

MINISTÈRE DE LA SANTÉ

RÉPUBLIQUE TOGOLAISE
Travail-Liberté-Patrie

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ

Programme National de Lutte contre le Paludisme
(PNLP)
Tél : 221 32 27, Fax : 222 57 59
Lomé Togo

**EVALUATION DES TESTS DE DIAGNOSTIC
RAPIDE DANS LE CADRE DU DIAGNOSTIC
BIOLOGIQUE DES CAS DE PALUDIMSE AU TOGO**

Protocole et Manuel de procédure

Dr A. DORKENOO

Médecin biologiste

Chef de Division des laboratoires, Ministère de la Santé

Lomé, Togo

évaluation des tests de diagnostic rapide dans le cadre du diagnostic biologique des cas de paludisme au Togo

Février 2012

Sommaire

| | | |
|-------|--|------------------------------------|
| 1- | INTRODUCTION | 3 |
| 2- | OBJECTIF GENERAL | 4 |
| 3- | OBJECTIFS SPECIFIQUES | 4 |
| 4- | DESCRIPTION DES SITES | 4 |
| 5- | METHODOLOGIE | 4 |
| 5-1 | Sélection des sujets | 4 |
| 5-1-1 | Critères de non inclusion | 4 |
| 5-1-2 | Méthodologie d'échantillonnage | 5 |
| 5-2 | Traitement des enfants inclus..... | 5 |
| 5-3 | Critères de jugement des TDR..... | 5 |
| 5-4 | Taille de l'échantillon,..... | 5 |
| 5-5 | Assurance de qualité et validation des résultats | 5 |
| 5-6 | Classification et critère d'évaluation | 6 |
| 6- | CONSIDERATION ETHIQUES..... | 7 |
| 7- | ORGANISATION PRATIQUE DE L EVALUATION SUR SITE | 7 |
| 7-1 | Composition des équipes..... | 7 |
| 7-1-1 | Coordination centrale | 7 |
| 7-1-2 | Coordination de la Région Sanitaire | Erreur ! Signet non défini. |
| 7-1-3 | Equipe d'évaluation sur site | 7 |
| 7-2 | Taches et procédures | 7 |
| 7-2-1 | Coordination centrale | 7 |
| 7-2-2 | La coordination administrative | 8 |
| 7-2-3 | Taches et procédures de l'équipe du site | 8 |
| 8- | Annexes..... | 22 |

1- INTRODUCTION

Le paludisme est une érythroparasitose due à un protozoaire du genre Plasmodium qui représente la première cause de morbi-mortalité au Togo, les enfants étant le groupe de populations qui en paie le plus lourd tribut. Il a représenté en 2009, 53 % des consultations externes et 50 % des hospitalisations dans les formations sanitaires publiques avec une durée moyenne d'hospitalisation de 5 jours. Le taux de mortalité hospitalière proportionnelle du paludisme a été en 2009 de 46% avec une létalité moyenne de 4 %. Les enfants de 0 – 5 ans sont les plus touchés dans une proportion de 36% par rapport au nombre de cas enregistrés tout âge confondu [1].

Il constitue un poids économique pour les pays touchés puisqu'il cause une perte de 1,3% du produit intérieur brut [2]. Le paludisme se présente sous deux formes cliniques : l'accès palustre simple et le paludisme grave ou compliqué.

Le Togo, comme la plupart des pays africains endémiques, a souscrit à l'initiative « Roll Back Malaria » dont un des objectifs est de réduire de 50 % la mortalité et la morbidité liées au paludisme d'ici à 2010 [4].

Les grands axes stratégiques retenus pour lutter contre le paludisme sont :

1. le diagnostic dans les 24 heures,
2. le traitement par des médicaments efficaces de tous les cas de paludisme,
3. le renforcement des mesures préventives dont la chimioprophylaxie/Traitement Préventif Intermittent chez la femme enceinte et la promotion de l'utilisation de la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

De plus d'une décennie, le Ministère de la Santé du Togo a intensifié les actions pour lutter contre le paludisme, lutte qui demeure l'une des priorités de santé publique au Togo.

L'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) pour la prise en charge des cas de paludisme simple est un des divers moyens adopté par le Togo pour prendre en charge les cas simples de paludisme en remplacement des monothérapies contre lesquelles les souches plasmodiales ont développé une résistance [5].

Selon les recommandations de l'OMS de 2006, l'utilisation rationnelle ces combinaisons exigeait une confirmation biologique obligatoire de tout cas fébrile suspect d'accès palustre simple excepté les enfants âgés de moins de 5 ans en zone de transmission stable.

Les moyens diagnostiques recommandés pour la confirmation sont notamment de la goutte épaisse (GE) et le frottis sanguin (FS) dans les structures avec microscopie et le test de diagnostic rapide (TDR) dans les structures sans microscopie et dans la communauté.

En effet, pour réduire le nombre de cas de paludisme grave, la prise en charge thérapeutique des cas de paludisme au niveau communautaire a été introduite dans la politique antipaludique en 2006, avec l'implication des agents de santé communautaires (ASC) pour le diagnostic du paludisme par les TDR, l'administration et le suivi des soins [6].

Depuis, plusieurs études réalisées dans plusieurs pays, ont démontré la nécessité d'assurer la confirmation biologique des cas même chez les enfants de moins de 5 ans [3]. En 2010, les autorités togolaises ont élaboré des directives exigeant cette confirmation biologique systématique devant tout cas fébrile suspect de paludisme simple en remplacement des recommandations contenues dans la politique antipaludique. Parallèlement, des progrès importants ont été faits pour l'amélioration de la sensibilité et la spécificité de ces TDR, puisque l'évaluation des TDR réalisée en 2008,2009 et 2010 par des institutions de recherche sous la coordination de l'OMS [5,7,8] a démontré que les TDR sont devenus un outil incontournable dans la prise en charge correcte des cas de paludisme.

C'est dans ce contexte que face à la charge importante de travail entraîné par ces directives au niveau des laboratoires, certaines structures de références et d'autres centres privés n'hésitent plus à utiliser le TDR pour le diagnostic du paludisme. Il a été également noté que sur le marché togolais, plusieurs type de TDR circulent sans qu'aucune garantie ne soit donnée sur la qualité de ces TDR.

C'est Dans le souci de renforcement de la qualité du diagnostic de confirmation du paludisme, que la division des laboratoires en accord avec le PLNP va dorénavant procéder à l'évaluation et à l'identification des TDR autorisés à être utilisés au Togo

Ainsi tout TDR doit être soumis à une évaluation avant d'être autorisé ou non par la DPLET à être enregistré.

Ce manuel est donc conçu pour évaluer les TDR du paludisme devant être autorisé par l'autorité réglementaire à être commercialisé sur le marché togolais.

2- OBJECTIF GENERAL

Disposer régulièrement des données sur la qualité des différents TDR du paludisme, circulants sur le marché Togolais.

3- OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Déterminer les éléments de performance (sensibilité, spécificité, valeur prédictive) de tout TDR de paludisme circulant au Togo par rapport à la méthode de référence qu'est la GE/FM
- Vérifier l'impact des autres paramètres (conditions de conservation, phase de réalisation,....) sur la qualité des TDR sur le terrain

4- DESCRIPTION DES SITES

Les sites sentinelles d'évaluation de l'efficacité des antipaludiques, de même que d'autres centres à forte activité de consultations externes et disposant d'un personnel de qualité et en nombre suffisant, pourront être utilisés comme cadre de cette activité en collaboration avec le PLNP, en association avec le département de parasitologie de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lomé et sous la coordination de la division des laboratoires.

Le laboratoire de référence du PNLP ainsi que le département de parasitologie de la Faculté de médecine assureront le contrôle de qualité des lames.

5- METHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude comparative portant sur les TDR à évaluer par rapport à la méthode de référence la goutte épaisse et le frottis mince.

5-1 Sélection des sujets

Tout sujet qui présente des signes cliniques évidents de paludisme peut être prélevé pour l'évaluation des TDR. Il faudra également veiller à ne pas inclure des cas d'association à d'autres pathologies fébriles évidentes pouvant interférer sur la validité des résultats positifs du fait des réactions croisées.

5-1-1 Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion sont la présence de signe évident de paludisme grave ne pouvant pas permettre le temps d'attente nécessaire pour disposer des résultats de la GE avant la mise en route du traitement

Toute personne n'ayant pas donné son consentement

5-1-2 Méthodologie d'échantillonnage

Pour chaque type de TDR à évaluer, on disposera de 300 tests

Trois groupes seront considérés :

- Le groupe à goutte épaisse négative (groupe contrôle)
- Le groupe à faible densité parasitaire: DP compris entre 100 et 200 trophozoïtes par μ l de sang
- Le groupe à forte densité parasitaire: 2000 et 5000 trophozoïtes par μ l de sang

Dans chaque groupe, on prendra 100 sujets.

5-2 Traitement des enfants inclus

Les enfants inclus chez qui le prélèvement sera fait, seront s'ils sont positifs soumis à un traitement à base de CTA soit AM-LM soit AS-AQ s'il s'agit du paludisme simple ou à la quinine ou l'artésunate s'il s'agit de cas de paludisme grave.

Les traitements adjuvants en fonction de chaque patient seront administrés et tous ses médicaments seront à la charge du patient.

5-3 Critères de jugement des TDR

Chaque type de TDR soumis à l'évaluation sera jugé sur

- La sensibilité et la spécificité pour les parasitémies fortes et les parasitémies faibles
- La sensibilité et la spécificité chez les sujets immuns et non immuns
- Les autres caractéristiques du TDR qui seront évaluées sont :
 - Type d'antigène détecté
 - Type de Plasmodium détecté
 - Présentation du TDR (en cassette ou en bandelette)
 - Le conditionnement
 - Nombre d'étapes de la phase analytique
 - La reconstitution des réactifs
 - La rapidité d'exécution
 - La rapidité et la facilité de lecture des résultats
 - Les conditions de stockage

5-4 Nombre d'échantillon de TDR à fournir

Chaque fournisseur doit donner 400 TDR à la division pour l'évaluation

5-5 Assurance de qualité et validation des résultats

Les lames de GE seront relues au niveau du laboratoire de référence du Paludisme et du département du Parasitologie de la FMMP de Lomé en double lecture par 2 microscopistes différents. Dans le cas où le coefficient de variation entre les résultats du Laboratoires de contrôle de qualité et ceux du site est supérieur à 5%, une troisième lecture sera faite par un autre microscopiste indépendant pour départager les deux autres équipes de lecture.

Supervision par la coordination centrale

Si les moyens financiers le permettent, plusieurs supervisions sont recommandées pour aller vérifier le travail des équipes locales sur le terrain, de valider les processus d'évaluation en vue d'apporter des actions correctives si nécessaires.

Au début de l'évaluation, la Division en collaboration avec les spécialistes en parasitologie, assurera la formation des équipes locales à la procédure décrite dans le présent document et si possible suivra le démarrage effectif de l'évaluation sur le site.

Elle approvisionnera également les sites, en matériel et consommables nécessaires pour la réalisation de l'évaluation.

Tout au long de l'étude, Une supervision régulière par la coordination se fera et portera sur :

- La vérification des documents comportant les informations cliniques, biologiques individuelles de chaque patient inclus en vue d'apprécier le respect de la méthodologie
- La vérification du système de traçabilité (conservation des formulaires remplis, des lames....)
- La vérification rapide de quelques lames (qualité de la confection des GE/FM, de l'identification, de la coloration, et exactitude du diagnostic biologique).

En fin d'étude les données seront validées après le contrôle de qualité

Le contrôle de qualité des lames, se fera sur les lames et les éléments de la traçabilité.

- Pour les lames, la relecture des lames par la technique de double lecture par les microscopistes qualifiés; seules les lames dont les résultats sont extrêmement discordants seront exclus.

:

- Pour la traçabilité, la vérification se fera sur les deux documents d'enregistrement du clinicien et du laboratoire pour l'exactitude des informations portées et leur concordance.

5-6 Classification et critère d'évaluation

Sensibilité : est considérée comme bonne si sur les densités fortes et faibles, elle est supérieure à 80%.

Spécificité : est considérée comme bonne si sur les densités parasitaires fortes et faibles, elle est supérieure à 80%

On établira également les valeurs prédictives positive et négative.

6- CONSIDERATION ETHIQUES

Cette évaluation rentre dans le cadre des prérogatives de la division des laboratoires qui doit assurer et garantir la qualité des différents réactifs et consommables circulant sur le marché togolais. Toutefois le protocole d'évaluation pourrait si nécessaire être soumis au CBRS pour valider l'aspect éthique et la valeur scientifique du protocole en conformité avec les normes internationales. Toutefois le consentement éclairé des parents ou du tuteur de l'enfant ou du sujet sera systématiquement obtenu avant le prélèvement chez toute personne éligible.

7- ORGANISATION PRATIQUE DE L EVALUATION SUR SITE

7-1 Composition des équipes

7-1-1 Coordination centrale

Elle est composée du chef de la division des laboratoires, des experts du laboratoire de référence du PNLP et de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie.

7-1-2 Equipe d'évaluation sur site

est composée de :

- un médecin clinicien et/ou un assistant médical
- 2 techniciens de laboratoire
- un infirmier (éventuellement)

7-2 Taches et procédures

7-2-1 Coordination centrale

➔ Le coordinateur du programme Paludisme

En sa qualité de premier responsable de l'ensemble des activités de lutte contre le paludisme il doit :

- s'assurer que les fournisseurs de TDR évaluent régulièrement leurs réactifs et actualisent leur certificat d'homologation,
- veiller avec les autres membres de la coordination à l'exécution des activités,
- disposer des résultats et les recommandations d'évaluation des TDR pour les prises de décisions au niveau du PNLP.

➔ La Division des laboratoires

Coordonner les activités de l'ensemble des sites notamment :

- la rédaction ou la mise à jour du document de procédure,
- la supervision et l'assurance de qualité,
- l'analyse des données et la production du rapport final,

- L'élaboration du budget prévisionnel.

→ Les experts (parasitologues)

Il est chargé d'aider le chef de Division dans sa tâche en veillant à :

- La formation des équipes de recherche
- au suivi de l'utilisation scrupuleuse par le personnel du manuel standardisé sur les sites
- supervision et l'assurance qualité
- détectant les éventuelles dérives pouvant entacher la qualité du travail,
- l'analyse des données et l'élaboration du rapport d'évaluation

→ Le technicien de laboratoire

Il peut être issu du laboratoire de référence du PNLP ou d'une autre structure mais disposant de connaissances et d'expériences solides en microscopie pour le diagnostic du paludisme ; il doit :

- participer aux séances de formation, en assurant la partie des exercices pratiques,
- participer aux supervisions au cours desquelles il collecte les lames pour le contrôle de qualité selon la procédure en vigueur,
- contrôler la qualité des lames par leur relecture.

7-2-2 La coordination administrative

Il s'agit d'une évaluation en site délocalisé sur les sites des autres régions sanitaires. Par conséquent, les autorités sanitaires régionales doivent être associées. Elles peuvent:

- participer au choix des sites et du personnel de recherche sur la base de la compétence,
- mettre à disposition, la logistique (voiture et/ou moto), l'équipement, les consommables, le perdiem,
- prendre toutes les dispositions administratives nécessaires pour le bon déroulement de la recherche sur le site d'accueil,
- transmettre si possible les données à la hiérarchie (division des laboratoires, et laboratoire national du PNLP),

7-2-3 Tâches et procédures de l'équipe du site

7-2-3-1 Tâches et procédures du clinicien

- Le clinicien a la responsabilité technique et éthique du test et est le garant de sa qualité.

→ Recrutement

Deux modes d'enrôlement sont possibles

1^{er} mode de procédure

L'évaluation est faite par le couple clinicien-personnel de laboratoire.

Le clinicien (médecin généraliste et pédiatre)

- Examiner les sujets âgés qui viennent consulter pour suspicion d'accès palustre,
- Sélectionner tous ceux qui présentent une présomption palustre (température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ et les autres signes décrits par l'OMS),
- Enregistrer ceux ayant une température axillaire supérieure à $37,5^{\circ}\text{C}$ (thermomètre placé dans le creux axillaire pendant au moins 5 minutes) avec ou sans signe de gravité ; vérifier que son état peut supporter une attente d'environ 30 min avant la mise en route du traitement,
- Expliquer au patient ou à son parent qu'une prise de sang va être faite afin de rechercher la cause de la maladie et qu'il faut une attente de 30min après le prélèvement, pour avoir le résultat. Si le résultat est positif il bénéficiera d'un deuxième prélèvement pour confirmation.
- Ecrire sur le formulaire conçu à cet effet
 - ❖ la date de consultation
 - ❖ le n° d'identification attribué au patient "
 - ❖ nom, prénom,
 - ❖ L'âge, le sexe, le poids,
- Confier la fiche à l'infirmière qui doit accompagner le patient au laboratoire pour le prélèvement de sang pour goutte épaisse, frottis mince.

Inclusion proprement dite et réalisation du TDR

Dès réception des résultats de laboratoire, les sujets éligibles après obtention du consentement éclairé, sont confiés à l'infirmier ou au technicien de laboratoire pour :

- effectuer le TDR et lire les résultats dans les temps définis par chaque fabricant de réactif,
- Noter le résultat sur le formulaire
- Renvoyer le patient au médecin pour la prescription du traitement approprié.

A la fin chaque journée

- Marquer le résultat du TDR dans le registre général

- compléter avec les résultats définitifs de densité parasitaire trouvée par le laboratoire,
- tenir si possible une réunion toute l'équipe de recherche pour vérifier le respect de la procédure, la concordance entre les données notifiées et apporter des solutions aux problèmes rencontrés.

2ème mode de procédure

L'évaluation est entièrement faite par le personnel du laboratoire

Pour toute personne adressée au laboratoire pour réalisation de goutte épaisse :

- Expliquer au patient ou à son parent qu'au lieu d'une, deux prises de sang vont lui être faits afin de mieux rechercher la cause de la maladie et obtenir son consentement :
- Ecrire sur le formulaire conçu à cet effet
 - ❖ la date d de l'enrôlement
 - ❖ le n° d'identification attribué au patient "
 - ❖ nom, prénom,
 - ❖ L'âge, le sexe, le poids,
- Effectuer la goutte épaisse et le frottis à partir du sang capillaire
- Demander au patient d'attendre environ 3àminutes,
- Si la valeur de la parasitémie est dans l'intervalle requis, effectuer le second prélèvement du sang capillaire sur un tube EDTA,
- Renvoyer le patient au médecin pour la prescription du traitement approprié

Inclusion proprement dite et réalisation du TDR

- Le technicien effectue et lis la GE/FM suivant la procédure décrite plus bas.
- En fonction des résultats obtenus, à partir du sang prélevé sur le tube EDTA, le TDR sera effectué et lu dans le temps précisé par chaque fabricant
- Le résultat sera noté également sur le formulaire

A la fin chaque journée

- Le technicien de laboratoire avec l'aide de l'infirmier sous la supervision du clinicien pourrait avoir les informations cliniques de chaque sujet inclus, pour les enregistrer sur les formulaires.
- Toute l'équipe du site doit tenir si possible une réunion, pour vérifier le respect de la procédure, la concordance entre les données notifiées et apporter des solutions aux problèmes rencontrés.

⇒ **Interprétation des résultats et rédaction du rapport**

- Les données seront ensuite saisies et analysées par le parasitologue du laboratoire choisi pour l'expertise analytique, en collaboration avec le chef de la Division des laboratoires, qui adressera sur la base des résultats obtenus, un rapport à la DPLET et au PNLP.

7-2-3-2 Tâches et procédures pour le technicien de laboratoire

⇒ **Si 1^{er} mode de procédure**

- A l'accueil du patient, le faire asseoir, et lui expliquer ce qu'on doit lui faire (le mettre en confiance),
- Enregistrer les informations du patient sur le formulaire ou le registre de laboratoire,
- Faire le prélèvement capillaire et confectionner 2 lames de frottis et goutte épaisse,
- En attendant que le résultat de la GE et FM, faire attendre le patient pendant en moyenne 30 minutes si c'est le technicien qui doit faire le TDR ou l'envoyer chez l'infirmier si c'est ce dernier qui doit le réaliser,
- Après séchage des préparations, faire une coloration rapide d'une des lames (Giemsa 10%), lire rapidement et établir la densité parasitaire, et si le résultat correspond aux trois catégories de résultats pré-définies,
- Colorer la seconde lame au Giemsa 3%, cette lame servira pour la lecture minutieuse en vue des résultats définitifs (diagnostic d'espèce, densité parasitaire) et pour l'archivage,
- Enregistrer le résultat définitif, en cas de grande discordance (diagnostic d'espèce et/ou plus 10% de différence de densité parasitaire, relire les paires de lames, rechercher d'éventuelles causes d'erreurs),
- Soit faire rentrer le patient pour réaliser le TDR ou le faire faire par l'infirmière qui fait partie de l'équipe,
- Noter également le résultat du TDR sur le formulaire ou le registre,
- Renvoyer le patient avec les résultats vers le médecin pour le traitement approprié.

⇒ **Si 2^{ème} mode de procédure**

- A l'accueil du patient, le faire asseoir, et expliquer ce qu'on doit lui faire (le mettre en confiance),
- Obtenir son consentement éclairé ou celui de son tuteur ou parent s'il s'agit d'un enfant,
- Enregistrer les informations du patient sur le formulaire ou le registre de laboratoire,

- Faire le prélèvement capillaire pour confectionner les deux lames de frottis et goutte épaisse,
- Faire attendre le patient pendant en moyenne 30 minutes pour que le résultat de la GE et FM soit prêt,
- Après séchage des préparations, faire une coloration rapide à (Giemsa à 10%), lire et établir rapidement la densité parasitaire et si le résultat correspond aux trois catégories de résultats défini,
- Rappeler le patient et faire le second prélèvement capillaire sur tube EDTA,
- Réaliser le TDR selon la procédure de chaque fabricant à partir de ce prélèvement
- Faire une coloration lente de la seconde lame (Giemsa 3%), lire et établir la densité parasitaire définitive et le diagnostic d'espèce, cette lame sera gardée pour l'archivage,
- Noter également le résultat du TDR sur le formulaire ou le registre

⇒ Procédures de laboratoires

→Goutte épaisse et frottis mince

Prélèvement

- Faire asseoir et rassurer le patient après s'être assuré que tout le matériel dont on a besoin est disponible et à portée de main
- Apprêter 2 tampons d'alcool, une lancette stérile, 3 tampons de coton secs stériles,
- Avoir à disposition un sac poubelle contenu dans sa poubelle,
- Mettre une paire de gant jetable neuve,
- Désinfecter à l'aide d'un tampon alcoolisé, le bout du 3^e ou 4^e doigt d'une main. Utiliser au besoin plusieurs tampons. Jeter les tampons usagés dans le sac poubelle,
- Essuyer le doigt avec un tampon de coton sec stérile et laisser sécher à l'air. Jeter le tampon dans le sac poubelle,
- Piquer la face latérale du bout du doigt avec une lancette stérile,
- Jeter la lancette usagée dans un container à objets piquants et coupants,
- Essuyer la première goutte avec une gaze stérile. Jeter la gaze usagée dans le sac poubelle,
- Confectionner d'abord le frottis qu'il faut sécher rapidement et ensuite la goutte épaisse sur la même lame,
- Au besoin, on peut exercer une légère pression sur la base du doigt pour obtenir la quantité de sang nécessaire,
- A la fin du prélèvement, appliquer un tampon de coton sec stérile sur le point de piqûre jusqu'à ce que le saignement s'arrête,
- Jeter la gaze usagée et les emballages dans le sac poubelle,
- Si le prélèvement est de mauvaise qualité, ou de quantité insuffisante, il faut le refaire en utilisant un autre doigt,

- Identifier les GE et Frottis, selon la procédure d'identification établie,
- Jeter les gants usagés,
- Demander au patient s'il a une question à laquelle vous devez répondre; remercier le et suivre le reste des étapes en fonction du mode choisi,
- A la fin de chaque prélèvement, le technicien **doit changer de gant** et se laver les mains à l'eau et au savon.

Confection du frottis et goutte épaisse sur la même lame

Il faut confectionner d'abord le frottis et ensuite la goutte épaisse

Confection du frottis

- Déposer une petite goutte de sang sur l'intersection 1/3 et 2/3 de la lame,
- Placer le bord rodé d'une lame devant la goutte en formant un dièdre de 45-60°, tirer légèrement cette lame de façon à faire fuser le sang dans le dièdre formé par les deux lames, pousser enfin la lame pour étaler le sang jusqu'à son épuisement spontané,
- Sécher rapidement le frottis en le faisant battre le vent pendant quelques secondes.

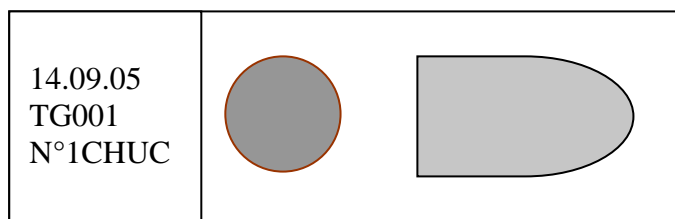
Confection de la Goutte épaisse

- Sur le 1/3 restant de la lame, déposer une goutte de sang,
- Avec le coin de la lame qui a servi à confectionner le frottis, étaler la goutte jusqu'à obtenir un cercle d'environ 1 cm de diamètre.

Identification des lames

Les éléments à inscrire sur la lame sont les suivants:

- Date à laquelle le prélèvement a été effectué
- TG suivi du n° d'ordre d'enregistrement du patient
- n° et initiales de quatre lettres attribuées à chaque site d'évaluation



14.09.11 = Date de l'étude
 TG = TOGO
 001= Patient N°1
 N°1 = Numéro du site
 CHUC= 4 lettres initiales du site d'étude

→ Il faut faire l'identification au niveau de la tête du frottis **au crayon à papier**. (Ne pas identifier au marqueur car il y a risque de perdre les coordonnées au cours de la fixation du frottis à l'alcool méthylique).

Séchage des lames

Les lames doivent être séchées à température ambiante, à l'abri des rayons solaires, de la poussière et des mouches; on pourra utiliser une sèche lame si cela est disponible pour raccourcir le temps de séchage notamment pour les lames de sélection des malades.

Coloration

- Fixer le frottis en le plongeant dans l'alcool méthylique pendant 5 minutes (éviter le contact de la goutte épaisse avec l'alcool)
- Laisser sécher,
- Couvrir une des lames avec une solution de Giemsa à 10%, laisser agir pendant 10 minutes, et/ou la deuxième lame avec une solution de Giemsa à 3% et laisser agir pendant 30 minutes en fonction du mode de procédure choisie,
- Laver en plongeant les lames dans l'eau distillée tamponnée (permet d'éviter le dépôt de colorant sur la préparation)
- Sécher sur le râtelier la face portant la préparation regardant le bas.

Préparation du Giemsa à 10%:

1 volume de solution de stock + 9 volumes d'eau distillée tamponnée

Préparation du Giemsa à 3%:

1 volume de solution de stock + 32,33 volumes d'eau distillée tamponnée

(soit en pratique : 3 ml de Giemsa + 97 ml d'eau distillée tamponnée)

Préparation de la solution de stock GIEMSA (considérée comme pur = 100%)

| | |
|------------------|--------|
| Poudre de Giemsa | 3,8 g |
| Méthanol | 250 ml |
| Glycérol | 250 ml |

- Dans un flacon en verre opaque contenant la quantité nécessaire de méthanol, ajouter la poudre de Giemsa faire dissoudre en agitant pendant 2 à 3 min,
- Ajouter le glycérol, continuer d'agiter,
- Laisser la solution 2-3 jours en agitant 3-4 fois tous les jours jusqu'à dissolution complète puis étiqueter et dater la solution.

Lecture et Calcul de la densité parasitaire

La lecture se fait au microscope avec l'objectif à immersion x100.

Pour le premier mode

La lame de la sélection des malades doit être lue rapidement et en priorité.

Il faudra commencer la lecture par la goutte épaisse; en cas de positivité, confirmer rapidement sur le frottis.

- Rechercher au faible grossissement sur la goutte épaisse la zone permettant une lecture correcte (hématies et leucocytes sont bien séparés les uns des autres et ne sont pas déformés).
- Déposer une goutte d'huile à immersion et faire la mise au point.
- Parcourir les champs contigus sur la lame suivant les bandes perpendiculaires au frottis sans revenir en arrière.
- Compter dans chaque champ en s'aidant du compteur manuel, le nombre total de parasites asexués et celui des globules blancs. Arrêter de compter lorsqu'on atteint 200 globules blancs (GB) pour la sélection, et pour 1000 GB pour l'inclusion proprement dite ou 500 parasites.
- Terminer la numération des parasites dans le dernier champ même si le nombre de 200/1000 GB est atteint.
- Consigner les résultats des nombres de globules blancs et de parasites asexués comptés dans le registre,
- Etablir la densité parasitaire sur la goutte épaisse et rendre le résultat provisoire au médecin.

Calculer la densité parasitaire par la formule suivante:

| |
|---|
| $\text{Densité parasitaire DP} = \frac{\text{Nombre (x) de parasites} \times 8000}{\text{Nombre (y) de globules blancs}} \quad (\text{parasites par } \mu\text{l})$ |
|---|

Les autres lames pourront être lues l'après midi.

Conservation des lames

Après lecture il faut se débarrasser de l'huile à immersion en enroulant les lames dans du papier absorbant (papier de toilette).

Les lames de goutte épaisse doivent être stockées d'une manière rationnelle afin qu'elles puissent être facilement retrouvées et réexaminées dans le cadre d'un contrôle de qualité. Les lames doivent être rangées dans une boîte de lames

Les lames seront conservées au moins 2 ans et devront permettre des contrôles ultérieurs

→ Réalisation du TDR

Prélèvement

Le prélèvement est constitué de sang capillaire obtenu après désinfection et piqûre du troisième ou quatrième doigt de chaque personne et déposé soit directement sur le TDR soit recueilli dans un microtube EDTA.

Réalisation

- Porter des gants propres et avec des pinces propres,
- Sortir le TDR de son emballage
- Attendre que le test prenne la température ambiante
- Prendre la quantité de sang précisée par le fabricant par la micropipette calibrée
- déposer immédiatement le sang prélevé à l'emplacement indiqué par chaque fabricant pour être déposé
- Ajouter le réactif également à l'emplacement indiqué par le fabricant et en volume requis
- Noter ou marquer sur le test l'heure à laquelle le test a été réalisé et l'heure à laquelle le résultat sera lu, et si possible mettre l'identification comme cela a été fait sur les lames.
- Lire le résultat après le temps précisé par le fabricant.

Lecture et interprétation des résultats

La lecture se fait à l'œil nu et consiste à regarder dans les fenêtres contrôle (C) et Test (T)

- on observe deux ou plusieurs bandes de couleur rose (figure 2a) lors que le test est positif (présence du *Plasmodium falciparum* ou une autre espèce en fonction du type test) :

- une seule bande rose observée dans la fenêtre contrôle (figure 2b) lorsque le test est Négatif (absence de Plasmodium)
- le test non valide en absence de bande dans la fenêtre contrôle qu'il y ait d'apparition de bande ou non dans la fenêtre test (figure 2c).

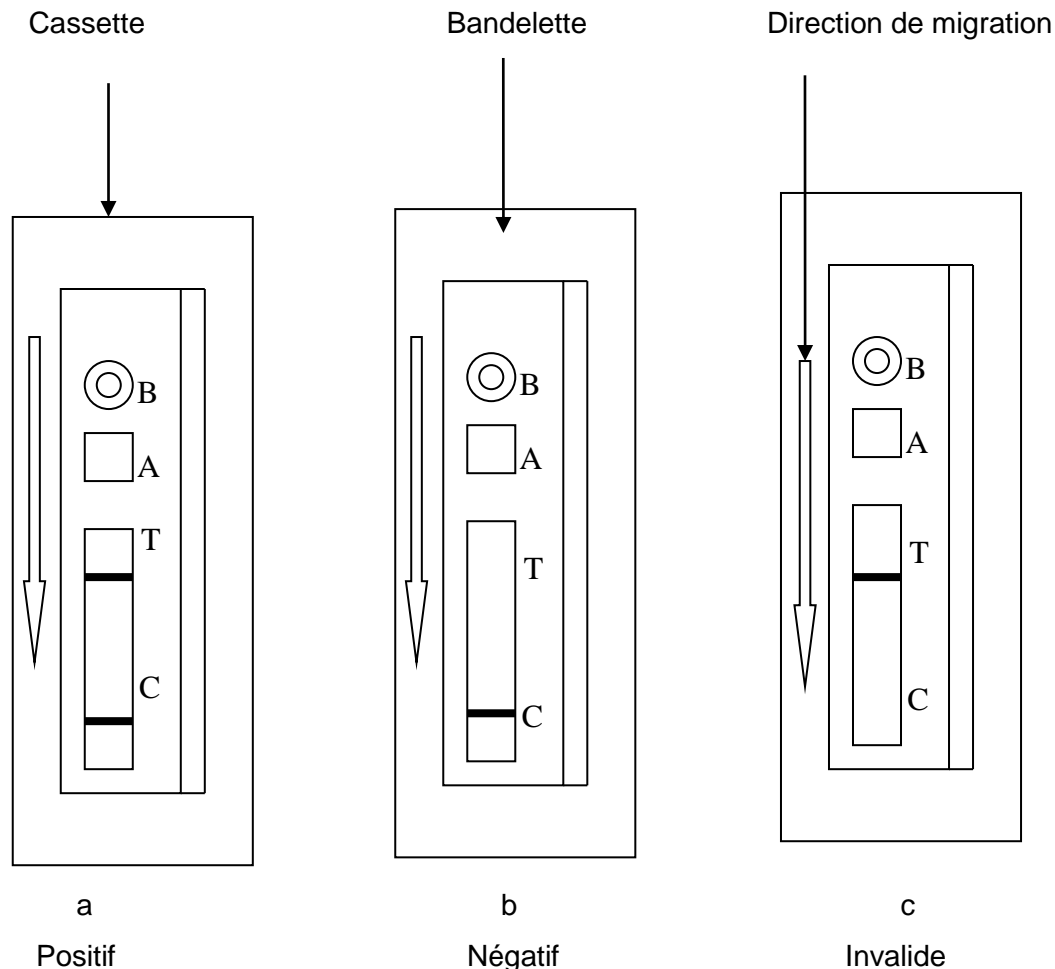


Figure 2 : Exemple de résultat de TDR

Identification des TDR

L'identification du TDR est possible si on dispose suffisamment de place sur le test. Il se fait comme pour les lames et comporte les mêmes informations que celles inscrites sur la lame mais avec une écriture permanente (marqueur).

Conservation des TDR

Les TDR non encore utilisés, seront conservés au laboratoire à température ambiante. Pour les besoin de contrôle de qualité, les tests utilisés seront également conservés au laboratoire pour vérification.

→ Bonnes pratiques de laboratoire, destruction des déchets

Il est essentiel que les mesures de sécurité universelles soient appliquées pendant les étapes de prélèvement, de séchage, de coloration et de manipulation des lames et des déchets (lancettes usagées, tampons, et gants). Ainsi:

- N'utiliser que des lancettes stériles à usage unique,
- Bien désinfecter le doigt des malades avant le prélèvement,
- La lésion de piqûre doit être correctement pansée, s'assurer de l'arrêt du saignement avant de libérer l'enfant,
- Immédiatement après usage, les lancettes doivent être jetées dans le container à objets tranchants et les autres matériels (tampons, gants et emballages doivent être placés dans le sac poubelle,
- Les sachets des déchets biologiques doivent être larges et résistants. Il doit être placé dans une poubelle en métal ou en plastique pouvant offrir support, protection et transport facile,

NB : aucun objet coupant ou piquant ne doit être jeté dans ces sachets (pour éviter de se faire piquer),

- Après chaque prélèvement, ou après avoir manipulé un échantillon, il faudra se laver les mains à l'eau et au savon.
- A la fin de chaque journée, chaque type de déchet doit être éliminé de façon appropriée (destruction par incinération ou enfouissement).

⇒ Assurance qualité

Elle consiste :

- au respect scrupuleux des procédures opératoires,
- au contrôle des calculs et de transcription des résultats,
- à la maintenance du matériel,
- au contrôle de la qualité du matériel et consommables,
- A soumettre aux deux types de contrôle de qualité, de lames des sujets inclus,
- à la bonne pratique de laboratoire.

7-2-3-3 Tâches et procédures pour l'infirmier

L'infirmier :

- organiser l'accueil des malades et des parents,
- sélectionner pour le clinicien, les patients éligibles,
- conduire les malades chez le technicien de laboratoire,

- réaliser en fonction du mode de procédure le TDR et lire le résultat.

REFERENCES

- 1- *Ministère de la Santé / Programme National de Lutte contre le Paludisme ,rapport de la revue de performance du plan stratégique 2006-2010 du programme Nationale de Lutte contre le Paludisme, 2011*
- 2- *Organisation Mondiale de la Santé, Directives pour le traitement du paludisme, Deuxième édition 2010*
- 3- *Réseau II de l'Afrique de l'ouest pour le Traitement AntiPaludique, Rapport de la troisième assemblée général de RAOTAP II, Ouagadougou, 2009.*
- 4- *Ministère de la Santé / Programme National de Lutte contre le Paludisme, Revue de performance du programme National de lutte contre le paludisme , 2011*
- 5- *WHO, Malaria Rapid Diagnostic Test performance, Results of WHO product testing of Malaria RDTs: Round 1, 2008*
- 6- *International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva, Council for International Organization of Medical Sciences, 2002.*
- 7- *WHO, Malaria Rapid Diagnostic Test performance, Results of WHO product testing of Malaria RDTs: Round 2, 2009*
- 8- *WHO, Malaria Rapid Diagnostic Test performance, Results of WHO product testing of Malaria RDTs: Round 3, 2010-2011*
- 9- *Déclaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects.*
- 10- *WHO, Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic test for Malaria ,2009*
- 11- *WHO, Malaria Microscopy Quality Assurance manual, 2008*
- 12- *ICH Topic E8. Note for guidance on general considerations for clinical trials. London, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1997 (CPMP/ICH/291/95).*
- 13- *Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva, World Health Organization, 2003 (unpublished document WHO/RBM/HTM/2003.50).*
- 14- *Ministère de la Santé / Programme National de Lutte contre le Paludisme, Manuel de formation pour la prise en charge du paludisme dans les formations sanitaires, Mars 2006*
- 15- *Ministère de la Santé / Programme National de Lutte contre le Paludisme, Politique nationale de lutte contre le paludisme, Août 2006.*

ANNEXES

8- Annexes

Annexe A : Guide de consentement

Formulaire de consentement éclairé pour sujets inclus dans l'évaluation TDR dans la confirmation biologique des cas fébriles suspects de paludisme simple sur site.

Contacts : Division des laboratoires : 22 22 38 01 / 22 22 07 99

Nom de l'organisation : Ministère de la Santé/

Ce formulaire de consentement comprend deux parties :

- la fiche d'information (destinée à vous communiquer des informations sur l'étude de surveillance)
- le certificat de consentement (à signer si la personne accepte de participer à l'étude)

.PARTIE I : Introduction de la fiche d'informations

Mon nom est et je travaille pour le Ministère de la santé. Nous réalisons une étude sur le meilleur diagnostic biologique du paludisme à adopter pour réduire l'incidence de cette maladie très courante dans notre pays et qui entraîne une morbi-mortalité dans la population. Je vais vous fournir des informations et vous inviter vous ou votre enfant à participer à cette étude. Avant de vous décider, vous pouvez en discuter avec toute personne avec laquelle vous vous sentez à l'aise. Il est possible que vous ne compreniez pas certains termes. Arrêtez-moi, s'il vous plait, lors de la mention de ces termes et je prendrai du temps pour les expliquer. Si vous avez ultérieurement des questions, vous pouvez me les soumettre ou les poser au médecin ou à un autre membre de notre équipe.

Le paludisme est l'une des maladies les plus courantes et les plus dangereuses au Togo qui exige un traitement médicamenteux efficace. Mais avant d'instituer ce traitement spécifique il faut s'assurer dans un temps rapide qu'il s'agit réellement du cas de paludisme et non d'une autre affection. D'autres méthodes diagnostiques peuvent être utilisées pour appuyer la goutte épaisse pour améliorer le diagnostic du paludisme : c'est le cas du TDR.

Nous voulons voir si ce nouvel outil détecte aussi bien le paludisme que la goutte épaisse habituellement utilisé.

Votre décision de participer à cette étude est totalement volontaire. Vous êtes libre de participer à l'étude ou non. Si vous n'optez pas pour cette participation, tous les services dont vous bénéficiez dans cet établissement continueront d'être assurés et rien ne changera. Vous êtes également libre de changer d'avis ultérieurement et de mettre fin à votre participation, même si vous aviez donné votre accord auparavant et vous continuerez de bénéficier des services qui étaient dispensés à votre enfant.

Aujourd'hui deux analyses vous seront fait pour avoir rapidement la confirmation sur ce de quoi il souffre : ainsi on prélèvera quelques gouttes de sang à son doigt pour les déposer sur une lame en vue de la numération des parasites et sur une cassette pour recherche une substance produite par les parasites qui sont dans son organisme.

Si c'est effectivement le paludisme simple dont il souffre, le résultat sera envoyé au médecin et le médicament antipaludique recommandé le ministère du Togo lui sera donné gratuitement et pris pendant 3 jours. Il s'agit qu'il faut vous sera administré

Vous ne ressentirez qu'une petite douleur lors de la piqûre, mais cette douleur disparaîtra très rapidement.

Si vous avez une question, vous pouvez la soumettre immédiatement ou plus tard, même une fois l'étude entamée. Si vous souhaitez poser des questions ultérieurement, veuillez prendre contact avec la division des laboratoires au Ministère de la Santé à Lomé.

PARTIE II : Certificat de consentement

J'ai été invité à participer à l'étude sur le diagnostic des accès fébriles d'origine palustre. Je comprends que cette participation implique que je vais me soumettre à deux prélèvements. Il m'a été indiqué que les risques étaient minimes et pouvaient inclure une douleur au niveau du doigt. Je suis conscient que cette participation va améliorer la prise en charge des cas de paludisme simple au Togo, et je ne recevrai aucune compensation. On m'a communiqué le nom des répondants que je peux facilement contacter.

J'ai lu les informations précédentes ou elles m'ont été lues. J'ai eu la possibilité de poser des questions à leur sujet et il a été répondu de manière satisfaisante aux questions que j'ai posées. Je consens volontairement à participer à cette évaluation et je comprends que j'ai le droit de me retirer de celle-ci à tout moment, sans que cela nuise en aucune façon aux soins médicaux qu'il reçoit.

Nom imprimé du participant _____

Signature du participant _____

Date _____

 Jour/mois/année

Si le participant est illettré, un témoin capable de lire et écrire doit signer (dans la mesure du possible, cette personne doit être choisie par le participant et n'avoir aucun lien avec l'équipe de recherche).

J'ai été témoin de la lecture exacte du formulaire de consentement au participant potentiel et celui-ci a eu la possibilité de poser des questions. Je confirme que le participant a donné librement son consentement.

Nom imprimé du témoin _____ et empreinte du pouce du malade ou d'un de ses parents/du tuteur

Signature du témoin _____

Date _____

 Jour/mois/année

