

LA RÉTRACTILITÉ DES MICROFILAIRES SANGUICOLES
DANS LES GOUTTES ÉPAISSES,
SES MODALITÉS ET SA VALEUR DIAGNOSTIQUE

Par Yves J. GOLVAN

L'un des caractères différentiels les plus apparents des Microfilaires sanguicoles dans les gouttes épaisses colorées est ce que l'on appelle classiquement leur « attitude ». Les Microfilaires de *W. bancrofti* et de *M. ozzardi*, et, à un moindre degré, celles de *D. perstans*, ont des courbures régulières, à grand rayon, « gracieuses ». Les Microfilaires de *Loa loa*, de *W. malayi* et de *W. bancrofti* var. *vauceli* voient leurs courbures principales compliquées de petites ondulations secondaires, ce qui leur donne un aspect tortillé très caractéristique.

Certains spécialistes sont capables de différencier à frais, sans aucune coloration vitale, les Microfilaires de Bancroft de celles de Loa, par la façon dont elles se meuvent. Il est donc possible que les mouvements particuliers à chaque espèce interviennent dans l'attitude que l'embryon présente lorsqu'il est mort et fixé. Mais, à notre avis, ce n'est pas là la cause essentielle.

Certains auteurs (Fülleborn, 1913 ; Feng, 1933 ; M. O. T. Iyengar, 1939, et T. Wilson, 1956) reconnaissent la valeur de ce caractère dans les étalements récents (datant de 48 heures au plus), mais considèrent que, dans les gouttes épaisses anciennes (vieilles de plus de 10 jours), les Microfilaires de *W. bancrofti* se rétractent considérablement, que leurs courbures principales se compliquent d'ondulations secondaires et que, en conséquence, elles se rapprochent de l'aspect caractéristique de celles de *L. loa* et de *W. malayi*.

Pour vérifier ce fait, nous avons coloré des gouttes épaisses récentes et de très anciennes par diverses méthodes et examiné la collection de Microfilaires de toutes provenances de l'Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris, fixées et colorées par des méthodes différentes et dans des conditions fort dissemblables.

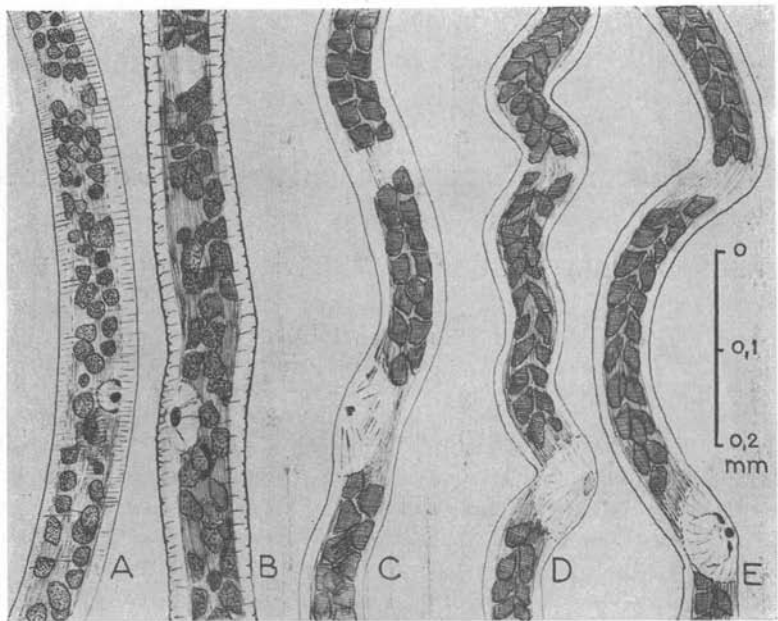


FIG. 1

- A) *W. bancrofti* typique non rétractée. Noter les noyaux somatiques et cuticulaires de petite taille, de coloration variable et bien séparés les uns des autres, l'aspect strié de la cuticule. On devine l'emplacement de la cellule excrétrice immédiatement au-dessous du pore excréteur.
- B) *W. bancrofti* typique rétractée. (Deshémoglobinsation à l'eau distillée, pas de séchage entre les temps et pas de fixation). Noter l'augmentation de taille des noyaux somatiques qui se chevauchent plus ou moins, l'aspect ridé de la cuticule et l'élargissement notable du diamètre.
- C) *Loa loa*. Les noyaux sont volumineux et disposés en deux colonnes parallèles.
- D) *Wuchereria malayi*. Les noyaux sont volumineux, leur grand axe est oblique et ils sont disposés en deux colonnes. La cuticule épouse étroitement les sinuosités de la colonne nucléaire.
- E) *Wuchereria bancrofti* var. *vauceli*. L'aspect est identique à celui de *W. malayi* et le diamètre sensiblement le même.

Techniques de coloration

Nous avons utilisé la technique courante de coloration au Giemsa dont les temps sont :

- 1) déshémoglobinsation par le sérum physiologique à 9 ‰ ;
- 2) séchage à la température du laboratoire ;
- 3) fixation par l'alcool méthylique ou l'alcool éthylique à 100° ;
- 4) séchage à la température du laboratoire ;

- 5) coloration par le mélange extemporané de 3 gouttes de colorant de Giemsa pour 1 cc. d'eau distillée faiblement alcaline ($pH = 7,2$). Cette technique évite la rétraction des Microfilaires au cours de la coloration.

Pour vérifier l'effet de la rétraction sur la morphologie des embryons, nous nous sommes placés dans les conditions les plus défavorables, en modifiant un ou plusieurs temps de notre technique : déshémoglobinisation à l'eau distillée, pas de séchage entre les temps, pas de fixation, coloration par des solutions très diluées de Giemsa.

Résultats

A) Gouttes épaisses récentes. — Nous avons coloré des Microfilaires de *W. bancrofti*, *L. loa*, *D. perstans*, *D. blancii* et *D. gracile*.

Avec la technique courante, nous n'avons observé aucune rétraction des Microfilaires et leur coloration était normale.

En introduisant une ou plusieurs modifications dans la technique, nous avons observé, de façon très irrégulière, des modifications dans la coloration des noyaux somatiques, de la gaine, et, également, des rétractions plus ou moins importantes.

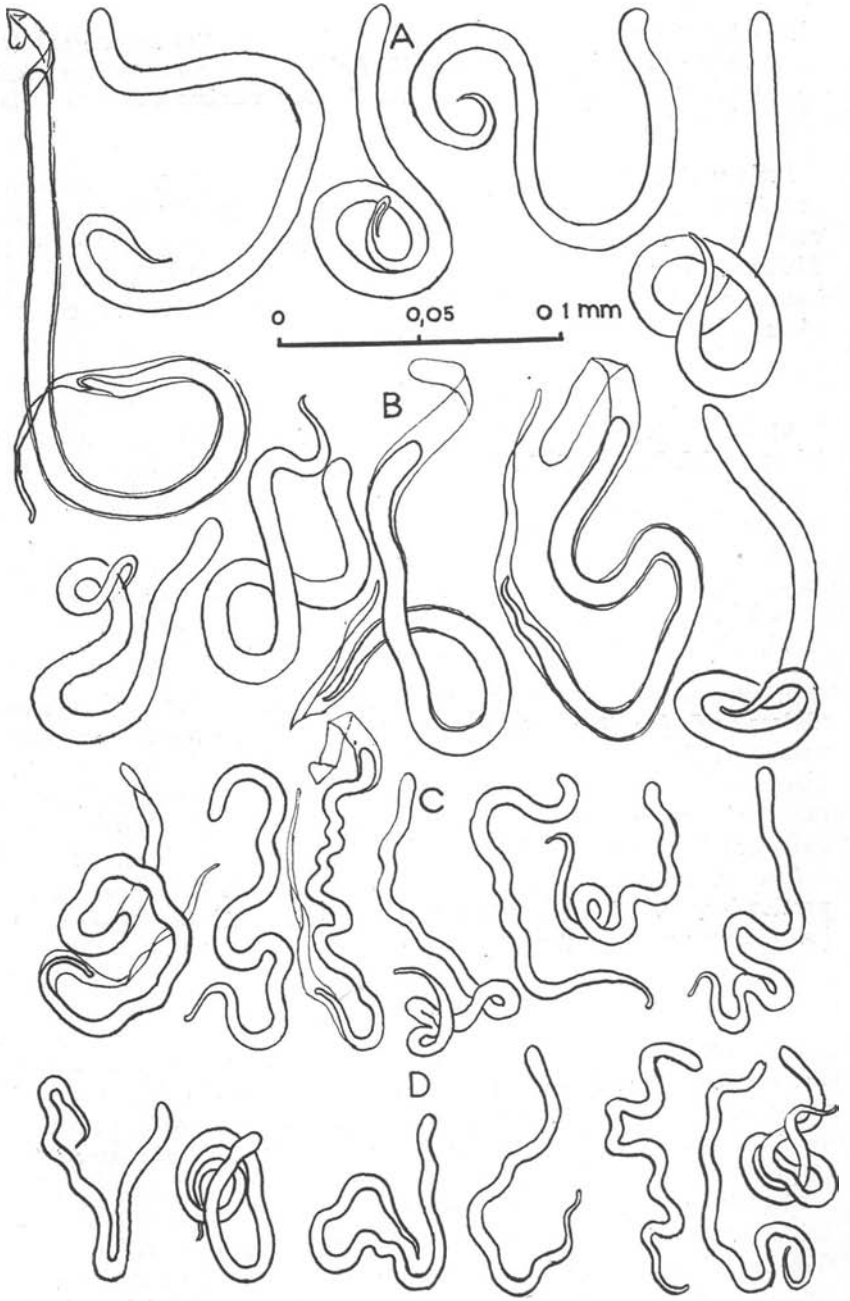
B) Gouttes épaisses anciennes. — Nous avons coloré des Microfilaires de *L. loa*, *D. perstans* et *D. blancii* dans des gouttes épaisses datant de 10 et 15 jours, ainsi que des Microfilaires de *W. bancrofti* dans des étalements faits à Calcutta, 25, 30 et 35 jours auparavant. Ces gouttes épaisses ont été comparées avec celles de même provenance, mais colorées sur place 24 heures après leur étalement.

Avec la technique courante, la rétraction des Microfilaires et, en particulier, de *W. bancrofti* est très minime, et elles conservent leurs courbures caractéristiques.

Discussion

Lorsque l'on colore des gouttes épaisses récemment étalées, on observe que les Microfilaires de *L. loa*, *W. malayi* et *W. bancrofti* var. *vaucei* se rétractent assez fortement, alors que les Microfilaires de *W. bancrofti* typique, *W. bancrofti* var. *pacifica*, *M. ozzardi* et *D. perstans* ne se rétractent pas ou fort peu.

Ce phénomène n'est nullement lié à la présence ou à l'absence de gaine autour de l'embryon. Dans les gouttes épaisses colorées au Giemsa, très souvent les gaines ne sont pas colorées, ou seules sont colorées les gaines des Microfilaires placées à la périphérie de la goutte, là où l'étalement est le plus mince, et donc là où il sèche le



plus vite. Certains auteurs pensent que les Microfilaires se débarassent de leur gaine au cours de l'étalement. Certes, ce phénomène existe, mais il reste exceptionnel. La preuve en est que si l'on colore les gouttes épaisses par l'hémalun ou l'hématéine, toutes les Microfilaires possèdent une gaine colorée.

Nous pensons que la rétraction n'est que la traduction d'une perméabilité plus ou moins grande de la cuticule de la Microfilarie aux agents fixateurs, et dépend donc, en définitive, de la structure même de cette cuticule. On peut en rapprocher le fait que, lorsque l'on colore des gouttes épaisses d'infestations mixtes par *W. malayi* et *W. bancrofti*, en utilisant un Giemsa très dilué (1/50, laissé agir pendant une heure), on voit que *W. malayi* est intensément colorée en violet sombre, alors que *W. bancrofti* a une coloration violet-rose très pâle. La rétraction est donc un caractère spécifique majeur, lié à la structure de la cuticule.

Dans les gouttes anciennes, on observe que les Microfilaires de Bancroft se sont secondairement rétractées, mais les modalités de cette rétraction sont très différentes de celle qui se produit immédiatement avec les embryons des autres Filaires pathogènes. En effet, et il faut souligner ce caractère important, chez *L. loa*, *W. malayi* et *W. bancrofti* var. *vauceli*, la rétraction porte à la fois sur la colonne nucléaire axiale et sur la cuticule. A un fort grossissement, on voit la cuticule épouser exactement les sinuosités de la colonne nucléaire (fig. 1 : C, D et E).

Au contraire, chez *W. bancrofti* typique, *W. bancrofti* var. *pacifica* et *M. ozzardi*, seule la colonne nucléaire devient sinueuse, alors que la cuticule se plisse transversalement, mais sans suivre les déformations de l'axe nucléaire. Il en résulte une diminution de la longueur des embryons, mais une augmentation de leur largeur. Une Microfilarie rétractée qui mesure plus de 7 μ de large est, à coup sûr, une Microfilarie de *W. bancrofti*. Pour le vérifier, le dessin à la chambre claire est indispensable, mais il permet, par une étude comparative, de lever tous les doutes (fig. 1 : A et B).

PLANCHE 1. — Attitude des Microfilaires dans les gouttes épaisses de sang.

- a) *W. bancrofti* typique et *W. bancrofti* var. *pacifica* avec et sans gaine visible, non rétractées.
- b) *W. bancrofti* typique de Calcutta colorée par la technique courante 25, 30 et 35 jours après l'étalement. Noter que la rétraction est minime et que la cuticule garde ses courbures caractéristiques.
- c) *W. malayi* avec et sans gaine provenant d'Inde, de Malaisie et du Tonkin.
- d) *W. bancrofti* var. *vauceli* provenant de la côte Sud-Est de Madagascar.

La technique courante de coloration au Giemsa, dont nous donnerons le détail dans une prochaine note, permet, non seulement d'éviter la rétraction accidentelle des Microfilaires de Bancroft dans les étalements récents, mais réduit au minimum cette rétraction dans les gouttes épaisses très anciennes et permet une identification facile.

La rétraction ou la non-rétraction d'une Microfilarie sanguicole, dans ces conditions, est donc un caractère spécifique de grande valeur dont il importe de tenir compte. Mais, même chez les spécimens très rétractés, les autres caractères spécifiques restent visibles (longueur de l'espace céphalique, taille des pores excréteur et anal, corps interne, disposition des noyaux dans l'extrémité caudale).

Ajoutons qu'il nous a été possible de colorer parfaitement les cellules génitales et excrétrices par leurs colorations particulières dans des gouttes épaisses étalées depuis plus de 35 jours, alors que ces colorations délicates sont considérées comme inefficaces lorsque les étalements datent de plus de 3 jours (Fülleborn, 1914 ; Feng, 1933 ; Langeron, 1949).

RÉSUMÉ

1) Dans les gouttes épaisses de sang, la rétraction ou la non-rétraction des diverses Microfilaires semble due à la perméabilité (*L. loa*, *W. malayi* et *W. bancrofti* var. *vauceli*) ou la non-perméabilité de la cuticule (*W. bancrofti* typique, *W. bancrofti* var. *pacifica*, *M. ozzardi* et *D. perstans*), et c'est un caractère spécifique.

2) Dans les gouttes épaisses anciennes, la rétraction des Microfilaires de Bancroft est évidente, mais, en aucun cas, cette rétraction n'empêche d'identifier facilement cette espèce.

3) Quelle que soit la méthode de coloration et l'ancienneté des étalements (essais portant sur des préparations datant de 35 jours), on voit nettement que si la Microfilarie de *W. bancrofti* a diminué de longueur avec la rétraction, sa largeur a augmenté, et que ce seul caractère permet la différenciation. De plus, les modalités de la rétraction diffèrent dans les deux groupes sus-mentionnés.

4) La rétraction n'empêche nullement d'apprécier les autres caractères différentiels : longueur de l'espace céphalique, taille des pores excréteur et anal, présence d'un corps interne, disposition des noyaux dans l'extrémité caudale.

5) Enfin, quoique certains auteurs l'aient affirmé, il est possible de mettre en évidence chez les Microfilaires, dans les gouttes épaisses

ses datant de plus de 30 jours, les cellules excrétrice et génitales en utilisant les colorants appropriés.

6) Ainsi, quelle que soit l'ancienneté du prélèvement, l'identification des différentes espèces de Microfilaires sanguicoles en goutte épaisse ne présente aucune difficulté.

SUMMARY

1) In thick blood drops, Microfilariae of *Loa loa*, *Wuchereria malayi*, and *Wuchereria bancrofti* var. *vauceli* have a shrunken appearance and *Wuchereria bancrofti* *typica*, *Wuchereria bancrofti* var. *pacifica*, *Mansonella ozzardi* and *Dipetalonema perstans* do not. This fact is due to the greater permeability of the cuticle in the former group which allows fast drying and, inversely, more rapid staining.

2) In old thick drops the shrinkage of Microfilariae of *W. bancrofti* is obvious. Nevertheless, in no case, this state of things hinders identification of this species which is always easy.

3) Whatever may be the method of staining and the age of thick drops (experiments on preparations of more than 30 days of age), if Microfilariae of *W. bancrofti* become shorter, their width increases and this feature is sufficient to identify them. Moreover the various Microfilariae do not shrink in the same way. In *loa-malayi-vauceli* group, the nuclear column follows the windings of the cuticle, whilst in *Bancrofti*, the nuclear column is twisted inside the wrinkled cuticle.

4) Retraction, by no means, impedes appreciation of the other differential features: Length of the cephalic space, size of the excretory and anal pores, « corps interne », arrangement of the nuclei in the caudal extremity.

5) Some authors have said that the age of the thick blood drops renders impossible the observation of the excretory and genital cells. This opinion is erroneous. In thick blood drops, 35 days old, those cells were easy to stain and extremely conspicuous.

6) Thus, in any cases and in the worst conditions, the diagnosis of the different species of Microfilariae is always possible.

BIBLIOGRAPHIE

- FENG (L. C.). — 1933. A comparative study of the anatomy of *Microfilaria malayi* Brug 1927 and *Microfilaria bancrofti* Cobbold 1877. *Prof. F. Fülleborn Memcr.-Chinese Med. Jl.*, XLVII (11-12), 1214-1246 (fig. 1-6, Pl. 1-3).
- FÜLLEBORN (F.). — 1913. Die Filarien des Menschen. *Handb. d. pathog. Mikroorg.* W. Kolle & A. von Wassermann, V, 185-344 (fig. 1-41, Pl. 1-6).
- 1913. Beiträge zur Morphologie und Differentialdiagnose der Mikrofilarien. *Arch. f. Schiffs-u. Trop. Hyg.*, Beiheft, I, 7-72.
- 1914. Ueber die Lage von *Microfilaria loa* (diurna) im Trockenpräparat. *Ibid.*, XVIII, 232-234.
- 1914. Zur Technik der Mikrofilarienfärbung. *Centralblatt. f. Bakteriol. Parasitenkunde u. Infektionskr.*, LXXIII, (6), 427-444 (fig. 1-3, Pl. 1-2).
- IYENGAR (M. T. O.). — 1939-40. Differentiation of Microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Filaria malayi*. *Indian Jl. Med. Res.*, XXVII, (2), 563-571 (Pl. 1-6).
- LANGERON (M.). — 1949. Précis de Microscopie (7^e édit.), 1430 pp. (fig. 1-932). Masson et C^{ie}, Paris.
- WILSON (T.). — 1956. Differences between the microfilariae of *Wuchereria malayi* and *Wuchereria bancrofti* in Giemsa-stained thick blood films. *Transac. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, L, (1), 54-57 (Pl. 1-2).

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris
