible après 60 minutes. Notons que sur 302 biopsies, une seule a été négative après 30 minutes et positive au-delà (respectivement 3 mf après 60 minutes et 4 mf après 120 minutes).

* MORICE (E.) et CHARTIER (F.), 1954 - Méthode statistique 2^e partie - Analyse statistique - Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques pour la métropole et la France d'Outre - Mer - Imprimerie Nationale, PARIS (FRANCE).

En conclusion si l'on considère qu'il n'émerge plus de microfilaraires après 120 minutes d'incubation des biopsies en eau distillée nous trouvons que pour 90 % des biopsies examinées 60 % des microfilaraires ont émergé après 30 minutes d'incubation et 90 % après 60 minutes.

La lecture à 30 minutes en eau distillée constitue un standard pratique et constant sur le terrain. Les lectures soit à 60 minutes soit à 120 minutes modifient la densité microfilarienne observée mais non la prévalence de la maladie dans l'échantillon.

La différence entre nos résultats et ceux de Picq et al., (1971) 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 dans les conditions de terrain qu'en laboratoire, puisse être mise en cause (Tada, 1976).

3.4.2. - Emergence comparée des microfilaraires entre la 30ème minute en eau distillée et la 24ème 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 microfilaraires restant sur la lame ("charge initiale") a été comparé au total obtenu après addition des microfilaraires supplémentaires sorties en 24 heures dans l'eau physiologique (tableau VI).

Tableau VI. Emergence comparée des microfilaraires entre la 30ème minute en eau distillée et la 24ème heure en eau physiologique (repris de Moreau, Prost et Prod'hon 1977).

Classe de densité initiale (N. de mf. 30ème 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 30ème 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

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 et y la charge totale :

- 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 % 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 % suivant la densité microfilarienne).

3.4.3. - Comparaison de la valeur qualitative des méthodes de Picq et de Nelson.

L'eau physiologique est un milieu plus favorable aux microfilaraires que l'eau distillée : elles y émergent plus vite et en plus grand nombre. Il arrive que chez des sujets faiblement parasités, un résultat trouvé négatif en eau distillée soit positif en eau physiologique : Sowa et Sowa, (1975), comparant les méthodes de Picq et de Duke sur un échantillon de 68 examens ont trouvé 20 % de faux résultats négatifs en eau distillée.

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. Nous donnons (tableau VII) les résultats de cet essai :

Tableau VII. Variation de la prévalence après relecture à la 24ème 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 microfilariennes des faux négatifs montre que nous avons détecté ainsi des infections légères : 200 biopsies sur 236 (84,7 %) ont donné un résultat inférieur à 4 microfilaraires (fig. 2). Les très rares cas de très fortes charges sont peut-être dus à une omission du microscopiste lors de la première lecture.

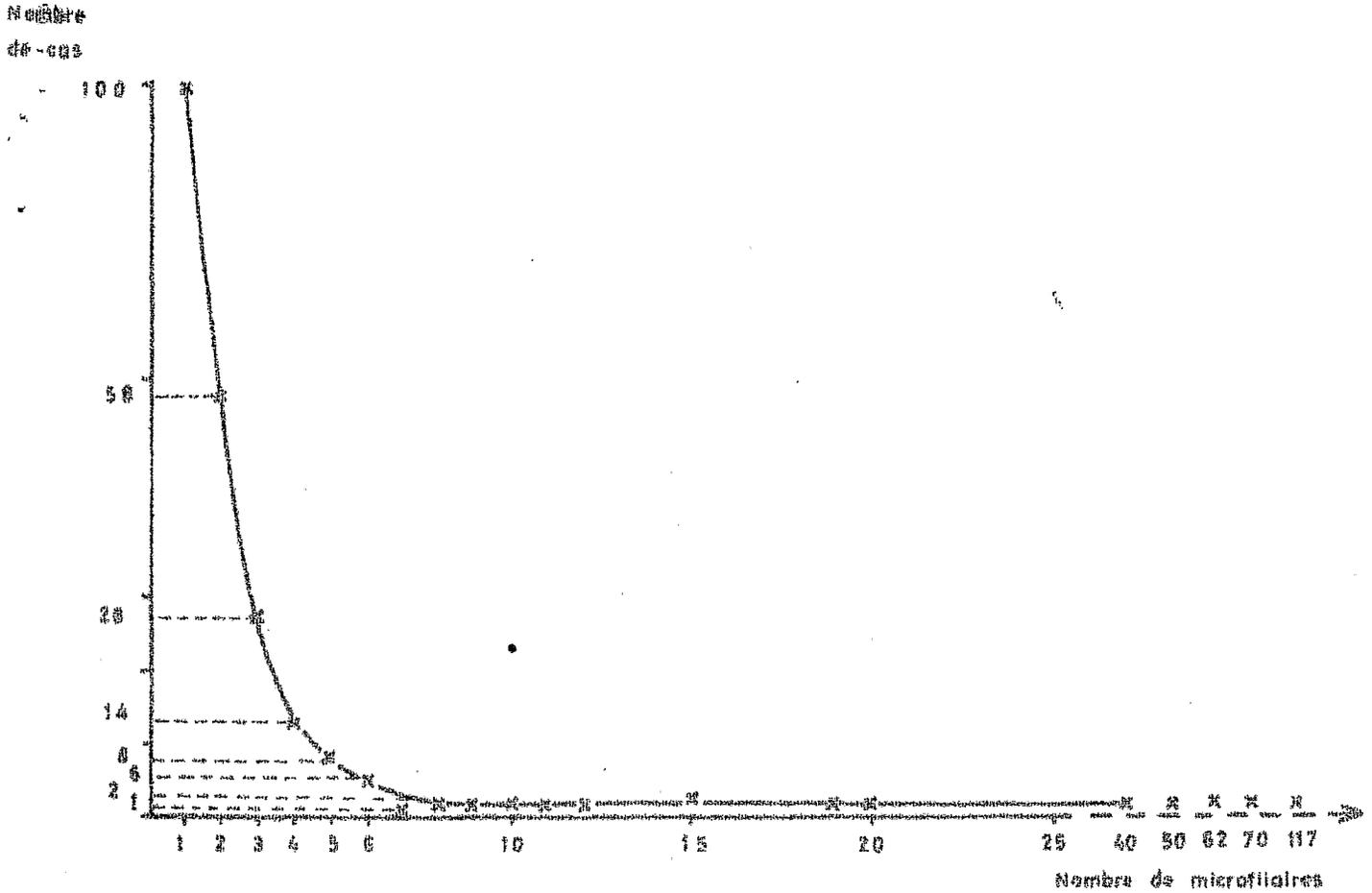


Fig 2. — Distribution des densités microfilariennes observées après 24 heures en eau physiologique de 236 biopsies négatives après examen à 30 minutes en eau distillée

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

L'analyse par âge des cas d'infection légère ainsi détectés montre qu'il ne prédominent pas chez les enfants. Leur nombre croît régulièrement avec l'âge en proportion directe de la prévalence du groupe considéré (Prost, 1976).

CONCLUSION

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

- a - toute méthode quantitative est nécessairement un standard de mesure et ne peut prétendre à l'absolu : malgré les techniques les plus sensibles, la totalité des microfilaires n'émerge pas d'une biopsie.
- b - 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 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'examens 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 si 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 24 heures d'incubation en eau physiologique si le résultat est négatif. 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 (test de Mazzotti par exemple).

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON (J.), FUGLSANG (H.), HAMILTON (P.J.S.) et MARSHALL (T.F. de C.), 1975a. - The prognostic value of head nodules and microfilariae in the skin in relation to ocular onchocerciasis - Tropenmed.Parasit., 26, 191-195.
- ANDERSON (R.I.), FAZEN (L.) et BUCK (A.A.), 1975b. - Onchocerciasis in Guatemala. 2 - Microfilariae in urine, blood and sputum after DEC. - Amer.J. Trop.Med.Hyg., 1, 58-61.
- ANDERSON (R.I.), FAZEN (L.) et Buck (A.A.), 1975c. - Onchocerciasis in Guatemala. 3 - Daytime periodicity of microfilariae in skin. - Amer.J. Trop.Med.Hyg., 1, 62-65.
- ANDERSON (R.I.), THOMAS (D.), Mc RAE (A.) et Buck (A.A.), 1975d. - Onchocerciasis : frequency of microfilaruria and other manifestations in a village of Cameroon. - Amer.J. Trop.Med.Hyg., 1, 66-70.
- BASSET (A.), LARIVIERE (M.) et HOCQUET (P.), 1962. - Technique de recherche des microfilaires d'onchocercques dans la peau. - Bull. Soc.Path.Exot., 55, (6), 968-970.
- BECKER (C.K.), 1950. - Filaires adultes (Onchocerca volvulus) libres dans les tissus. - Ann.Soc.Belge Med.Trop., 30, 9-10.
- BRINKMANN (U.K.), 1973. - Quantitative measurements on skin snips of onchocerciasis patients. - Tropenmed.Parasit., 24, 397-403.
- Brinkmann (U.K.), 1974. - The assessment of microfilarial densities in skin snips from onchocerciasis patients under field conditions. - Tropenmed.Parasit., 25, 160-166.
- BRINKMANN (U.K.), 1976. - A comparison of skin scarification and skin biopsies in the diagnosis of onchocerciasis. - Doc.OMS/OCP/EPI/76.13.
- BRINKMANN (U.K.), 1977. - Pathology and general features of onchocerciasis in the project area. - Workshop on onchocerciasis, Accra, July 1977. Doc.OMS/OCP/EPI/77.34.

- BUCK (A.A.), 1973. - Microfilaruria in onchocerciasis in Africans. Tropenmed. Parasit., 24, 336-338.
- BUCK (A.A.), ANDERSON (R.I.), CONSTON (Jr) (J.A.C.), WALLACE (G.K.), CAMOR (D.H.), HARMAN (Jr) (L.E.), DORMER (M.W.) et GAULEY (J.P.), 1971. - Microfilaruria in onchocerciasis. A clinical and epidemiological follow up study in the Republic of Chad. - Bull.Org.Mond. Santé., 45, 353-369.
- BURCH (T.A.), 1951. - Prurit consécutif à l'emploi de l'Hetrazan, comme test de diagnostic de l'onchocercose. - Rev.Coleg.Med.Guatem., 2, 53-57.
- COLLINS (R.C.), CAMPBELL (C.C) et WILTON (D.P.), 1976. - The skin biopsy in the diagnosis of onchocerciasis : a comparative study of NCTC 135, saline and water. - WHO/ONCHO/76.128.
- COUZINEAU (P.), BOURREE (P.) et MOLIMARD (R.), 1973. - Onchocercose avec microfilarémie et microfilarurie découverte au cours d'un syndrome néphrotique. Bull. Soc. Path. Exot., 66, (4), 553-558.
- DE BORGES (R.), 1971. - Findings of microfilarial larval stages in gynecologic smears. - Acta cytol. (Philadelphie), 15, 476-478.
- DUKE (B.O.L.), 1962. - A standard method assessing microfilarial densities in onchocerciasis surveys. Bull. Org. Mond. Santé., 27, 629-632.
- DUKE (B.O.L.), 1970. - Onchocerciasis : deep worm bundles close to hip joints. - Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 64, 791-792.
- DUKE (B.O.L.), 1975. - L'épreuve de Mazzotti. - ONCHO/WR/75.9 Angl./Fr. 6 pp.
- DUKE (B.O.L.), 1976. - Route of entry of Onchocerca volvulus microfilariae into the eye. - Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 70, 90-91.
- DUKE (B.O.L.), SCHEFFEL (P.D.), GUYON (J.) et MOORE (P.J.), 1967. - The concentration of Onchocerca volvulus microfilariae in skin snips taken over twenty-four hours. - Ann.Trop.Med.et Parasit., 61, (2), 206-219.

- DUKE (B.O.L.), VINCELLETTE (J.) et MOORE (P.J.), 1976. - Microfilariæ in the cerebro-spinal fluid and neurological complications during treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine. - Tropenmed.Parasit., 27, 122-132.
- FAIN (A.) et BASTIN (J.P.), 1975. - Le diagnostic parasitologique de l'onchocercose. - Ann.Soc.Belge Med.Trop., 55, (5), 505-515.
- FAIN (A.), ELSEN (P.), WERY (M.) et MAERTENS (K.), 1974a. - Les filarioses humaines au Mayumbe et dans les régions limitrophes (Rép. du Zaïre). Evaluation de la densité microfilarienne. - Ann. Soc.Belge Med.Trop., 54, (1), 5-34.
- FAIN (A.), VANDEPITTE (J.) et WERY (M.), 1974b. - Microfilarémie par Onchocerca volvulus. - Ann.Soc.Belge Med.Trop., 54, (2), 121-127.
- FUGLSANG (H.) et ANDERSON (J.), 1974. - Microfilariæ of Onchocerca volvulus in blood and urine during and after treatment with diethylcarbamazine J.Helminth., 48, 93-97.
- FUGLSANG (H.) et ANDERSON (J.), 1977. - 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., 28, 63-67.
- FUGLSANG (H.), ANDERSON (J.), MARSHALL (T.), AYONGE (S.) et FISIIY (C.), 1976. - Seasonal variation in the concentration of Onchocerca volvulus microfilariae in the skin. - Tropenmed.Parasit., 27, 365-369.
- FULLEBORN (F.) et SIMON (P.), 1913. - Untersuchungen über das Vorkommen der Larven von Onchocerca volvulus in Lymphdrüsen und in der Circulation. Arch. Schiffs. Trop. Hyg., 17, 843-844.
- GENTILINI (M.), LEGER (N.) et DIOT (G.), 1973. - Présence de microfilaries d'Onchocerca volvulus dans le sang. - Soc.de Parasitologie, Séance du 10 Mai 1973, Perpignan.
- GUNDERS (A.E.) et NEUMANN (E.), 1963. - 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., 12, (5), 761-766.

- GUNDERS (A.E.) et NEUMANN (E.), 1972. - Parasitology and diagnosis of onchocerciasis with special reference to the outer canthus of the eye. Isr.J.Med.Sci., 8, 1139-1142.
- HOOGHE (d') (M.), 1934. - Contribution à l'étude de l'Onchocercose humaine dans l'Uele. - Ann.Soc.Belge Med.Trop., 14, 153-180.
- ISRAEL (M.S.), 1959. - The nodule in onchocerciasis. - Trans.R.Trop. Med.Hyg., 53, (2), 142.
- KALE (O.O.), 1976. - Standardization of techniques of assessing microfilarial densities in Onchocerciasis surveys. - Tropenmed.Parasit.Sonderheft., 1, 41-42.
- KALE (O.O.), BAMMEKE (A.O.) et AYENI (O.), 1974. - An evaluation of skin snip techniques used in the quantitative assessment of microfilarial densities of Onchocerca volvulus. - Bull.Org.Mond.Santé., 51, 547-549.
- KERSHAW (W.E.), DUKE (B.O.L.) et BUDDEN (F.H.), 1954. - Distribution of microfilariae of Onchocerca volvulus in the skin. Its relation to skin changes and to eye lesions and blindness. - Brit.Med.J., 2, 724-729.
- KERSHAW (W.E.), JAMISON (D.G.), NUGENT (D.) et DUKE (B.O.L.), 1956. 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.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 50, 1, 6.
- LAGRAULET (J.), 1971. - Etude des biopsies cutanées et de la réaction de Mazzotti chez les onchocercariens examinés en France. - Bull.Soc. Path.Exot., 64, 231-237.
- LAGRAULET (J.) et BARD (J.), 1969. - Une méthode d'évaluation du degré d'infestation dans l'onchocercose. - Bull.Soc.Path.Exot., 62, 601-605.
- LAGRAULET (J.), ROBERT (C.) et BARD (J.), 1967. - Techniques des biopsies cutanées dans le diagnostic de l'onchocercose. - Bull.Soc. Path.Exot., 60, 297-300.

- LARTIGUE (J.J.), 1967. - Variation du nombre de microfilaries d'Onchocerca volvulus contenues dans des biopsies cutanées pratiquées à différentes heures de la journée. - Bull.Org.Mond.Santé., 36, 491-494.
- MAZZOTTI (L.), 1948. - Posibilidad de utilizar como medio de diagnostico auxiliar en la Onchocercosis las reacciones alérgicas consecutivas a la administration de "Hétrazan". - Rev.Inst.Salubr.Enferm.Trop., 9, 235-237.
- MAZZOTTI (L.), 1951. - Observations based on cutaneous biopsies in onchocerciasis. - Amer.J.Trop.Med.Hyg., 31, 624-627.
- MAZZOTTI (L.), 1954. - Estudio comparativo entre la biopsia y la escarificacion cutanéas en el diagnostico de la onchocercosis. - Rev.Inst.Salubr.Enferm.Trop., 14, 19-23.
- MAZZOTTI (L.), 1959. - Presencia de microfilarias de Onchocerca volvulus en el liquido cefalo-roquides de enfermos tratados con hetrazan. - Rev.Inst.Salubr.Enferm.Trop., 19, 1-5.
- MAZZOTTI (L.) et OSORIO (M.T.), 1949. - 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., 10, 269-275.
- MILLER (M.J.), 1958. - An evaluation of the skin scarification technique for the recovery of microfilariae of Onchocerca volvulus. - Amer.J.Trop.Med.Hyg., 7, 554-560.
- MONJUSIAU (A.), 1963. - Programme de recherche sur les aspects ophtalmologiques de l'onchocercose - Mission Afrique de l'Ouest, Avril-Juillet 1962. WHO/PA/96.63.
- MONJUSIAU (A.), LAGRAULET (J.), DURAND (B.) et ROBERT (C.), 1964. - Contribution à l'étude de la réaction de Mazzotti. - Bull.Soc.Path.Exot., 57, 1084.
- MONTPELLIER (J.) et LACROIX (A.), 1920. - Le craw-craw ou gale filarienne. Son origine dans les Kystes sous-cutanés à Onchocerca volvulus. - Bull.Soc.Path.Exot., 13, 305-315.

- MOREAU (J.P.), PROD'HON (J.) et PROST (A.), 1977. - Propositions d'une méthodologie d'enquête de masse sur l'endémie onchocercienne en Afrique de l'Ouest. - In : Rapp.fin.17ème conf.techn.OCCGE, BOBO-DIOULASSO.

- NNOCHIRI (E.), 1964. - Observations on onchocercal lesions seen in autopsy specimens in Western Nigeria. - Ann.Trop.Med.Parasit., 58, 89-93.

- NOZAIS (J.P.), HEROIN (P.), LANGLET (J.) et DOUCET (J.), 1976. - Intérêt de l'immunologie dans le diagnostic de l'onchocercose cutanée. - Bull.Soc.Path.Exot., 69, (5), 456-466.

- OMS - RAPPORT D'UN COMITE D'EXPERTS, 1976. - Epidémiologie de l'onchocercose. - Sér.Rapp.Techn. n° 597.

- ONORI (E.), 1963. - 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., 12, 3-10.

- OOMEN (A.P.), 1967. - Clinical manifestations of onchocerciasis. - Ethiop. Med.J., 5, 159.

- OVAZZA (M.), 1966. - Evaluation des méthodes et des techniques relatives au parasite et à la morbidité-utilisables en enquêtes de masse sur l'onchocercose WHO/ONCHO/66-48.

- PAROUTY (J.), 1975. - Evaluation de trois modèles de pinces à sclérectomie pour le diagnostic quantitatif de l'infestation cutanée par Onchocerca volvulus. - Thèse de doctorat en médecine, Marseille.

- PFISTER (R.), 1952. - Répartition et fréquence des filarioses en Haute-Volta et en particulier dans la région de Bobo-Dioulasso. - Bull.Soc.Path.Exot., 45, 92-102.

- PICQ (J.J.) et COZ (J.), 1970. - Contribution à l'étude de l'évaluation de densités microfilariennes chez les onchocerciens. - PROC. 2nd.Int.Congr.Parasit., Washington, 4, 28.

- PICQ (J.J.), COZ (J.) et JARDEL (J.P.), 1971. Une méthode d'évaluation des densités microfilariennes d'Onchocerca volvulus Leuckart, 1893, chez les onchocerquiens : technique et temps de lecture des biopsies cutanées. - Bull.Org.Mond.Santé., 45, 517-520.
- PICQ (J.J.) et JARDEL (J.P.), 1974. - Une méthode d'évaluation des densités microfilariennes d'Onchocerca volvulus Leuckart, 1893 chez des onchocerquiens. Répartition des densités microfilariennes suivant les sites et niveau de prélèvement des biopsies cutanées. Variation des densités microfilariennes au cours des 24 heures. - Bull.Org.Mond.Santé, 51, 145-153.
- PICQ (J.J.) et ROUX (J.), 1973. - Faits nouveaux dans l'onchocercose : la microfilariurie. Sa répartition géographique, ses rapports avec les densités microfilariennes cutanées, l'albuminurie et la chimiothérapie. Premiers résultats. - Médecine Tropicale, 33, 451-469.
- PRICE (D.L.), 1961. - The occurrence of microfilariae of Onchocerca volvulus in urine of infected individuals. - J.Parasitol., 47, 572.
- PROD'HON (J.), CROZAFON (P.) et BENDERITTER (P.), 1977. - L'endémie onchocercienne dans la région de TOUBA et BOROTOU (Bassin du Haut Sassandra, République de COTE-D'IVOIRE) (Mai 1977). Doc.Tech.OCCGE n° 6548, BOBO-DIOULASSO.
- PROST (A.), 1976. - Examen des biopsies cutanées dans l'onchocercose. Comparaison des résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus après incubation de 30 minutes en eau distillée et de 24 h. en sérum physiologique. - Doc.Tech.OMS/OCP/EPI/76.19.
- PROST (A.), THYLEFORS (B.) et PAIRAULT (C.), 1975. - Méthodes d'évaluation épidémiologique de masse de l'onchocercose. Leur utilisation au cours d'un programme de lutte contre le vecteur. OMS, ONCHO/WP/75.14, 20p., français/anglais.
- RIVES (M.) et SERIE (F.), 1967. - L'onchocercose en Côte-d'Ivoire. - Méd.Afr.Noire, 10, 483-488;
- RODHAIN (J.) et GAVRILOV (W.), 1935. - Un cas de localisation profonde de "microfilaria volvulus". - Ann.Soc.Belge Méd.Trop., 15, (4), 1-10.

- ROUGEMONT (A.), BOISSON (M.E.), PAROUTY (J.) et PARIAUD (P.), 1975.
- Evaluation de trois modèles de pinces à sclérotomie pour le diagnostic quantitatif de l'infestation cutanée par Onchocerca volvulus.
- WHO/ONCHO/75.117.

- SCHEIBER (P.), BRAUN-MUNZIGER (R.A.), SOUTHGATE (B.A.) et AGBO (K.N.), 1976a. - Epidemiological studies on onchocerciasis by means of a new field technique. - Bull.Org.Mond.Santé, 53, 472-475.

- SCHEIBER (P.), SOUTHGATE (B.A.) et BRAUN-MUNZIGER (R.), 1976b.
- Erste Erfahrungen mit einer neuen Method sur Ermittlung von Onchocerca volvulus - Mikrofilarien aus "Standard skin snips". - Tropenmed.Parasit., Sonderheft 1, 42.

- SOWA (J.) et SOWA (S.C.), 1975. - Quantitative assessment of microfilarial load in onchocerciasis. - Trans.R.Soc.Trop.Méd.Hyg., 69, 363-364.

- TADA (I.), 1976. - Quantitative studies of the changes in microfilarial density in Onchocerca volvulus infection. - Tropenmed.Parasit., Sonderheft 1, 28.

- TADA (I.) et FIGUEROA MARROQUIN (H.), 1974. - The density of Onchocerca volvulus microfilariae in the skin at different times of the day in Guatemala. - Jap.J.Parasit., 23, (4), 220-225.

- TADA (I.), IWAMOTO (I.) et WONDE (T.), 1973. - A preliminary report on the examination of skin snips method used in the detection of Onchocerca volvulus microfilariae. - Trop.Med., 15, 121-123.

- THOMAS (D.B.), ANDERSON (R.I.) et MCRAE (A.A.), 1973a. - Microfilariae of Onchocerca volvulus in a vaginal smear specimen. - Amer.J.Parasit., 59, 941-942.

- THOMAS (D.B.), ANDERSON (R.I.) et MCRAE (A.A.), 1973b. - Daytime variation in the density of Onchocerca volvulus microfilariae in human skin. Bull.Org.Mond.Santé, 49, 493-498.

- THYLEFORS (B.) et PROST (A.), 1977. - Aspects on a tolerable level of onchocerciasis. - Doc.OMS/OCP/SAP/77/WP.4.
- TOUFIC (N.), 1969a. - Pratique de la biopsie cutanée dans l'onchocercose par une pince emporte-pièce. - Afr.Méd., 8, (72), 587-588.
- TOUFIC (N.), 1969b. - La pince emporte-pièce dans la biopsie cutanée de l'onchocercarien. - Bull.Soc.Path.Exot., 62, 517-730.
- VAN DEN BERGHE (L.) et CHARDOME (M.), 1951. - An easier and more accurate diagnosis of malaria and filariasis through the use the skin scarification smear. - Amer.J.Trop.Méd.Hyg., 31, 411-413.
- WEGESA (P.), 1966. - Variation of microfilarial densities of 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, Tanzania, 9, 31-32.
- WERY (M.), MAERTENS (K.) et FAIN (A.), 1975. - La scarification dermique dans les enquêtes filarioses : sept années d'utilisation au Zaïre. In : Rapp.final 10ème conf.techn.OCEAC, 355-359.
- WOODRUFF (A.W.), CHOYCE (D.P.), PRINGLE (C.), LAING (A.B.G.), HILS (M.) et WEGESA (P.), 1966. - Onchocerciasis in the Usumbura mountains, Tanzania : the disease, its epidemiology, and its relationship to ocular complications. - Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 60, 695-706.