

**RECHERCHES SUR LA FILARIOSE**  
**CHOIX D'UNE TECHNIQUE DE NUMÉRATION**  
**DES MICROFILAIRES DU SANG**

Par **Henri GALLIARD** et **D.-V. NGU**

Les recherches cliniques sur la filariose n'exigent que des procédés de recherche des microfilaires les plus simples. La numération précise, en particulier, n'est pas indispensable. C'est seulement pour étudier le phénomène de la périodicité et en obtenir éventuellement une explication que nous avons étudié comparativement les différentes techniques de numération qui sont très nombreuses dans leurs détails, mais se ramènent à quelques principes simples, pour adopter celle qui paraît donner les résultats les plus précis.

Après un certain nombre d'essais comparatifs, dont nous donnons plus loin l'essentiel, nous avons adopté une des méthodes dont Fülleborn a donné le principe (1908), c'est-à-dire la numération dans le sang dilué et hémolysé, en chambre humide et graduée.

Nous avons pris comme mélangeur la pipette de Potain, au 1/10, pour la numération des globules blancs. Le liquide de dilution est celui qui est employé pour la numération des globules blancs :

Eau .....	100
Acide acétique .....	0,50
Formol .....	1

légèrement coloré par quelques gouttes de bleu de méthylène. Le sang à examiner est aspiré jusqu'au trait I et le liquide de dilution jusqu'au trait II. Mais il faut observer deux précautions :

1° La piqûre du doigt doit être suffisamment profonde pour que le sang vienne facilement et spontanément. Il ne faut, en aucun cas, exercer de compression pour congestionner la région piquée, procédé qui détermine des variations considérables d'une goutte à l'autre.

2° Le sang doit être aspiré dans la pipette au fur et à mesure de son écoulement et à la fin de l'aspiration, le point piqué doit être complètement sec.

La numération se fait dans une cellule de Nageotte dont la contenance totale est de  $50 \text{ mm}^3$ . Le contenu d'une pipette suffit pour remplir deux cellules, ce qui correspond à  $100 \text{ mm}^3$  de dilution, c'est-à-dire à  $10 \text{ mm}^3$  de sang. Il suffit de diviser par 10 le nombre total de microfilaires trouvées dans les deux cellules pour avoir le nombre de microfilaires par  $\text{mm}^3$  de sang.

La nuit, nous nous contentons de faire la numération avec une seule cellule chaque fois. Le jour, le nombre de microfilaires étant plus faible, nous faisons la numération dans trois cellules ( $30 \text{ mm}^3$  de sang).

\*  
\*\*

Avant de fixer notre choix sur cette méthode, nous avons procédé à un certain nombre de vérifications.

I. *Choix du point de prélèvement du sang.* — Dans la thèse de N.-H. Phiem, sont signalés un certain nombre de résultats obtenus par l'un de nous et l'auteur. La conclusion en était que le sang périphérique contient partout le même nombre de microfilaires.

Mais la technique adoptée était la numération en goutte épaisse faite avec un volume de sang indéfini. Nous avons donc refait la même expérience avec la technique décrite plus haut. Ainsi :

Malade Sa.	Orteil :	dans la 1 <sup>re</sup>	goutte :	7,8	microfilaires	par $\text{mm}^3$ .
	—	2 <sup>e</sup>	—	9	—	—
	Doigt :	—	1 <sup>re</sup>	—	7,4	—
	—	—	2 <sup>e</sup>	—	8,8	—

Les différences sont donc insignifiantes.

II. *Différence entre le sang périphérique et le sang veineux.* — Pour Sukanuma (1921), il y a autant de microfilaires dans le sang périphérique que dans le sang veineux. Cependant pour Yorke et Blacklock (1917), le sang périphérique est plus riche. C'est ce que nous avons vérifié ici sur six porteurs de microfilaires.

Doigt —	Veine du pli du coude —
0,1 par mm <sup>3</sup>	0,0 par mm <sup>3</sup>
0,2 —	0,0 —
6 —	5,2 —
4,2 —	3,7 —
5,9 —	4,8 —
5,0 —	4,2 —

Les différences sont faibles mais cependant appréciables.

III. *La numération des microfilaires dans quelques millimètres cubes de sang hémolysé est-elle moins précise que dans un volume important ?* Il semble bien que non. Recherchant les microfilaires dans 10 cm<sup>3</sup> de sang hémolysé, avec une solution de formol, nous avons constaté que la plus grande partie ne se retrouvait pas dans les culots de centrifugation. Ainsi dans un cas où le sang veineux contenait deux microfilaires par mm<sup>3</sup>, on n'en retrouvait que 300 dans le culot de centrifugation de 10 cm<sup>3</sup>, alors que théoriquement on aurait dû en trouver 20.000. Avec 5 cm<sup>3</sup> et 1 cm<sup>3</sup> les résultats ne sont pas meilleurs.

Dans le sang veineux citraté, les microfilaires vivent longtemps et, par leurs mouvements, pourraient faciliter la recherche. En réalité, en raison même de leur mobilité et aussi de la densité plus grande du plasma, la centrifugation arrive plus difficilement encore que dans le cas du sang hémolysé à les réunir au fond du tube.

Ainsi, si les méthodes par centrifugation d'un certain volume de sang sont utilisables pour la découverte des microfilaires, elles sont d'une imprécision absolue quand il s'agit de numération.

IV. *La technique de numération en chambre humide est-elle plus précise que celle de la goutte épaisse ou du frottis coloré ?* — Il est certain que la technique de numération en chambre humide demande un certain appareillage et doit être faite autant que possible extemporanément. Il semblerait logique de lui préférer une méthode plus pratique : la prise de sang avec une pipette calibrée, qui a été recommandée par Low (avec 20 mm<sup>3</sup> de sang), l'étalement, la dessiccation sur lame et la numération après coloration.

Nous avons fait des essais comparatifs des deux méthodes.

Pour avoir des gouttes épaisses de même quantité de sang nous avons mesuré ce volume avec des pipettes capillaires calibrées à 25 mm<sup>3</sup>. La pipette est ensuite lavée deux fois à l'eau distillée et le liquide de lavage étalé sur deux lames. La numération des micro-

filaires se fait sur la lame de sang coloré et les deux gouttes d'eau de lavage.

Voici les résultats obtenus sur 13 malades différents :

<i>En chambre humide après hémolyse</i>			<i>Par goutte épaisse colorée</i>		
—			—		
10	microfilaires	pour 25 mm <sup>3</sup>	0	microfilaires	pour 25 mm <sup>3</sup>
5	—	—	2	—	—
20	—	—	2	—	—
3	—	—	10	—	—
85	—	—	96	—	—
5	—	—	0	—	—
13	—	—	2	—	—
15	—	—	0	—	—
85	—	—	95	—	—
27	—	—	7	—	—
120	—	—	64	—	—
17	—	—	0	—	—
5	—	—	0	—	—

Ainsi, s'il existe des résultats contradictoires, dix fois sur treize le premier procédé donne un chiffre supérieur. Il semble plus exact car, cinq fois, il a permis de déceler des microfilaires alors que l'examen du frottis donnait un résultat négatif.

Nous nous sommes demandé quelles étaient les causes de ces différences ? Les microfilaires peuvent d'abord rester adhérentes à la pipette malgré le double lavage à l'eau distillée. D'autres, pour une raison quelconque, peuvent résister à la coloration.

Nous avons vérifié, d'autre part, que les liquides de coloration et de lavage des gouttes épaisses n'entraînaient qu'un nombre infime de microfilaires. Ainsi, dans le culot de centrifugation des liquides de coloration de six gouttes épaisses, qui contenaient en tout 500 microfilaires, on en trouvait seulement trois.

De même, pour les frottis, on peut supposer qu'une partie importante des larves restent attachées à la lamelle.

On est cependant surpris de constater que ces différentes causes d'erreur interviennent certainement très peu, puisque le nombre des larves trouvées dans le sang frais entre lame et lamelle n'est pas plus grand que dans les préparations étalées et colorées comme on le voit ci-dessous.

On voit donc que le nombre des microfilaires est sensiblement égal dans les frottis minces et à frais entre lame et lamelle ; que

dans la goutte épaisse le nombre est plus grand ; enfin que les chiffres donnés par la numération après hémolyse dépassent constamment et nettement les précédents.

Mais il est évident qu'une technique ne vaut que par la constance des résultats qu'elle donne, c'est-à-dire, dans ce cas, par la similitude des chiffres obtenus chez un même malade, et au même moment.

	FROTTIS	GOUTTE ÉPAISSE	SANG FRAIS ENTRE LAME ET LAMELLE	NUMÉRATION APRÈS HÉMOLYSE
Malade ... Sang.....	73 dans 25 <sup>mm</sup> 3 ou 2,92 par <sup>mm</sup> 3	108 dans 25 <sup>mm</sup> 3 ou 4,32 par <sup>mm</sup> 3	67 dans 25 <sup>mm</sup> 3 ou 2,88 par <sup>mm</sup> 3	7,2 — 7,8 par <sup>mm</sup> 3
Malade ... Phong....	16 dans 10 <sup>mm</sup> 3 ou 1,6 par <sup>mm</sup> 3	47 dans 10 <sup>mm</sup> 3 ou 4,7 par <sup>mm</sup> 3	25 dans 10 <sup>mm</sup> 3 ou 2,5 par <sup>mm</sup> 3	6 à 6,7 par <sup>mm</sup> 3

Dans la technique du sang hémolysé en chambre humide, les écarts ne dépassent pas 20 pour 100. Si les écarts sont plus importants, ils sont dus toujours à l'inobservance d'une ou des deux précautions mentionnées plus haut. Avec l'étalement ou la goutte épaisse de sang coloré, les écarts sont beaucoup plus grands et atteignent couramment 40 à 60 pour 100. Notons aussi que nous avons vérifié les résultats de ces techniques sur des malades généralement peu parasités (5 à 12 microfilaries par <sup>mm</sup>3) et sur des chiens chez qui le nombre des microfilaries, de *D. immitis*, est beaucoup plus élevé (50 à 70 par <sup>mm</sup>3).

#### RÉSUMÉ

En conclusion, après un certain nombre d'essais comparatifs, nous croyons préférable d'adopter, pour la numération des microfilaries du sang périphérique, la méthode du sang dilué et hémolysé avec numération en cellule humide, celle de Nageotte entre autres. Les résultats obtenus sont plus exacts, plus comparables entre eux, qu'avec les techniques de prélèvement avec pipette calibrée, suivi

d'étalement en frottis ou en goutte épaisse, et coloration, ou examen à frais entre lame et lamelle.

Les chiffres obtenus sont relativement plus élevés, avec une quantité de sang faible (10 à 30 mm<sup>3</sup> de sang), que ceux donnés par centrifugation d'un volume important. La méthode semble donc avantageuse autant pour la recherche des microfilaires de *Wuchereria bancrofti* que pour leur numération (1).

#### BIBLIOGRAPHIE

- FÜLLEBORN (F.). — Ueber Versuche an Hundefilarien und deren Uebertragung durch Mücken. *Beihefte zum Arch. f. Sch. und Trop. Med.*, XII, 1908, p. 2.
- GALLIARD (H.) et NGU (D. V.). — Techniques de recherche des microfilaires du sang. *Ann. Fac. Méd. et Pharm. Indochine*, VI, 1941, p. 35.
- LANGERON (M.). — *Précis de Microscopie*, 6<sup>e</sup> édition, Paris, Masson, 1942.
- LOW (G. C.). — *Filaria loa* cases : continuation reports. *J. trop. Med. and Hyg.*, XVI, 1913, p. 118.
- KNOTT (J.). — A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. Roy. Soc. Med. and Hyg.*, XXXIII, 1939, p. 191.
- PHIEM (N. H.). — *Contribution à l'étude de la filariose au Tonkin*. Thèse de Hanoï, 1936.
- SUGANUMA (S.). — Contribution to the knowledge of periodicity of the *Filaria bancrofti*. *Japan Med. World*, Tokyo, I, 1921, p. 1.
- YORKE (W.) et BLACKLOCK (B.). — Observation on the periodicity of *Microfilaria nocturna*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, II, 1917, p. 127.

#### Faculté de médecine de Hanoï.

(1) James Knott, considérant que, dans tout sang présentant des microfilaires la nuit, on peut en trouver le jour, à condition d'utiliser une quantité de sang suffisamment importante, a recommandé une méthode (par laquage avec le formol, centrifugation et coloration sur lame) permettant d'effectuer les enquêtes épidémiologiques le jour au lieu de la nuit. La quantité de sang employée est de 1 cm<sup>3</sup>, mais, dans certains cas, il faut examiner 10 cm<sup>3</sup>. Ohama a utilisé la même méthode avec le même succès. Notons cependant que, même dans 30 mm<sup>3</sup>, quantité que nous employons pour nos numérations le jour, nous avons toujours trouvé, sauf dans des cas tout à fait exceptionnels, des microfilaires à toute heure du jour. Il semble d'ailleurs que dans la pratique, et non pour démontrer l'efficacité de la méthode, on pourrait choisir d'autres heures que 9 ou 10 (S. Ohama), qui sont celles, dans notre expérience, où le nombre des larves est le plus bas, alors que peu avant et peu après il s'élève sensiblement.