



Programme National
de Lutte contre le Paludisme



Laboratoire d'Écologie
Vectorielle et Parasitaire (LEVP)

PROCÉDURES STANDARDS POUR LA SURVEILLANCE DES VECTEURS DE MALADIE DANS LE CONTEXTE D'UNE SURVEILLANCE ET D'UNE GESTION INTÉGRÉES DES MALADIES À TRANSMISSION VECTORIELLE



Organisation
Mondiale de la Santé

BILL & MELINDA
GATES foundation

Sénégal, 2009

Introduction

Depuis 2008, sept pays pilotes (Cameroun, Kenya, Mali, Madagascar, Mozambique, Sénégal et Tanzanie) assurent la mise en œuvre du projet intitulé «lutte antivectorielle: “comblar les lacunes entre la disponibilité des outils et leur usage effectif.” Ce projet est financé par la Fondation Bill et Melinda Gates à travers l'Organisation mondiale de la Santé. L'objectif du projet est de renforcer les capacités nationales pour une bonne mise en œuvre des opérations de lutte contre les vecteurs du paludisme. Un des cinq objectifs spécifiques du projet est de faciliter le développement, l'harmonisation et l'utilisation de méthodologies et de systèmes de prise de décision, dans le cadre de la lutte intégrée contre les vecteurs de maladies humaines.

Pour une intervention efficace et efficiente de lutte anti-vectorielle, il est nécessaire de disposer au préalable des informations sur l'écologie, le comportement et la dynamique des populations de vecteurs locaux. Après interventions, il est fondamental d'évaluer l'effet des opérations et aussi de pouvoir détecter ou prédire les fluctuations inhabituelles des tendances qui peuvent avoir des conséquences significatives sur la maladie.

Pour cette raison, des scientifiques d'institutions de recherche, des programmes nationaux de lutte contre le paludisme et de l'OMS se sont réunis en Juin 2008, à Libreville (Gabon) pour élaborer le premier projet de document intitulé «procédures opérationnelles standardisées (SOP) pour la surveillance des vecteurs dans le cadre de la surveillance intégrée des maladies et la gestion intégrée des vecteurs ». Le Projet de document a été finalisé par deux consultants et envoyé aux 7 pays pilotes pour être testé sur le terrain.

A cet effet, le Sénégal, à l'instar des autres pays pilotes a élaboré son document SOPs orienté plus particulièrement sur la lutte contre les vecteurs du paludisme. Les domaines abordés dans ce document sont :

- la surveillance et suivi des populations de vecteurs ;
- la susceptibilité des vecteurs et l'efficacité des insecticides

Surveillance et Suivi des populations de vecteurs

La surveillance des vecteurs comprend diverses activités d'identification et de suivi de la dynamique des populations des vecteurs. Ces activités sont effectuées à un rythme variable selon les objectifs visés et les ressources disponibles. Le but de la surveillance est d'identifier les facteurs déterminants et de suivre les variations temporelles et spatiales de la composition, des comportements, de la densité, de l'âge moyen et de l'infection des populations de vecteurs. Ce suivi est fait par la prospection de leurs gîtes larvaires et l'échantillonnage de leurs populations d'adultes au niveau de sites sentinelles.

La surveillance est un processus de collecte régulière et systématique des données en vue d'une prise de décisions opérationnelles.

Différence entre suivi et surveillance

Le suivi est une surveillance appliquée à une intervention de lutte, sa fréquence est en général plus rapprochée et les sites plus nombreux.

La surveillance peut être effectuée au minimum avec deux passages par an dont un pendant la période de forte transmission et l'autre pendant la période de faible transmission. En dehors de ce schéma, des circonstances épidémiologiques particulières (augmentation du nombre de cas) peuvent conduire à un autre passage.

Contenu de la surveillance : composition de la faune vectorielle, comportements des vecteurs, densité vectorielle, longévité, infection des vecteurs, et sensibilité des vecteurs aux insecticides.

Contenu du suivi des vecteurs : composition de la faune vectorielle, comportements des vecteurs, densité vectorielle, longévité, infection des vecteurs, sensibilité des vecteurs aux insecticides, bio essais (efficacité de l'intervention et rémanence)

Objectif de la surveillance des vecteurs

L'objectif de la surveillance est de fournir les informations de base pour la sélection des mesures, des outils et de méthodes de lutte anti vectorielle.

Pourquoi mettre en place un programme de surveillance des vecteurs ?

Un programme de surveillance des vecteurs est nécessaire pour orienter :

- le choix des interventions à mettre en œuvre ;
- dans le choix des outils à utiliser lors des interventions ;
- orienter dans le choix de l'approche / stratégie de mise en œuvre.

Composantes de la surveillance des vecteurs ?

- Districts de santé abritant les sites sentinelles

- Critères

- les districts seront choisis en tenant compte de la stratification de la maladie dans chaque pays ;
- à l'intérieur de chaque district, les sites de surveillance seront fonction de la diversité écologique existant dans le district.

- Activités

- échantillonnage de la faune vectorielle (prospection larvaire, capture sur appâts humain/ animal, piège, faune résiduelle des habitations, faune extérieure, ...)

- traitement du matériel biologique (identification spécifique, état physiologique, âge physiologique, infection, anthropophilie, sensibilité des vecteurs aux insecticides)

- Comment utiliser les informations ?

- Le district fait un rapport mensuel qu'il envoie avec les échantillons conditionnés au laboratoire du PNLP. Ce dernier analyse les échantillons (cf. tableau) et envoie certains d'entre eux au NRU (PCR?) (cf. tableau). Le NRU fait deux rapports dans l'année au PNLP.
- Rétro information (Feed back) : Laboratoire du NRU au PNLP et Laboratoire du PNLP au District
- Prise de décision : Le NRU et le Laboratoire aident le PNLP à la prise de décision au vu des évidences.

- Que mesurer lors de la surveillance des vecteurs et où ?

- L'échelle géographique : district
- La surveillance sera faite à travers les sites sentinelles représentatifs des faciès épidémiologiques.

- Méthodes d'échantillonnage

Populations pré imaginale

La prospection des gîtes larvaires permet de suivre la composition spécifique, la fréquence et l'abondance des populations de vecteurs. La fréquence est le pourcentage des gîtes positifs (hébergeant au moins une larve et/ou nymphe de vecteur) et l'abondance est la densité des larves des vecteurs dans les gîtes positifs (nombre moyen de larves/nymphes par litre).

La prospection d'un gîte consiste à observer directement ou au besoin à prélever de l'eau du gîte pour la recherche de la larve/nymphe. Au minimum prélever 10 louchées, espacées d'une minute ou 10 louchées dont une tous les deux mètres. Pour

l'estimation de l'abondance des larves/nymphes, il faut prélever au moins 1 litre d'eau et décompter le nombre de larves/nymphes. Si le volume d'eau du gîte est inférieur à un litre, déterminer ce volume et décompter la totalité des larves/nymphes pour rapporter la densité à 1 litre.

Quelques bonnes pratiques de la prospection de gîtes larvaires :

- **géo référencier les sites**
- **bien se positionner par rapport au soleil**
- **éviter de trainer la louche en surface (coup rapide)**
- **utiliser de tamis de différentes mailles**
- **utiliser les plateaux et les pots de prélèvement**

La collecte des données est faite à l'aide d'une fiche (Tableau 1) portant pour chaque gîte, un numéro, le type/nature du gîte et les résultats de la prospection (positivité, densité).

Les prospections sont effectuées à chaque passage, mensuel, bimestriel, trimestriel ou semestriel, ou à un rythme permettant de couvrir une partie de la saison des pluies et de la saison sèche. Le suivi d'une lutte anti-larvaire (LAL) doit être effectué sur une base hebdomadaire.

Les larves mortes sont mises dans des tubes avec une solution d'éthanol à 70% et une étiquette portant les mentions utiles (au crayon). Les larves vivantes sont maintenues en vie pour obtenir des adultes ou tuées et conservées dans une solution d'éthanol à 70% pour être ultérieurement préparées et identifiées. Les résultats obtenus permettent d'apprécier la dynamique des populations pré imaginale des vecteurs.

Concernant le Paludisme et la Filariose lymphatique, la surveillance des vecteurs est effectuée dans les zones à risque d'épidémie et dans les zones en situation d'urgence, pour la collecte de données de base/référence avant une intervention de lutte anti-vectorielle (LAV). Pour les vecteurs d'arboviroses et d'onchocercose, la surveillance doit être faite dans les zones à risque.

FICHE DE COLLECTE DE LARVES

Pays Fiche N°
 Région Date/...../.....
 District Heure
 Localité
 Latitude/longitude
 Altitude
 Zone traité/non traité /
 Non de l'opérateur

Gîtes N°	Type de gîte surf. approx. ¹	Distance + proche habitation	Caractéristiques de l'eau		Soleil ³	Végét ⁴	Méthode de collecte ⁵	Gîtes prospectés		Nb de coups	Nb de larves ⁶	Larves par Litre	Espèces identifiées et Nb de larves par espèce ⁶					
			Stagnante Courante	Claire Trouble				Prof. approx. ²	Nb				+	-	Total	Par litre	Total	Par litre

¹ Source, ruisseau, marais, lit de fleuve, canal d'irrigation, puits sans margelle, empreint de pas, empreint de sabot, flaque d'eau de pluie, récipient, autres à indiquer
² Peu profond (<1m de profondeur) / profond (> 1m de profondeur)
³ Ensoleillé, semi-ombragé, ombragé
⁴ Sans/avec (émergente, flottante et espèce végétale prédominante si connue)
⁵ Dipping / filet, autres à spécifier et surface de collecte approximative
⁶ Entre parenthèse, larve L3 et L4 si une description détaillée est à faire

Populations imaginales (adultes)

L'échantillonnage des populations imaginales des vecteurs est fait par (1) la récolte matinale de la faune résiduelle des habitations, (2) la capture nocturne des femelles agressives et (3) l'utilisation de pièges. Le matériel biologique récolté est traité sur le terrain et au laboratoire pour l'identification spécifique, la détermination de l'état physiologique, de l'âge physiologique, des préférences trophiques et de la recherche d'infection.

La récolte de la faune matinale résiduelle

Elle est effectuée le matin (07h-09h) dans au moins 10 pièces/cases de chaque village sélectionné. Elle est faite par pulvérisation d'une solution de pyréthrinolide après étalement de draps blancs dans la pièce, pour recueillir les moustiques assommés par l'insecticide pulvérisé. Après une dizaine de minutes d'attente, les draps sont soigneusement sortis puis les moustiques récoltés à l'aide de pinces souples (au niveau des ailes ou pattes) et placés dans des gobelets ou des boîtes de Pétri dont le fond est garni d'une couche de coton imbibé d'eau sur laquelle est posée un papier filtre.

Des indications précises sont notées concernant le lieu, la date de récolte, le numéro de la concession et le numéro de la pièce, etc. Des précautions particulières sont prises avant l'aspersion d'insecticide. Tout en évitant de trop déranger les moustiques, la préparation des pièces suppose l'enlèvement des aliments, des petits objets et meubles, couvrir les ouvertures avec des chiffons ou draps, fermer les portes et fenêtres.

Les femelles de moustiques récoltées sont regroupées par genre ou espèce et sexe puis dénombrées. Les femelles de vecteurs sont ensuite classées selon leur état physiologique en femelles à jeûn, gorgées et gravides.

La capture de moustiques agressifs

Les captures nocturnes sur homme sont faites de 20h à 06h, par des agents formés pour cela. A chaque point de capture, deux agents se relaient au cours de la nuit (par heure ou entre la première et la seconde partie de la nuit). Chaque agent est équipé d'une lampe torche, de tubes à hémolyse, de coton et de sacs portant mention du point (intérieur ou extérieur) et de la tranche horaire de la

capture. Il prélève avant la piqûre les moustiques venus se poser sur ses jambes dénudées. Assis dans l'obscurité, il allume sa lampe dès qu'il sent le contact d'un moustique qu'il doit capturer avant qu'il ne le pique, avec un tube à hémolyse qu'il bouche avec du coton. Le tube est introduit dans la sacoche correspondant à l'heure et au point de capture. La capture est effectuée dans chaque village et à chaque passage, au cours de 2 nuits successives, dans au moins deux concessions (sites/points de capture). Dans chaque site, la capture est faite à l'intérieur d'une chambre/case et à l'extérieur (véranda). Une rotation des captureurs doit se faire d'un jour à l'autre en fonction des lieux et des heures de captures,

La capture nocturne à l'aide de pièges

Différents types de piège sont utilisés selon les objectifs de l'étude.

Des pièges lumineux de type «CDC miniature light trap» peuvent être placés tant à l'intérieur des cases qu'à l'extérieur (sous les vérandas, au niveau des étables, à proximité des gîtes larvaires ou ailleurs). Ces pièges peuvent être associés ou non à des appâts (dormeur, animal ou autre source de CO₂).

Des animaux placés sous une moustiquaire aux bords inférieurs situés à 5-20 cm du sol peuvent être utilisés directement comme appât.

Des pièges de sortie (fenêtre) peuvent également être utilisés pour récolter les moustiques qui quittent les cases au cours de la nuit ou au matin.

Le nombre de ces pièges est fonction des capacités de gestion des récoltes. Les pièges fonctionnent au cours de la nuit (19 h à 06h). Si nécessaire, les récoltes peuvent être prélevées une ou plusieurs fois durant la nuit.

La collecte des moustiques adultes permet de déterminer la densité (abondance) des populations

de vecteurs et de suivre leur évolution dans l'espace et dans le temps. Divers indicateurs peuvent être suivis dans ce cas (taux d'agressivité, densité au repos, densité moyenne par nuit et par piège selon type et emplacement...). La mesure de ces indicateurs est essentielle pour la détermination des comportements de piqûre et de repos des vecteurs, l'estimation des niveaux de la transmission et le suivi de l'effet de la LAV.

La récolte à l'extérieur

Les moustiques exophiles peuvent être recherchés et récoltés à l'extérieur, dans des abris naturels (végétation ou creux d'arbres, terriers, etc.) ou des abris artificiels (puits de Muirhead-Thompson).

Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients. Et le choix dépend des objectifs de l'étude, de l'environnement et des moyens disponibles.

Traitement du matériel récolté

Sur le terrain

Les femelles de moustiques sont identifiées (genre et espèce) d'après leurs caractères morphologiques et dénombrées par espèce (tableaux xx et yy). Seules les femelles de vecteurs du paludisme sont disséquées pour la détermination de l'âge physiologique. La dissection des ovaires consiste à les extraire de l'abdomen du moustique dans une goutte d'eau distillée. Les ovaires sont ensuite séchés (à l'air libre) puis observés au microscope optique (objectif x 10) pour voir l'état des trachéoles (pelotonnées chez les femelles nullipares et déroulées chez les pares). La dissection concerne aussi bien les femelles endophiles que les femelles agressives. A chaque passage dans chaque village, la totalité ou au moins 100 femelles agressives doivent être disséquées.

Les femelles de vecteurs non disséquées et le reste des femelles disséquées sont placés dans des microtubes contenant: un dessiccateur et portant un numéro correspondant à celui du moustique sur la fiche de terrain. Les têtes et thorax serviront pour la recherche de l'antigène circumsporozoïtique et le reste de la femelle pour l'identification de l'espèce (pour le complexe *An. gambiae*). Le sang provenant de l'abdomen des femelles gorgées est étalé sur du papier filtre Wathman pour obtenir des spots qui seront analysés au laboratoire pour identifier l'origine

du repas (bien conservé les papiers filtres : silicagel ; au frigo, .etc.). Les données collectées sur le terrain concernant l'identification (genre, espèce), la dynamique des populations (densité, état et âge physiologiques) et les préférences trophiques, sont complétées ou affinées par celles issues d'analyses au laboratoire (identification, infection et sources des repas sanguins).

Conserver les moustiques morts

Les moustiques adultes sont tués avec un tampon de coton (avec quelques gouttes de chloroforme) posé sur le tulle moustiquaire du gobelet et une boîte de Pétri (en verre) au dessus. Il faut respecter les précautions d'usage pour la manipulation du chloroforme qui est un produit potentiellement dangereux. Les moustiques morts peuvent être séchés ou non avant d'être placés individuellement ou par petits lots, dans des tubes de 1,5 ml (numérotés) contenant un dessiccateur (silicagel) et acheminés au laboratoire.

Au Laboratoire

La recherche de l'antigène Circum-sporozoïtique est réalisée par la méthode ELISA CSP. La technique utilisée est basée sur la recherche de l'antigène CSP par des anticorps monoclonaux spécifiques de *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*.

La détermination de l'origine des repas de sang est basée sur des caractères sérologiques du plasma (recherche d'immunoglobuline G ou IgG). La méthode ELISA utilisée consiste à faire agir sur les repas sanguins, des anticorps spécifiques d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval, chien et porc). Ces anticorps sont marqués par une enzyme (péroxydase) et en présence du substrat de cette dernière, une réaction colorée révèle la présence de l'IgG à identifier.

La différenciation des espèces du complexe *An. gambiae* est réalisée par la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique PCR permet de connaître la proportion de chaque espèce dans les récoltes quelle que soit la méthode d'échantillonnage utilisée.

Les différentes données collectées permettent pour chaque espèce de vecteur, de déterminer le taux d'inoculation entomologique (TIE) et la capacité vectorielle, à chaque passage, la saison de transmission, l'année ou pour la période d'étude.

FICHE DE COLLECTE DES MOUSTIQUES AU REPOS

Etat physiologique des femelles récoltées

Pays Fiche N°
 Région Date/...../.....
 District Heure
 Latitude/longitude Localité
 Equipe Altitude
 Zone traité/non traité /

N°	<i>A.gambiae</i>			<i>A. funestus</i>			A.			A			<i>Culex</i>			<i>Aedes</i>			<i>Mans</i>		
	Aj	Go	Gr	1/2GO	Male	Aj	Go	Gr	1/2GO	Aj	Go	Gr	Aj	Go	Gr	Aj	Go	Gr		male	
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					

N	CONCESSION	PROPRIETAIRE	M/T	STATUT	MOUSTIQUAIRE		
					Non	NT	T
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

FICHE DE CAPTURE DE NUIT SUR APPAT HUMAIN

Pays Fiche N°
 Région Zone traité/non traité Date/...../.....
 District Point de capture
 Localité Nuit de capture N° Altitude
 Distance du plus proche gîte Equipe.....

Tranche Horaire	Intérieur				Extérieur (0) ¹				Pares (Total disséqué)		Remarque ³ (F)	
	Total anophèle collecté (F)	An. vecteurs		Autres An.		Culicines	Total anophèle collecté (F)	An. vecteurs		Culicines		
		A0 ²	A1 ²	A2/2 ²			A0	A1			A2
20h-21h												
21h-22h												
22h-23h												
23h-00h												
00h-01h												
01h-02h												
02h-03h												
03h-04h												
04h-05h												
05h-06h												
Total												

¹ Distance par rapport au point de capture intérieur

² A0 = *An. funestus* ; A1 = *An. gambiae* s.l. ; A2 = *An. pharoensis* ; A3 = *An. coustani/zeimani* ; A4 = ; A5 = *An. rufipes*, A6 = *An. niti* ; A7 = *An. wellcomei* ; A8 = *An.*

³ Remarque : vent = V ; vent fort = VF ; vent modéré = VM ; pluie = P ; forte pluie = PF ; pluie modérée = PM ; Mentionné les femelles gravides et les nouvelles émergences venues se gorgées, la température (T°C) et l'humidité relative HR% s'ils ont été enregistrés

FICHE DE CAPTURE PAR PIEGE

Pays Fiche N°
 Région Date/...../.....
 District Piège N°
 Localité Nuit de capture N° Pluie¹ :
 Latitude/longitude Vent¹ :
 Equipe Insecticide utilisé
 Intérieur (Int) / Extérieur (Ext) Distance du plus proche gîte

Zone traité/non traité

Date du dernier traitement
 Insecticide utilisé
 Distance du plus proche gîte

Tranches horaires	Spécimens collectés					Etat physiologique			Etat trophique			P/TD		
						Vivants	Morts	Total	AJ	Go	S-Gr		Gr	
1 ^{ère} tranche	anophèles vecteurs	A0 ²												
		A1 ²												
		A2 ²												
	anophèles non vecteurs	A ³												
	 ²												
	 ²												
	 ²												
	culicines	Cx												
		Ae												
		Ma												
	Autres													
	Total par piège													
2 ^{ème} tranche	anophèles vecteurs	A0 ²												
		A1 ²												
		A2 ²												
	anophèles non vecteurs	A ²												
	 ²												
	 ²												
	 ²												
	culicines	Cx												
		Ae												
		Ma												
	Autres													
	Total par piège													
	Total général													

¹ Fort ou Modéré

² A0 = *An. funestus* ; A1 = *An. gambiae s.l.* ; A2 = *An. pharoensis* ; A3 = *An. coustani/zeimani* ; A4 = *An. squamosus* A5 = *An. rufipes*, A6 = *An. nili* ; A7 = *An. wellcomei* ; A8 = *An.*

CAPTURE DE NUIT

Date :
 Localité :
 Opérateurs :

T°C 21H :
 T°C 01H :
 T°C 07H :

INTERIEUR		COULEUR SACS				CONCESSION				CHAMBRE			
		Type d'habitat		Dur esp. toit		Baraque		Nbre occupant		REMARQUES			
HEURES	Total	<i>An gambiae</i>				<i>An funestus</i>				DIVERS			
	Ano	Tot	P	NP	Dis	Tot	P	NP	Dis	Tot	P	NP	Dis
19h-20h													
20h-21h													
21h-22h													
22h-23h													
23h-00h													
00h-01h													
01h-02h													
02h-03h													
03h-04h													
04h-05h													
05h-06h													
06h-07h													
Total													

FAUNE RÉSIDUELLE

Date :
 Localité :
 Opérateurs :
 NATURE DE LA FAUNE:.....
 HEURE :

STATUT	TYPE D'HABITAT		CONCESSION		INSECTICIDES		
	Dur étanche Dur espace toit Dur esp. Porte-fenetre	Baraque Banco/Tôle Banco/Chaume Nombre occupant	An. funestus		Autres		
	SEMI GRAVIDE	NON GORGE	GORGES	SEMI GRAVIDE	NON GORGE	GORGES	NON GORGE
Moustiquaire Simple Imprégné Sans							
<u>TOTAL</u>							

Susceptibilité des vecteurs et efficacité des insecticides

Les tests pour l'évaluation de la sensibilité/résistance des vecteurs aux insecticides peuvent être effectués sur des larves ou des adultes. Cependant, du fait de la faible utilisation des mesures de lutte anti larvaire dans les Programmes de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en Afrique, l'utilisation des moustiques adultes est préférable pour les tests.

Les techniques utilisées varient suivant l'espèce et ses différents stades, de l'immersion dans des solutions de différentes concentrations d'insecticide (larves de moustiques et de simules), aux applications topiques (mouches, glossines) et aux contacts avec des papiers imprégnés de différentes concentrations d'insecticide (adultes de moustiques, mouches, glossines, phlébotomes).

En général jusqu'à maintenant, les tests de sensibilité aux insecticides des moustiques adultes sont effectués en utilisant les kits de l'OMS. D'autres méthodes sont cependant disponibles dont certaines ont été récemment évaluées. Une de ces méthodes est celle de la bouteille d'essai mise au point récemment par le CDC d'Atlanta (Center for Disease Control). La bouteille d'essai et le kit de l'OMS pour le test, récemment utilisés au Kenya, présentent une fiabilité similaire. La bouteille d'essai a été testée sur le terrain essentiellement parce que le système OMS d'acquisition des kits et des papiers imprégnés n'a pas bien fonctionné (longs délais pour la réception des commandes, difficultés de paiement, coûts...) Néanmoins, il est largement admis que l'utilisation du kit de l'OMS pour le test de sensibilité des vecteurs est la méthode la plus pratique pour une surveillance de routine.

Concentrations Diagnostiques (Concentrations discriminatoires)

La concentration diagnostique est celle qui pour un insecticide donné entraîne une mortalité de 100% parmi les spécimens d'une espèce de vecteur donnée. Une concentration diagnostique (concentration discriminatoire) correcte pour un insecticide donné doit être déterminée pour la surveillance de la résistance de chaque espèce de moustiques. Pour tester la sensibilité à un insecticide donné, il est parfois difficile d'obtenir le nombre de moustiques requis pour réaliser le test avec la gamme complète de concentrations : un nombre important de moustiques est nécessaire pour déterminer la LC 50 (concentration de l'insecticide qui tue 50% des spécimens), la LC 95 et la limite supérieure de la LC 100. Les centres collaborateurs déterminent en général les concentrations diagnostiques (concentrations discriminatoires) en cherchant pour un insecticide donné, l'effet sur différentes souches d'une espèce connue comme sensible (absence de gène de résistance). En tenant compte des variations inévitables dans les résultats, de nombreux comités d'Experts de l'OMS ont admis que les concentrations diagnostiques doivent être

déterminées comme le double de la concentration la plus faible qui entraîne systématiquement une mortalité de 100% pour l'espèce considérée. C'est pour cela que la concentration diagnostic est utilisée pour la surveillance de routine. En considérant que la concentration diagnostique est l'outil le plus pratique et fiable pour la surveillance de la résistance, la précision de ces concentrations est d'une importance capitale. Une fois déterminées, le comité d'Experts de l'OMS approuvera des concentrations diagnostiques provisoires. Les concentrations de 5 insecticides (perméthrine, deltaméthrine, lambdacyhalothrine, cyfluthrine et etofenprox) sont en cours de finalisation.

L'utilisation de la concentration diagnostique ne permet pas de déterminer le niveau de la résistance, elle permet juste de détecter la présence d'une résistance. Quand plus de 5% d'un échantillon de moustiques survivent à l'exposition à une concentration diagnostique, on dit qu'il y a résistance. Dans ce cas, la gamme complète de tests incluant le test de sensibilité, les analyses biochimiques et moléculaires doivent être réalisées pour réunir le plus d'informations sur la résistance détectée, le niveau et les mécanismes impliqués.

Tests des larves de moustiques

Le test de la sensibilité des larves de moustiques est d'une valeur limitée pour la surveillance de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme. Les niveaux de la résistance chez les larves et chez les adultes ont tendance à différer en particulier concernant les pyréthrinoïdes qui ont un effet excito-répulsif sur les adultes. En tout cas, les tests sur les larves ne peuvent être réalisés hors des laboratoires spécialisés. Les tests de sensibilité doivent donc être réalisés exclusivement sur des moustiques adultes pour surveiller la résistance.

L'expérience de OCP montre clairement que la préparation des solutions d'insecticide un élément important dans la réussite des tests car les solutions éthyliques ne sont pas stables. En conséquence, cette expérience d'OCP, au moins pour ce qui concerne la préparation des solutions d'insecticides, doit être prise en compte dans le programme OMS de surveillance de la résistance.

Protocole standardisé de test de la sensibilité aux insecticides des moustiques adultes

C'est une technique normalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 1963) nécessitant un kit fourni par l'OMS. La sensibilité de base peut être déterminée en exposant à une concentration standard et à des temps variables, des lots de moustiques qui sont ensuite maintenus en observation pendant 24 heures avant la détermination du taux de mortalité.

Critères de choix des moustiques du test

Les anciennes directives de l'OMS pour les tests de sensibilité recommandaient l'utilisation de femelles "gorgées", récoltées sur le terrain. Cependant, des variations furent observées dans les résultats obtenus de tests effectués avec des pyréthrinoïdes. Des moustiques survivants malgré les concentrations diagnostiques utilisées et leur sensibilité antérieure aux pyréthrinoïdes. En plus, la sensibilité aux pyréthrinoïdes change dans le temps et dépend de l'état physiologique des moustiques. Pour obtenir des résultats fiables, il est fortement recommandé d'utiliser uniquement des femelles "non gorgées". Ces dernières doivent être âgées de 2 – 5 jours et issues de larves ou nymphes récoltées

sur le terrain ou de femelles sauvages gravides. En plus des problèmes de variation des résultats, il est beaucoup plus difficile d'échantillonner des femelles "gorgées" que des femelles "à jeun" car si les agents chargés de cette tâche ne sont pas très expérimentés, il y a une forte mortalité parmi les spécimens collectés. La collecte de lots de femelles de moustiques avec un taux de mortalité naturelle proche de celui obtenu dans un insectarium est difficile. C'est à cause de cela que le test avec des femelles âgées de moins de 2 jours qui sont les plus fragiles entraîne une augmentation de la mortalité. Et le test avec des femelles âgées de plus de 5 jours entraîne une forte variabilité dans les résultats. En conséquence, seules des femelles "à jeun" de 2 – 5 jours doivent être utilisés pour la surveillance de routine de la sensibilité aux insecticides.

Si pour une quelconque raison seules des femelles collectées sur le terrain sont utilisées, cela doit être mentionné sur les fiches de test et leur état physiologique précisé (à jeun, gorgé, semi-gravide, gravide). Là où les effectifs de moustiques sont faibles, de jeunes mâles (âgés de 2 – 5 jours) peuvent être testés car la sensibilité de ces derniers est similaire à celle des jeunes femelles. Là également, il faut bien préciser sur les fiches les nombres (proportions) de mâles et de femelles utilisés pour chaque test ou concentration testée. Il faut cependant insister sur l'importance d'utiliser exclusivement des femelles pour les tests de routine.

Conditions du test

Les tests avec le DDT et les pyréthrinoïdes ne doivent jamais être effectués dans des conditions de température supérieure à 30° C. L'idéal est de réaliser les tests dans les conditions de laboratoire avec une température autour de 25°C (+/- 2°C) et une Humidité Relative de 70-80 %. Après l'exposition, les spécimens sont mis en observation avec un tampon de jus sucré (5%) pendant 24 heures dans des conditions constantes de température et d'humidité. Toutes modifications de ces conditions doivent être mentionnées sur les fiches de test. La température et l'HR doivent être relevées au cours des périodes d'exposition et d'observation.

Le test doit être réalisé avec des lots de 20 à 25 femelles par tube. Les moustiques à tester sont prélevés un à un de leur cage avec un aspirateur à bouche et transférés dans les tubes d'attente (observation) pour une période de 1 à 2 heures, ce qui permet de supprimer du test tous les individus endommagés.

Détail sur la position des tubes

Il est fortement question de savoir si les tubes doivent être maintenus en position verticale ou horizontale pendant la période d'exposition. Cette question a été soulevée du fait de l'effet KD rapide observé avec les pyréthriinoïdes et du fait d'une survie possible des spécimens testés non à cause d'une résistance mais plutôt parce qu'ils n'ont pas absorbé une dose suffisante (létale) de l'insecticide avant leur KD. L'OMS recommande que les tubes soient maintenus en position verticale. La méthode doit être standardisée et les tubes dans cette position lors des tests avec des doses discriminatives ou de détermination de la sensibilité de base. L'avantage d'avoir des tubes en position verticale est de pouvoir dénombrer plus facilement les spécimens KD pendant la période d'exposition. Ce taux de KD est très simple à déterminer et ne demande aucun équipement complémentaire. En plus le kdr est un indicateur de résistance aux pyréthriinoïdes très sensible. Pour une période d'exposition d'une (01) heure, il suffit de soulever délicatement le tube d'exposition pour décompter les spécimens KD qui sont au fond. Ce décompte des KD peut être effectué après 10, 15, 20; 30; 40; 50 et 60 minutes (juste avant le transfert dans le tube d'observation). Si après 60 minutes, moins de 80 % de KD est observé, il faut faire un autre décompte de KD, 20 mn après le début de l'observation (80 mn après le début de l'exposition). Le décompte du KD à différentes périodes permet de déterminer la droite de régression sur papier log-probit et graphiquement les KD 50 et KD 95.

Nombre de moustiques par test

Dans la surveillance de routine, seules des concentrations discriminatives sont utilisées. Le nombre minimum de séries nécessaires est de 4 à 5 pour chaque concentration testée avec des lots de 20 à 25 spécimens soit 80 à 100 par test. Pour chaque localité de test, il faut tout faire pour répéter le test.

Composition du kit de test

Le kit de l'OMS pour le test doit être retenu comme kit de test standard. L'équipement et/ou les insecticides (PI) doivent être commandés séparément. Le kit comprend les éléments suivants :

- 12 tubes en plastique de 125 mm de long et 44 mm de diamètre: 5 tubes (avec une pastille rouge) sont utilisés pour l'exposition des

moustiques à l'insecticide, 2 (avec une pastille verte) sont utilisés pour les lots témoins et 5 (avec une pastille verte) comme tube de transfert et d'observation avant et après exposition. Chaque tube est fermé à un pôle avec un grillage en plastique.

- 6 lames de fermeture de tube avec un trou de 20 mm.
- 40 pièces de papier (12 x 15 cm) pour couvrir les tubes d'observation.
- anneaux de métal pour tenir en place le papier sur la paroi interne des tubes.
- les anneaux en acier doivent être utilisés uniquement pour les tubes d'observation et de témoins, les 5 anneaux en bronze pour les tubes d'exposition.
- 2 tubes aspirateurs de 12 mm de diamètre intérieur, avec un cordon de 60 cm et un embout.
- 1 rouleau de scotch.
- les fiches d'instruction, 20 fiches de rapport et 3 papiers de log-probit pour le tracé des droites de régression.

Détail de la Procédure

1. Introduire dans le tube d'observation une pièce de papier enroulée dans le cylindre et maintenue en position avec un anneau d'acier. Ajuster (visser) la lame de fermeture du tube.
2. Collecter environ 200 femelles de moustiques avec l'aspirateur (Fig. IA). Les moustiques doivent être prélevés un à un (Fig. IB) et délicatement transférés dans le tube d'observation à travers le trou de la lame / tube (Fig. IC), il faut 20 - 25 moustiques par tube. Toute autre méthode de prélèvement et de transfert des moustiques n'entraînant pas une mortalité excessive des spécimens peut être utilisée
3. Une période d'observation d'environ 1 heure, avant le test est retenue pour s'assurer que des spécimens endommagés ne sont pas inclus dans le lot à tester. Pour cela, enlever tous les mal en point à l'issue de la période d'observation pré-test.
4. Introduire dans le tube d'exposition une pièce de PI, enroulée dans le cylindre et maintenue par un anneau en bronze.
5. Ajuster (visser) le tube d'exposition à la lame de fermeture du tube d'observation des

spécimens du test (Fig. ID). Faire glisser la lame pour permettre le passage des moustiques du tube d'observation au tube d'exposition. Pousser (souffler) délicatement les moustiques vers le tube d'exposition. Pousser la lame pour fermer le bout du tube d'exposition. Détacher le tube d'observation.

6. Reposer le tube d'exposition pour la période de contact souhaitée (Fig. IE) dans les conditions de lumière diffuse modérée, de température et de HR adéquates.

7. A la fin de la période d'exposition, transférer les moustiques dans le tube d'observation en faisant l'opération inverse de la procédure 5 (FIG ID). Si certains spécimens sont assommés pendant la période d'exposition, ils doivent être délicatement dégagés de la lame de fermeture en tenant le tube horizontalement, avant de faire coulisser la lame pour l'ouverture et le transfert dans le tube d'observation. Placer ensuite le tube d'observation en position avec un tampon de jus sucré sur le grillage du pôle supérieur (Fig. IF).

8. Garder les tubes d'observation pendant 24 heures dans un espace sombre à température adéquate (< 30 °C). Là où c'est possible, les températures maxi et minimale sont relevées. Si cela est nécessaire, les tubes sont protégés contre les fourmis en les plaçant sur une plateforme au dessus d'un récipient contenant de l'eau. Dans des conditions particulières de chaleur et de sécheresse, on peut suspendre un tissu imbibé d'eau dans la pièce d'observation pour relever l'humidité.

9. Les moustiques morts sont décomptés au bout des 24 heures d'observation. Les spécimens assommés ou qui ont perdus des pattes et qui ne peuvent se relever sont également comptés comme morts. Enlever ensuite les morts du tube. Pour faciliter le décompte des spécimens vivants, on peut les transférer dans un gobelet où ils seront endormis avec du chloroforme ou de l'éther ou secouer légèrement le tube pour les assommer.

Ne jamais utiliser du chloroforme ou de l'éther pour endormir des moustiques qui sont dans les tubes d'exposition ou d'observation qui risquent d'être endommagés (plastique). Les résultats sont portés sur les fiches de test.

10. Chaque série de test consiste à utiliser 5 tubes d'exposition et 1 tube témoin. Au moins deux séries de test sont nécessaires pour une localité donnée.

11. On déterminera par la suite les taux de mortalité observés dans les lots testés et dans les lots témoins. Si la mortalité dans les lots de témoins est comprise entre 5 et 20%, la mortalité observée dans les lots testés doit être corrigée par la formule d'Abbott :

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{\text{Mortalité test} - \text{Mortalité témoin} \times 100}{100 - \text{Mortalité témoin}}$$

12. Toutefois si la mortalité dans le lot témoin dépasse 20%, le test ne peut être validé mais les résultats doivent être enregistrés. Les causes de mortalité dans le lot témoin doivent être recherchées et évitées. La collecte de moustiques de locaux traités aux insecticides est cependant fortement suspectée comme une cause de mortalité de témoins. Il est alors plus judicieux de collecter des spécimens à tester dans des zones non traitées ou d'utiliser des spécimens issus de larves d'élevage.

Interprétation des résultats

Les centres collaborateurs de l'OMS font en général ce travail, en déterminant pour chaque espèce et insecticide, la concentration diagnostique (concentration discriminatoire) en cherchant pour chaque insecticide, l'effet sur différentes souches d'une espèce connues comme sensibles (absence de gène de résistance).

La sensibilité d'un insecte à un pesticide est évaluée par la détermination des concentrations létales (CL 50 et CL 95), tuant respectivement 50 et 95% des spécimens testés. Ces valeurs sont déterminées sur des papiers log-probit ou avec un logiciel spécifique. On parle de résistance lorsque la CL 50 augmente de 10 fois chez les larves, 5 fois chez l'adulte. Quand plus de 5% d'un échantillon de moustiques survivent à l'exposition à une concentration diagnostique, on dit qu'il y a résistance. Les bases d'interprétation des résultats des tests de sensibilité sont très variables mais on admet, qu'une population est sensible, tolérante ou résistante selon le taux de mortalité des spécimens testés :

Statut	Test d'au moins 80 spécimens	Test de 20 à 79 spécimens
Sensible	98 – 100%	98 – 100%
Résistance Suspectée (Tolérance)	95 - 97	80 à 97%
Résistance	Inférieur à 95%	Inférieur à 80%

Ces critères supposent également que la dose diagnostique soit correcte pour l'espèce étudiée. Si la dose est trop élevée, comme c'était le cas pour la Lambdacyhalothrine, la résistance est sous estimée. Si la dose est trop faible, comme c'était le cas pour la Permethrine, la résistance est surestimée.

Dans le cas de résistance, les analyses biochimiques et moléculaires doivent être réalisées pour réunir le plus d'informations sur la résistance détectée, le niveau et les mécanismes impliqués.

Remarques Générales

1. Comparativement au DDT, la Dieldrine ou les Organophosphorés, les faibles concentrations de pyréthriinoïdes sont plus appropriées pour les tests de sensibilité. C'est pour cela que l'OMS a recommandé l'utilisation de PI pour plus de 20 tests est excessive. Le même PI ne devrait pas être utilisé plus de 3 fois dans les tests de routine. Dans les cas exceptionnels, le même PI pourrait être utilisé au plus 5 fois en le précisant sur les fiches de test. Les PI peuvent être conservés dans les tubes de test à la température ambiante (avec climatisation) durant la période des séries de test. Entre deux séries de test, les PI doivent être rangés dans leurs emballages d'origine correctement fermés et gardés au réfrigérateur.
2. Après avoir enlevé le PI, l'emballage contenant les PI non utilisés doit être rapidement bien refermé avec du scotch. Une conservation prolongée à une température élevée doit être évitée et les PI ne doivent pas être utilisés au delà de la date d'expiration mentionnée sur les emballages. La date d'expiration n'est valable que si l'emballage est toujours bien refermé après ouverture.
3. L'exposition à des concentrations élevées de pyréthriinoïdes entraîne généralement la perte d'une ou de plusieurs pattes de moustiques encore vivants. Il est recommandé que les moustiques capables de voler après les 24

heures d'observation, soient décomptés parmi les vivants quel que soit le nombre pattes perdues.

Contrôle de la qualité de l'application / efficacité de l'insecticide

Le contrôle de l'efficacité des AID et de la rémanence peut être réalisé sur les surfaces traitées. Les essais biologiques (bio essais) sont effectués suivant le protocole OMS avec des cônes. Les tests sont faits avec des femelles de 3-5 jours d'*Anopheles gambiae* s.s. (souche sensible entretenue en insectarium dans au moins 6 pièces d'habitation par site/village (5 pièces traitées et une pièce contrôle non traitée). Le choix des pièces dans les villages est fait par tirage au sort et les pièces retenues sont maintenues pendant toute la période du suivi de l'efficacité.),

Pour les lots tests, trois cônes sont placés dans chaque pièce à tester et les spécimens de la souche sensible mis dans les cônes, en contact avec la surface traitée (exposés), pendant la durée de l'exposition (test). Après l'exposition, ils sont retirés des cônes pour être placés dans des gobelets avec un tampon de jus sucré, rangés dans un endroit frais et isolé, pour une période d'observation de 24 heures. La détermination du taux de mortalité (observée et corrigée) est faite comme pour les tests de sensibilité aux insecticides.

L'emplacement des cônes sur les murs est changé à chaque passage, afin d'éviter un éventuel effet de la fixation du cône sur la couche d'insecticide appliquée. Pour les lots contrôles, 4 cônes sont placés dans une ou deux chambres non traitées par village et par passage. Le nombre de moustiques exposés par cône est de 10 et la durée de l'exposition de 30 minutes.

Paramètres entomologiques, indicateurs et protocoles d'étude

Paramètres	Indicateurs	Périodicité de la collecte	Méthodes
Populations larvaires	Nature des gîtes, présence/absence de larves	Dépend de la pluviométrie ; objectif	Prospection et prélèvements
	Composition spécifique, abondance & fréquence		
Populations adultes			
Echantillonnage	Taux d'agressivité pour l'homme (TAH)	2 nuits successives/mois	AHN ; PL FMR
	Densité au repos à l'intérieur (DRI)		
Inventaire faunistique	Composition spécifique des adultes	Tous les mois	AHN ; FMR ; PL
Densité vectorielle ¹	TAH : Nombre de piqûres/homme/nuit		AHN ; PL
	DRI : Nombre de femelles par case		F MR
Comportements de piqûres	Endophagie, exophagie		AHN ; PL
Comportement de repos	Endophilie, Exophilie		FMR
Etat physiologique	Proportions de felles à jeun, gorgées et gravides		FMR
Age physiologique	Taux de parturité		AHN ; PL
Préférence trophique	Anthrophilie		F MR
Infection des vecteurs	Indice circumsporozoïtique		AHN ; FMR ; PL

Paramètres	Indicateurs	Périodicité de la collecte	Protocole/méthodes	Système d'appui
Population larvaires	Composition spécifique (larves), abondance fréquence	Mensuelle	Dipping*	District**, laboratoire PNL P
Composition des espèces de la faune adulte	Composition spécifique des adultes, fréquence	Mensuelle	Morphologie, PCR (la totalité ou au moins 150)	District**, laboratoire PNL P/NRU
Densité vectorielle ¹	Densité agressive, densité par case, densité/pièges	Mensuelle	Appât humain (2 homme-nuit), pièges /lumineux (2pièges/nuit), faune résiduel (au moins 10 cases)	District**,
Comportements de piqures	Endophagie, exophagie	Mensuelle	Interprétation	Labo PNL P
Comportement de repos	Endophilie, Exophilie	Mensuelle	Interprétation	Labo PNL P
Préférence trophique	Anthrophilie	Mensuelle	ELISA (150)	Labo PNL P
Infection des vecteurs	Indice circumsporozoitique	Mensuelle	ELISA (150)	Labo PNL P
sensibilité des vecteurs aux insecticides.	Knock down*, mortalité,	Biennale	Interprétation	District**, laboratoire PNL P, NRU
Mécanisme de résistance	Mécanisme	Biennale	Interprétation	NRU

* prospection larvaire Prospection larvaire : rechercher les gîtes potentiels * rizières, mares, barrages (au moins 30 louchées), trous d'emprunt de terre, flaques (10 louchées), autres (exhaustif),

1 : temps de passage : 2 nuits/mois pour les captures, la durée de passage pour l'activité mensuelle peut varier de 2 à 5 jours (Un jour par site pour le monitoring) ,

** 2 agents a former qui formeront ensuite les relais communautaires

TESTS DE SENSIBILITE DES MOUSTIQUES ADULTES SELON LA PROCEDURE DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Enquêteur:.....
Nom & adresse de l'Institut :.....

Informations géographiques

Pays :.....Région..... District:.....
Localité/Village :.....
Coordonnées Géographiques: Latitude :.....Longitude :.....(si disponibles)
Altitude:.....Principales cultures :.....
Brève description de la zone
.....
.....

Principaux insecticides utilisés dans la zone :

pour l'imprégnation des moustiquaires :..... et depuis quand ?.....
pour la pulvérisation intra domiciliaire :.....et depuis quand ?.....
pour la lutte anti larvaire :.....et depuis quand ?.....
en agriculture :.....
..... et depuis quand ?.....

Informations sur l'échantillon

Espèces testées :.....Membre du complexe.....(si disponible)
Sexe :.....Age (jours):.....(si possible)
Etat physiologique : A jeûn /...../ Gorgée /...../ Semi-gravide /...../ Gravide /...../
Méthodes d'échantillonnage: F1 de larves sauvages /.../ Capture sur homme /.../
Récolte de la faune résiduelle des habitations /...../ Autre (spécifier) /...../
.....
S'il s'agit de F1 de larves sauvages, préciser le type de gîte.
.....
.....

Informations sur l'Insecticide

Insecticide testé :.....Concentration :.....
Papier imprégné préparé par :.....Date d'imprégnation :.....
Date d'expiration :.....Date de sortie du papier de l'emballage :.....
Nombre d'utilisations antérieures:.....
Conditions de conservation : Température ambiante :.....°C
Réfrigéré à :.....°C

Conditions du test

Date du test:.....Temps d'exposition (minutes).....

	Température de.....à	Humidité Relative de.....à
Période d'exposition		
Période d'observation		

Résultats du Test

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Total des moustiques testés	Nombre de moustiques du lot témoin
Nombre de moustiques testés						
Nombre de moustiques abattus (KD) après une exposition de : *:						
10'						
15'						
20'						
30'						
40'						
50'						
60'						
80'						
Nombre de moustiques morts à la fin de la période d'observation						
Mortalité observée (%)						
Mortalité corrigée (%)						
Espèce des survivants **						
Mécanisme(s) de résistance **						

* pour le DDT et les pyréthriinoïdes seulement

**= là où c'est possible

Adresse