

COMPARAISON DE LA SENSIBILITE DES SCARIFICATIONS ET BIOPSIES DERMQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ONCHOCERCOSE

par

M. C. HENRY, M. P. MULUMBA, B. LOKOMBE & P. DESMET

Service de Parasitologie, I. M. T.,
Faculté de Médecine, Université de Kinshasa,
B.P. 747, Kinshasa XI, Zaïre

Résumé — A l'occasion d'une enquête sur le terrain, le test des scarifications dermiques, standardisé selon Fain *et al*, (4) a été comparé à la méthode de la biopsie dermique, incubée 24 heures en eau physiologique et après digestion par la collagénase (15). L'étude a été effectuée dans un foyer faiblement infesté.

Il a été observé que le pourcentage moyen d'émergence des microfilaries dans la biopsie dermique incubée 24 heures en eau physiologique croît avec l'infestation onchocerquienne.

Le taux de détection des patients onchocerquiens est significativement plus élevé avec les scarifications dermiques et les biopsies digérées par la collagénase, qu'avec les biopsies incubées 24 heures en eau physiologique ($p < 0,001$). Il n'y a pas de différence significative entre les taux de détection déterminés à travers les scarifications ou les biopsies traités enzymatiquement ($p > 0,1$). Une corrélation linéaire simple existe entre les résultats obtenus par scarifications et par biopsie après digestion par la collagénase.

Les deux techniques présentent pratiquement un même seuil moyen de sensibilité.

La biopsie dermique digérée par la collagénase est une méthode quantitative et très sensible. Du fait de son coût et de sa praticabilité peu aisée, elle est destinée plutôt aux évaluations thérapeutiques.

La biopsie dermique incubée 24 heures en eau physiologique et les scarifications dermiques sont des techniques semi-quantitatives adaptées au terrain. Du fait de son haut niveau de détection, le test des incisions dermiques est particulièrement indiqué pour les enquêtes dans les populations faiblement infestées par *O. volvulus* et surtout pour surveiller les foyers contrôlés.

KEYWORDS: Onchocerciasis; Skin snips; Skin scarifications; Zaïre.

Introduction

Le diagnostic parasitologique de l'onchocercose est basé sur la mise en évidence des microfilaries *Onchocerca volvulus* dans le derme.

C'est en 1920, que Montpellier et Lacroix démontrent que «... les microfilaries *O. volvulus* siègent toujours dans les couches papillaires et sous-papillaires du derme» (8).

En 1934, D'Hooghe (2) recherche à frais, les microfilaries *O. volvulus* dans le liquide obtenu par les scarifications dermiques; comme celui-ci est constitué de suc dermique et de sang, il peut renfermer également des microfilaries sanguicoles et dermiques autres que *O. volvulus*. La technique des incisions est alors modifiée en colorant au Giemsa les préparations, ce qui permet d'identifier les diverses espèces de microfilaries avec certitude.

En 1974, Fain et ses collaborateurs standardisent la méthode des scarifications dermiques; ils l'utilisent avec succès dans leurs enquêtes épidémiologiques (4, 16).

Cependant, un grand nombre de spécialistes en onchocercose préfèrent utiliser une autre technique parasitologique : la biopsie dermique exsangue. Fain et Bastin (5) expliquent cela par une mauvaise utilisation probable de la méthode des scarifications et donc une moindre performance : les incisions sont pratiquées trop superficiellement dans le but de ne pas faire saigner, comme dans la biopsie dermique.

Dans le cadre du projet OCP* notamment, la biopsie est l'objet de nombreuses recherches de standardisation et d'optimisation (1, 3, 10, 11, 13). Le progrès le plus important est la mise au point d'une digestion enzymatique du fragment cutané (15) : la méthode est quantitative mais est onéreuse et n'est pas d'un emploi aisé.

Plusieurs auteurs ont déjà tenté de comparer les deux tests, scarifications et biopsie dermiques; ils ont abouti à des résultats assez divergents dus probablement au manque de standardisation des techniques (7, 9, 12, 16).

Les progrès effectués dans les méthodes nous ont conduits à comparer les performances des scarifications dermiques effectuées selon les recommandations de Fain *et al.* (4) à celles de la biopsie dermique incubée pendant 24 heures en eau physiologique et digérée par la collagénase. La comparaison est menée tant au niveau de la sensibilité que des conditions d'application des techniques.

Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée à l'occasion d'une enquête épidémiologique menée dans le foyer d'onchocercose à Kinsuka/Kinshasa. Celui-ci est caractérisé par un faible taux de transmission (6).

218 biopsies et 218 scarifications dermiques ont été prélevées au niveau des régions deltoïdiennes et des crêtes iliaques chez 68 patients. Ces prélèvements se répartissent ainsi : d'une part, 171 scarifications et biopsies dermiques examinées après 24 heures en eau physiologique et ensuite après digestion à la collagénase ont été pratiquées chez 50 pêcheurs et casseurs de pierres; d'autre part, 47 scarifications et biopsies dermiques conservées d'abord en alcool puis digérées par la collagénase ont été prélevées chez 18 femmes. Les biopsies et les scarifications dermiques ont été effectuées côte à côte et sans délai. Pour éviter les modifications dues aux pincements de la peau propres à la technique des incisions dermiques, la biopsie a été prélevée en premier lieu.

Les biopsies dermiques

Après désinfection de la peau, elles sont prélevées, exsangues, à l'aide d'une pince Holt Legrand stérilisée dans une solution de glutaraldéhyde; elles sont pesées sur une balance à torsion Sauter et ont un poids moyen de 2,2 mg (1-4,5 mg)

— 171 biopsies sont déposées dans les cupules en U d'une plaque de microtitration remplies avec 0,2 ml d'eau physiologique. Pour prévenir

* Onchocerciasis Control Programme.

l'évaporation, la plaque est couverte d'un couvercle plastique scellé avec du parafilm. Après 24 heures, les suspensions de microfilaires sont pipetées dans chaque cupule et déposées sur une lame porte-objet; les microfilaires sont dénombrées au microscope optique (gross. 100 ×).

Ensuite 0,2 ml d'une solution de collagénase sont placés dans chaque cupule où repose la biopsie. La solution de collagénase est constituée, selon la technique décrite par Schultz-Key (15), de milieu 199 contenant des sels de Earl et de la glutamine (reçu de Flow Laboratories) ajusté à un PH 7 par du bicarbonate de sodium, de 0,3 mg/ml de collagénase degré 2 (produit par Boehringer, Mannheim, RFA) et de 0,2 mg/ml de gentamycine.

La plaque de microtitration est scellée et tenue à température ambiante. Après 24 heures, les biopsies sont totalement digérées; les nouvelles suspensions de microfilaires sont déposées sur des lames couvertes par des lamelles et examinées au microscope optique (gross. 100 ×).

- 47 autres biopsies ont été conservées pendant quelques jours dans une solution de fixation — eau distillée, éthanol, glycérine (40: 50: 10) — préparée selon Schultz-Key et Karam (14). Elles sont digérées ensuite pendant 36 heures à 25°C par une solution de collagénase à 0,5 mg/ml. Les suspensions de microfilaires sont examinées comme ci-dessus.

Les scarifications dermiques

218 scarifications dermiques sont effectuées selon la méthode décrite par Fain *et al.* (4). A côté du prélèvement biopsique, 4 incisions parallèles, longues de 8 mm et espacées de 2 mm, sont pratiquées à l'aide d'une lame de bistouri: le derme est entamé. Après plusieurs secondes d'attente, la peau, de part et d'autre des incisions, est pincée avec les doigts. Le suc dermique mélangé au sang est recueilli sur une lame dégraissée; celle-ci est appliquée à plusieurs reprises sur la plaie. Les empreintes des incisions recouvrent une surface d'environ 2 cm sur 4,5 cm. Les auteurs estiment à 25 mm³ en moyenne la quantité de sang et de suc dermique.

Les prélèvements sont effectués par une même personne pour obtenir une meilleure reproductibilité de la technique.

Après séchage, les lames sont colorées au Giemsa pendant 40 minutes. La numération des microfilaires est ensuite effectuée. La qualité des numérations dans les scarifications et les biopsies dermiques a été contrôlée par sondage sur un échantillon de 5% de préparations.

Mesure de la densité microfilarienne

Pour la biopsie, la densité est exprimée en mf (microfilaires) par mg de peau. La densité microfilarienne totale est égale à la somme des mf apparues après incubation de la biopsie pendant 24 heures en eau physiologique et après digestion par la collagénase.

Pour le test des scarifications, la densité est exprimée en microfilaires par lame.

1. *Pourcentage moyen d'émergence des mf dans les biopsies après 24 heures en eau physiologique :*

L'ensemble des observations a été stratifié selon 4 niveaux de densité parasitaire (mf/mg de peau) :

- (1) 0 (zéro)
- (2) de 1 à 10
- (3) de 11 à 50
- (4) plus de 50.

La valeur moyenne de ce paramètre et son intervalle de confiance à 95 % ont été établis pour les 3 dernières catégories, où il représente le quotient du nombre moyen de mf émergées après 24 heures sur le nombre moyen de mf dénombrées dans la biopsie après 24 heures et après digestion par la collagénase.

2. *Comparaison de la sensibilité des méthodes :*

Sur le plan diagnostique, celle-ci se définit comme étant la probabilité d'avoir un test positif chez un sujet parasité. Elle a été déterminée en comparant deux tests selon leur capacité de révéler la présence ou l'absence de mf (test de McNemar).

3. *Etude des corrélations entre les densités microfilariennes déterminées par les deux méthodes :*

Elle a été mesurée par le coefficient de corrélation simple de Bravais-Pearson.

La corrélation a été calculée sur les densités microfilariennes moyennes obtenues pour chaque individu et pondérées par le nombre de sites de prélèvements. 8 patients ayant une microfiladermie nulle ont été exclus de l'étude.

Le seuil de sensibilité de chaque méthode a été estimé en extrapolant à partir des droites de régression de chaque méthode.

Résultats

1. *Pourcentage moyen d'émergence des microfaires dans les biopsies après 24 heures en eau physiologique :*

Suivant les niveaux de densité microfilarienne totale par mg de peau, le tableau 1 donne les pourcentages moyens d'émergence des mf après 24 heures en eau physiologique pour les 42 patients onchocerquiens. Dans le tableau 2, nous avons écarté 12 individus dont toutes les biopsies sont nulles après 24 heures en eau physiologique.

TABLEAU 1
**Pourcentage moyen d'émergence des microfilaires après 24 heures
 en eau physiologique pour tous les patients onchocerquiens**

Densité totale mf/mg peau	n patients (n biopsies)	n moyen mf/mg peau	% moyen d'émergence	I. C. à 95 %
1 à 10	18 (61)	3	18	~0 à 70
11 à 50	15 (51)	25	45,1	24 à 65
> 50	9 (31)	93	71,5	61 à 80
Total	42 (143)	40	39,1	25 à 57

TABLEAU 2
**Pourcentage moyen d'émergence des microfilaires après 24 heures
 en eau physiologique après avoir exclu les personnes
 dont toutes les biopsies sont nulles après 24 heures en eau physiologique**

Densité totale mf/mg peau	n patients (n biopsies)	n moyen mf/mg peau	% moyen d'émergence	I. C. à 95 %
1 à 10	7 (26)	3	46	~1 à 91
11 à 50	14 (47)	26	48,4	30 à 70
> 50	9 (31)	93	71,5	61 à 80
Total	30 (104)	41	54,8	37 à 69

39,1% des mf sont émergées après 24 heures chez les 42 patients examinés (tableau 1) et 54,8% chez les 30 individus ayant au moins une biopsie positive après 24 heures (tableau 2).

Le pourcentage moyen d'émergence augmente avec l'importance de l'infestation. Quand celle-ci est faible, (inférieure à 11 mf/mg de peau), le taux d'émergence est bas (18%); il s'élève à 46% si on exclut les patients ayant toutes leurs biopsies nulles après 24 heures. Au delà d'une densité supérieure à 50 mf/mg de peau, l'émergence atteint 71,5%.

Des écarts considérables, dont l'amplitude diminue au fur et à mesure que croît la microfiladermie, sont observés dans les pourcentages moyens d'émergence.

2. Comparaison de la sensibilité des différentes méthodes :

Sur le plan diagnostique, la différence observée entre les 2 tests, scarification et biopsie dermique après 24 heures en eau physiologique, est hautement significative ($p < 0,001$), en faveur des scarifications.

Si le test des scarifications est négatif, il n'y a que 4% de chance (3/68) d'avoir une biopsie dermique positive après 24 heures.

Si le test des scarifications est positif, la biopsie dermique après 24 heures sera un succès dans seulement 59% des cas (61/103).

De même, nous observons une différence hautement significative entre la biopsie dermique digérée par la collagénase et la biopsie examinée après 24 heures en eau physiologique ($p < 0,001$), en faveur de la biopsie traitée par l'enzyme.

TABLEAU 3
 Comparaison de la sensibilité des méthodes (test de McNemar)

	Scarifications		Total	
	+	-		
B. incubée 24 heures en eau physiologique	+	61	3	64
	-	42	65	107
Total	103	68	171	

$$\chi^2 = \frac{(42-3)^2}{42+3} = 33,8 (p < 0,001)$$

	B. digérée par la collagénase		Total	
	+	-		
B. incubée 24 heures en eau physiologique	+	61	3	64
	-	41	66	107
Total	102	69	171	

$$\chi^2 = 34,5 (p < 0,001)$$

	Scarifications		Total	
	+	-		
B. incubée et digérée par la collagénase	+	102	3	105
	-	0	66	66
Total	102	69	171	

$$\chi^2 = 3 (p > 0,10)$$

	Scarifications		Total	
	+	-		
B. fixée et digérée par la collagénase	+	29	5	34
	-	7	6	13
Total	36	11	47	

$$\chi^2 = 0,3 (p > 0,10)$$

Toutefois, pour diagnostiquer un porteur de microfilaries, il n'y a pas de différence significative ($p > 0,10$) entre les deux méthodes, scarifications dermiques et biopsie dermique digérée par la collagénase, que celle-ci, au préalable, soit incubée 24 heures en eau physiologique ou fixée (tableau 3)

3. Corrélation entre les deux méthodes :

L'existence d'une corrélation linéaire simple a été établie entre les deux méthodes :

$n = 188$; $R = 0,75$; $Y = 15,6 + 2,13 X$ où Y représente les scarifications et X la biopsie.

$\bar{Y} = 65,8$ mf/lame; $S_y = 93,4$.

$\bar{X} = 23,5$ mf/mg peau; $S_x = 32,8$.

La valeur du coefficient de détermination ($R^2 = 0,56$) indique que la relation entre scarifications et biopsie dermique digérée par la collagénase est ferme : près de 60% de la variabilité de Y est expliquée par X. Cette proportion est significative ($t = 15,50$ à 186 d.l.).

Si nous comparons les seuils de sensibilité des deux méthodes, nous notons que les scarifications détectent 15,6 mf/lame ($\pm 5,6$) quand la biopsie est nulle ($Y_{\text{scarif}} = 15,6 + 2,13 X_{\text{biopsie}}$).

Par contre la biopsie révèle 6,2 mf/mg de peau ($\pm 1,9$) quand le test des incisions est nul. ($Y_{\text{biopsie}} = 6,2 + 0,26 X_{\text{scarif}}$) (Fig. 1).

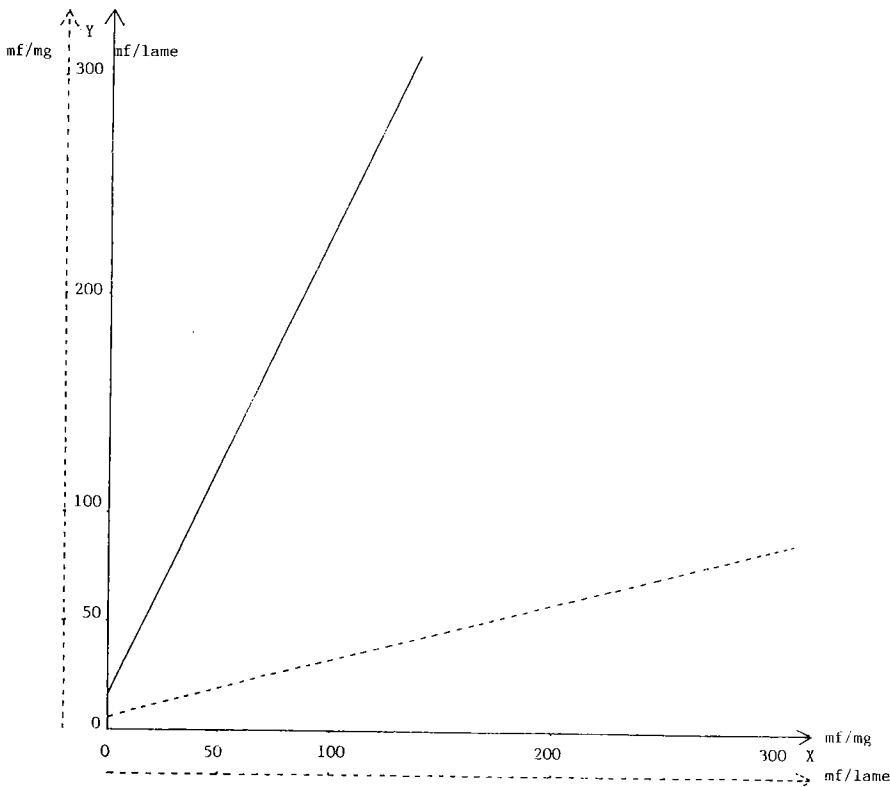


Figure 1

Seuils de sensibilité des deux méthodes, scarifications et biopsie digérée par la collagénase

— : $Y_{\text{scarif}} = 15,54 + 2,14 X_{\text{biopsie}}$

- - - : $Y_{\text{biopsie}} = 6,2 + 0,26 X_{\text{scarif}}$

Le poids moyen d'une biopsie dans notre étude est de 2,2 mg. Le seuil moyen de sensibilité de la biopsie traitée par la collagénase est pratiquement semblable à celui des scarifications.

Discussion

Emergence des microfilaries après 24 heures en eau physiologique

Notre étude montre que le taux d'émergence des mf en eau physiologique après 24 heures augmente avec l'infestation des individus : pour des intensi-

tés inférieures à 11 mf/mg, le pourcentage moyen d'émergence passe de 18 % pour l'ensemble des patients examinés, à 46 % quand nous excluons les personnes ayant toutes leurs biopsies nulles après 24 heures; il s'élève à 71,5 % quand les densités sont supérieures à 50 mf/mg de peau. Par ailleurs, l'estimation de la proportion de mf émergées est meilleure quand il y a une forte microfiladermie.

Schultz-Key (15) dans une étude semblable, obtient des résultats nettement plus élevés: respectivement 80 % d'émergence pour plus de 10 mf par biopsie dermique et 67 % pour moins de 10 mf par biopsie dermique; il obtient également une estimation plus exacte de la proportion de mf émergées quand le nombre de mf par biopsie est supérieur à 10.

Les résultats différents obtenus dans les deux études peuvent s'expliquer ainsi: d'une part, l'infestation de notre échantillon par *O. volvulus* est plus faible (la densité moyenne par biopsie s'élève à 40 mf/mg de peau dans notre étude et à environ 56 mf/mg dans celle de Schultz-Key) et d'autre part, notre étude a été menée dans les conditions d'un travail de terrain qui n'impliquait par l'examen des suspensions de rinçage comme l'a fait Schultz-Key.

Comme cet auteur, nous avons également observé des variations considérables du taux d'émergence d'une biopsie à l'autre chez un même patient et d'un individu à l'autre dans une même catégorie de densité parasitaire.

Au vu de ces observations, il s'avère que la méthode de la biopsie dermique incubée en eau physiologique pendant 24 heures est semi-quantitative et peut donner des résultats faussement négatifs dans les cas de faible infestation onchocercienne.

Sensibilité des méthodes

Le taux de détection des cas parasités obtenu par les scarifications dermiques d'une part, et par la biopsie dermique digérée par la collagénase d'autre part, est hautement significativement plus élevé que celui obtenu par la biopsie examinée après 24 heures d'incubation en eau physiologique, ($p < 0,001$).

Par contre, il n'y a pas de différence significative de performance entre les scarifications et la biopsie digérée par la collagénase ($p > 0,1$).

Une corrélation linéaire simple existe entre ces deux méthodes dans le cas de notre échantillon. Cependant le modèle peut ne plus être valable pour un échantillon fortement parasité par *O. volvulus*.

Le seuil moyen de sensibilité des deux méthodes, scarifications et biopsie traitée enzymatiquement, est pratiquement semblable (Fig. 1).

Spécificité des méthodes

Les deux tests, scarifications et biopsie dermiques, apparaissent aussi spécifiques l'un que l'autre.

La biopsie, exsangue, met en évidence seulement des microfilaires dermiques, *Onchocerca volvulus* et *Mansonella streptocerca*, reconnaissables par leur taille et leur forme. Pendant notre enquête, nous avons diagnostiqué les deux microfilaires chez quelques pêcheurs originaires de l'Equateur.

Quant aux scarifications, elles révèlent la présence de microfilaries sanguicoles et dermiques, d'autant plus facilement identifiables que les préparations sont colorées. Lors d'enquêtes épidémiologiques, le procédé permet un inventaire des microfilaries diurnes et aperiodiques et même d'autres parasites sanguins (*Plasmodium* principalement). Il est possible de réexaminer à l'aise les prélèvements.

Application des méthodes

La biopsie dermique digérée par la collagénase est une méthode très sensible et la seule qui soit quantitative. Elle n'est pas adaptée au terrain : la collagénase doit être conservée à 4°C et utilisée pour un maximum d'efficacité à un PH 7 précis. Toutefois la digestion peut être appliquée sur des biopsies conservées dans une solution de fixation (14).

Etant donné son coût, la technique est destinée à des études précises par exemple des évaluations thérapeutiques.

La biopsie dermique incubée en eau physiologique pendant 24 heures est un méthode semi-quantitative et peu sensible dans les foyers de faible infestation. Elle est facile à effectuer sur le terrain, peu traumatisante et bon marché. Il faut l'examiner après 24 heures et il s'avère impossible de revoir ultérieurement le prélèvement.

Le test des scarifications dermiques est semi-quantitatif et très sensible dans la mesure où il est effectué correctement. Il est simple, facile à pratiquer sur le terrain, rapide et peu cher. Les prélèvements colorés peuvent être lus ultérieurement.

A cause de son rapport coût-efficacité excellent et étant donné son haut niveau de détection, le test est particulièrement indiqué pour mener des enquêtes dans les populations faiblement infestées et surtout pour surveiller les foyers contrôlés.

Comparison of dermic scarifications and skin biopsies for the diagnosis of onchocerciasis.

Summary. — During a field survey the method of dermic scarifications, standardized by Fain *et al.* (1974), was compared to the examination of biopsies after 24 hours incubation in isotonic saline and after digestion by collagenase (Schultz-Key, 1977). This study was carried out in a lightly infested focus.

The average percentage of emergence of microfilariae in skin biopsy after 24 hours in isotonic saline increased with onchocerciasis infestation.

The rate of detection of onchocerciasis patients was significantly higher with the scarifications and the biopsies digested by collagenase than with the biopsies in saline ($p < 0,001$).

There was no significant difference between the rate of detection of patients with *O. volvulus* obtained through the scarifications or through enzymatically treated biopsy ($p > 0,1$).

A simple linear correlation exists between those methods. These two techniques present a nearly identical sensibility-threshold.

After digestion by collagenase the skin snip is a quantitative and very sensitive method. On account of its cost and its difficult practicability this method is specially indicated for therapeutical evaluations.

Skin snip incubated in normal saline and dermic scarifications are semi-quantitative techniques well fitted for field-investigations.

As the method of dermic incisions has a high detection level it is specially indicated for investigations of populations which are weakly infested with *O. volvulus* and more specially for the supervision of controlled foci.

Vergelijking van de gevoeligheid van huidscarificaties en huidbiopsies voor de diagnose van onchocerciasis.

Samenvatting. — Bij gelegenheid van een onderzoek op het terrein, werd de huidscarificatie, gestandaardiseerd volgens Fain *et al.* (1974), vergeleken met de methode van de biopsie na 24 uur incubatie in fysiologisch water en na vertering door collagenase (Schultz-Key, 1977). Deze studie werd uitgevoerd in een zwak geïnfecteerde haard.

Er werd vastgesteld dat het gemiddelde percentage uitbraken van de microfilaria in de biopsie na 24 uur in fysiologisch water stijgt met de infestatie van *O. volvulus*.

De detectiegraad van onchocerciasis patienten is significant hoger met de huidscarificatie en met de biopsie verteerd door collagenase, dan met de biopsie na 24 uur incubatie in fysiologisch water ($p < 0,001$). Er is geen significant verschil voor de detectiegraden gemeten door huidscarificatie of enzymatisch behandelde biopsie ($p > 0,1$).

Er bestaat een eenvoudige lineaire relatie tussen deze twee methodes. Ze vertonen praktisch dezelfde gemiddelde gevoeligheid.

De biopsie verteerd door collagenase is een zeer gevoelige quantitative methode. Door haar kostprijs en moeilijkheidsgraad is ze eerder bestemd voor therapeutische evaluaties. De biopsie na 24 uur incubatie in fysiologisch water en de huidscarificatie zijn semiquantitatieve technieken die geschikt zijn voor veldwerk.

Door zijn hoog detectiepeil is de test met de huidsneden bijzonder geïndiceerd voor enquêtes in licht besmette bevolkingsgroepen, en vnl. voor de surveillantie van gecontroleerde haarden.

Reçu pour publication le 26 juin 1986.

REFERENCES

1. Collins RC, Campbell CC, Wilton DP: The skin biopsy in the diagnosis of onchocerciasis a comparative study of NCTC 135, saline and water. Doc. WHO/ONCHO/77. 141.
2. D'Hooghe M: Contribution à l'étude de l'onchocercose humaine dans l'Uélé. Première partie L'onchocercose chez les Européens dans l'Uélé. Ann. Soc. belge Méd. trop., 1934, **14** 153-180.
3. Duke BOL: A standard method of assessing microfilarial densities on onchocerciasis surveys Bull. WHO, 1962, **27**, 627-631.
4. Fain A, Elsen P, Wéry M, Maertens K: Les filarioses humaines au Mayumbe et dans les régions limitrophes (République du Zaïre). Evaluation de la densité microfilarienne. Ann. Soc. belge Méd. trop., 1974, **54**, 5-34.
5. Fain A, Bastin JP: Le diagnostic parasitologique de l'onchocercose. Ann. Soc. belge Méd. trop., 1975, **55**, 505-515.
6. Henry MC, Janssens PJ, De Boeck M: Observations récentes sur la transmission de l'onchocercose à Kinsuka, Kinshasa, Zaïre. Ann. Soc. belge Méd. trop., 1984, **64**, 267-281.
7. Mazzotti L: Estudio comparativo entre la biopsia y la escarificación cutánea en el diagnóstico de la onchocercosis. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop. Med., 1954, **14**, 19-23.
8. Montpellier J, Lacroix A: Le craw-craw ou gale filarienne. Son origine dans les kyste sous-cutané à *Onchocerca volvulus*. Bull. Soc. Path. exot., 1920, **13**, 305-315.
9. Onori E: Studies on the comparative efficiency of skin biopsy and scarification in the diagnosis of African onchocerciasis. West Afr. med. J., 1983, **12**, 3-10.
10. Picq JJ, Coz J, Jardel JP: Une méthode d'évaluation des densités microfilariennes d'*O. volvulus* Leuckart, 1893, chez les onchocerciens. Technique et temps de lecture des biopsies cutanées. Bull. OMS, 1971, **45**, 517-520.
11. Picq JJ, Jardel JP: Une méthode d'évaluation des densités microfilariennes d'*O. volvulus* Leuckart, 1893, chez des onchocerciens. Répartition des densités microfilariennes suivant les sites et niveaux de prélèvement des biopsies cutanées; variations des densités microfilariennes des 24 heures. Bull. OMS, 1974, **51**, 145-153.
12. Rives M, Série F: L'onchocercose en Côte d'Ivoire. Méd. d'Afr. noire, 1967, **14**, 485.
13. Scheiber P, Braun-Munzinger RA, Southgate BA: A new technique for the determination of microfilarial densities in onchocerciasis. Doc. WHO/ ONCHO/ **76**, 119.
14. Schultz-Key H, Karam M: Quantitative assessment of microfilariae and adults of *Onchocerca volvulus* in ethanol-fixed biopsies and nodules. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, **78**, 157-159.
15. Schultz-Key H: A simple technique to assess the total number of *Onchocerca volvulus* microfilariae in skin snips. Tropenmed. Parasit., 1978, **29**, 51-54.
16. Wéry M, Maertens K, Wéry-Paskoff S, Fain A: Contribution à l'étude de l'infestation par *Onchocerca volvulus* dans la région de Lusambo (Kasaï oriental, Zaïre). Aspects parasitologique, ophtalmologique et immunologique. Ann. Soc. belge Méd. trop., 1976, **56**, 95-120.