©Soc.pathol.
exo

Bibliographie

Liétar (J.). — Biologie et écologie des mollusques vecteurs de bilharziose à Jadotville. *A. S. B. M. T.*, XXXVI, n° 6 *bis* 31 décembre 1956.

Morice (E.) et Chartier (F.). — Méthode statistique. 2e partie. Analyse statistique. Paris, Imprimerie Nationale, 1954. Institut National de la Statistique et des études économiques pour la métropole et la France d'Outre-Mer.

TECHNIQUES DE CONCENTRATION DES MICROFILAIRES SANGUICOLES

Par HO THI SANG et J. PETITHORY (*)

La plus ancienne et la plus utilisée des méthodes de concentration des microfilaires sanguines est la goutte épaisse. Méthode routinière de recherche comme de dépistage systématique, elle est rapide et n'exige aucune instrumentation spéciale, mais ne permet d'étudier qu'une quantité limitée de sang (10 à 20 mm^3 environ pour une goutte épaisse courante). Si elle suffit pour détecter des microfilarémies relativement importantes, elle est par contre bien souvent défaillante dans les cas de faible parasitémie, malgré des examens répétés, devant des signes cliniques évidents de filariose. C'est pour de tels malades que nous avons été conduits à essayer d'autres techniques dans le but de choisir celle qui nous paraît actuellement la meilleure tant par sa simplicité que par son efficacité.

Par ailleurs, ayant eu la chance de disposer en décembre 1962, de dix litres de sang humain contenant 50 microfilaires *Loa loa* par millimètre cube, sang provenant d'un malade du Professeur L. Brumpt, nous avons été amenés à nous occuper de l'extraction et de la purification de ces microfilaires afin d'en étudier l'antigénicité et la toxicité.

I. — Méthodes de concentration des microfilaires en vue du diagnostic.

La technique idéale de concentration doit, à notre avis, répondre aux critères suivants :

— concentrer dans le plus petit volume possible la plus grande proportion de microfilaires et si possible, toutes les microfilaires ;

(*) Séance du 17 avril 1963.

©Soc.pathol.
exo

— éliminer le plus possible les éléments figurés du sang ;
— permettre de traiter une quantité appréciable de sang ;
— ne pas altérer les microfilaires afin d'en permettre la coloration et la détermination d'espèces ;
— préserver leur vitalité pour en faciliter la recherche à l'examen direct entre lame et lamelle grâce à leur mobilité intacte ;
— être de réalisation facile et rapide ;
— ne faire appel qu'à des réactifs simples.

Il a été décrit, en dehors de la goutte épaisse, de nombreuses techniques qui concentrent les microfilaires soit dans la couche leucocytaire, soit dans le sérum, soit dans le plasma après hémolyse par différents agents.

Nous allons passer en revue, rapidement, les diverses méthodes proposées, en signalant leurs avantages et leurs inconvénients, pour insister enfin sur celle que nous avons choisie.

A. — Recherche des microfilaires dans la couche leucocytaire

1. *Triple centrifugation de* Martin, Lebœuf et Roubaud, 1909 (9).

Elle fut à l'origine utilisée surtout pour le diagnostic de la maladie du sommeil mais également pour la recherche des « filaires ». La technique originale décrite par les auteurs est la suivante :

— Prélèvement de 10 ml. de sang sur 1 ml. de citrate de soude à 20 0/0.

— Première centrifugation à 1.500 tours/minute pendant 8 à 10 minutes. A partir de la 7e minute au plus tard, il faut vérifier l'état du tube toutes les 60 secondes et arrêter la centrifugation dès que la séparation en deux couches à peu près distinctes est faite. On obtient les meilleurs résultats quand il flotte encore dans le plasma quelques très légers nuages de globules rouges.

— Décanter la couche supérieure que l'on centrifuge à nouveau 10 minutes à 1.500 tours/minute. On obtient ainsi un sédiment dans lequel se trouvent contenus avec la majorité des globules blancs une certaine quantité d'hématies, la *plus grande partie des « filaires »* et parfois déjà de très rares trypanosomes.

— Centrifuger une troisième fois le liquide surnageant pendant 20 minutes à 1.500 tours/minute. Le sédiment fort peu volumineux renferme les trypanosomes et *quelques « filaires »*.

Les auteurs ont ainsi dépisté chez 100 sujets, 85 0/0 de porteurs de microfilaires après concentration contre 48 0/0 seulement à l'examen direct.

©Soc.pathol.
exo

Avantages et inconvénients. — Technique simple. Microfilaires mobiles. Quantité de sang traité importante. Mais méthode relativement longue, concentration faible et variable.

2. *Centrifugation en tube capillaire de* Saridiwonsga, 1961 (13).

Prélever le sang directement sans anti-coagulant en tube capillaire.

Centrifuger immédiatement à 12.000 tours/minute pendant 2 minutes. Examen direct du tube capillaire au microscope au niveau de la couche leucocytaire.

Avantages et inconvénients. — Procédé rapide. Microfilaires vivantes. Mais l'examen doit être immédiat après la prise de sang. Nécessite une centrifugeuse puissante capable d'atteindre instantanément 12.000 tours/minute. Peut rendre service néanmoins pour la détection des microfilaires chez les petits animaux, dans un laboratoire de recherche bien équipé.

B. — Recherche des microfilaires dans le sérum

3. *Technique de* Fantham, Stephans et Théobald, 1916 (3) et (12).

Prélever quelques millilitres de sang sans anti-coagulant. Abandonner le tube 24 heures à la température du laboratoire. Prélever pour l'examen quelques gouttes de sérum dans le fond du tube, ou centrifuger le sérum et examen du culot.

Avantages et inconvénients. — Matériel élémentaire. Microfilaires vivantes. Éléments figurés du sang en grande partie éliminés. Mais concentration très faible et délai de 24 heures nécessaire.

C. — Recherche des microfilaires après hémolyse (*)

4. *Hémolyse à l'eau distillée*, Gordon et Webber, 1955 (5).

Ajouter à 1 ml. de sang 5 ml. d'eau distillée ou d'eau du robinet. Centrifuger à 2.000 tours/minute pendant 10 minutes. Examiner le culot.

Avantages et inconvénients. — Méthode simple. Concentration

(*) Toutes les techniques d'hémolyse peuvent être faites avec du sang prélevé sur anti-coagulant, ou directement sur la solution hémolysante. La concentration est obtenue soit par sédimentation, soit par centrifugation.

©Soc.pathol.
exo

bonne. Les microfilaires *Loa loa* et *W. bancrofti* sont mobiles avec des gaines très faciles à voir. Les microfilaires *D. perstans* sont pratiquement immobiles.

5. *Hémolyse à l'acide acétique 2 0/0*, Smith et Rivas, 1914 (14).

Prélever 1 ml. de sang directement sur 5 ml. d'une solution aqueuse d'acide acétique à 2 0/0. Centrifuger 10 minutes à 2.000 tours/minute. Examiner le culot.

Avantages et inconvénients. — Résultats parallèles à la technique précédente. Mais microfilaires tuées et coloration au Giemsa impossible.

6. *Hémolyse au formol à 2 0/0*, Knott, 1939 (8).

Prélever 1 ml. de sang directement sur 10 ml. d'une solution aqueuse de formol à 2 0/0. Sédimenter pendant 24 heures. Examiner le sédiment. Colorer au besoin les microfilaires au bleu de méthylène de Lœffler-éosine.

Avantages et inconvénients. — Technique simple. Concentration bonne. Microfilaires mortes en extension permettant la mensuration à frais. Gaine nette. Coloration au Giemsa possible.

7. *Hémolyse à la saponine.*

7a. *Solution aqueuse de saponine à 2 0/0*, Harris et Summers, 1945 (6).

Ajouter à 4 ml. de sang prélevé sur héparine, la même quantité d'une solution à 2 0/0 de saponine dans l'eau distillée. Mélanger jusqu'à hémolyse complète. Centrifuger 10 minutes à 2.000 tours/minute. Examiner le culot.

Avantages et inconvénients. — Très bonne concentration de 100 0/0 selon les auteurs pour *Dirofilaria immitis*. Dilution faible permettant de traiter une quantité appréciable de sang. Microfilaires vivantes et parfaitement mobiles du moins en ce qui concerne *D. immitis*, *Loa loa* et *W. bancrofti*, mais gaine difficile à voir. Les microfilaires *D. perstans* sont par contre pratiquement toutes immobiles, selon notre expérience personnelle. Caractères tinctoriaux intacts.

7b. *Solution d'Herbeuval préconisée pour la leucoconcentration*, 1961, (7).

Le liquide d'Herbeuval est une solution complexe ne contenant pas moins de 11 produits allant de l'acide ascorbique à la polyvinyl-

©Soc.pathol.
exo

pyrrolidone, en passant par le formol qui fixe les leucocytes et une solution hémolytique à base de saponine et comportant elle-même 3 réactifs.

Avantages et inconvénients. — Concentration très bonne comme la précédente. Mais dilution plus forte et microfilaires tuées par le formol.

Nous avons essayé puis abandonné cette méthode pour la recherche courante des microfilaires chez nos malades, à cause de la composition de la solution d'Herbeuval dont la complexité n'est justifiée que pour la conservation des cellules cancéreuses et des leucocytes. De plus toutes les microfilaires sont immobiles et la présence des leucocytes en parfait état est plus gênante qu'utile.

7c. *Technique personnelle.*

De toutes les techniques exposées, nous retiendrons les concentrations après hémolyse, soit simplement par l'eau, soit par le formol 2 0/0, soit surtout à la saponine. C'est une de ces méthodes, dérivée de celle de Harris et Summers à la saponine que nous utilisons quotidiennement pour nos examens. Les modifications apportées sont de trois ordres.

1. En pratiquant de nombreux essais sur un sang très riche en microfilaires *Loa loa*, nous avons constaté que la dilution au demi préconisée par les auteurs laissait dans le liquide surnageant de nombreuses microfilaires malgré une centrifugation de 20 minutes à 3.000 tours/minute. Par contre une dilution au 1/3 permet la sédimentation totale des microfilaires.

2. La saponine introduite est en grand excès.

3. La dissolution de la saponine dans l'eau distillée a pour conséquence l'immobilisation des microfilaires *D. perstans*, ce qui rend difficile la détection de ces embryons de petite taille. Cet inconvénient disparaît avec l'emploi de l'eau physiologique.

Notre technique est donc la suivante :

Technique

1. *Prélèvement :* Le sang est prélevé à la veine, sur anti-coagulant. Nous utilisons de préférence le citrate de sodium et le complexon. L'héparine conserve bien la vitalité des microfilaires, mais celles-ci ont tendance à s'agglutiner, ce qui ne gêne pas pour la concentration, mais constitue un inconvénient non négligeable lorsqu'il s'agit de faire, à partir du même prélèvement une numération de microfilaires soit en goutte épaisse, soit à la pipette de Potain. Nous

©Soc.pathol.
exo

déconseillons aussi, les anti-coagulants à base de fluorure de sodium ou d'oxalate (WINTROBE, HELLER) qui tuent les embryons.

2. *Dilution :* Dans un tube à centrifuger, diluer à raison de un volume de sang pour deux volumes d'eau physiologique à 9 0/0. En pratique, 5 ml. de sang et 10 ml. d'eau physiologique. Mélanger par retournement du tube.

3. *Hémolyse :* Ajouter goutte à goutte de la saponine en solution à 2 0/0 dans de l'eau physiologique, jusqu'à laquage complet en mélangeant doucement par retournement du tube. La quantité nécessaire est de l'ordre de 2 à 5 gouttes pour 5 ml. de sang (*).

4. *Centrifugation :* 10 minutes à 2.000 tours/minute environ.

5. *Récupération du culot :* Renverser le tube pour rejeter le liquide surnageant, et sans redresser le tube, en essuyer l'intérieur avec un tampon de coton monté au bout d'une pince sans toucher au culot. Remettre celui-ci en suspension après y avoir ajouté, au besoin, une petite goutte d'eau physiologique. Prélever le culot par capillarité avec une pipette Pasteur.

RÉSULTATS

On peut habituellement, dans les cas de leucocytose normale, examiner la totalité du culot provenant de 5 ml. de sang sous 2 ou 3 lamelles 22 × 22, qu'il est inutile de lutter si l'examen des préparations montées est pratiqué dans un délai assez bref.

Nous avons ainsi examiné de nombreux malades porteurs de microfilaires *Loa loa*, *D. perstans* et *W. bancrofti*. Les microfilaires ainsi traitées restent parfaitement vivantes, y compris *D. perstans*, donc facilement repérables au petit grossissement et quelle que soit la densité leucocytaire. Nous avons pu notamment conserver vivants des embryons de *Loa loa* après concentration, pendant plus d'une semaine à 4° C.

La différence, à frais, entre microfilaires à gaine et sans gaine est assez délicate, la gaine étant souvent plaquée contre le corps de l'embryon. La notion de taille, la présence ou l'absence de corps interne, de même que l'aspect pointu ou en doigt de gant de l'extrémité postérieure peuvent orienter le diagnostic. Mais il est toujours possible et même particulièrement conseillé d'étaler le culot sur quelques lames et après séchage, fixation à l'alcool méthylique, de

(*) Nous utilisons la saponine pure Prolabo. La solution 2 0/0 se conserve au moins 3 mois à la température du laboratoire. Au bout d'un certain temps le pouvoir hémolytique baisse et il est alors nécessaire d'ajouter de plus grandes quantités. Si celles-ci deviennent trop importantes, il est préférable de renouveler la solution.

©Soc.pathol.
exo

colorer les microfilaires soit au Giemsa, soit au besoin à l'hémalun-éosine pour la mise en évidence de la gaine : les caractères tinctoriaux sont parfaitement conservés.

En appliquant cette technique systématiquement à tous les malades que nous voyons, nous avons pu à plusieurs reprises déceler des microfilarémies que l'examen à frais et plusieurs gouttes épaisses ne nous avaient pas montré. Nous en citerons 3 exemples :

1. Sou... Un examen direct (2 lamelles 22 × 22) et deux gouttes épaisses négatifs. Concentration : une dizaine de microfilaires que la coloration montre être des *Loa loa*, dans 5 ml. environ de sang.

2. Gom. Examen direct et gouttes épaisses : nombreuses microfilaires *D. perstans*. Concentration : une vingtaine de microfilaires *Loa loa* dans 5 ml. de sang, en plus des *D. perstans*.

3. Sav... Examen direct (3 lamelles 22 × 22) et 2 gouttes épaisses négatifs. Concentration : une cinquantaine de microfilaires de *W. bancrofti* dans 5 ml. de sang.

II. — Préparation et purification d'une grande quantité de microfilaires.

Pour obtenir une certaine quantité de microfilaires pures en vue de la fabrication d'un antigène, la technique de choix serait celle qui permette de traiter facilement une grande quantité de matériel, qui élimine complètement le plasma et les éléments figurés du sang, et qui préserve la vitalité des embryons.

On utilise à cet effet :

— soit la filtration ;

— soit la concentration après hémolyse, suivie de centrifugation différentielle.

1. *Filtration, technique de* Gordon et Webber, 1955 (5).

Cette technique nécessite un filtre spécial, en forme d'entonnoir, introuvable dans le commerce, et dont les mailles métalliques laissent entre elles des espaces microscopiques de 23 microns.

Une partie de sang est hémolysée dans 9 parties d'eau distillée. Les microfilaires sont ensuite fixées pendant au moins 5 minutes par adjonction d'une quantité égale de solution aqueuse de formol à 5 0/0. On ajoute alors à la quantité obtenue 9 fois son volume d'eau distillée pour aboutir en fin de compte à une dilution de 1/200 du sang, soit un litre de solution pour 5 ml. de sang.

©Soc.pathol.
exo

Le liquide est filtré par siphonage. Les mailles du filtre laissent passer les éléments figurés du sang et retiennent la majorité des microfilaires. On récupère celles-ci par lavage du filtre et centrifugation du liquide obtenu.

Avantages et inconvénients. — Cette méthode, préconisée aussi comme moyen de diagnostic, n'assure pas, de l'avis même des auteurs, la meilleure concentration, la centrifugation après hémolyse donnant des résultats supérieurs. Elle nous paraît cependant intéressante pour l'isolement des microfilaires. Mais matériel difficile à se procurer ; colmatage rapide des filtres si l'on doit traiter une grande quantité de sang. De plus, microfilaires fixées au formol.

2. *Filtration sous vide avec un filtre en verre fritté Sovirel nº 4.*

Nous avons essayé ces filtres dont les pores ont 10 à 20 microns de diamètre. La méthode ne permet de traiter qu'une quantité très faible de sang. De plus le filtre se colmate très vite et la récupération des microfilaires est difficile.

3. *Concentration et purification après hémolyse à la saponine.*

La technique que nous avons utilisée pour traiter 10 litres de sang riche en microfilaires *Loa loa* est proche de celle décrite par Franks et Stoll en 1945 pour préparer un antigène à base de microfilaires de *D. immitis* (4).

La concentration des microfilaires est obtenue après hémolyse à la saponine. Le problème de l'élimination des leucocytes est délicat. Nous avons essayé sans succès la trypsine, la streptodornase, la streptolysine, le teepol, le biocidan, les uns tuant les microfilaires, les autres étant inopérants. La sédimentation différentielle nous semble la plus efficace : les leucocytes plus légers sédimentent dans la couche supérieure. Il est évident que, pour obtenir une bonne purification, on est obligé d'éliminer aussi une quantité appréciable de microfilaires en même temps que les débris de leucocytes.

Technique

— Prélèvement de sang sur citrate de soude à 20 0/0 : 20 ml. de solution citratée pour 400 ml. de sang. Laisser sédimenter à basse température. Aspirer et rejeter le plasma surnageant qui ne contient pas de microfilaires

©Soc.pathol.
exo

— Diluer 100 ml. de culot dans 200 ml. d'eau physiologique. Hémolyser en ajoutant la quantité nécessaire de solution de saponine à 2 0/0 en eau physiologique, soit environ 10 à 15 ml.

— Centrifuger 15 minutes à 2.000 tours/minute.

— Rassembler un certain nombre de culots. Effectuer 6 à 7 lavages en eau physiologique suivis de centrifugation. On élimine ainsi la saponine, le reste du plasma, les plaquettes, l'hémoglobine et les stromas globulaires, et il ne reste plus dans le sédiment que les microfilaires et des leucocytes plus ou moins altérés.

— Dissocier le culot compact formé de l'enchevêtrement des microfilaires et de leucocytes adhérents à celles-ci en écrasant le culot à l'aide d'un agitateur en verre et en passant l'émulsion obtenue à travers un tamis à mailles lâches (10 à 12 mailles par centimètre). Homogénéiser la suspension au moyen d'un agitateur électromagnétique.

— Ajouter de l'eau physiologique à la suspension et centrifuger 20 minutes à 4.000 tours/minute au moins. Le culot se dissocie alors en deux couches : la superficielle leucocytaire et la profonde constituée par les microfilaires. Renouveler l'opération pour éliminer complètement les leucocytes.

Résultats

On obtient ainsi une préparation pure de microfilaires qui ne contient plus que de très rares débris leucocytaires. Nous avons pu recueillir de la sorte environ 130 millions de microfilaires *Loa loa*, vivantes après toutes ces opérations successives, et restant encore vivantes pendant 8 jours à 4° C. Ces microfilaires ont été lyophilisées (*) en vue de l'étude de leur pouvoir toxique et antigénique.

Résumé

Les auteurs présentent une modification de la méthode de Harris et Summers de concentration des microfilaires sanguicoles après hémolyse à la saponine. Ils ont appliqué cette technique à la préparation et à la purification des microfilaires *Loa loa* en vue de l'étude ultérieure de leur pouvoir toxique et antigénique.

(*) Nous remerçions le Professeur agrégé J. Schneider qui a bien voulu en faire effectuer la lyophilisation.

©Soc.pathol.
exo

SUMMARY

Concentration techniques of sanguicolous microfilariae.

The authors describe a technique for concentration of sanguicolous microfilariae with a view to diagnostic. This technique derivates from that of Harris and Summers. The method yields very rich cultures of living microfilariae and allows studies on their morphology and their antigenicity and toxicity.

Institut de parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris.
Directeur : Professeur L. C. BRUMPT.

BIBLIOGRAPHIE

(1) EUZEBY (J.). — Diagnostic experimental des helminthoses animales. Vigot, 23, rue de l'École de médecine, Paris, 1958.
(2) FAIN (A.), HERIN (V.) et THIENPONT (D.). — Filariose des bovidés au Ruanda-Urundi. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.*, 1955, **55**, 555-582.
(3) FANTHAM (H. B.), STEPHENS (J. W. W.) et THÉOBALD (F. V.). — The animal parasites of man. Bale sons and Danielson. London, 1916.
(4) FRANKS (M. B.) et STOLL (N. R.). — The isolation of microfilariae from blood for use as antigen. *J. of Paras.*, 1945, **33**, 158-162.
(5) GORDON (R. M.) et WEBBER (W. A. F.). — A new technique for the concentration of microfilariae from the venous blood and its application to their detection in persons harbouring them in low density. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 1955, **49**, 80-95.
(6) HARRIS (J. S.) et SUMMERS (W. A.). — A concentration method for demonstrating microfilariae in blood. *The Am. Journ. Trop. Med.*, 1945, **25**, 497-499.
(7) HERBEUVAL (R.), HERBEUVAL (Mme), CUNY (G.) et DUHEILLE (T.). — Recherche des cellules cancéreuses dans le sang et les liquides d'exsudats par la leuco-concentration. *Presse Méd.*, 1961, **69**, 149-150.
(8) KNOTT (J.). — A method for making microfilariae surveys on day blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1939, **33**, 191-196.
(9) MARTIN (G.), LEBŒUF et ROUBAUD. — La maladie du sommeil au Congo français. Masson, 1909, 264-266.
(10) MORRIS (M. L.), DINKEL (J. H.) et GREEN (F. D.). — *North. Am. Vet.*, 1935, **16**, 34.
(11) PICK (F.). — Nouvelle méthode d'enrichissement des microfilaires sanguicoles *in vivo*. *Acta Trop.*, 1951, **8**, 154-157.
(12) RANQUE (J.) et CABASSU (H.). — Les limites Nord-Est et Sud-Est du foyer Camarguais de filariose canine. *Rev. Path. comp. Hyg. gen.*, 1947, **47**, 442-447.
(13) SARIDIWONGSA WONGSATHUAYTHONG. — Detection of microfilariae in peripheral blood of monkeys by the microcapillary technique. *The Journ. Trop. Med. Hyg.*, 1961, **64**, 255-257.
(14) SMITH (A. J.) et RIVAS (D.). — Notes upon human filariasis. *Am. Journ. Trop. Diseases*, 1914, **2**, 361-377.