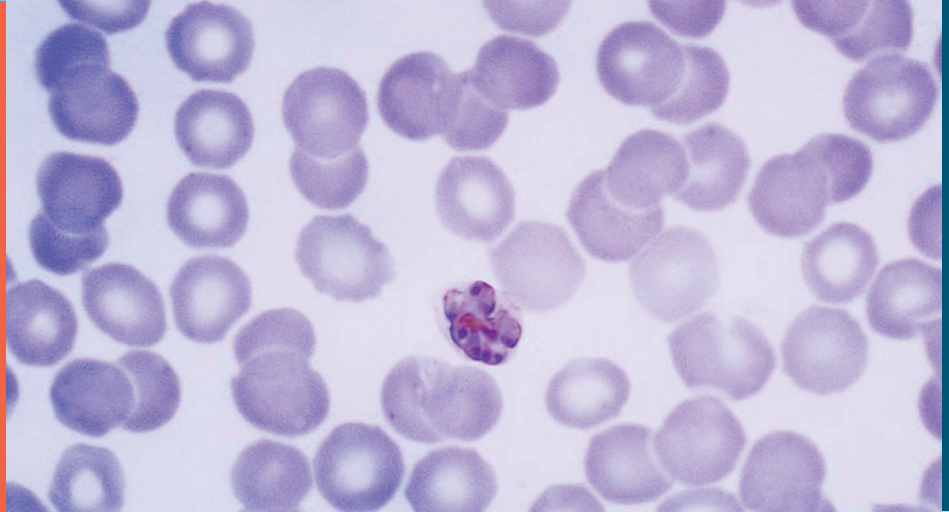


GUIDE MÉTHODOLOGIQUE



Microscopie pour la détection,
l'identification et la quantification
des parasites du paludisme sur
frottis sanguins ou gouttes épaisses
colorés dans les environnements de
recherche

Procédure



Organisation
mondiale de la Santé



Pour la recherche sur
les maladies de la pauvreté

UNICEF • PNUD • Banque mondiale • OMS

GUIDE MÉTHODOLOGIQUE

Microscopie pour la détection,
l'identification et la quantification
des parasites du paludisme sur
frottis sanguins ou gouttes épaisses
colorés dans les environnements de
recherche

Procédure

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data

Microscopie pour la détection, l'identification et la quantification des parasites du paludisme sur frottis sanguins ou gouttes épaisses colorés dans les environnements de recherche - procédures - guide méthodologique [Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings: procedure - methods manual]

ISBN 978-92-4-000024-7

Copyright © Organisation mondiale de la Santé pour le compte du Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales 2020

Certains droits réservés. La présente publication est disponible sous la licence Creative Commons Attribution – Pas d'utilisation commerciale – Partage dans les mêmes conditions 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO ; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.fr>).

Aux termes de cette licence, vous pouvez copier, distribuer et adapter l'oeuvre à des fins non commerciales, pour autant que l'oeuvre soit citée de manière appropriée, comme il est indiqué ci-dessous. Dans l'utilisation qui sera faite de l'oeuvre, quelle qu'elle soit, il ne devra pas être suggéré que l'OMS approuve une organisation, des produits ou des services particuliers. L'utilisation de l'emblème de l'OMS est interdite. Si vous adaptez cette oeuvre, vous êtes tenu de diffuser toute nouvelle oeuvre sous la même licence Creative Commons ou sous une licence équivalente. Si vous traduisez cette oeuvre, il vous est demandé d'ajouter la clause de non responsabilité suivante à la citation suggérée : « La présente traduction n'a pas été établie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). L'OMS ne saurait être tenue pour responsable du contenu ou de l'exactitude de la présente traduction. L'édition originale anglaise est l'édition authentique qui fait foi ».

Toute médiation relative à un différend survenu dans le cadre de la licence sera menée conformément au Règlement de médiation de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle.

Citation suggérée. Microscopie pour la détection, l'identification et la quantification des parasites du paludisme sur frottis sanguins ou gouttes épaisses colorés dans les environnements de recherche : procédures - guide méthodologique. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Catalogage à la source. Disponible à l'adresse <http://apps.who.int/iris>.

Ventes, droits et licences. Pour acheter les publications de l'OMS, voir <http://apps.who.int/bookorders>.

Pour soumettre une demande en vue d'un usage commercial ou une demande concernant les droits et licences, voir <http://www.who.int/about/licensing>.

Matériel attribué à des tiers. Si vous souhaitez réutiliser du matériel figurant dans la présente oeuvre qui est attribué à un tiers, tel que des tableaux, figures ou images, il vous appartient de déterminer si une permission doit être obtenue pour un tel usage et d'obtenir cette permission du titulaire du droit d'auteur. L'utilisateur s'expose seul au risque de plaintes résultant d'une infraction au droit d'auteur dont est titulaire un tiers sur un élément de la présente oeuvre.

Clause générale de non responsabilité. Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les traits discontinus formés d'une succession de points ou de tirets sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'OMS, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'OMS ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

La présente publication exprime les vues collectives d'un groupe international d'experts et ne représente pas nécessairement les décisions ni les politiques de l'Organisation mondiale de la Santé.

Les opinions exprimées dans la présente publication n'engagent que les auteurs et ne représentent pas nécessairement les décisions, la politique officielle ou les opinions des institutions auxquelles ils sont affiliés.

Photo de couverture : CDC/Dr Mae Melvin

Conception graphique et illustrations : Lisa Schwarb, Lausanne

Table des matières

Remerciements	7
Abréviations	8
Chapitre 1. Introduction	9
Chapitre 2. Procédure de base recommandée N° 1 : préparation des étalements sanguins pour l'examen microscopique du paludisme	11
2.1 Objectif	11
2.2 Champ d'application	11
2.3 Attribution des responsabilités	11
2.4 Matériel et équipement	12
2.5 Procédure	12
2.5.1 Etiquetage	12
2.5.2 Préparation de gouttes épaisses et de frottis	12
2.6 Contrôle de qualité	14
2.7 Dimensions possibles de la goutte épaisse	14
Chapitre 3. Procédure de base recommandée N° 2 : coloration des étalements sanguins pour l'examen microscopique du paludisme	15
3.1 Objectif	15
3.2 Champ d'application	15
3.3 Attribution des responsabilités	15
3.4 Matériel et équipement	16
3.4.1 Pour l'eau tamponnée	16
3.4.2 Pour la solution de Giemsa	16
3.4.3 Pour la coloration des étalements sanguins	16
3.5 Procédure	16
3.5.1 Préparation de l'eau tamponnée	16
3.5.2 Préparation de la solution de travail de Giemsa	17
3.5.3 Coloration des lames	18
3.5.4 Montage permanent des étalements sanguins	18
3.6 Contrôle qualité	18

Chapitre 4. Procédure de base recommandée N° 3 : examen microscopique pour la détection, l'identification et la quantification des parasites du paludisme sur gouttes épaisses et frottis colorés	19
4.1 Objectif.....	19
4.2 Champ d'application.....	19
4.3 Attribution des responsabilités.....	19
4.4 Matériel et équipement.....	20
4.4.1 Pour la mise en aveugle, la saisie des données et le contrôle qualité (QC) interne.....	20
4.4.2 Pour l'examen microscopique.....	20
4.4.3 Pour la conservation des lames après l'examen microscopique.....	20
4.5 Procédure.....	20
4.5.1 Mise en aveugle des lames.....	20
4.5.2 Évaluation de la qualité des lames.....	21
4.5.3 Sélection de la goutte épaisse ou du frottis pour estimer la densité parasitaire.....	21
4.5.4 Détection et estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse.....	22
4.5.5 Estimation de la densité parasitaire à partir du frottis.....	24
4.5.6 Conservation des lames.....	24
4.5.7 Calcul de la densité parasitaire.....	25
4.6 Contrôle qualité (CQ).....	26
4.6.1 Contrôle qualité interne (CQI).....	28
4.6.2 Contrôle qualité externe (CQE).....	29
4.7 Variations des paramètres de comptage et résolution des discordances.....	30
4.7.1 Variations des paramètres de comptage en fonction de l'indice de champ de l'oculaire.....	30
4.7.2 Résolution des résultats contradictoires.....	30
Références bibliographiques	33

Remerciements

M. El Hadji Ba, Institut de recherche pour le développement – Sénégal, Dakar, Sénégal; Professeur J. Kevin Baird, *Eijkman-Oxford Clinical Research Unit*, Jakarta, Indonésie; D^r John Barnwell, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) des États-Unis d'Amérique, Atlanta, GA, États-Unis d'Amérique; D^r David Bell, *Global Good and Intellectual Ventures Laboratory*, Bellevue, WA, États-Unis d'Amérique; D^r Jane Carter, *African Medical and Research Foundation* (Amref) Health Africa, Nairobi, Kenya; D^r Mehul Dhorda, *WorldWide Antimalarial Resistance Network*, Bangkok, Thaïlande; Professeur Arjen Dondorp, *Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit*, Bangkok, Thaïlande; Mme Lenny Ekawati, *Eijkman-Oxford Clinical Research Unit*, Jakarta, Indonésie; D^r Michelle Gatton, *Queensland University of Technology*, Brisbane, QLD, Australie; D^r Iveth González, *FIND*, Genève, Suisse; Professeur Philippe J. Guerin, *WorldWide Antimalarial Resistance Network University of Oxford*, Oxford, Royaume-Uni; Dre Sandra Incardona, *FIND*, Genève, Suisse; Dr Ken Lilley, *Army Malaria Institute (AMI)*, Enoggera, QLD, Australie; D^r Didier Menard, *Institut Pasteur du Cambodge*, Phnom Penh, Cambodge; Professeur Francois Nosten, *Shoklo Malaria Research Unit*, Mae Sot, Thaïlande; D^r Peter Obare, *Kenya Medical Research Institute*, Kisumu, Kenya; D^r Bernhards Ogutu, *Kenya Medical Research Institute*, Kisumu, Kenya; D^r Piero L. Olliaro, *Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR)*, un programme coparrainé par l'UNICEF, le PNUD, la Banque mondiale et l'OMS, Genève, Suisse; Professeur Ric N. Price, *WorldWide Antimalarial Resistance Network*, Darwin, Australie; M. Stephane Proux, *Shoklo Malaria Research Unit*, Mae Sot, Thaïlande; D^r Andrew R. Ramsay, *Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR)*, un programme coparrainé par l'UNICEF, le PNUD, la Banque mondiale et l'OMS, Genève, Suisse; D^r John C. Reeder, *Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR)*, un programme coparrainé par l'UNICEF, le PNUD, la Banque mondiale et l'OMS, Genève, Suisse; Dr Kamolrat Silamut, *Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit*, Bangkok, Thaïlande; D^r Cheikh Sokhna, *Institut de recherche pour le développement – Sénégal*, Dakar, Sénégal.

Abréviations

C/	Contre
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> des États-Unis d'Amérique
CFG	Champ à fort grossissement
CQ	Contrôle qualité
EOCRU	<i>Eijkman-Oxford Clinical Research Unit</i> (unité de recherche clinique conjointe entre l'Institut Eijkman de biologie moléculaire et l'université d'Oxford), Indonésie
GG-IVL	<i>Global Good and Intellectual Ventures Laboratory</i>
ID	Identification
IPC	Institut Pasteur du Cambodge, Cambodge
IRD	Institut de recherche pour le développement, Sénégal
KEMRI	<i>Kenya Medical Research Institute</i> (institut de recherche médicale du Kenya)
MON	Mode opératoire normalisé
MORU	<i>Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit</i> (unité de recherche en médecine tropicale conjointe entre l'université Mahidol et l'université d'Oxford), Thaïlande
OMS	Organisation mondiale de la Santé
QUT	<i>Queensland University of Technology</i> (université de technologie du Queensland), Australie
ReMMS	<i>Research Malaria Microscopy Standards</i> (standards à respecter pour la microscopie du paludisme réalisée à des fins de recherche)
SMRU	<i>Shoklo Malaria Research Unit</i> (unité de recherche sur le paludisme de Shoklo), Thaïlande
TDR	Programme spécial UNICEF/PNUD/Banque mondiale/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales
WWARN	<i>WorldWide Antimalarial Resistance Network</i> (réseau international sur la résistance aux antipaludiques), Oxford, Royaume-Uni

Chapitre 1

Introduction

L'examen microscopique du paludisme reste une méthode de référence de premier ordre pour les essais sur le terrain évaluant des interventions cliniques ou encore des outils diagnostiques. Le terme de « microscopiste expert » est habituellement utilisé pour qualifier un niveau de compétence que l'on considère comme étant plus élevé que ce que l'on observe d'ordinaire chez les microscopistes cliniques, mais ce terme reste mal défini. L'Organisation mondiale de la Santé a défini des critères afin de standardiser la formation et l'évaluation des microscopistes spécialisés dans le paludisme qui exercent dans les services de santé, les programmes de lutte antipaludique nationaux et les laboratoires de référence nationaux : des points de référence concernant les compétences à acquérir et à surveiller ont été établis (WHO, 2009). Les exigences en matière d'expertise sont encore plus strictes lorsque la microscopie est utilisée dans le cadre de la recherche, nécessitant généralement une rigueur toute particulière en ce qui concerne la quantification des parasites et la spécificité diagnostique de la détection des parasites. Lors d'une consultation informelle organisée par les membres du TDR, Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales, les participants se sont accordés à reconnaître qu'il était nécessaire de standardiser l'examen microscopique utilisé à des fins de recherche afin d'améliorer la qualité des essais cliniques et des essais sur les méthodes diagnostiques, de pouvoir comparer les résultats entre les essais et de rendre les publications plus claires.

Le présent manuel a été élaboré afin de permettre d'adopter progressivement des standards communs pour mener des travaux de recherche faisant appel à la microscopie pour la détection, l'identification et la quantification des parasites responsables du paludisme, et rendre compte des résultats.

Il présente des procédures qui reposent sur les critères d'assurance qualité adoptés eu égard à l'examen microscopique du paludisme réalisé à des fins de recherche qui ont été définis lors de la consultation susmentionnée et dont les participants appartenaient aux organismes suivants : le TDR ; le réseau international sur la résistance aux antipaludiques (WWARN), Royaume-Uni ; la Fondation FIND pour des outils diagnostiques nouveaux et novateurs, Suisse ; les *Centers for Disease Control and Prevention* des États-Unis d'Amérique ; l'institut de recherche médicale du Kenya (KEMRI) ; consultation qui s'est ensuite étoffée de l'Amref Health Africa (Kenya) ; l'unité de recherche clinique EOCRU (*Eijkman-Oxford Clinical Research Unit*), Indonésie ; l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) ; l'Institut de recherche pour le développement (IRD), Sénégal ; la structure *Global Good and Intellectual Ventures Laboratory* (GG-IVL), États-Unis d'Amérique ; l'unité de recherche en médecine tropicale MORU (*Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit*), Thaïlande ; l'université de technologie du Queensland QUT (Queensland University of Technology), Australie ; ainsi que l'unité de recherche sur le paludisme de Shoklo SMRU (*Shoklo Malaria Research Unit*), Thaïlande.

Ces standards pour la microscopie du paludisme réalisée à des fins de recherche (ReMMS pour « *Research Malaria Microscopy Standards* » en anglais) représentent un minimum indispensable suggéré pour l'examen microscopique du paludisme pratiqué dans le cadre des études cliniques. Les institutions collaboratrices s'efforceront de s'y conformer dans les études de recherche dont les résultats seront publiés. Ces standards se veulent une base solide pour l'adoption plus générale de protocoles de référence standardisés pour la microscopie réalisée dans le cadre de la recherche sur le paludisme.



Chapitre 2

Procédure de base recommandée N° 1 : préparation des étalements sanguins pour l'examen microscopique du paludisme

2.1 Objectif

Cette partie du document décrit la procédure pour préparer des étalements sanguins à partir de sang périphérique, recueilli par piqûre au bout du doigt ou par ponction veineuse, afin qu'ils soient colorés, puis examinés au microscope pour détecter, identifier et quantifier les parasites du paludisme.

2.2 Champ d'application

Cette procédure est destinée à être utilisée dans les études de recherche clinique sur le paludisme telles que celles évaluant l'efficacité d'un médicament ou d'un vaccin, ou les performances d'un test de diagnostic. Elle repose sur les critères d'assurance qualité relatifs à l'examen microscopique du paludisme réalisé à des fins de recherche qui ont été définis à l'occasion d'une consultation informelle organisée par les membres du TDR et réunissant des représentants des CDC, de la fondation FIND, de l'institut KEMRI, du programme TDR et du réseau WWARN, lesquels ont par la suite été rejoints par des représentants des structures Amref Health Africa, EOCRU, GG-IVL, IPC, IRD, MORU, QUT et SMRU.

Selon le contexte, cette procédure pourra avoir besoin d'être adaptée ou modifiée avant d'être mise en application. Toutefois, certains éléments – soulignés dans le texte ci-après – doivent être conservés dans le mode opératoire normalisé (MON) et/ou mis en œuvre dans le cadre de la procédure et de son assurance qualité afin de garantir la conformité avec les standards ReMMS.

2.3 Attribution des responsabilités

Les tâches à accomplir pour cette procédure sont indiquées ci-dessous. Chacune d'entre elles doit être attribuée à une ou des personne(s) ayant été formée(s) pour effectuer ces tâches et observer les précautions d'usage en matière de santé et de sécurité.

- Étiquetage des lames
- Préparation des étalements de sang.

2.4 Matériel et équipement

Pour la préparation de gouttes épaisses et de frottis sanguins.

- Lames en verre : neuves, exemptes de graisse, avec une extrémité dépolie
- Étiquettes et marqueur permanent
- Micropipettes d'une contenance de 2 à 20 µL
- Lame gabarit
- Lame d'étalement : coins biseautés, bords rodés
- Méthanol absolu, de qualité « réactif de laboratoire » ou supérieure

2.5 Procédure

2.5.1 Étiquetage

Les lames doivent être étiquetées avec, au minimum, les mentions suivantes : le numéro d'identification (ID), ou code, de l'étude et du participant, les initiales du participant, ainsi que la date et l'heure du prélèvement de sang. En cas de suivi des participants, le moment de la mesure dans l'étude doit également être inscrit.

Dans la mesure du possible, il convient d'utiliser des étiquettes dont la zone d'écriture peut être recouverte par une pellicule transparente (étiquettes « enveloppantes ») et/ou des étiquettes à code-barres. Sinon, l'étiquetage doit être réalisé de façon que l'écriture reste lisible après la coloration et après de longues périodes d'archivage.

- Écrire le numéro d'ID de l'étude et du participant, les initiales du participant, la date et l'heure du prélèvement de sang (ainsi que le moment du suivi, le cas échéant) sur une étiquette, en utilisant un marqueur permanent. Autrement, s'il existe un système approprié et validé pour le suivi des lames, elles peuvent être étiquetées seulement à l'aide d'un code unique.
- Coller l'étiquette sur l'une des extrémités de la lame.

2.5.2 Préparation de gouttes épaisses et de frottis

Il est indispensable d'utiliser des lames neuves, propres, dégraissées et sans rayures. Bien préparées, les gouttes épaisses sont étalées de manière régulière sur la lame, présentent en moyenne 10 à 15 leucocytes (ou globules blancs) par champ à fort grossissement (CFG) au grossissement $\times 1000$ (même si cela peut varier en fonction de la numération leucocytaire et de l'indice de champ de l'oculaire) et ne contiennent pas de poussière ou d'autres débris. Il est possible de préparer systématiquement des gouttes épaisses d'épaisseur correcte en mesurant les volumes de sang utilisés et en les étalant sur une zone déterminée. Bien qu'il soit possible de réaliser des étalements de qualité acceptable sans micropipette, ni lame gabarit, ces outils aident à assurer une reproductibilité et facilitent la formation des techniciens. Les frottis minces de bonne qualité présentent un bord en biseau avec une monocouche d'érythrocytes (ou hématies, ou globules rouges). Les frottis doivent être étalés à l'aide du bord non abîmé d'une lame à bord rodé. La préparation d'étalements standards est facilitée par le recours à des lames gabarits qui indiquent l'emplacement et la dimension de chaque étalement.

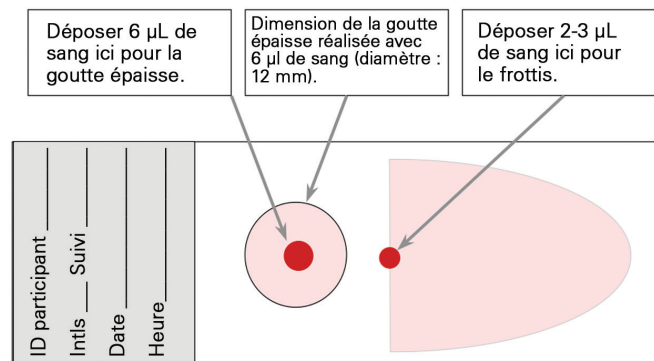
Le volume de sang et la dimension de la goutte épaisse décrite dans la procédure ci après ont été calculés d'après les spécifications des microscopes les plus couramment disponibles, munis d'un objectif plan achromatique à immersion $\times 100$ et d'un oculaire $\times 10$ avec un indice de champ de 18 ou 20 afin d'obtenir 10 à 15 leucocytes par CFG en moyenne à partir d'un échantillon de sang contenant 8000 leucocytes/ μL .

La durée et la méthode de séchage des lames peuvent être modifiées, mais les paramètres de la méthode utilisée doivent être validés par rapport à l'équipement utilisé, à l'humidité typique de l'environnement et au fait que le sang soit anticoagulé ou non, l'objectif étant que les gouttes épaisses ne soient ni fixées par la chaleur, ni perdues au rinçage. La durée du séchage peut avoir besoin d'être prolongée si le sang a été prélevé sur un anticoagulant tel que l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA).

- i. Placer la lame étiquetée sur la lame gabarit ci-dessous (Figure 1).
- ii. Avec une micropipette, déposer 6 μL de sang pour la goutte épaisse et 2-3 μL pour le frottis, tel que montré sur le gabarit de la Figure 1.

Remarque : Lorsque l'on dépose le sang sur une lame avec une micropipette, il est préférable d'utiliser la technique de pipetage inversé afin de prévenir la formation de bulles dans la goutte épaisse, c'est à dire que le volume de liquide aspiré dans l'embout de la micropipette doit être supérieur au volume déposé. Les gouttes épaisses peuvent être réalisées avec des volumes de sang plus petits ou plus grands, mais le diamètre de la goutte (ainsi que le gabarit de la Figure 1 ci dessous) devra alors être ajusté (voir la section 2.7).

Figure 1. Lame gabarit pour la préparation des étalements sanguins (goutte épaisse et frottis) sur lame



Remarque : Les dimensions de la goutte épaisse sur les versions imprimées de ce gabarit doivent être vérifiées avant utilisation.

- iii. En utilisant le bord rodé de la lame d'étalement, étaler le sang pour faire le frottis.
- iv. En utilisant le coin biseauté de la lame d'étalement, étaler le sang pour faire la goutte épaisse jusqu'à ce que tout le cercle de 12 mm de diamètre soit recouvert de manière uniforme.
- v. Faire sécher les étalements sur une surface plane, en les protégeant de la poussière et des insectes. Les lames doivent être complètement sèches avant la coloration. Il est possible de les faire sécher sur une platine chauffante pour lames à 37-40 °C pendant 1 heure ou dans une atmosphère sèche à température ambiante pendant une nuit.

Remarque : Il est également possible d'utiliser des sèche-cheveux pour sécher les lames, mais quelle que soit la méthode utilisée, les lames ne doivent pas être soumises à une chaleur excessive en continu car la goutte épaisse pourrait être fixée par la chaleur, ce qui empêcherait l'hémolyse.

- vi. Fixer le frottis en le plongeant dans une solution de méthanol absolu pendant quelques secondes, puis le laisser sécher à l'air. Positionner le frottis de manière à faire un angle aigu, avec la face de la lame portant les étalements orientée vers le haut et le frottis vers le bas. Cette méthode évite que la goutte épaisse ne soit fixée par les vapeurs et les écoulements de méthanol. La goutte épaisse ne doit pas être fixée.

Remarque : La lame peut être colorée tout de suite après le séchage ou bien être conservée pendant une durée allant jusqu'à un mois dans une boîte fermée hermétiquement contenant un absorbeur d'humidité en quantité importante et placée dans un endroit frais et sec dans le but de réaliser la coloration ultérieurement.

2.6 Contrôle qualité

Tous les étalements doivent être examinés à la recherche de signes évidents de mauvaise qualité et être refaits dans les cas suivants :

- présence de poussière ou de saleté sur les étalements ;
- gouttes épaisses irrégulières ou fragmentaires, frottis présentant des stries, souvent parce que les lames contiennent des traces graisseuses ou que l'on a utilisé une lame ébréchée pour l'étalement ;
- fixation de la goutte épaisse.

2.7 Dimensions possibles de la goutte épaisse

Tableau 1. Dimension de la goutte épaisse en fonction du volume de sang utilisé

Volume de sang (µL)	Diamètre de la goutte épaisse (mm)	Surface de la goutte épaisse (mm ²)
4	10	78,5
5	11	95,0
6	12	113,1
7	13	132,7

Chapitre 3

Procédure de base recommandée N° 2 : coloration des étalements sanguins pour l'examen microscopique du paludisme

3.1 Objectif

Cette partie du document décrit la procédure pour colorer les étalements sanguins, réalisés à partir de sang périphérique recueilli par piqûre au bout du doigt ou par ponction veineuse, afin qu'ils soient examinés au microscope pour détecter, identifier et quantifier les parasites du paludisme.

3.2 Champ d'application

Cette procédure est destinée à être utilisée dans les études de recherche clinique sur le paludisme telles que celles évaluant l'efficacité d'un médicament ou d'un vaccin, ou les performances d'un test de diagnostic. Elle repose sur les critères d'assurance qualité relatifs à l'examen microscopique du paludisme réalisé à des fins de recherche qui ont été définis à l'occasion d'une consultation informelle organisée par les membres du TDR et réunissant des représentants des CDC, de la fondation FIND, de l'institut KEMRI, du programme TDR et du réseau WWARN, lesquels ont par la suite été rejoints par des représentants des structures Amref Health Africa, EOCRU, GG-IVL, IPC, IRD, MORU, QUT et SMRU.

Selon le contexte, cette procédure pourra avoir besoin d'être adaptée ou modifiée avant d'être mise en application. Toutefois, certains éléments – soulignés dans le texte ci après – doivent être conservés dans le MON et/ou mis en œuvre dans le cadre de la procédure et de son assurance qualité afin de garantir la conformité avec les standards ReMMS..

3.3 Attribution des responsabilités

Les tâches à accomplir pour cette procédure sont indiquées ci-dessous. Chacune d'entre elles doit être attribuée à une ou des personne(s) ayant été formée(s) pour effectuer ces tâches en observant les précautions d'usage en matière de santé et de sécurité.

- Préparation de la solution tampon mère et/ou de l'eau tamponnée
- Préparation de la solution mère et/ou de la solution de travail du colorant
- Coloration des étalements sanguins sur les lames

3.4 Matériel et équipement

3.4.1 Pour l'eau tamponnée:

- Fiole jaugée ou éprouvette graduée, 1 L
- Eau distillée
- Solution tampon mère ou comprimés pour préparer une solution tampon, pH 7,2
- Solutions de Na₂HPO₄ (hydrogénophosphate de sodium) et de KH₂PO₄ (dihydrogénophosphate de potassium) à 2 %
- pH-mètre

3.4.2 Pour la solution de Giemsa:

- Entonnoir
- Papier filtre
- Flacon foncé ou opaque muni d'un bouchon
- Solution mère de Giemsa
- Éprouvette graduée, 50-100 mL
- Micropipette (100-1000 µL) avec embouts ou pipette de 1-2 mL avec pipeteur automatique
- Eau tamponnée, pH 7,2

3.4.3 Pour la coloration des étalements sanguins:

- Support de coloration pour lames
- Minuteur
- Pince
- Pissette
- Portoir de séchage pour lames

3.5 Procédure

3.5.1 Préparation de l'eau tamponnée

L'eau tamponnée qui servira à la dilution de la solution mère de Giemsa peut être facilement préparée à partir de comprimés que l'on trouve dans le commerce et qui permettent de préparer une solution de pH 7,2. S'il n'est pas possible de se procurer ce type de comprimés, une solution mère de tampon phosphate peut être préparée à partir de la méthode décrite dans le guide de l'OMS intitulé Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme (OMS, 2010). L'eau utilisée pour les batteries au plomb des véhicules à moteur est distillée et peut servir pour préparer la solution mère et la solution de travail du tampon. En l'absence d'eau distillée, il est possible d'utiliser de l'eau qui a été filtrée à l'aide de filtres en céramique. Dans tous les cas, le pH de l'eau tamponnée doit être vérifié avec un pH mètre avant utilisation.

- i. Mesurer environ 900 mL d'eau distillée dans la fiole jaugée ou l'éprouvette graduée.
- ii. Ajouter 1 comprimé pour préparer une solution tampon de pH 7,2 et mélanger en imprimant un mouvement de rotation.
- iii. Avec un pH mètre étalonné, s'assurer que le pH de l'eau tamponnée est compris dans une fourchette acceptable (pH 7.2 ± 0.1). Ajuster le pH si nécessaire en utilisant des solutions de Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 (2% w/v).

Remarque: Avec des comprimés vendus dans le commerce pour préparer des solutions tampons, le pH se situe généralement dans la fourchette acceptable, sans qu'il y ait besoin de procéder à des ajustements. Si nécessaire, toutefois, il convient de consulter le guide *Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme (OMS, 2010)* : les méthodes pour préparer les solutions et ajuster le pH y sont décrites.

- iv. Compléter le volume de la solution de tampon jusqu'à 1 L et conserver la solution à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la prochaine utilisation.

Remarque: Même conservée à une température de 2-8 °C, la solution tampon peut être contaminée par des algues ou des germes. Vérifier la turbidité (qui indique la présence d'une prolifération) de l'eau tamponnée avant de l'utiliser pour la coloration des étalements sanguins.

3.5.2 Préparation de la solution de travail de Giemsa

Il est recommandé d'utiliser des préparations de colorant disponibles dans le commerce. Le colorant doit être sélectionné parmi les produits proposés par différents fabricants : il convient de tester des dilutions à 3 % avec différentes durées de coloration (par exemple 30, 40, 45, 50 minutes) et de vérifier la qualité de la coloration dans les conditions dans lesquelles le colorant sera utilisé en pratique. S'il n'est pas possible de se procurer des préparations de colorant commerciales, une solution mère de Giemsa peut être préparée à partir de la méthode décrite dans le guide *Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme (OMS, 2010)*. Les solutions de travail doivent être préparées extemporanément, c'est-à-dire juste avant utilisation, en diluant la solution mère qui aura été filtrée le jour même afin de limiter les artefacts liés au colorant et les dépôts sur les étalements. Le colorant dilué restant après que toutes les lames ont été colorées doit être éliminé.

La procédure ci-dessous décrit les étapes pour la solution de colorant à 3 % v/v qui doit être utilisée avec la méthode de coloration dite « lente » car elle donne de meilleurs résultats et aide à limiter la perte de parasites durant le processus. La méthode de coloration dite « rapide » avec le colorant dilué à 10 % v/v peut être utilisée pour le dépistage des patients avant leur inclusion dans les études et/ou dans les situations où un diagnostic rapide s'avère nécessaire. En pareil cas, il faut toutefois effectuer un duplicata de la lame qui sera également colorée par la méthode lente.

- i. À l'aide d'un entonnoir et de papier filtre, filtrer la solution mère de Giemsa dans un flacon foncé ou opaque sec. Conserver le flacon fermé avec son bouchon jusqu'à ce que le colorant soit utilisé car l'humidité dégrade le colorant Giemsa.

Remarque: La solution mère de colorant peut être filtrée une fois par jour. La solution restante peut être reversée dans le récipient d'origine en prenant soin de ne pas agiter le colorant.

- ii. Déterminer le volume de colorant dilué (3 % v/v) à préparer à partir du Tableau 2.
- iii. Verser l'eau tamponnée (environ la moitié du volume final) dans une éprouvette graduée et ajouter le volume approprié de solution mère de colorant. Compléter le volume jusqu'au niveau déterminé d'après le tableau ci-dessous.

Remarque: S'assurer que les pipettes entrant en contact avec la solution mère de Giemsa soient bien sèches car toute introduction d'humidité accélère la détérioration du colorant. Pour que les dilutions soient précises, les volumes de la solution mère de colorant doivent être mesurés avec des micropipettes, ou des pipettes sérologiques de 1-2 mL et des pipeteurs automatiques.

Tableau 2. Préparation de la solution de travail de Giemsa

Nombre de lames	Solution mère de Giemsa (mL)	Volume final, complété avec l'eau tamponnée de pH 7,2 (mL)
1	0,15	5
2-3	0,3	10
4-6	0,6	20
N	0,03 x N	3 x N

3.5.3 Coloration des lames

Les lames sont colorées en recouvrant chaque lame séparément avec la solution de travail du colorant. Il n'est pas recommandé d'utiliser des cuvettes de Coplin, ni d'autres cuves ou bacs à coloration étant donné qu'il existe un risque que les parasites passent d'une lame à l'autre. La durée de la coloration est généralement de 40-50 minutes, mais ce paramètre doit être vérifié par des essais à chaque nouveau lot ou flacon de colorant. Après la coloration, le mieux est de rincer les lames avec de l'eau tamponnée, mais il est également possible d'utiliser de l'eau filtrée.

- Placer les lames, étalements vers le haut, sur un support de coloration. S'assurer qu'elles ne se touchent pas.
- Colorer les lames pendant 40-50 minutes en les recouvrant complètement par la solution de Giemsa 3 % v/v fraîchement préparée.

Remarque: Si l'on colore plus de 10 lames en même temps, le minuteur devra être lancé après que la première lame aura été recouverte de colorant.

- Rincer chaque lame en l'aspergeant d'un léger jet d'eau tamponnée jusqu'à ce que le colorant soit éliminé.
- Laisser les lames sécher complètement, à l'abri de la poussière. Il est possible d'utiliser une boîte pour le séchage ou un sèche-cheveux pour cette étape. Les lames peuvent être lues dès qu'elles sont sèches ou bien conservées dans une boîte fermée contenant un absorbeur d'humidité en grande quantité et placée dans un endroit sec et frais.

3.5.4 Montage permanent des étalements sanguins

La durée de vie des étalements sanguins après coloration est d'environ deux ans en milieu tropical. Elle est plus courte pour les étalements qui sont régulièrement exposés à de l'huile à immersion et à des solvants, et qui sont soumis à un usage quelque peu brutal, par exemple lorsque l'huile à immersion est essuyée de l'étalement. Les banques de lames doivent procéder à un montage permanent, avec milieu de montage et lamelles, des lames importantes de leur collection afin d'éviter que les étalements de sang ou les colorations soient abîmés par l'huile à immersion. Cela peut augmenter la durée de vie des lames jusqu'à 10-20 ans. Un protocole détaillé pour monter les étalements sanguins de manière permanente est donné dans le guide de l'OMS *Malaria microscopy quality assurance manual* (WHO, 2009).

3.6 Contrôle qualité

Les étalements sanguins doivent être examinés à la recherche de signes évidents de mauvaise qualité et être refaits dans les cas suivants :

- présence de poussière ou de saleté sur les étalements ;
- étalements perdus durant le processus de coloration ou de rinçage.

Chapitre 4

Procédure de base recommandée N° 3 : examen microscopique pour la détection, l'identification et la quantification des parasites du paludisme sur gouttes épaisses et frottis colorés

4.1 Objectif

Cette partie du document décrit la procédure pour examiner au microscope des gouttes épaisses et des frottis réalisés à partir de sang périphérique et ayant été colorés au Giemsa dans le but de détecter, d'identifier et de quantifier les parasites du paludisme.

4.2 Champ d'application

Cette procédure est destinée à être utilisée dans les études de recherche clinique sur le paludisme telles que celles évaluant l'efficacité d'un médicament ou d'un vaccin, ou les performances d'un test de diagnostic. Elle repose sur les critères d'assurance qualité relatifs à l'examen microscopique du paludisme réalisé à des fins de recherche qui ont été définis à l'occasion d'une consultation informelle organisée par les membres du TDR et réunissant des représentants des CDC, de la fondation FIND, de l'institut KEMRI, du programme TDR et du réseau WWARN, lesquels ont par la suite été rejoints par des représentants des structures Amref Health Africa, EOCRU, GG-IVL, IPC, IRD, MORU, QUT et SMRU.

Selon le contexte, cette procédure pourra avoir besoin d'être adaptée ou modifiée avant d'être mise en application. Toutefois, certains éléments – soulignés dans le texte ci après – doivent être conservés dans le MON et/ou mis en œuvre dans le cadre de la procédure et de son assurance qualité afin de garantir la conformité avec les standards ReMMS.

4.3 Attribution des responsabilités

Les tâches à accomplir pour cette procédure sont indiquées ci-dessous. Chacune d'entre elles doit être attribuée à une ou des personne(s) ayant été formée(s) pour effectuer ces tâches en observant les précautions d'usage en matière de santé et de sécurité.

- Mise en aveugle, saisie des données, coordination de la deuxième/troisième lecture
- Évaluation de la qualité des lames
- Lecture des lames, détection et quantification des parasites

4.4 Matériel et équipement

4.4.1 Pour la mise en aveugle, la saisie des données et le contrôle qualité interne (CQI)

- Ruban-masque ou étiquette à code-barres avec identifiant unique
- Ordinateur équipé de Microsoft Access ou Excel, ou d'un logiciel de base de données ou tableur similaire
- Registres papier pour consigner les résultats des examens microscopiques

4.4.2 Pour l'examen microscopique

- i. Microscope
 - Objectif : à immersion, $\times 100$, plan-achromatique, avec micromètre à réticule
 - Oculaire : $\times 10$, micromètre à réticule (si l'objectif ne possède pas de réticule)
 - Source lumineuse électrique (diode électroluminescente [LED] ou lampe à incandescence, avec un filtre bleu)
- ii. Huile à immersion de synthèse, avec un indice de réfraction $\geq 1,5$
- iii. Compteurs manuels simples ou multiparamètres

4.4.3 Pour la conservation des lames après l'examen microscopique

- iv. Papier absorbant ou réactif HistoClear
- v. Boîtes à lames
- vi. Ruban adhésif
- vii. Absorbant d'humidité (si les lames sont conservées dans une pièce non climatisée)

4.5 Procédure

4.5.1 Mise en aveugle des lames

L'examen microscopique des lames doit être effectué en aveugle afin d'éviter tout biais, c'est-à-dire que les microscopistes ne doivent ni connaître l'identité du patient ou les informations relatives à l'échantillon, ni le résultat des autres tests de diagnostic réalisés sur cet échantillon. La mise en aveugle peut se faire en attribuant un identifiant unique à chaque lame pour les suivre durant la microscopie, consigner les résultats et relier les résultats des analyses aux dossiers médicaux.

- i. Saisir les informations relatives aux patients et aux échantillons dans la base de données ou la feuille de calcul Excel pour le CQI, et attribuer un identifiant unique à chaque lame (il peut s'agir de numéros séquentiels).
- ii. Recouvrir les étiquettes des lames avec du ruban-masque opaque et écrire les identifiants uniques dessus.
- iii. Transmettre les lames au microscopiste pour la lecture.

4.5.2 Évaluation de la qualité des lames

Avant que les lames soient lues pour détecter ou quantifier les parasites du paludisme, leur qualité doit être évaluée selon les critères décrits ci après en observant quelques champs sur chacune d'entre elles avec l'objectif à immersion $\times 100$. Si la lame n'est pas lisible, cela doit être enregistré en tant que tel et une nouvelle lame doit être préparée.

Tout écart par rapport aux critères ci dessous doit être consigné en ce sens que cela peut venir perturber l'examen microscopique. Le nombre de leucocytes par CFG dans une goutte épaisse réalisée à partir d'un volume donné de sang et d'un diamètre précis variera en fonction de l'indice de champ de l'oculaire (voir la sous-section 4.7.1), de sorte que les critères définis ci après peuvent avoir besoin d'être adaptés aux caractéristiques du microscope utilisé. L'évaluation de la qualité des lames peut être effectuée lorsque le microscopiste sélectionne la goutte épaisse ou le frottis pour l'estimation de la densité parasitaire.

Les critères d'évaluation de la qualité des lames pour les gouttes épaisses sont les suivants :

- 10-15 leucocytes par CFG en moyenne (pour un grossissement total $\times 1000$, en partant du principe que l'on a 8000 leucocytes/ μL) ;
- un fond bleu-gris pâle (érythrocytes lysés) sans précipités de Giemsa, poussière ou autres artefacts ;
- les noyaux des leucocytes doivent être colorés en violet foncé et les plaquettes doivent être bien visibles et de couleur rose vif.

Les critères d'évaluation de la qualité des lames pour les frottis sont les suivants :

- présence d'une « queue », ou bord biseauté, avec une répartition homogène des érythrocytes et pas de cellules qui se superposent, ou très peu ;
- érythrocytes colorés en gris-rose.

4.5.3 Sélection de la goutte épaisse ou du frottis pour estimer la densité parasitaire

Les estimations de la densité parasitaire peuvent être effectuées à partir des gouttes épaisses ou des frottis, chaque méthode ayant ses limites. Les estimations de la densité parasitaire à partir du frottis sont en règle générale plus précises que celles effectuées à partir de la goutte épaisse car il y a peu ou pas de perte de parasites durant le processus de coloration. Cependant, la méthode du frottis est celle qui convient le mieux lorsque les densités parasitaires sont élevées. L'estimation de la densité parasitaire à partir de la goutte épaisse peut être dans une certaine mesure moins précise à cause de la perte de parasites, mais elle peut convenir pour une large gamme de densités parasitaires, des parasitémies moyennes aux limites inférieures des parasitémies détectables ($< \sim 16\ 000$ parasites/ μL). Les frottis donneront des résultats plus précis pour les niveaux plus élevés de parasitémie ($> \sim 16\ 000$ parasites/ μL) car lorsque les densités sont élevées de la sorte, il peut s'avérer difficile d'obtenir des numérations parasitaires précises à partir des gouttes épaisses. Lorsque l'on détermine la densité parasitaire à partir de la goutte épaisse, il est possible d'utiliser les méthodes reposant sur la numération des leucocytes, la méthode « par CFG » ou la méthode de Earle-Perez (Earle & Perez, 1932). Avec la méthode de Earle-Perez, la précision n'est pas très différente de celle d'un comptage par rapport à un nombre déterminé de leucocytes sur goutte épaisse (Bowers et al., 2009).

La recherche de gamétocytes et/ou d'infections mixtes doit se faire sur goutte épaisse, peu importe que la densité parasitaire asexuée soit estimée sur la goutte épaisse ou le frottis.

- i. Déposer une petite goutte d'huile à immersion sur la goutte épaisse et le frottis.
- ii. Observer 10 champs sur la goutte épaisse en utilisant l'objectif $\times 100$ à immersion.
- iii. Déterminer la qualité de la lame en fonction des critères indiqués dans la section 4.5.2 ci dessus et écarter la lame si la qualité est mauvaise (trop d'artéfacts ou de précipités de colorant, coloration ou pH inhabituel[le] interférant avec la détection et/ou l'identification des parasites, gouttes épaisses fixées ou fragmentaires, etc.).
- iv. Compter le nombre de parasites et de leucocytes observés.

- v. Si le nombre de parasites asexués est inférieur ou égal à deux fois celui des leucocytes, poursuivre avec la détection des parasites asexués ou l'estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse.
- vi. Si le nombre de parasites est supérieur à deux fois le nombre de leucocytes, estimer la densité des parasites asexués sur le frottis (WHO, 2009).

4.5.4 Détection et estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse

La détection des parasites (formes asexuées ou sexuées) est réalisée par rapport à un nombre standard de leucocytes ou de champs à fort grossissement CFG sur la goutte épaisse. L'identification des espèces de parasites présentes se fait mieux sur le frottis mais dans les cas où la densité parasitaire est faible, elle peut avoir à être effectuée sur la goutte épaisse. Une lame est déclarée négative si aucun parasite n'a été observé après avoir lu le nombre déterminé de leucocytes ou de CFG. La zone de l'étalement observée dans un champ à fort grossissement, et par conséquent le volume de sang examiné par champ, dépend de l'indice de champ de l'oculaire. Par exemple, lire 200 CFG sur une goutte épaisse (réalisée à partir de 6 µL de sang et d'un diamètre de 12 mm) sur un microscope équipé d'un oculaire avec un indice de champ égal à 20 correspond à examiner approximativement 0,33 µL de sang, mais avec un indice de champ de 18, le volume de sang examiné est d'environ 0,27 µL. Il est évident que cela a une incidence s'il faut examiner un volume déterminé de sang sur une goutte épaisse et/ou pour le calcul de la densité parasitaire à partir de la méthode « par CFG ».

L'estimation de la densité parasitaire sur la goutte épaisse est la plus précise lorsque la méthode utilisée pour détecter les parasites est la même que celle utilisée pour compter les parasites. En d'autres termes, si les lames doivent être déclarées négatives par rapport à un nombre standard de leucocytes, les parasites détectés doivent également être rapportés pour le nombre de leucocytes comptés OU si les lames doivent être déclarées négatives après avoir examiné un nombre standard de CFG, les parasites détectés doivent être rapportés pour le nombre de CFG examinés. La précision est encore améliorée si l'on commence le comptage des leucocytes ou des CFG à partir du premier champ de bonne qualité observé, que l'on voie des parasites ou non dans le champ d'observation, car on tient alors compte de tout le volume de sang examiné pour les calculs de la densité parasitaire. Si la lame est négative ou si la densité parasitaire est $< 1/500$ leucocytes, cela implique de compter jusqu'à 2500 leucocytes, ce qui peut augmenter significativement le temps nécessaire pour lire une lame. Si cela n'est pas faisable, la méthode « par CFG » doit être utilisée.

Des objectifs ou des oculaires équipés de micromètres à réticule peuvent être utilisés pour estimer la densité parasitaire sur la goutte épaisse qui a été réalisée à partir d'un volume de sang bien défini, comme dans la méthode de Earle-Perez. Il est conseillé d'utiliser des oculaires équipés de micromètres à réticule couvrant le centre du champ d'observation si la lentille de l'objectif n'est pas de type plan-achromatique afin de faciliter le comptage uniquement dans la partie du champ qui est nette. Si des réticules sont utilisés, seuls les parasites et les leucocytes qui sont à l'intérieur de la grille doivent être comptés dans un champ donné.

La méthode de Earle-Perez (1932) est une méthode permettant de déterminer la densité parasitaire à partir de la goutte épaisse et qui peut être utilisée lorsque l'on ne dispose pas de la numération leucocytaire exacte (WHO-WPRO, 2010; Laurens et al., 2012). Toutefois, les résultats peuvent être similaires à ceux obtenus par le calcul effectué à partir d'une numération leucocytaire connue et les deux méthodes sont acceptables (Bowers et al., 2009). Dans la méthode de Earle-Perez, un volume déterminé de sang (5 µL) est étalé uniformément sur un rectangle de 6 × 15 mm. La goutte épaisse est examinée à partir d'un oculaire équipé d'un micromètre à réticule de 6 × 6 en se déplaçant sur la largeur de la goutte épaisse et la densité parasitaire est estimée d'après le nombre de parasites observés par « bande », c'est-à-dire par volume de sang calculé, examinée sur la largeur de l'étalement.

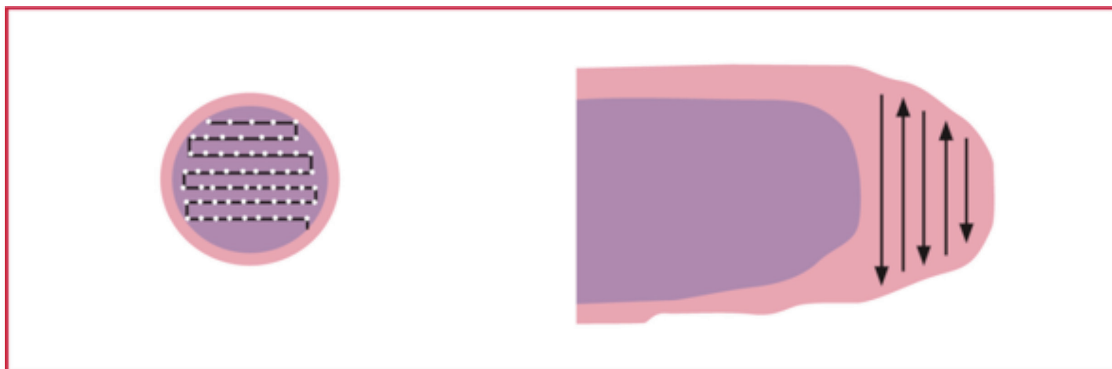
En cas d'infections mixtes, toutes les espèces infectantes doivent être rapportées. Cependant, il n'est pas nécessaire de distinguer la densité parasitaire des formes asexuées et/ou sexuées pour chaque espèce à moins que les objectifs de l'étude ne l'imposent.

- i. Utiliser des compteurs manuels remis à zéro pour compter le nombre de leucocytes ou de champs, et le nombre de parasites (formes asexuées/sexuées). Commencer à compter à partir du premier champ de bonne qualité (c'est-à-dire un champ sans débris/artéfacts, ou très peu, et avec 10-15 leucocytes) – ne pas attendre d'observer un parasite avant de commencer à compter les leucocytes/champs.
- ii. Si aucune forme asexuée ou sexuée de parasites n'a été observée après 2500 leucocytes ou 200 CFG, déclarer la lame négative.
- iii. Si des parasites sont observés avant que 500 leucocytes ou 40 champs aient été comptés, poursuivre le comptage jusqu'à 500 leucocytes ou 40 champs avant de consigner le résultat. Si des parasites sont observés après que 500 leucocytes ou 40 champs ont déjà été comptés, arrêter la lecture après que tous les parasites et/ou leucocytes sur le champ ont été comptés. Le comptage doit être mené à son terme pour le dernier champ, c'est-à-dire que tous les parasites et leucocytes sur le dernier champ doivent être comptés, et il peut être arrêté si > 490 leucocytes ont été déjà été comptés au bout d'un champ.

Remarque : Les parasites appartenant à différentes espèces ne doivent pas être comptés séparément, à moins que les objectifs de l'étude ne l'exigent. La présence de gamétocytes et de pigment paludéen doit être indiquée dans le rapport de résultats, mais sans comptage particulier, à moins que l'étude ne l'exige. La présence de schizontes doit être indiquée de manière distincte dans le compte-rendu si les objectifs de l'étude l'exigent. La présence de schizontes de *P. falciparum*, notamment s'ils sont en nombre important, peut être révélatrice d'une maladie grave et les cliniciens doivent donc en être informés.

- iv. Consigner le résultat sous forme de données brutes, c'est-à-dire espèces de parasites, nombre de formes asexuées ou sexuées du parasite par rapport au nombre de leucocytes ou de champs comptés.

Figure 2. Schéma de lecture des lames



Source:OMS (2009).

4.5.5 Estimation de la densité parasitaire à partir du frottis

En cas de densité parasitaire élevée (c'est-à-dire $> \sim 16\ 000$ parasites/ μL), la détection des parasites est réalisée par rapport à un nombre standard d'érythrocytes sur le frottis. Cela aide à réduire l'inexactitude et l'imprécision dues à la perte de parasites pendant la coloration et au comptage de grands nombres de parasites dans un champ. Le comptage des érythrocytes doit commencer dès le premier champ de bonne qualité afin d'améliorer la précision de l'estimation de la densité parasitaire.

Il est possible d'observer des gamétocytes ou des schizontes sur le frottis, mais ils ne doivent pas être comptés à partir de cet étalement car cela risque d'entraîner une surestimation de leur densité.

- i. Utiliser des compteurs manuels remis à zéro pour compter le nombre d'érythrocytes et de parasites asexués. Commencer le comptage à partir du premier champ de bonne qualité (c'est-à-dire un champ sans débris/artéfacts, ou très peu, étalé uniformément, où les érythrocytes ne se superposent pas au niveau de la « queue » ou du bord en biseau du frottis) – ne pas attendre d'observer un parasite avant de commencer à compter les érythrocytes.
- ii. Compter les érythrocytes parasités en même temps que les érythrocytes normaux jusqu'à ce que 2000 érythrocytes aient été comptés au total. Compter les érythrocytes comportant plus d'un parasite ou des formes multinucléées comme 1 érythrocyte infecté. Le comptage doit être mené à son terme pour le dernier champ, c'est-à-dire que tous les parasites et érythrocytes sur le dernier champ doivent être comptés, et il peut être arrêté si > 1900 érythrocytes ont été déjà été comptés au bout d'un champ. Il n'est pas nécessaire de distinguer les parasites des différentes espèces au cours du comptage.

Remarque : La présence de schizontes de *P. falciparum*, notamment s'ils sont en nombre important, peut être révélatrice d'une maladie grave et les cliniciens doivent donc en être informés. Le comptage des parasites doit se faire par rapport à 2000 érythrocytes au minimum, bien que ce nombre puisse être augmenté en fonction des objectifs de l'étude.

- iii. Dans le cas peu probable où aucun parasite asexué n'a été observé sur le frottis après avoir compté 2000 érythrocytes, poursuivre l'examen de la lame sur la goutte épaisse comme décrit dans la section 4.5.4.

Remarque : Si la sélection de l'étalement pour l'estimation de la densité parasitaire (frottis *c/* goutte épaisse) a été faite correctement, il est peu probable qu'aucun parasite asexué ne soit observé sur le frottis, à moins que ce dernier ne soit pas régulier, ou que le patient présente un taux anormalement élevé d'érythrocytes ou un taux anormalement faible de leucocytes.

- iv. Compter au moins 500 leucocytes ou 40 champs sur la goutte épaisse pour vérifier la présence d'autres espèces et/ou de formes sexuées du parasite.
- v. Consigner le résultat sous forme de données brutes, c'est-à-dire espèces de parasites et nombre d'érythrocytes infectés par rapport au nombre total d'érythrocytes comptés.

4.5.6 Conservation des lames

Il peut s'avérer nécessaire de conserver les lames pendant de longues périodes après que l'examen microscopique initial a été effectué, afin qu'elles soient réexaminées et/ou archivées. Si l'on veut éviter que la coloration ne se détériore, l'huile à immersion doit être retirée des lames et ces dernières doivent être conservées à l'abri de la chaleur, de l'humidité et de la lumière.

- i. Retirer l'huile à immersion, en posant les lames à l'envers sur du papier absorbant doux pendant une nuit ou en les plongeant dans du réactif HistoClear et en leur imprimant un léger mouvement de rotation.

Remarque : HistoClear est un solvant inflammable. Si les étiquettes des lames sont écrites avec un marqueur permanent, protéger l'étiquette de sorte qu'elle ne soit pas exposée au réactif. Utiliser le réactif HistoClear dans un espace ouvert et bien ventilé, loin de sources de chaleur et/ou de flammes nues.

- ii. Classer les lames en fonction de la date de prélèvement, par patient, par moment du suivi dans l'étude, en fonction du caractère positif/négatif, etc., selon ce qui est le plus pratique
- iii. Conserver les lames dans une boîte de lames et consigner leur position. Mettre les lames à l'abri de l'humidité, de la poussière et des insectes.

4.5.7 Calcul de la densité parasitaire

La densité parasitaire peut être calculée en comptant les parasites par rapport au nombre de leucocytes, ou par CFG, sur la goutte épaisse ou par rapport au nombre d'érythrocytes sur le frottis. Les estimations de la densité parasitaire sont les plus précises lorsque l'on l'utilise les véritables numérations leucocytaires ou érythrocytaires par microlitre pour les calculs. Des numérations hypothétiques de leucocytes (8000 leucocytes/ μ L) et/ou d'érythrocytes ($5,0 \times 10^6$ / μ L) peuvent permettre d'obtenir des estimations relativement précises de la densité parasitaire dans la plupart des cas, mais elles peuvent également être sources d'erreurs. Cela peut être évité en utilisant la méthode « par CFG » mais les calculs visant à estimer la densité parasitaire doivent alors prendre en compte le volume de sang dans le champ, qui est fonction du volume de sang déposé, de la surface de la goutte épaisse et de l'homogénéité de l'étalement, ainsi que de l'indice de champ du microscope utilisé.

Les microscopistes doivent écrire les données brutes dans leurs comptes-rendus, c'est-à-dire le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes/d'érythrocytes/de CFG examinés. Les derniers calculs de la densité par microlitre doivent être réalisés à l'aide d'outils informatiques ou d'une calculatrice. Les calculs ci après sont donnés à titre indicatif.

- i. Estimation de la densité parasitaire à partir du nombre de parasites comptés par rapport aux leucocytes sur la goutte épaisse :

$$\text{Densité parasitaire par } \mu\text{L} = \text{nombre de parasites comptés} \times \text{nombre de leucocytes par } \mu\text{L} \div \text{nombre de leucocytes comptés}$$

La numération leucocytaire réelle, déterminée en même temps que l'étalement sanguin ou au moment du diagnostic de l'infection en cours, doit être utilisée dans ce calcul. Si cela n'est pas possible, il faut envisager d'utiliser la méthode « par CFG » pour estimer la densité parasitaire à partir de la goutte épaisse.

- ii. Estimation de la densité parasitaire à partir du nombre de parasites comptés pour un nombre donné de CFG sur la goutte épaisse

$$\text{Densité parasitaire par } \mu\text{L} = \text{nombre de parasites comptés} \div (\text{nombre de CFG examinés} \times \text{volume de sang par CFG})$$

Le volume de sang examiné par CFG peut être estimé à partir du Tableau 4 dans la sous section 4.7.1.

- iii. Estimation de la densité parasitaire à partir du nombre de parasites comptés par rapport aux érythrocytes sur le frottis

$$\text{Densité parasitaire par } \mu\text{L} = \text{nombre de parasites comptés} \times \text{nombre d'érythrocytes par } \mu\text{L} \div \text{nombre d'érythrocytes comptés}$$

La numération érythrocytaire réelle, déterminée en même temps que l'étalement sanguin ou au moment du diagnostic de l'infection en cours, doit être utilisée dans ce calcul.

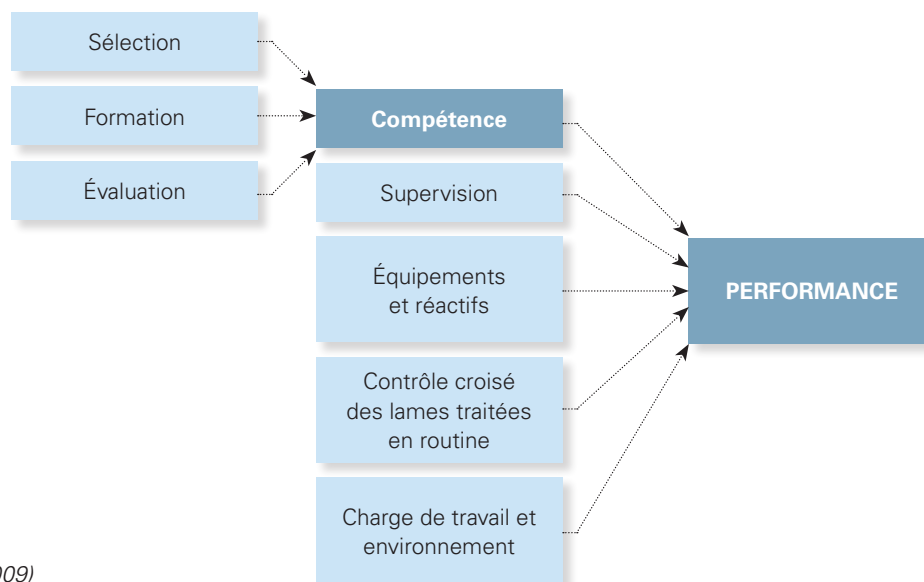
4.6 Contrôle qualité (CQ)

L'assurance qualité de l'examen microscopique du paludisme pratiqué dans le cadre de la recherche doit comprendre, au minimum, la confirmation des compétences des techniciens avant l'étude (par un système d'accréditation ou d'évaluation des compétences), un contrôle qualité interne (CQI) et un contrôle qualité externe (CQE), ainsi que des contrôles concernant la charge de travail, les conditions de travail, et la qualité des équipements et des réactifs.

Le CQI et le CQE (c'est-à-dire le réexamen des lames pour évaluer la qualité de l'étalement et de la coloration, ainsi que la détection et la quantification des parasites) sont des aspects déterminants du système d'assurance qualité pour l'examen microscopique du paludisme. Les résultats du CQI doivent servir tant de « système d'alerte précoce » pour détecter les défaillances au niveau de la qualité des étalements et de la coloration, que d'outils pour l'évaluation continue des compétences des techniciens et des microscopistes. Le CQE est une évaluation indépendante permettant de vérifier les résultats et de mettre en évidence des erreurs importantes ou systématiques qui peuvent ne pas être repérées si tous les microscopistes locaux font les mêmes erreurs. En fonction de la compétence des microscopistes, jusqu'à 100 % des lames doivent être lues deux fois pour le CQI d'une étude donnée, mais le nombre de lames devant être réexaminées pour le CQE est moins important.

Le schéma de CQI et de CQE ci dessous décrit le minimum qui doit être mis en place pour l'assurance qualité de la microscopie du paludisme réalisée dans un contexte de recherche. Il peut avoir besoin d'être adapté ou complété par des tests relatifs à d'autres paramètres en fonction des besoins de l'étude entreprise. Par exemple, dans les études visant à évaluer les taux de clairance parasitaire, il peut s'avérer nécessaire de revérifier et/ou comparer les résultats de toutes les lames d'un même sujet. La mise en place d'un système de contrôle qualité interne et externe n'empêche pas la formation et l'évaluation des compétences des microscopistes avant le début de l'étude afin de déterminer leur aptitude à respecter les procédures et à donner des résultats conformes aux standards indiqués ci-après.

Figure 3. Garantir de bonnes performances dans la microscopie du paludisme et en faire la preuve



La compétence des microscopistes pour détecter, identifier et quantifier les parasites doit être vérifiée avant le début de l'étude (accréditation) en les mettant à l'essai avec un jeu de lames se conformant aux standards minimums décrits ci après. Les jeux de lames utilisés pour l'accréditation doivent être de bonne qualité et très bien caractérisés, avec une confirmation des espèces par amplification génique (PCR), et plusieurs lectures en aveugle pour valider la présence ou l'absence de parasites, ainsi que l'estimation de la densité parasitaire. Des MON pour réaliser et valider de telles séries de lames sont disponibles dans le guide de l'OMS *Malaria microscopy quality assurance manual* (WHO, 2009). Les lames incluses dans la série-test doivent présenter des densités parasitaires faibles, intermédiaires et élevées afin d'évaluer l'exactitude de l'estimation des densités parasitaires par les microscopistes. La non-détection de certains parasites/certaines espèces sur des gouttes épaisses associées à des densités parasitaires faibles à très faibles peut être due simplement au hasard et cette possibilité doit être prise en compte lorsque les performances des microscopistes sont notées pour ce qui est de la sensibilité et des scores de *kappa*.

– Lames positives (au moins 50 lames) :

- Critères relatifs aux espèces de parasites :
 - ~25 lames correspondant à une infection par *Plasmodium falciparum* uniquement
 - ~10 lames correspondant à une infection mixte, toutes avec *P. falciparum* et 1 autre espèce co -infectante (sélectionnée en fonction de la prévalence locale), la densité parasitaire de chaque espèce devant être ≥ 2 -3 parasites pour 500 leucocytes/40 CFG
 - ~15 lames avec *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* seuls ;

• Critères relatifs à la densité parasitaire :

- ~10 lames avec 50-200 parasites/ μ L
- ~10 lames avec 200-500 parasites/ μ L
- ~20 lames avec 500-2000 parasites/ μ L
- ~10 lames avec 10 000-250 000 parasites/ μ L

– Lames négatives (au moins 80 lames) ::

- doit inclure 10-12 lames avec de la poussière, des débris, des moisissures et/ou des bactéries, des corps de Howell-Jolly
- doit inclure au moins 1 exemple de chacune des situations suivantes : lame pas assez colorée, lame trop colorée, lame réalisée avec du colorant dilué dans un tampon de pH $\leq 6,8$, lame réalisée avec du colorant dilué dans un tampon de pH $\geq 7,6$.

Tableau 3. Grades pour l'accréditation des microscopistes spécialistes du paludisme dans le cadre de la recherche

Niveau d'accréditation	Niveau d'accréditation	Identification des espèces	Quantification des parasites (dans un intervalle de 25 % autour de la numération vraie)	Taux de faux positifs
Niveau 1 (<i>Expert</i>)	≥90%	≥90%	≥50%	≤2.5%
Niveau 2	80–<90%	80–<90%	40–<50%	≤5%
Niveau 3	70–<80%	70–<80%	30–<40%	≤10%
Niveau 4	<70%	<70%	<30%	≤20%

Source: Adapté d'après les niveaux d'accréditation définis par l'OMS pour le diagnostic microscopique du paludisme (OMS, 2009).

La charge de travail dans les services de microscopie doit être gérée de façon que les performances des microscopistes soient maintenues à un niveau acceptable. Selon la proportion de lames positives lues, un microscopiste doit être capable de lire environ 25-40 lames par jour. Le guide de l'OMS *Malaria microscopy quality assurance manual* (WHO, 2009) contient d'autres précisions sur l'estimation de la charge de travail.

4.6.1 Contrôle qualité interne (CQI)

Le pourcentage de lames devant être lues deux fois pour le CQI dépendra de la compétence des microscopistes. Pour les microscopistes non certifiés et/ou ceux dont le niveau d'accréditation est >2, toutes les lames devront faire l'objet d'une double lecture, suivie d'une troisième lecture en cas de résultats contradictoires. Les deuxième et troisième lectures peuvent être effectuées dans un laboratoire de référence par des microscopistes certifiés. Si tous les microscopistes intervenant dans une étude possèdent une accréditation de niveau 1 ou 2, tel que déterminé par des évaluations formelles, au moins 20 % des lames devront être lues deux fois dans le cadre du CQI.

Des troisièmes lectures, ou lectures « décisives », doivent systématiquement être réalisées lorsque les résultats sont contradictoires pour ce qui est de la détection des espèces de parasites et des estimations de la densité parasitaire. Différents critères ont été utilisés par le passé pour définir des variations acceptables des estimations de la densité parasitaire. Ils reposaient le plus souvent sur des intervalles de proportions et/ou des nombres absolus de parasites comptés. Une méthode statistique plus élaborée a également été publiée (Alexander *et al.*, 2010) et une autre, qui repose sur l'évaluation de la probabilité que deux lectures proviennent de la même distribution théorique, est proposée ici (plus de détails sont fournis dans la sous-section 4.7.2). Les différentes approches ne peuvent pas toujours signaler les mêmes doubles lectures qui nécessitent une troisième lecture pour les estimations de la densité parasitaire, mais elles sont susceptibles de permettre d'améliorer les estimations de la densité parasitaire et de représenter des outils pour l'assurance qualité de la microscopie en général. La sous-section 4.7.2 fournit des précisions sur la résolution des résultats contradictoires.

- i. Saisir les données brutes rapportées par les microscopistes dans une feuille Excel ou une base de données qui calcule la densité parasitaire et compare les résultats de chaque microscopiste pour les paramètres suivants :
 - présence/absence de formes asexuées du parasite uniquement ;
 - espèces des parasites ;
 - densité parasitaire si des parasites asexués sont détectés – les lectures doivent être comparées pour évaluer la concordance des résultats sauf si les deux estimations sont $\leq 200/\mu\text{L}$ auquel cas on considère que les estimations de la densité parasitaire rentrent dans la fourchette de variabilité acceptée dans la mesure où des parasites ont été détectés dans les deux cas ;
 - les formes sexuées et les schizontes peuvent être consignés séparément mais ce sont les besoins de l'étude qui dicteront la nécessité, ou non, de s'y intéresser dans les évaluations des discordances.
- ii. En cas de désaccord concernant ces paramètres entre la première lecture et la deuxième lecture, une troisième lecture décisive doit être ordonnée. Un calculateur développé sur Microsoft® Excel est disponible pour aider à déterminer si une troisième lecture s'avère nécessaire.
- iii. Les résultats de l'examen microscopique obtenus par chaque microscopiste doivent être comparés périodiquement au résultat final qui a été rendu afin de vérifier ses compétences, de surveiller l'effet de la charge de travail sur les performances en microscopie et de déterminer les besoins en matière de formations de remise à niveau, etc.

Remarque : Les résultats sont analysés de manière à déterminer les scores de kappa pour la détection des parasites et l'identification des espèces, et/ou à construire des graphiques de Bland-Altman pour évaluer l'exactitude et la précision des estimations de la densité parasitaire. D'autres analyses peuvent s'avérer nécessaires en fonction du type d'étude entreprise.

4.6.2 Contrôle qualité externe (CQE)

- i. Un minimum de 10 lames par microscopiste par mois au cours d'un essai (5 positives et 5 négatives, toutes sélectionnées de manière aléatoire), ou 5 % de la totalité des lames lues si le nombre est supérieur à 200 par mois, sélectionnées de la même manière, doivent être réexaminées, et les résultats analysés, par des évaluateurs externes en utilisant les outils statistiques décrits ci dessus.

Remarque : Le CQE peut être effectué à la fin de l'étude mais il est préférable de réexaminer les lames périodiquement par lot tout au long de l'étude.
- ii. Les évaluateurs externes doivent pouvoir justifier d'une compétence équivalente au Niveau 1 de l'évaluation des compétences.

4.7 Variations des paramètres de comptage et résolution des discordances

4.7.1 Variations des paramètres de comptage en fonction de l'indice de champ de l'oculaire

Tableau 4. Variations des paramètres de comptage en fonction de l'indice de champ de l'oculaire

Indice de champ	18	20	22	26.5
SURFACE DU CFG (mm ²)	0.0255	0.0314	0.0380	0.0552
VOLUME PAR CFG (µL)	0.00135	0.00167	0.00202	0.00293
VOLUME POUR 200 CFG (µL)	0.270	0.333	0.403	0.585
NOMBRE MOYEN DE LEUCOCYTES/CFG (en supposant que la numération leucocytaire est de 8000/µL)	11	13	16	23

4.7.2 Résolution des résultats contradictoires

i. Examen microscopique initial

Les étalements sont lus de manière indépendante par deux microscopistes qualifiés, chacun ignorant les résultats de l'autre lecteur et les résultats de tout autre test de diagnostic, pour ce qui est des éléments suivants :

- la présence ou l'absence de parasites du paludisme (formes asexuées ; c'est-à-dire lame positive ou négative) ;
- les espèces plasmodiales présentes ;
- la densité parasitaire ;
- la présence ou l'absence d'une gamétocytémie, de formes multinucléées (facultatif).

ii. Définition de résultats contradictoires

Les résultats sont entrés dans une base de données et systématiquement comparés pour ce qui est des trois critères ci-dessus. Ils sont considérés comme contradictoires si des différences apparaissent dans l'un ou l'autre des paramètres suivants :

- présence/absence des formes asexuées du parasite uniquement ;
- espèces de parasites ;
- densité parasitaire si des parasites asexués sont détectés – les lectures doivent être comparées pour évaluer la concordance des résultats sauf si les deux estimations sont $\leq 200/\mu\text{L}$ auquel cas on considère que les estimations de la densité parasitaire rentrent dans la fourchette de variabilité acceptée dans la mesure où des parasites ont été détectés dans les deux cas. Une troisième lecture est recommandée lorsque l'une des densités au moins est >200 parasites/ μL et qu'il y a $<10\%$ de probabilité d'observer les deux densités si les deux étaient des échantillons pris au hasard à partir de la loi de probabilité théorique avec une moyenne égale à la moyenne des densités issues de

la lecture 1 et de la lecture 2.

iii. Résolution des résultats contradictoires

Une lecture par un troisième microscopiste qualifié doit être faite pour chaque étalement pour lequel les deux premiers résultats ne sont pas concordants. Le troisième microscopiste est tenu dans l'ignorance des résultats des deux premiers lecteurs et de tout autre test de diagnostic. Les résultats de la troisième lecture sont entrés dans la base de données informatisée ; les résultats sont alors comparés pour arriver à des valeurs définitives :

- pour la présence ou l'absence de la parasitémie, le troisième lecteur départage les deux premiers ;
- pour les espèces, si le troisième lecteur identifie de manière indépendante les mêmes espèces que l'un ou l'autre des deux premiers lecteurs, il s'agit du résultat définitif ; mais si le troisième lecteur n'est d'accord avec aucun des deux premiers, les trois lecteurs devront se concerter et examiner les points de désaccord jusqu'à ce qu'au moins deux d'entre eux s'entendent ;
- pour la densité parasitaire, si la densité parasitaire du troisième lecteur se situe dans une marge acceptable par rapport à l'une des densités établies par les deux premiers lecteurs, la densité définitive sera la moyenne des deux valeurs : la troisième valeur et la valeur la plus proche de la troisième parmi les deux premières lectures. Si la densité parasitaire du troisième lecteur ne se situe dans une marge acceptable par rapport à aucune des densités établies par le premier et le deuxième lecteurs, ou si elle se situe dans une marge acceptable par rapport aux deux densités établies par les premiers lecteurs, la densité définitive sera la moyenne des trois valeurs. Un calculateur développé sur Microsoft® Excel est disponible pour aider à déterminer si une troisième lecture s'avère nécessaire.

Remarque : Une autre possibilité pourrait être de consigner le résultat comme « échec de quantification » et/ou de demander aux trois microscopistes de réexaminer les lames en aveugle.



Références bibliographiques

- Alexander N, Schellenberg D, Ngasala B, Petzold M, Drakeley C, Sutherland C (2010). Assessing agreement between malaria slide density readings. *C.Malar J.* 2010;9:4.
- Bowers KM, Bell D, Chiodini PL, Barnwell J, Incardona S, Yen S et al. (2009). Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods. *Malar J.*8:267.
- Earle WS, Perez MJ (1932). Enumeration of parasites in the blood of malarial patients. *Lab Clin Med.*17:1124.
- Laurens MB, Duncan CJ, Epstein JE, Hill AV, Komisar JL, Lyke KE et al. (2012). A consultation on the optimization of controlled human malaria infection by mosquito bite for evaluation of candidate malaria vaccines. Consensus Group on Design of Clinical Trials of Controlled Human Malaria Infection. *Vaccine.*30:5302.
- WHO (2009). *Malaria microscopy quality assurance manual, version 1*. Geneva: World Health Organization (http://www.who.int/malaria/publications/malaria_microscopy_QA_manual.pdf?ua=1, accessed 15 October 2014).
- OMS (2010). *Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme – Partie 1 : guide du stagiaire, 2^e édition*. Genève : Organisation mondiale de la Santé (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/164472/9789242547825_fre.pdf;jsessionid=A6BB101500B2CA2D6ED61AB67AA40A71?sequence=1, consulté le 15 octobre 2014).
- WHO-WPRO/FIND/UNDP/World Bank/WHO-TDR/FIND/GMP (2010b). Methods manual for laboratory quality control testing of malaria rapid diagnostic tests, version six. WHO Regional Office for the Western Pacific (WPRO), FIND, United Nations Development Programme (UNDP)/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR), WHO Global Malaria Programme (GMP). Geneva: World Health Organization (http://www.wpro.who.int/malaria/NR/rdonlyres/461C306D-D720-43CA-A476-1A250EC3C26A/0/rdt_laboratory_qc_testing_meth_man_v6.pdf, accessed 15 October 2014).

TDR Pour la recherche sur les maladies de la pauvreté

UNICEF • PNUD • Banque mondiale • OMS

Le Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR) est un programme mondial de collaboration scientifique qui a été créé en 1975. Il met l'accent sur la recherche portant sur les maladies négligées qui touchent les pauvres, dans le but d'améliorer les approches existantes et de mettre au point de nouveaux moyens de prévenir, diagnostiquer, traiter et combattre ces maladies. Le TDR est parrainé par les organisations suivantes :

unicef 



 World Health
Organization

TDR/Organisation mondiale de la Santé
20, avenue Appia
1211 Genève 27
Switzerland

Fax: (+41) 22 791-4854
tdr@who.int
www.who.int/tdr

ISBN 978 92 4 000024 7



9 789240 000247