**REPUBLIQUE DU BENIN**

-------------------

**MINISTERE DU DEVELOPPEMENT, DE L’ANALYSE ECONOMIQUE ET DE LA PROSPECTIVE**

------------------------------------------

**INSTITUT NATIONAL DE LA STATISTIQUE ET DE L’ANALYSE ECONOMIQUE**

**(INSAE)**

--------------------------



**Volet Malaria de l’Enquête par Grappe à Indicateurs Multiples**

**(VOLET MALARIA MICS 5)**

**PROTOCOLE DE RECHERCHE**

**OCTOBRE 2013**

**SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

AA : Artésunate-Amodiaquine

A&P: Anémie et Parasitémie

CDC : Center for Disease Control

CSPro : Census and Survey Processing System

CSRef : Centre de Santé de Références

CTA: Combinaison Thérapeutique à base d’Artémisinine

DL : Décilitre

DPS : Direction de la Planification Stratégique

G : Gramme

GE : Goutte épaisse

GRSE : Groupe de Référence Suivi et Évaluation

Hb : Hémoglobine

INSAE : Institut National de la Statistique et de l’Analyse Économique

QC: Quality Control

LPFSS: Laboratoire de Parasitologie de la Faculté des Sciences de la Santé

P. Falciparum : Plasmodium Falciparum

PTF: Partenaire Technique et Financier

TDR: Test de Diagnostique Rapide

USAID: United States Agency for International Development

ZD: Zone de Dénombrement

**SOMMAIRE**

[1. Contexte et justification 4](#_Toc370755740)

[2. Objectifs de l’enquête malaria 4](#_Toc370755741)

[3. Méthodes 4](#_Toc370755742)

[3.1. L'échantillonnage et la sélection 4](#_Toc370755743)

[3.2. Coordonnateur médical de terrain / épidémiologiste 5](#_Toc370755744)

[3.3. Collecte de sang, manipulation et analyse 5](#_Toc370755745)

[3.4. Assurance de qualité des frottis dans une enquête 6](#_Toc370755746)

[3.5. Précautions prises dans la collecte de sang 6](#_Toc370755747)

[3.6. Notification des résultats des tests 6](#_Toc370755748)

[3.7. Obtenir le consentement éclairé pour les essais et le traitement 7](#_Toc370755749)

[3.8. Fournir des résultats d'hémoglobine et d'orientation pour l'anémie sévère 7](#_Toc370755750)

[4. Préparation, transport, et contrôle de qualité des frottis de sang 8](#_Toc370755751)

[4.1. Étapes à suivre pour prélever le sang 8](#_Toc370755752)

[4.2. Matériels et fournitures pour la préparation et la coloration des gouttes épaisses 9](#_Toc370755753)

[4.3. Les étapes de la préparation des GE 10](#_Toc370755754)

[4.4. Stockage et transport des lames 11](#_Toc370755755)

[4.5. Réception et traitement des gouttes épaisses au laboratoire 16](#_Toc370755756)

[4.6. Contrôle de la qualité pour la coloration des gouttes épaisses 17](#_Toc370755757)

[4.7. L'examen au microscope des gouttes épaisses colorées 17](#_Toc370755758)

[4.8. Contrôle de qualité pour l'examen microscopique de gouttes épaisses pour les parasites du paludisme 18](#_Toc370755759)

[5. Organisation de la collecte 18](#_Toc370755760)

[6. Identification du personnel national pour l’enquête malaria 18](#_Toc370755761)

[6.1. Comité Technique 18](#_Toc370755762)

[6.2. Recrutement et formation des agents de collecte 19](#_Toc370755763)

[7. Dispositif de collecte des données 19](#_Toc370755764)

[8. Considérations éthiques et réglementaires 20](#_Toc370755765)

[ANNEXE 23](#_Toc370755766)

[ANNEXE 3 : CALENDRIER D’EXECUTION 24](#_Toc370755767)

[ANNEXE 4 : BUDGET DETAILLE 25](#_Toc370755768)

**1. Contexte et justification**

La République du Bénin a souscrit aux Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) définis par les Chefs d’Etat et de Gouvernement lors du sommet mondial pour le Millénaire tenu à New York en Septembre 2000. Ces objectifs visent une nette amélioration du bien être des populations et particulièrement des enfants et des femmes à l’horizon 2015 dans tous les domaines fondamentaux de la vie humaine. Ainsi, le Gouvernement béninois s’est engagé à construire «un monde digne pour les enfants au Bénin» dans le cadre des 10 engagements mondiaux issus de la Session Spéciale des Nations Unies consacrée aux enfants, tenue a New York en mai 2002.

A cet effet, le Gouvernement du Bénin envisage de réaliser en 2014, l’Enquête par Grappe à Indicateur Multiple (MICS en anglais) pour la première fois au Bénin afin de préparer le rapport de 2014 sur l’évaluation des OMD. Cette enquête fédère les programmes de collecte de données de la cinquième génération de l’Enquête MICS et l’Enquête Santé Malaria et s’inscrit dans le dispositif permanent d’enquêtes auprès des ménages. Cette opération mixte de collecte favorisera une meilleure rationalisation des ressources et la disponibilité d’une base de données permettant de réaliser des analyses pointues sur les conditions de vie en relation avec les conditions socio-sanitaires.

L’Enquête MICS 5 permettra de disposer des informations sur les niveaux de fécondité, l’activité sexuelle, les préférences en matière de fécondité, la connaissance et l’utilisation des méthodes de planification familiale, les pratiques d’allaitement, l’état nutritionnel des femmes et des enfants de moins de cinq ans, la mortalité infantile, la santé de la mère et de l’enfant et sur la connaissance, la pratique de l’excision, et les attitudes et les comportements vis-à-vis du sida et d’autres infections sexuellement transmissibles. Elle permettra également d’avoir des données sur l’utilisation des moustiquaires, le niveau de la tension artérielle. La prise en compte du volet malaria permettra aussi d’avoir des données afin de mieux apprécier le niveau de l’anémie et de la parasitémie palustre au sein des populations.

Pour cette opération, les données seront collectées à l’aide des tablettes (ordinateurs portables) dans lesquelles les masques de saisie des différents types de questionnaires seront configurés. Cette nouvelle technologie, a été expérimentée au Bénin depuis 2011 lors de EDS-IV et EMICoV 2 et continue d’être adoptée pour les diverses enquête réalisées par l’INSAE.

**2. Objectifs de l’enquête malaria**

L’objectif général de l’enquête couplée MICS-Malaria de 2014 est de renseigner les indicateurs contractuels nationaux et internationaux pour des prises de décisions opportunes et de planification stratégique. Ainsi, il est question de faire le test chez tous les enfants âgés de 6 à 59 mois, habitant dans 50% des ménages échantillon de MICS afin de mesurer la prévalence de la parasitémie du paludisme chez les enfants au Bénin et compléter les indicateurs de santé déjà pris en compte dans la MICS.

**3. Méthodes**

3.1. L'échantillonnage et la sélection

Le sous-échantillon de ménages sélectionnés pour l’enquête de la parasitémie palustre est constitué d’environ 7 270 ménages, soit un ménage sur deux de l’échantillon de MICS. C’est un sous-échantillon représentatif au niveau national, des 12 départements, du milieu de résidence et pour certains indicateurs, des communes. Tous les enfants de 6-59 mois de ces ménages feront l'objet de test de parasitémie du paludisme.

3.2. Coordonnateur médical de terrain / épidémiologiste

Pour renforcer la qualité des données recueillies sur le terrain, deux consultants coordonnateurs médical indépendant/épidémiologiste sera recruté par l’INSAE. Ils seront responsables de tous les aspects techniques médicaux sur le terrain. Sa période de performance sera de 3 à 4 mois. Il travaillera en étroite collaboration avec le responsable des opérations de collecte sur le terrain, et les 4 coordonnateurs de l’enquête. Comme ces quatre coordonnateurs, le coordonnateur médical, sera chargé de visiter le personnel sur le terrain régulièrement. Il sera responsable du contrôle de la qualité des interviews (gestion de l’enquête et contrôle du questionnaire) et plus spécifiquement le contrôle de la qualité des prélèvements de sang afin de s'assurer que le personnel de terrain suit exactement les instructions données. Le contrôle portera également sur le consentement éclairé, les techniques de prélèvement sanguin, le stockage des échantillons, et les mesures d'élimination des déchets.

L’INSAE sera responsable de fournir la logistique nécessaire pour la supervision sur le terrain et le contrôle des données.

3.3. Collecte de sang, manipulation et analyse

***Mesure de la parasitémie du paludisme***

La goutte épaisse(GE) pour la lecture microscopique et le test de diagnostic rapide (TDR sont des méthodes de diagnostic du paludisme dans les enquêtes auprès des ménages. La lecture microscopique reste le «gold standard» pour la détection et l’identification de l’espèce parasitaire dans le sang. Par contre le TDR détecte les antigènes du parasite sécrétés dans le sang. La lecture microscopique est effectuée sur des frottis de sang colorés, épais ou minces, et son utilisation est préférable à celle du TDR pour les raisons suivantes:

1. La lecture microscopique permet de détecter des parasites même en faible densité dans le sang;
2. La lecture microscopique permet de spécifier l’espèce parasitaire et le stade de développement des parasites;
3. La lecture microscopique permet d’avoir la densité parasitaire (parasitémie) du paludisme; et
4. Le TDR peut fournir des faux positifs chez les personnes qui ont été récemment traitées contre le paludisme ou qui ont une antigénémie persistante sans parasitémie.

Les TDRs sont très attrayants pour les enquêtes auprès des habitués parce qu'ils produisent rapidement des résultats, nécessitant peu de compétences techniques, peu de réactifs et de fournitures. En outre, les résultats sont faciles à interpréter. Les TDRs sont particulièrement utiles, car ils peuvent fournir des résultats au cours des interviews dans les ménages, permettant ainsi un traitement rapide des enquêtés atteints de parasitémie périphérique. Le Groupe de Référence Suivi et Évaluation (GRSE) de l’initiative de l'Organisation Mondiale de la Santé pour faire Reculer le Paludisme recommande l'utilisation à la fois de la lecture microscopique et du TDR au cours des enquêtes auprès des ménages pour effectuer le diagnostic du paludisme. Les enquêtes antérieures auprès des ménages où les deux méthodes (lecture microscopique et TDR) ont été réalisés, ont démontré des différences significatives dans la prévalence du paludisme telle que mesurée par les deux méthodes.

Par conséquent, dans la MICS, les TDR seront utilisés sur le terrain pour prendre seulement la décision de traiter un enfant testé dans l’enquête. La lecture microscopique utilise les gouttes épaisses pour mesurer la parasitémie dans le sang afin d’assurer la comparabilité avec d'autres enquêtes nationales déjà réalisées.

Tous les enfants de 6-59 mois seront testés d'abord contre le paludisme en utilisant un test de diagnostic rapide (TDR; SD *Bioline Malaria Antigen test*) qui est basé sur la détection de l’antigène HRP-2 spécifique de paludisme à *P. falciparum.* Les enfants avec des résultats positifs au TDR seront traités conformément aux directives nationales de traitement du paludisme.

Les enfants auront également une analyse de sang pour déterminer la parasitémie par la lecture microscopique. Quelques gouttes de sang par une piqûre au doigt seront recueillies sur une lame de verre et confectionner une goutte épaisse. Cette dernière sera colorée et examinée au microscope, dans un laboratoire par un technicien hautement qualifié.

3.4. Assurance de qualité des frottis dans une enquête

Les lames avec les gouttes épaisses sanguines confectionnées sur le terrain seront colorées et lues d'abord par deux microscopistes différents. Tous les frottis épais avec des résultats contradictoires obtenus par les deux microscopistes (première et deuxième lectures) et de tous les gouttes épaisses positif au test de parasitémie du paludisme seront réexaminés par un microscopiste tiers afin de confirmer la positivité.

3.5. Précautions prises dans la collecte de sang

Étant donné que la majorité de l'enquête consiste à prélever du sang des enfants, tous les soins seront faits pour veiller à ce que les répondants soient les moins incommodés. La zone de prélèvement du sang sera nettoyée avec un tampon imbibé d'alcool avant de faire la ponction. La ponction sera faite avec une aiguille rétractable, non réutilisables. Après avoir prélevé le sang, le flux sanguin sera arrêté en appliquant une pression sur le site de ponction avec une compresse de gaze. Une fois que le saignement s'arrête, la région sera protégée contre les infections par un bandage. Toute personne procédant au test d'anémie et de paludisme sera spécifiquement formée à cette procédure.

3.6. Notification des résultats des tests

Les résultats des tests pour l'anémie (en indiquant si la personne n'a pas l'anémie, une légère anémie, une anémie modérée, ou une anémie sévère) et les résultats des tests pour le paludisme (en indiquant si la personne a le paludisme détectable ou non) seront donnés aux parents ou adultes responsables de l’enfant. Les enfants atteints d'anémie sévère seront référés aux structures sanitaires les plus proches pour traitement et suivi médical. Les enfants dont le test au TDR est positif se verront offrir un traitement gratuit sur place avec artésunate-Amodiaquine (AA), conformément aux lignes directrices nationales du Bénin pour le traitement du paludisme simple chez les enfants de moins de 5 ans. Des informations seront données sur les contre-indications et effets secondaires potentiels du traitement. Un choix d’accepter ou de refuser sera accordé au parent ou adulte responsable de l’enfant sans conséquences, si elles le désirent.

Après l'obtention du consentement de la mère ou d’un autre adulte dans le ménage pour le traitement, une cure complète avec l'Artésunate-Amodiaquine (AA) sera donnée aux enfants avec des résultats positifs au TDR. Ce médicament se présente sous forme de comprimés contenant 20 mg d'artésunate et 120 mg d’amodiaquine. Il sera donné comme seul traitement (et non comme une prophylaxie). AA a un faible risque d'effets indésirables (généralement autour de 3 pour cent), qui incluent les étourdissements, la fatigue, le manque d'appétit et les palpitations.

Artésunate-Amodiaquine (AA) sera administré selon la posologie suivante:

|  |  |
| --- | --- |
| **Âge approximatif** | **Dosage \*** |
| < 3 ans | 1 comprimé deux fois par jour pendant 3 jours |
| 3 à 5 ans | 2 comprimés deux fois par jour pendant 3 jours |

\*Le premier jour, la deuxième dose est prise 8 heures après la première; les jours suivants, la dose est simplement prise “matin” et "soir”.

3.7. Obtenir le consentement éclairé pour les essais et le traitement

Une des principales tâches de l'enquêtrice est d'expliquer le but du test au parent ou à l’adulte responsable de l’enfant, pour obtenir leur consentement avant de prélever le sang. Afin de s'assurer que ces personnes peuvent prendre une décision éclairée sur le test, le questionnaire de MICS contient une déclaration de consentement, qui sera lu à l'enquêtée parent (s) ou adulte responsable. Cette «déclaration de consentement éclairé» comprend les éléments de base suivants:

(1) Une description des objectifs du test

(2) Les informations de base sur la façon dont le test sera effectué

(3) Des assurances quant à la confidentialité des résultats

(4) Une demande spécifique de l'autorisation de prélever le sang

(5) Une demande spécifique de l'autorisation d'offrir un traitement gratuit sur place au cours de l’enquête avec l'artésunate-amodiaquine (AA) pour tous les enfants dont les résultats sont positifs au TDR.

(6) Les informations sur les effets indésirables possibles liés au traitement.

L'enquêtrice doit lire la déclaration de consentement éclairé à chaque parent/ adulte responsable de l’enfant et obtenir leur consentement pour le test de l'enfant avant que tout prélèvement de sang ne soit effectué. L'enquêtrice doit signer pour signifier qu'elle a lu le consentement éclairé.

3.8. Fournir des résultats d'hémoglobine et d'orientation pour l'anémie sévère

Avant de quitter le ménage, l'enquêtrice informe verbalement le parent ou l'adulte responsable de chaque enfant, sur le niveau d'hémoglobine de l'enfant. Lors de la déclaration des résultats, des explications seront données sur la lecture du niveau d'hémoglobine chez une personne. L'enquêtrice laissera également dans le ménage une brochure d'information sur l'anémie.

L'anémie sévère étant une menace mortelle, l’enquêtrice conseillera les parents ou adultes responsables des enfants sévèrement anémiques (enfants avec un taux d'hémoglobine inférieur à 8 g/dL) de se rendre à un établissement de santé le plus proche pour un diagnostic plus approfondi et recevoir le traitement approprié.

Pour chaque enfant ayant une anémie sévère, l’enquêtrice remplira une fiche de référence pour l’anémie, avec le nom de l'enfant, l'âge, le niveau d'hémoglobine, et la date du test.

**Fiche de Référence pour Anémie – MICS**

**Au cours de l’Enquête MICS-5 2014, Nom \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_, âge\_\_\_ ans, a été testé pour l’anémie en utilisant l’HemoCue le \_\_ \_\_/\_\_ \_\_/\_\_ \_\_. Son niveau d’hémoglobine était \_\_ \_\_. \_\_ g/dl, qui indique qu’il/elle est sévèrement anémique. (NOM) a besoin de suivi médical pour traiter l’anémie.**

**4. Préparation, transport, et contrôle de qualité des frottis de sang**

4.1. Étapes à suivre pour prélever le sang

1. L’enquêtrice doit identifier tous les enfants éligibles pour lesquels il ou elle prépare les GE/gouttes épaisses sur lames.

2. Par une piqûre au doigt, l’enquêtrice prélève 2-3 gouttes de sang sur une lame de microscope pour préparer un frottis sanguin. De la même piqûre au doigt, l’enquêtrice/agent de santé/technicien prélèvera une autre goutte de sang pour effectuer le test d'hémoglobine (une seule piqûre au doigt est nécessaire et suffisant pour les deux tests, frottis et hémoglobine).

3. Confectionner une goutte épaisse/ frottis de sang sur lame de microscope.

4. Placez horizontalement les lames de microscope avec les frottis dans une boîte de séchage pour les faire sécher.

5. Assurez-vous que les codes à barres sur les lames correspondent aux codes à barres dans le questionnaire et sur la fiche de transmission.

6. Après 24 heures d’exposition dans la boîte de séchage, placer les lames de microscope avec le sang séché dessus, dans un petit sac en plastic (petit ziploc), ensuite et pour chaque grappe, rassembler tous les petits ziplocs contenant les lames avec sang séché dessus dans une seule boîte de stockage ou rangement (ou grand ziploc) avec identification de la grappe inscrite dessus pour le transport au bureau central, puis au laboratoire.

7. Placer la feuille de transmission des prélèvements de sang séché dans le grand ziploc de la grappe, pour le transport au bureau central, puis au laboratoire lors des visites de supervision.

4.2. Matériels et fournitures pour la préparation et la coloration des gouttes épaisses

Les matériels et fournitures spéciaux suivants sont utilisés pour la préparation, le stockage et le transport des lames de sang de microscope.

1. **Lames de verre**. Les lames de verre seront utilisées pour la préparation de films de sang qui seront colorés pour l'identification du parasite du paludisme. Ces lames ne sont pas à stériliser, mais lavées à l'alcool pour enlever de la graisse et des débris. Une extrémité de la lame est dépolie ou gravé pour permettre l'étiquetage du prélèvement de sang
2. **Étiquettes de codes à barres.** Les étiquettes à code barres seront utilisées pour identifier les films de sang (lames de verre). Des étiquettes autocollantes pré-imprimées sont fournies sur des feuilles spéciales. Chaque ligne de la feuille comprend [quatre] étiquettes avec le même code à barres. Une ligne de la feuille sera utilisée pour chaque enquêté. Des instructions pour l'utilisation des étiquettes de code à barres sont incluses dans le manuel de l'enquêtrice.
3. **Papier journal**. Il est utilisé pour déterminer l'épaisseur de la goutte épaisse confectionnée après avoir uniformément étaler les gouttes de sang qui ont été collectées sur la lame. Une lame bien préparée doit comporter des couches de globules rouges à travers lesquelles le papier journal est à peine lisible.
4. **Papier glacée**. Il est utilisé pour emballer la lame de sang afin de protéger les gouttes épaisses confectionnées contre d’autres contaminations.
5. **Boîte de séchage ou Compartiments à séchoir**. Elle sert à placer les lames dans ses compartiments pour les faire sécher. Les lames sont placées face dessous dans les compartiments à séchoir pour les protéger contre les débris et les contaminants.
6. **Boîte de lames ou de stockage ou de rangement**. Il est utilisé pour le transport des lames de verre en toute sécurité du terrain au bureau central, puis au laboratoire.
7. **Feuille de transmission des prélèvements de la grappe**. Elle est utilisée pour rendre compte à chaque étape du processus de transport des prélèvements sanguins du terrain jusqu’à leur traitement au laboratoire.
8. **Les sacs en plastique pour les déchets biologiques dangereux.** Ce sont de gros sacs rouges qui sont fournis pour collecter tous les déchets biologiques dangereux de la journée. Ces sacs à déchets biologiques seront détruits de manière appropriée avant de quitter la grappe.

**Matériels nécessaires au laboratoire pour la coloration des gouttes épaisses et lecture des films de sang**

Les matériels et fournitures spéciaux suivants sont utilisés pour le traitement des films de sang au laboratoire pour la lecture microscopique.

1. **Colorant Giemsa**. Un colorant de formules spéciales pour la coloration des gouttes épaisses afin d'identifier les parasites du paludisme.
2. **Bac Coplin**. Un bac /récipient pour contenir le Giemsa dilué. Les gouttes épaisses préparés (lames de verre) sont placés dans le bac Coplin contenant du colorant Giemsa. Les lames de verre sont ainsi laissées tremper dans la solution Giemsa pendant 20 minutes.
3. **Tampon d’eau**. C’est de l'eau (pH de 7,0 à 7,2) utilisée pour laver et enlever les colorants en excès de la lame de verre à la fin de la procédure de coloration.
4. **Boîte de séchage ou Compartiments à séchoir**. Elle sert à placer les lames dans ses compartiments pour les faire sécher. Les lames sont placées face dessous dans les compartiments à séchoir pour les protéger contre les débris et les contaminants.
5. **Feuilles de papier absorbant.** Des feuilles de papier absorbant seront fournies pour mettre sur la surface où votre matériel de test sera placé et sur lesquelles vous effectuerez les tests pour l'anémie, la conduite du test rapide du paludisme, et des gouttes épaisses confectionnés pour le test des parasites du paludisme au laboratoire.
6. **Les sacs en plastique pour les déchets biologiques dangereux.** Ce sont de gros sacs rouges qui sont fournis pour collecter tous les déchets biologiques dangereux de la journée. Ces sacs à déchets biologiques seront détruits de manière appropriée.

4.3. Les étapes de la préparation des GE

**4.3.1. Étapes de la préparation des gouttes épaisses sur le terrain**

1. Mettez une paire de gants avant de commencer la préparation des frottis de sang sur les lames.

2. Prenez une lame de microscope ayant un bout givré ou fritté pour l'étiquetage et une zone dégagée sur laquelle on prélève le sang. L'enquêtrice/agent de santé/technicien collera l'étiquette code à barres du côté givré de la lame avant de commencer à tout prélèvement de sang.

3. Aussi, le côté rugueux du bout givré de la lame doit faire face dessus lors de la préparation de la lame pour prendre le sang et confectionner le frottis.

4. Touchez la lame à l'endroit de la ponction (piqûre) pour recueillir 3-4 gouttes de sang de taille moyenne, l’une à côté de l’autre, et au milieu de la lame.

5. Mélanger doucement ensemble les gouttes de sang collectées à l’aide d'un bâtonnet applicateur pour couvrir de sang une superficie de près de 1,25 cm de diamètre. S’il n’y pas de bâtonnet applicateur, on pourra utiliser la pointe d'une deuxième lame comme applicateur. Si un bâtonnet applicateur est utilisé, ne pas essayer de «mélanger» le sang, mais plutôt étaler le sang dans un mouvement circulaire. Un papier journal devrait être à peine lisible à travers le centre de la couche.

6. Laisser la goutte épaisse sécher à l'air libre dans la boîte de séchage (jusqu'à plusieurs heures ou au lendemain) dans une position horizontale et à température ambiante. NE PAS chauffer ou de fixer la lame avec de l'alcool.

7. Collecter, stocker et transporter les lames du terrain au bureau central, puis au laboratoire.

**4.3.2. Étapes de la coloration des gouttes épaisses et la lecture au laboratoire**

1. Recevoir, enregistrer et stocker les lames avec les frottis de sang au laboratoire pour la coloration des frottis.

2. Dans un bac Coplin, diluer le colorant Giemsa pour préparer la solution de coloration à 2,0%.

3. Tremper les lames de sang pour colorer la goutte épaisse avec la solution colorante de 2,0% de Giemsa modifié pendant 20 minutes.

4. Laver la lame avec de l'eau (pH de 7,0 à 7,2) pour enlever l'excès de colorant. La lame peut être immergée dans un bac Coplin avec de l'eau pendant 3-4 minutes.

5. Laisser la lame sécher à l'air pendant 10 minutes.

6. Ensuite examiner les couches de sang colorées à l’aide de microscope optique sous 100X grossissement (objectif à immersion d'huile).

7. Réarranger les lames de sang lues au microscope dans leurs boîtes pour d’autres lectures au microscope ou pour stockage et archivage.

4.4. Stockage et transport des lames

**4.4.1. Stockage des lames**

Les lames de sang collectées sur le terrain pour le test de paludisme doivent être bien entretenues. Elles doivent être laissées sécher complètement, être protégées de la poussière, des mouches, des débris et d’autres contaminants, et être tenues hors de l'humidité. Il est décrit dans ce qui suit, une description de quelques procédures de base, que les agents de collecte auront à observer pour faire en sorte que les lames soient conservées en bon état.

Lorsque l’agent revient du terrain à la fin de la journée, il doit vérifier la qualité les lames que qu’il a confectionnées. Il doit s’assurer qu’il n'a pas touché le frottis accidentellement avec les doigts ou avec d’autres matériels qu’il utilise sur le terrain. Il s’assure qu'il n'y a pas de poussière ou de particules de saleté enrobées dans le sang. Il doit placer suffisamment de sachets de desséchants dans la boîte de séchage, et cela permettra de garder les lames à sec et d'accélérer le processus de séchage. Il doit ajouter assez de sachets de desséchants tel que requis, en accordant une attention particulière aux conditions environnementales. Si l’environnement est très humide (indiqué par l’indicateur d’humidité), il doit peut-être ajouter «extra» sachets de desséchants. Il doit vérifier que la couleur bleue de l’indicateur d’humidité n'a pas changé au rose. Si une coloration rose se développe, il doit supprimer les sachets de desséchants et de les remplacer par des neufs et aussi changer l’indicateur d’humidité.

**4.4.2. Transport des lames**

Le but de la fiche de transmission des lames est de rendre compte à chaque étape du processus de transport, la situation des lames de sang.

1. Lorsque l’agent de santé a terminé la grappe et avant de la quitter, il doit enlever les restes des lames confectionnées de la boîte de séchage et vérifier le nombre de lames qu’il a confectionné dans la grappe. Il doit porter des gants lors de l'exécution de ces procédures. Il doit vérifier un à un, le code à barres des étiquettes sur les lames de verre contre les codes à barres apposée dans le questionnaire et sur la fiche de transmission.

2. Pour chaque étiquette code à barres collée sur une lame, il doit cocher dans la colonne technicien le code correspondant sur la feuille de transmission. Il doit compter et enregistrer le nombre de lames dans les cases prévues à la colonne (3) sur le recto face avant de la feuille de transmission, dans la ligne intitulée technicien. S’il ya des anomalies, il doit rendre compte. Il utilisera la colonne (7) pour expliquer.

3. Il doit signer par votre nom dans la colonne (4) et la date dans la colonne (6). Le superviseur de l'équipe passera sur le terrain pour contrôle et re-vérification du travail.

4. Il doit protéger le frottis de sang sur la lame avec une feuille de papier cristal (glassine paper). Ensuite, il doit insérez le tout dans une boîte à lame, en les plaçant d’avant en arrière. Alternativement, s’il n’a pas de papier glassine, il peut protéger la goutte épaisse en couvrant la lame avec une feuille de papier non pelucheux.

5. Il doit plier la fiche de transmission le long des pointillés (de sorte que les étiquettes code-barres ne sont pas pliées), et la conserver avec les lames dans la boîte à lames de la grappe.

6. Périodiquement, un coordonnateur ou tout autre membre du bureau central de l’enquête effectuera des visites de supervisions au cours desquelles il collectera les questionnaires remplis et les lames pour chaque grappe terminée. Lorsqu’il collectera les lames, il devra recompter les lames pour chacune des grappes terminées et vérifier les codes à barres sur chaque lame contre les codes à barres sur la feuille de transmission et contre les codes à barres dans le questionnaire. Les échantillons de sang et les fiches de transmission seront amenés au bureau central de l'enquête pour enregistrement avant de les expédier au laboratoire pour traitement et analyse. Les figures 1 et 2 sont des exemples de codes à barres et la fiche de transmission.

**Figure 1 : FICHE DE TRANSMISSION DES PRELEVEMENTS (RECTO)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| NUMERO  D’EQUIPE   |  |  | | --- | --- | |  |  | |  | |  |  |  | | --- | --- | --- | |  |  |  |   NUMERO DE GRAPPE |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| PERSONNE CHARGÉE D’ENVOYER/ RECEVOIR LES PRÉLÈVEMENTS DE SANG | QUAND FAUT-IL REMPLIR LA FICHE? | NOMBRE DE PRÉLÈVEMENTS DE SANG | SIGNATURE  (CONFIRMANT QUE CHAQUE PRÉLÈVEMENT EST PRÉSENT—VOIR AU VERSO DE CETTE FICHE) | SIGNATURE  (CONFIRMANT QUE LE NOMBRE DE PRÉLÈVEMENTS DE SANG CORRESPOND AU NOMBRE DANS LA COL. 3) | DATE | NOTES  (NOTER TOUTE DIFFÉRENCE OBSERVÉE DANS LE NOMBRE DE PRÉLÈVEMENTS À CHAQUE VÉRIFICATION) |
| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
| ENQUETRICE | QUAND LA GRAPPE EST COMPLÈTEMENT TERMINÉE | |  |  | | --- | --- | |  |  | |  |  |  |  |
| COORDONNATEUR DE TERRAIN | AU MOMENT OÙ LES PRÉLÈVEMENTS SONT RAMASSÉS SUR LE TERRAIN POUR ÊTRE TRANSPORTÉS AU BUREAU CENTRAL DE L’ENQUÊTE | |  |  | | --- | --- | |  |  | |  |  |  |  |
| DIRECTEUR TECHNIQUE/ COORDONNATEUR MÉDICAL | À LA RÉCEPTION AU BUREAU CENTRAL DE L’ENQUÊTE | |  |  | | --- | --- | |  |  | |  |  |  |  |
| CHEF TECHNICIEN DU LABORATOIRE | À LA RÉCEPTION AU LABORATOIRE | |  |  | | --- | --- | |  |  | |  |  |  |  |

Les deux pages (recto/verso) de cette fiche doivent être photocopiées au laboratoire. L’original doit être retourné au Directeur Technique/ Coordonnateur médical après signature du laboratoire confirmant la réception et la vérification. Le laboratoire détruira les photocopies de cette fiche après que les prélèvements aient été traités.

**Figure 1 (suite) : FICHE DE TRANSMISSION DES PRELEVEMENTS (VERSO)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| NO. | CODES À BARRES DU PRÉLÈVEMENT | RÉSULTAT | Enquêtrice | Coord. Médic. |  | NO. | CODES À BARRES DU PRÉLÈVEMENT | RÉSULTAT | Enquêtrice | Coord. Médic. |
| 1 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 16 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 17 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 18 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 19 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 20 |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 21 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 22 |  |  |  |  |
| ------ | ------------------------------------------------------------------ | | -------- | ------ | Fold here  ↓ | ---─ | ------------------------------------------------------------ | | -------- | -------- |
| 8 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 23 |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 24 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 25 |  |  |  |  |
| 11 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 26 |  |  |  |  |
| 12 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 27 |  |  |  |  |
| 13 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 28 |  |  |  |  |
| 14 |  |  |  |  | **:**  **:**  **:**  **:** | 29 |  |  |  |  |

**Figure 2** Étiquettes codes à barres



4.5. Réception et traitement des gouttes épaisses au laboratoire

Des gouttes épaisses (ou frottis épais) seront préparées sur le terrain par les enquêtrices formés pour effectuer le test de paludisme. Ces gouttes épaisses seront amenées dans un laboratoire central par un spécialiste de la santé, où ils seront colorés et examinés au microscope par un microscopiste. Lorsque les gouttes épaisses sur lames arrivent au laboratoire, elles seront inspectées et enregistrées par un microscopiste (un technicien du laboratoire) qui procédera aux tâches suivantes:

1. Vérifier le nombre de prélèvements (nombre de lames) reçus par le laboratoire contre le nombre de prélèvements enregistrés sur la feuille de transmission.
2. Retirez les lames de la boîte un à un, et vérifiez l'étiquette code à barres sur chaque lame contre l'étiquette code à barres sur la feuille de transmission. Les étiquettes code-barres sur les lames confectionnées dans la grappe doivent correspondre aux étiquettes code à barres sur la feuille de transmission de la grappe.
3. Signez par votre nom, sur la feuille de transmission confirmant que chaque lame figurant sur la feuille de transmission a été reçue dans le laboratoire.
4. Portez la date sur la feuille transmission.
5. Notez sur la feuille de transmission toutes les discordances ou problèmes entre le nombre de lames envoyé et le nombre reçu, y compris le problème avec la qualité des gouttes épaisses, et les étiquettes manquantes, etc.
6. Effectuez une photocopie du recto et du verso de la feuille de transmission et conserver la copie en toute sécurité dans le laboratoire. L'original doit être renvoyé au bureau central à l’INSAE.
7. Les gouttes épaisses sanguines doivent être colorées dans les 24 heures suivant leur arrivée au laboratoire (LPFSS).

Le laboratoire nommera six membres de son personnel comme responsables de toutes les activités de test de MICS liées au prélèvement. Deux de ces six personnes devront être présentes en permanence au laboratoire pendant les heures d’ouverture.

Ces personnes seront responsables de : 1) la réception des prélèvements, de leur contrôle et de leur stockage ; 2) l’affectation des prélèvements aux techniciens chargés des tests ; 3) la supervision et le contrôledes tests ; 4) les procédures de qualité interne ; 5) la saisie des résultats des tests. En outre, ces personnes devront immédiatement communiquer au responsable médical de l’étude, à l’INSAE tout problème qui pourrait se poser au cours de l’enquête (mauvaise qualité des prélèvements reçus ; problèmes de saisie des résultats, etc.),

Le Laboratoire traitera les prélèvements, comme nous l’avons annoncé plus haut, seulement après la fin du travail sur le terrain et qu’après que les données des questionnaires eurent été brouillées.

4.6. Contrôle de la qualité pour la coloration des gouttes épaisses

Le contrôle de qualité de la procédure de coloration des frottis de sang doit être effectué sur une base régulière. Le laboratoire devrait avoir en place un ensemble de procédures pour le contrôle de qualité des réactifs en stock, la procédure de coloration et les résultats de l'examen microscopique des gouttes épaisses colorées. Les stocks de solutions de l'eau tamponnée doivent être propres et clairs, sans aucun signe visible de contamination.

1. Le pH de l'eau tamponnée à utiliser doit être vérifié avant chaque utilisation, le pH devrait être entre 7,0 et 7,2.
2. Le laboratoire doit préparer des frottis colorés à partir du sang normal afin d'évaluer la réaction de coloration.
3. Au microscope, les frottis de sang doivent apparaître violacés. S’ils apparaissent en bleu, alors l'eau utilisée est trop alcalin, si rose au rouge, l'eau est trop acide.
4. Au microscope, les globules rouges apparaissent gris-rose, les plaquettes sont rose foncé et des globules blancs possèdent un noyau bleu-violet.
5. De légères variations dans la coloration sont à prévoir en fonction des lots de teinture utilisés et de l’état ou caractéristiques du sang utilisé pour confectionner la goutte épaisse. Cependant, si les structures morphologiques décrites ci-dessus sont distinctes, alors la procédure de coloration est acceptable.
6. Le contrôle de qualité (QC) est acceptable si les réactions de coloration sont acceptables.
7. Les résultats au contrôle de qualité (QC) devraient être enregistrés.

4.7. L'examen au microscope des gouttes épaisses colorées

Pour l'identification précise des parasites du paludisme dans des gouttes épaisses colorées, un microscopiste hautement qualifié et expérimenté est indispensable. Pour effectuer un travail de haute qualité, cette personne doit avoir un microscope de très bonne qualité pour une visualisation claire des parasites du paludisme. Le microscope doit être équipé d'au moins objectifs oculaires 10, 40 et 100 x et un tungstène ou lampe halogène. Le système de microscope doit être facilement ajustable lorsqu’on effectue la lecture des lames. Une source sûre et constante d'électricité est également nécessaire. Lorsqu’on examine les frottis (gouttes épaisses), le microscopiste devrait examiner au moins 200 champs d’immersion à l'huile avant de conclure la lame négative au test pour les parasites du paludisme.

***Étapes de l'examen microscopique des gouttes épaisses***

1. Sélectionner une zone de la goutte épaisse sur la lame qui est bien coloré, sans débris de coloration et ayant de nombreux globules blancs, en utilisant un objectif oculaire de 40x.

2. Placer une petite goutte d’huile d’immersion de microscope sur cette zone de la goutte épaisse sur la lame.

3. Abaisser l’objectif oculaire de 100x à immersion sur la zone sélectionnée de la goutte épaisse pour que la lentille touche juste l'huile d'immersion.

4. Assurez-vous que la source de lumière est correctement ajustée et commencer l'examen de la lame.

5. Examiner la goutte épaisse suivant un schéma de mouvement de gauche à droite. Examiner un minimum de 200 champs d'immersion à l’huile (x 100).

La présence de TOUT parasite sur la goutte épaisse indique que le test du sang est positif pour le paludisme.

4.8. Contrôle de qualité pour l'examen microscopique de gouttes épaisses pour les parasites du paludisme

Le laboratoire qui effectue l'examen de coloration et l’examen microscopique des gouttes épaisses doit avoir un programme ou une procédure en place pour le Contrôle de Qualité Interne et Contrôle de Qualité Externe. Un programme d’évaluation interne de la qualité est indispensable pour le suivi au jour le jour des opérations de fonctionnement du laboratoire, tels que la procédure de coloration et de l'exactitude des résultats de lecture des gouttes épaisses. Une évaluation externe de la qualité certifiera que le laboratoire respecte les normes standards d'un laboratoire de test de paludisme.

**5.**  **Organisation de la collecte**

L’enquête Malaria couplée avec MICS 5 sera réalisée par l’Institut National de la Statistique et de l’Analyse Économique (INSAE).

L’USAID fournira l’assistance technique à travers ???????. L’USAID devra mettre en place les intrants nécessaires pour conduire avec efficacité les tests de parasitémie au laboratoire et les kits de test rapide. Si L’USAID doit appuyer les aspects techniques de l’enquête : préparation des premières versions des questionnaires et des manuels d’instruction et des plans de tabulation et d’analyse, l’INSAE sera responsable de tous les aspects opérationnels, y compris le planning et les activités de terrain, le traitement des données recueillies et la rédaction et la distribution des rapports. L’INSAE fournira les locaux nécessaires pour le personnel de l’enquête.

Par ailleurs, l’INSAE est appelé à collaborer avec les organismes nationaux intéressés par les questions de population et de santé, les partenaires au développement et certaines ONG.

**6. Identification du personnel national pour l’enquête malaria**

L’Enquête Malaria intégrée à MICS sera exécutée par l’INSAE. Le Directeur Général de l’INSAE, M. Alexandre BIAOU sera le Directeur National de l’Enquête Malaria intégrée à MICS. Mme Élise AHOVEY, Directrice des Études Démographiques assurera la direction technique de l’enquête conjointement avec M. Djabar ADECHIAN, Directeur des Statistiques Sociales et assisté des cadres de deux directions concernées.

6.1. Comité Technique

Le comité technique est celui mis en place pour la conduite de l’enquête MICS et qui sera assuré par un comité technique présidé par le Directeur Général de l’INSAE (DG/INSAE). Les attributions de ces comités sont celles présentées dans le plan d’enquête de MICS. Le Comité technique se réunira de façon périodique sur convocation du DG/INSAE. Au cours de ses réunions, le comité examinera et adoptera les documents qui leur seront soumis par les organes respectifs d'exécution de l’enquête MICS. L’USAID fera partie des partenaires au développement, qui sont parties prenantes des Comités techniques.

6.2. Recrutement et formation des agents de collecte

Vingt sept agents de santé seront recrutées par l’INSAE pour le volet santé spécifiquement le volet malaria et feront partie des équipes mises en place lors de l'enquête principale. Chaque équipe de l’enquête MICS comportera en son sein un agent de santé qui aura pour tâche principale de faire les tests d’anémie, de parasitémie palustre, ainsi que la prise de la tension artérielle.

Les agents de santé qui sont chargés des tests et prélèvement recevront une formation spéciale pour la prise de sang et la préparation des gouttes épaisses de sang sur lames pour la lecture microscopique au laboratoire.

Tous les chefs d’équipes participeront à cette formation pour aider les agents de santé en cas de besoin sur le terrain. Tous les candidats aux postes d’agents de terrain pour le volet santé seront sélectionnés sur la base de leur maturité, de leur capacité à communiquer, de leur niveau d’instruction, de leur connaissance de la langue nationale et de leur disponibilité pour travailler loin de chez eux pour une période allant de trois à quatre mois. Tout sera fait pour engager du personnel de terrain qualifié dont le profil sera prédéfini par l’équipe technique de l’enquête.

Il y aura également une formation ciblée sur les procédures d'obtention du consentement éclairé, les techniques de prélèvement sanguin, l'utilisation de l’appareil HemoCue pour le test de l'anémie et les procédures pour référer les personnes pour des CSRef. La formation portera aussi sur les procédures et la technique de confection de la goutte épaisse sur des lames de microscopes et la manipulation et le stockage des prélèvements sur papier filtre jusqu'à leur transport au laboratoire ainsi que les procédures d'élimination des déchets biomédicaux. La formation comprendra une présentation détaillée sur les procédures de sécurités liées au transport des échantillons de sang du terrain au bureau central, puis au laboratoire. Tout le personnel du bureau impliqué dans MICS, les spécialistes impliqués dans les activités du test, ainsi que le personnel de soutien, participeront à la formation.

Les questions de stigmatisation, de conceptions erronées, les questions de confidentialité seront abordées au cours de cette formation. Une autre demi-journée de formation sera consacrée à informer tout le personnel impliqué dans MICS sur le paludisme et les moyens de prévention, et les raisons pour lesquelles l’enquête porte sur le test de la parasitémie.

**7. Dispositif de collecte des données**

Le dispositif de collecte est intimement lié au dispositif de MICS. Pour la mise en œuvre de l’opération de collecte des données, l’INSAE organisera une réunion officielle avec tous les partenaires pour lancer les activités de terrain de MICS au Bénin. En outre, des campagnes de sensibilisation seront organisées par l’INSAE en vue de rencontrer les autorités (Maires) des localités couvertes par l'enquête. Egalement d’autres activités de sensibilisation seront menées pour informer la population des localités couvertes. Enfin, au cours des travaux sur le terrain, les superviseurs seront aussi chargés de rencontrer les autorités locales pour les informer de l'arrivée des équipes dans leur localité respective. Le dispositif à mettre en place pour le volet Malaria dans MICS va s’appuyer sur le schéma organisationnel mis en place pour l’enquête MICS.

L’INSAE mettra à la disposition de l’enquête la logistique nécessaire pour conduire et gérer l’enquête correctement. Environ trente cinq véhicules seront nécessaires lors de l’opération de collecte. De façon détaillée, deux (2) véhicules sont à mettre à la disposition des agents lors de la formation pour l’enquête pilote ; vingt sept véhicules (27) seront loués aux équipes pour le travail sur le terrain qui durera trois mois ; enfin, six (6) véhicules sont nécessaires pour assurer périodiquement le transport des lames vers Cotonou.

**8.** **Considérations éthiques et réglementaires**

**Consentement pour participer à l’étude**

La participation à cette étude est volontaire. Toute personne recrutée sera libre de refuser ou d’accepter de participer à l’étude. Des explications claires sur les objectifs et les procédures seront données aux participants (es) afin qu’ils donnent un consentement éclairé quant à leur participation (voir fiche de consentement éclairé et la fiche d'information en annexes ….). Ce consentement oral ou écrit sera signé. Il comportera les séquences ci-après : participer à la collecte des données générales sur MICS, donner son accord pour la collecte des données générales et le dépistage de l’anémie, le dépistage du paludisme.

**Confidentialité dans la collecte des données générales et du dépistage de l’anémie, le dépistage du paludisme**

La collecte des données sera effectuée dans des conditions rassurant les participantes à l’égard de la confidentialité des informations obtenues et des résultats des tests qui seront pratiqués. Les tests du paludisme et d’anémie ne seront pas anonymes. Toute personne testée anémiée par le test Hémocue sera référée vers un centre de santé pour sa prise en charge. Quant au test du paludisme, en cas de paludisme simple, il sera remis à l’enquêté, une dose suffisante d’Artésunate + Amodiaquine pour son traitement. En cas de paludisme grave, il sera référé vers un centre de santé pour sa prise en charge adéquate. Un numéro sera attribué à tout(e) participant(e) à l’enquête. Il n’inclura aucune caractéristique socio-démographique susceptible d’aider à retrouver le(a) participant(e). Aucun nom ne sera demandé. Les questionnaires et les échantillons seront identifiés seulement par le code-barre qui ne permet pas l’identification de la personne qui a accepté de participer à l’étude.

**Risques liés à la participation à l’enquête**

Ils seront expliqués aux enquêtés. Ils sont minimes. C’est un risque minime de saignement et d’ecchymose associé à la ponction au bout du doigt pour obtenir l’échantillon de sang. La ponction sera réalisée avec des lancettes à ressort neuves stériles et jetables à usage unique et par un personnel formé.

Un risque psychologique lié à la nature délicate des questions de l’interview est possible. Le questionnaire structuré sera administré par des enquêteurs ou enquêtrices formés/es et la confidentialité des réponses obtenues sera assurée. Rappelons que les personnes recrutées seront libres de répondre ou non au questionnaire, qu’il ne leur sera pas demandé de donner leurs noms et qu’après remise des questionnaires et des échantillons aux superviseurs, même l’enquêteur ne pourra pas associer un questionnaire ou un résultat de laboratoire à un participant ou à une participante, encore moins le personnel du laboratoire et les autres intervenants/es dans l’enquête qui travailleront avec les codes attribués aux participants et participantes.

**Avantages à participer à cette étude**

Plusieurs avantages au plan individuel et au plan de la santé publique découlent de cette étude. L’enquête permettra aux participants et aux participantes de connaître leur taux d’hémoglobine et les dispositions à prendre en cas d’anémie. De même, pour les malades qui souffriraient de paludisme simple, ils seront traités sur place et en cas de paludisme grave, ils seront référés vers un centre de santé à même de leur assurer une prise en charge correcte. En termes de santé publique, il est évident que les données de l’enquête permettront aux responsables nationaux d’actualiser tous les programmes liés à la démographie et à la santé et de mieux renseigner les indicateurs contractuels nationaux et internationaux pour des prises de décisions opportunes et la planification stratégique.

ANNEXE 3 : CALENDRIER D’EXECUTION

ANNEXE 4 : BUDGET DETAILLE