REPUBLIQUE DE SAO TOME ET PRINCIPE

GUIDE DE SURVEILLANCE DES INDICATEURS POUR LA LUTTE INTEGREE CONTRE LES VECTEURS

PROCEDURES STANDARDISEES POUR LA SURVEILLANCE DES VECTEURS DE MALADIE DANS LE CONTEXTE D'UNE SURVEILLANCE ET D'UNE GESTION INTÉGRÉES DES MALADIES A TRANSMISSION VECTORIELLE

Patrick BITSINDOU
Consultant Entomologiste
Contact : (242) 055 588 340 / 068 946 578
Mail : pbitsindou@yahoo.fr

São Tomé et Principe, Août-Septembre 2018

Table des matières	
1. Introduction	Page 5
2. Justification de la Surveillance et Suivi des populations de vecteurs	Page 5
3. Objectifs de la surveillance des vecteurs	Page 7
4. Les principaux indicateurs de la surveillance des vecteurs	Page 7
4.1. Méthodes d'échantillonnage	Page 7
4.1.1. Populations pré-imaginales (stades aquatiques)	Page 7
4.1.2. Populations imaginales (adultes)	Page 8
4.1.2.1. La collecte de la faune matinale résiduelle	Page 9
4.1.2.2. La capture de la faune agressive	Page 10
4.1.2.3. La capture à l'aide de pièges	Page 10
4.1.3. Traitement du matériel collecté	Page 11
4.1.4. Conditions de conservation des moustiques sur le terrain (transport vers le laboratoire du PNLP)	Page 13
4.2. Les MIILDA	Page 13
5. Susceptibilité des vecteurs et efficacité des insecticides	Page 14
5.1. Concentrations diagnostiques (concentrations discriminatoires)	Page 14
5.2. Tests de susceptibilité des larves de moustiques	Page 14
5.3. Protocole standardisé de test de la sensibilité/résistance aux insecticides des moustiques adultes	Page 15
5.3.1. Critères de choix des moustiques du test	Page 15
5.3.2. Conditions du test	Page 15
5.3.3. Détails sur la position des tubes	Page 15
5.3.4. Nombre de moustiques par test	Page 16
5.3.5. Composition du kit de test	Page 16
5.3.6. Détails de la procédure	Page 16
5.3.7. Interprétation des résultats	Page 17
6. Contrôle de la qualité de l'application / Efficacité de l'insecticide	Page 18
Annexes	Page 19

LISTE DES ANNEXES	
Annexe 1 : Cycle biologique des Culicidés (moustiques)	Page 20
Annexe 2 : Caractères distinctifs des différents groupes de Culicidés (1)	Page 21
Annexe 3 : Caractères distinctifs des différents groupes de Culicidés (2)	Page 22
Annexe 4 : Imago d'*Anopheles gambiae sl*	Page 23
Annexe 5 : Etats physiologiques du moustique femelle	Page 24
Annexe 6 : Dissection des glandes salivaires	Page 25
Annexe 7 : Dissection des ovaires	Page 26
Annexe 8 : Ovaire nullipare et ovaire pare	Page 27
Annexe 9 : Collecte de larves dans un gîte	Page 28
Annexe 10 : Capture de la faune agressive sur appât humain	Page 29
Annexe 11 : Capture de la faune résiduelle au pyrèthre ou "spray catch"	Page 30
Annexe 12 : Piège lumineux ou "CDC miniature light trap"	Page 31
Annexe 13 : Piège de sortie ou piège fenêtre	Page 32
Annexe 14 : Capture de la faune agressive avec appât sous double moustiquaire	Page 33
Annexe 15 : Piège extérieur : Abri-tranchée ou puits de Murhied-Thompson	Page 34
Annexe 16 : Exercices d'application pour la détermination des indicateurs de surveillance des vecteurs	Page 35
Annexe 17 : Corrigé des Exercices d'application pour la détermination des indicateurs de surveillance des vecteurs	Page 37
Annexe 18 : Fiche de capture de la faune agressive	Page 39
Annexe 19 : Test de sensibilité des moustiques adultes selon la procédure de l'OMS	Page 40
Annexe 20 : Fiche de suivi des Bio-Essais	Page 42
Annexe 21 : Histoire de l'utilisation des insecticides à Sao Tomé et Principe	Page 43
Annexe 22 : Fiche de suivi et de traitement des gîtes larvaires des anophèles vecteurs	Page 44
Annexe 23 : Fiche de capture par piège lumineux	Page 45
Annexe 24 : Fiche de collecte de la faune résiduelle des anophèles	Page 46

Abréviations
Bti : *Bacillus thuringiensis israelensis*
CDC : Center for Disease Control
CSP : Circum-Sporozoïte Plasmodium
ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GPS : Global Positioning System
IA : Indice d'Anthropophilie
IS : Indice Sporozoïtique
LAV : Lutte Anti-Vectorielle
OCEAC : Organisation pour la Coordination des Endémies en Afrique Centrale
OCP : Onchocerciasis Control Programme
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymeras Chain Reaction
PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
SIMR : Surveillance Intégrée des Maladies et Riposte
SOP : Procédures Opérationnelles Standardisées
TIE : Taux d'Inoculation Entomologique

1. Introduction

La surveillance des vecteurs est une composante intégrale de la planification, de la mise en œuvre, du suivi et de l'évaluation des interventions de lutte anti-vectorielle. Cependant, il est reconnu que la surveillance de routine des vecteurs est un maillon faible des programmes nationaux de lutte contre les maladies à transmission vectorielle.

Avec l'extension des activités de lutte anti-vectorielle par les programmes de lutte contre les maladies à transmission vectorielle, les informations à temps sur l'écologie, le comportement et la dynamique de population des espèces vectrices locales sont essentielles. Il est également fondamental d'évaluer l'efficacité des opérations de lutte contre les vecteurs et de prédire ou de détecter précocement les fluctuations inhabituelles des situations qui pourraient avoir des conséquences significatives sur la maladie.

Avec le regain d'intérêt pour la lutte anti-vectorielle, particulièrement dans l'optique de l'élimination du paludisme, il est impératif d'élaborer des procédures opératoires standard, avec une intégration des stratégies de surveillance des maladies à transmission vectorielle qui est largement appliquée dans la région africaine.

Pour cette raison, des scientifiques d'institutions de recherche, des partenaires, des personnes ressources, des programmes nationaux de lutte contre le paludisme et de l'OMS se sont réunis du 10 au 13 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 but du document est d'améliorer l'exécution des activités de surveillance des vecteurs des programmes nationaux de lutte contre la maladie par l'harmonisation des méthodes entomologiques existantes et des procédures de la SIMR (Surveillance Intégrée des Maladies et Riposte).

Ce document devrait être utilisé par les programmes nationaux de lutte contre les maladies à transmission vectorielle dans la région pour standardiser leurs activités de surveillance des vecteurs, afin d'améliorer les performances de la lutte contre les vecteurs et de réduire la transmission des maladies.

A cet effet, São Tomé et Principe, à l'instar de certains pays, a élaboré son document des procédures opérationnelles standardisées (SOP) **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

2. Justification de la Surveillance et Suivi des populations de vecteurs

La surveillance des vecteurs est la collecte, l'analyse, et l'interprétation de façon régulière et systématique des données entomologiques pour la planification, la mise en œuvre et l'évaluation des mesures de lutte contre les vecteurs. 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 permet : i) la diffusion à temps des données de surveillance aux responsables chargés de la lutte contre les vecteurs, ii) la prévention ou la prédiction et la détection précoce de la survenue des maladies transmises par les vecteurs et iii) une prise de décision basée sur l'évidence.

- **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. Son contenu comprend : la recherche de nouveaux gîtes, la

composition de la faune vectorielle, le comportement des vecteurs, la densité vectorielle, la longévité, l'infection des vecteurs, la sensibilité des vecteurs aux insecticides, les bio-essais (efficacité de l'intervention et rémanence).

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. Son contenu comprend : la collecte des larves pour obtenir des imagos pour les tests de sensibilité, la composition de la faune vectorielle, le comportement des vecteurs, la densité vectorielle, la longévité, l'infection des vecteurs et la sensibilité des vecteurs aux insecticides.

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

- **Composantes de la surveillance des vecteurs**
  - Les sites sentinelles : critères de choix
    - les districts abritant les sites sentinelles sont choisis en tenant compte de la stratification de la maladie dans le pays ;
    - à l'intérieur de chaque district, les sites de surveillance seront choisis en fonction de la diversité écologique existant dans le district.

A São Tomé et Principe, les six (6) districts de São Tomé et la Région Autonome de Principe (RAP) ont été retenus pour abriter les sites sentinelles.

En tenant compte de ce qui précède, dans chaque district, deux (2) localités ont été retenues comme sites sentinelles. Les localités retenues sont :

- district d'Agua Grande : Praia Gamboa et Madre Deus
- district de Mé-Zochi : Praia Melhao et Cruzeiro
- district de Lobata : Conde et Praia Micolo
- district de Lemba : Ponta Figo et Neves
- district de Cantagalo : Zandrigo et Ribeira Afonso
- district de Caue : Angolares et Emolve (Vila Clotilde)
- RAP : Rua Trabalhadores et Porto Real

  - Activités menées dans les sites sentinelles
    - l'échantillonnage de la faune vectorielle (prospection larvaire pour les tests de sensibilité du vecteur, capture sur appâts humain, capture à l'aide de piège lumineux). Afin de surveiller le comportement du vecteur, il serait opportun que la recherche de la faune résiduelle matinale reprenne ;
    - le traitement du matériel biologique qui jusque-là se fait au laboratoire du PNLP (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 et envoie éventuellement certains d'entre eux au centre de référence (OCEAC) pour les tests PCR / ELISA. Le centre de

référence (OCEAC) fait un rapport au PNLP.
- Rétro information (feed-back) : le centre de référence se doit de faire un rapport au PNLP et le PNLP se doit de faire un feed-back au District.
- Prise de décisions : selon les résultats, les institutions de recherche comme l'OCEAC (pour la sous-région) et les partenaires (OMS, UNICEF, PNUD, etc.) aident le PNLP à la prise de décision au vu des évidences et des recommandations.

3. Objectifs de la surveillance des vecteurs

- Fournir les informations de base pour la sélection des mesures, des outils et de méthodes de lutte anti-vectorielle. Ainsi, pour ce faire, les objectifs spécifiques incluent ce qui suit :
  - déterminer les changements dans la distribution et la densité de la population des vecteurs dans le temps ;
  - fournir les données entomologiques qui aideront dans l'évaluation des risques et dans la préparation contre les situations d'urgence et les épidémies de maladies à transmission vectorielle ;
  - recueillir des informations de base pour une sélection et une planification adéquates des interventions de lutte contre les vecteurs ;
  - évaluer l'impact de la lutte contre les vecteurs pour une prise de décisions et une mise en œuvre promptes et appropriées des interventions ;
  - fournir des bases factuelles pour le plaidoyer et la mobilisation des ressources.

La surveillance et le monitorage des vecteurs fourniront les bases factuelles nécessaires aux responsables des programmes de lutte contre les maladies pour planifier et évaluer les interventions y compris la détection et la réponse aux épidémies.

4. Les principaux indicateurs de surveillance des vecteurs

Cette section fournit une liste d'indicateurs standard qui peuvent être utilisés pour la détection, la prévention et l'évaluation des maladies transmises par les vecteurs.

Les indicateurs entomologiques sont analysés en utilisant les informations recueillies sur les fiches de collecte des données par des agents communautaires ou des entomologistes. Les indicateurs sont portés sur des fiches de collecte des données fournis au niveau du PNLP ou du district. De telles informations collectées sont résumées et présentées sous forme de tableaux, de figures ou de cartes. Quand les données sont ainsi présentées, l'information peut être rapidement comprise et il est plus facile de voir les modalités et les tendances. Une façon d'assurer l'analyse est de maintenir un registre de données au niveau des districts sanitaires.

Les indicateurs sont estimés séparément pour chaque espèce de vecteurs collectés.

4.1. Méthodes d'échantillonnage

4.1.1. Populations pré-imaginales (stades aquatiques: œufs ; larves et nymphes ou pupes)

La reconnaissance géographique comprend la localisation et la détermination de la taille des zones d'intervention et le repérage/observation de quelques gîtes larvaires. Elle permet donc de localiser les structures d'intervention ciblées, de sélectionner des sites sentinelles pour la collecte des données de base et pour le suivi et de préparer les opérations planifiées. Elle comprend, en plus de la délimitation des zones d'intervention, l'identification, le recensement et la cartographie des structures à traiter. Sur les cartes disponibles, les limites des localités sont précisées (GPS) de même que les repères (naturels et artificiels).

La prospection d'un gite consiste à observer directement ou au besoin à prélever de l'eau du gîte avec une louche pour la recherche des larves/nymphes. Au minimum prélever 10 louchées, espacées d'1 à 2 minute(s) ou 10 louchées dont une tous les deux mètres. Pour l'estimation de l'abondance des larves/nymphes, on peut :

- compter le nombre de louchées utilisées pour la collecte des larves/nymphes et décompter la totalité des larves/nymphes et rapporter la densité à 1 louchée. On peut déterminer le volume de la louche et rapporter la densité à 1 litre ;
- ou prélever au moins 1 litre d'eau et décompter le nombre de larves/nymphes. Si le volume d'eau du gite est inférieur à un litre, déterminer ce volume et décompter la totalité des larves/nymphes pour rapporter la densité à 1 litre.

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 gites 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).

- **Quelques bonnes pratiques de la prospection de gîtes larvaires**
  - géo-référencier les sites de suivi / surveillance ;
  - bien se positionner par rapport au soleil (l'ombre fait fuir les larves/nymphes vers le fond du gîte) ;
  - éviter de trainer la louche en surface (effectuer des coups rapides) ;
  - utiliser de tamis de différentes mailles ;
  - utiliser les plateaux et les pots de prélèvement.

Dans chaque site, le suivi (recherche et traitement avec le *Bti*) des gîtes larvaires est fait tous les jours de la semaine en dehors des deux jours (lundi et mercredi) réservés à la capture des moustiques adultes (imagos). La surveillance/supervision est faite à chaque passage des superviseurs du PNLP à la fréquence de deux fois par semaine par site.

La collecte des données est faite à l'aide d'une fiche (en Annexe : fiche de collecte de larves) portant pour chaque gîte, un numéro, la date de l'investigation, la date du dernier traitement avec le Bti, le type/nature du gîte et les résultats de la prospection (positivité, densité). Le décompte des larves de stade I, stade II, stade III, stade IV et des nymphes (pupes) collectées est fait distinctement.

Les larves collectées sont identifiées et/ou conservées pour obtenir des adultes (pour les tests de sensibilité aux insecticides). Les résultats obtenus permettent d'apprécier la dynamique des populations pré-imaginales des vecteurs, d'avoir des données de base/référence (avant et après une intervention de LAV) pour l'évaluation de l'impact des interventions d'épandage de Bti ou d'autres larvicides adéquats.
Pour les vecteurs d'arboviroses et d'onchocercose, la surveillance doit être faite dans les zones à risque.

- **Quels indicateurs peut-on déterminer lors du suivi des gîtes larvaires ?**
  - Nombre de larves de stade I, de stade II, de stade III, de stade IV et les nymphes (pupes)
  - Densité larvaire : nombre moyen de larves par louchée (déterminer le volume d'une louchée)

    - Densité larvaire = $\dfrac{\text{Nombre de larves et de nymphes collectées}}{\text{Total nombre de louchées}}$

  - Proportion de gîtes positifs : proportion de gîtes contenant des larves et/ou nymphes de vecteurs.

    - Proportion de gîtes positifs = $\dfrac{\text{Nombre de gîtes positifs}}{\text{Nombre total de gîtes prospectés}} \times 100$

4.1.2. Populations imaginales (adultes)
Sur le terrain, les moustiques collectés sont identifiés en utilisant les caractéristiques morphologiques de

genres (*Anopheles, Aedes, Culex*) et d'espèces (*Anopheles coluzzii, An gambiae ss, An melas, An funestus....*) et de sexe. S'il s'agit de l'identification des espèces de groupes ou de complexes comme *An gambiae* et *An funestus,* les spécimens de moustiques doivent être soigneusement préservés dans des micro-tubes individuels et envoyés au laboratoire de référence (OCEAC).

L'échantillonnage des populations imaginales des vecteurs est fait par (i) la récolte matinale de la faune résiduelle dans les habitations, (ii) la capture nocturne des femelles agressives et (iii) 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 de l'infestation.

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.

4.1.2.1. La collecte de la faune matinale résiduelle

Elle cible les moustiques qui se reposent à l'intérieur des habitations et est effectuée le matin entre 07h et 09h dans au moins 10 chambres/cases de chaque village sélectionné. Elle est faite par pulvérisation d'une solution de Pyréthrinoïde (spray catch ou capture au pyrèthre) après étalement de draps blancs dans la pièce, pour recueillir les moustiques assommés par l'insecticide utilisé. Après une dizaine de minutes d'attente, les draps sont soigneusement sortis puis les moustiques collectés à l'aide de pinces souples (au niveau des ailes ou pattes) et placés dans des gobelets ou des boites de Pétri dont le fond est garni d'une couche de coton imbibé d'eau sur laquelle est posée un papier filtre.

Sur des fiches de collecte (cf. annexes), 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. Ne pas oublier de demander et de noter le nombre de personnes ayant dormi dans la pièce/case prospectée la nuit précédant la collecte.

Les moustiques récoltés sont regroupés par genre, espèce et sexe puis dénombrés. Les femelles sont ensuite classées selon leur espèce, leur état physiologique (à jeun, gorgées, semi-gravides et gravides).

Cette méthode ne permet de disposer des informations que sur la fraction endophile de la population de vecteurs collectées. Elle est difficilement applicable à São Tomé et Principe du fait que les vecteurs du paludisme sont essentiellement exophiles.

La collecte de la faune résiduelle permet de déterminer sur le terrain :

- la composition de la faune de vecteurs qui se repose à l'intérieur des maisons ;
- l'état physiologique des femelles des vecteurs collectés :
  - moustique à jeun : la femelle n'a pas piqué et présente un abdomen qui ne contient ni sang ni œuf ;
  - moustique gorgé : la femelle s'est nourrie la nuit et présente un abdomen avec du sang ;
  - moustique semi-gravide : la femelle a piqué en début de nuit et présente un abdomen occupé (i) près du thorax, par le reste du repas de sang et (ii) du côté de l'extrémité de l'abdomen une partie blanche qui représente les œufs en pleine maturation ;
  - moustique gravide : la cavité abdominale de la femelle est complétement occupée par les œufs.

- **Quels indicateurs peut-on déterminer à partir de la faune résiduelle ?**

  - la composition de la faune résiduelle des vecteurs ;
  - la densité agressive (ma) : nombre moyen de piqûres/homme/nuit pour chaque espèce donnée

    - Densité agressive (ma) = $\frac{\text{Nombre de moustiques femelles (gorgés + semi-gravides)}}{\text{Nombre des dormeurs dans les chambres prospectées}}$

  - la densité moyenne par case : nombre moyen de vecteurs par case par nuit calculé selon la formule ci-dessous

    - Densité de vecteur par case = $\frac{\text{Nombre de vecteurs collectés}}{\text{Nombre de cases prospectées}}$

4.1.2.2. La capture de moustiques agressifs (capture de nuit sur appât pour les anophèles)
Les captures nocturnes sur homme doivent être 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 sacoches 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 et qu'il bouche avec du coton. Une fois bouché, le tube est introduit dans la sacoche correspondant à l'heure et au point de capture. La capture est effectuée dans chaque site et à chaque passage dans au moins deux concessions (points de capture). Dans chaque site, la capture est faite 2 fois par semaine, à l'intérieur d'une chambre/case et à l'extérieur (véranda). Une rotation des collecteurs doit se faire d'un jour à l'autre en fonction des lieux et des heures de captures.

- **Quels indicateurs peut-on déterminer avec la capture nocturne sur appât humain ?**

  - la composition de la faune agressive des vecteurs
  - la densité agressive (ma) : Nombre moyen de piqûres / homme / nuit pour chaque espèce donnée :

    - Densité agressive (ma) = $\frac{\text{Nombre de vecteurs collectés}}{\text{Nombre de collecteurs}}$

4.1.2.3. La capture 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» utilisés la nuit, ils 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 CO_2).
- Des animaux placés sous une moustiquaire aux bords inférieurs situés à 5-20 cm du sol peuvent être utilisés 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.
- Les moustiques exophiles peuvent être recherchés et collectés à l'extérieur dans la journée, dans des abris naturels (végétation ou creux d'arbres, terriers, etc.) ou des abris artificiels (puits de Muirhead-Thompson).

Le nombre de ces pièges est fonction des capacités de gestion des récoltes. Les pièges fonctionnent au cours de la nuit (18 h à 06h) sauf pour les puits de Muirhead-Thompson. Si nécessaire, les récoltes peuvent être prélevées une ou plusieurs fois durant la nuit.

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.

- **Quels indicateurs peut-on déterminer avec les captures nocturnes par pièges ?**

  - Composition de la faune capturée par les différents pièges
  - Densité par piège : nombre moyen de vecteurs / piège / nuit pour chaque espèce donnée :

$$\text{Densité par piège} = \frac{\text{Nombre de vecteurs collectés}}{\text{Nombre de pièges}}$$

Pour les captures à l'aide des pièges, la densité des vecteurs peut être rapportée comme étant le nombre de vecteurs par piège par nuit.

4.1.3. Traitement du matériel récolté

Le traitement du matériel peut être fait en partie sur le terrain ou totalement au laboratoire. Les femelles de moustiques sont identifiées (genre et espèce) d'après leurs caractères morphologiques et dénombrées par espèce. Seules les femelles de vecteurs du paludisme sont disséquées sous loupe binoculaire pour la détermination du taux d'infection et de l'âge physiologique.

- La dissection des ovaires consiste à les extraire de l'abdomen du moustique, dans une goutte d'eau distillée sur une lame. 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 des glandes salivaires consiste à les extraire du thorax du moustique dans une goutte de liquide physiologique. Après dissection, une lamelle est placée sur les glandes salivaires. Ainsi préparées, les glandes salivaires sont observées au microscope optique (objectif x 40) pour voir éventuellement les sporozoïtes. Notons qu'au laboratoire, il est possible de déterminer les infections par le test ELISA (positivité des moustiques pour l'antigène circum-sporozoïte de Plasmodium).
- Pour permettre de déterminer l'origine des repas de sang, lors des dissections, le sang provenant de l'abdomen des femelles gorgées est étalé sur du papier filtre Wattman pour obtenir des spots qui seront analysés au laboratoire. Les papiers filtres ainsi préparés sont ensuite conservés ave du silicagel au réfrigérateur.

Les dissections concernent aussi bien les femelles endophiles (faune résiduelle) que les femelles agressives. A chaque passage dans un site, toutes les femelles doivent être disséquées, si possible.

Pour les tests PCR / ELISA (laboratoire de référence), les femelles de vecteurs non disséquées et le reste des femelles disséquées sont placés dans des micro-tubes individuels contenant : un dessiccateur (grains de silicagel) 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 circum-sporozoïtique et le reste des femelles pour l'identification de l'espèce (pour le complexe *An gambiae*). Sur chaque micro-tube renfermant un spécimen sera collée une étiquette sur laquelle sera inscrit un numéro qui sera celui du spécimen et qui sera également reporté sur un carnet avec les renseignements nécessaires à l'identification/reconnaissance du moustique (origine, date, lieu et méthode de capture).

Les moustiques non disséqués sont tués avec un tampon de coton (avec quelques gouttes de chloroforme)

posé sur le tulle moustiquaire du gobelet et une boite 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 sont ensuite placés individuellement ou par petits lots, dans des micro-tubes de 1,5 ml (numérotés) contenant un dessiccateur (grains de silicagel) et acheminés au laboratoire.

Les données collectées concernant l'identification (genre, espèce), la dynamique des populations (densité, état et âge physiologiques) sont complétées par celles issues d'analyses au laboratoire (identification, infection et sources des repas sanguins pour l'identification des préférences trophiques).

Pour la recherche (PCR, ELISA) les moustiques doivent être envoyés dans les laboratoires de référence (ex. OCEAC). Pour ce faire, les moustiques sont placés individuellement dans des tubes (à hémolyse ou de nunc). Au préalable, quelques grains de silicagel sont placée au fond du tube et coincés avec du coton. Le moustique est ensuite placé sur le coton puis le tube est refermé. Chaque tube ainsi préparé porte une étiquette indiquant au crayon le numéro de référence, la date, le site et le type de collecte... La recherche de l'antigène circum-sporozoïte 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, porc...). Ces anticorps sont marqués par une enzyme (peroxydase) et en présence du substrat de cette dernière, une réaction colorée révèle la présence de 1'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.

- **Quels indicateurs peut-on déterminer après le traitement des spécimens au laboratoire ?**

Les différentes données collectées permettent, pour chaque espèce de vecteur, de déterminer le taux d'inoculation entomologique (TIE) à chaque passage, la saison de transmission, la période de prolifération du vecteur...

- Indice sporozoïtique (is) ou Taux d'infection : proportion de vecteurs porteurs de sporozoïtes parmi les moustiques disséqués. Il est calculé selon la formule ci-après :

  - Taux d'infection (is) = $\frac{\text{Nombre de moustiques observés avec des sporozoïtes}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100$

- Taux d'infection (ELISA) : proportion de moustiques positifs pour l'antigène circum-sporozoïte de *Plasmodium*. Le taux d'infection est calculé en divisant le nombre de moustiques positifs au test ELISA par le nombre total de moustiques analysés :

  - Taux d'infection = $\frac{\text{Nombre de moustiques positifs au test ELISA}}{\text{Nombre de moustiques analysés/testés}} \times 100$

- Taux de parturité : pourcentage de femelles observées pares parmi les moustiques disséqués :

  - Taux de parturité = $\frac{\text{Nombre de femelles observées avec des ovaires pares}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100$

- Taux d'inoculation entomologique (TIE) : nombre de piqûres infectantes par homme et par nuit. Il est obtenu à partir du produit du taux d'agressivité (ma) par le taux d'infection (s) :

  TIE = ma x s

- Indice d'anthropophilie (I.A.) : proportion de moustiques gorgés ayant pris leur repas de sang sur des humains. L'identification de l'origine des repas de sang des moustiques est faite par des tests ELISA. La proportion d'échantillons contenant du sang humain est le rapport entre le nombre d'échantillons (repas) positifs pour le sang humain et le nombre total de moustiques examinés (repas analysés).

  - Indice d'Anthropophilie = $\frac{\text{Nombre de moustiques positifs pour le sang humain}}{\text{Nombre total de moustiques/repas analysés}}$

Pour le calcul des indicateurs, des exercices corrigés sont donnés en Annexe.

4.1.4. Conditions de conservation des moustiques sur le terrain

Si les moustiques doivent séjourner quelque temps sur le terrain et être gardés vivants pendant le transport, certaines précautions doivent être observées pour les maintenir en bonne forme dans les gobelets.

- Tremper des morceaux de coton dans une solution à 5-8% de sucre, éliminer l'excès de solution sucrée et placer le coton sur le treillis moustiquaire qui ferme le gobelet.
- Placer les gobelets contenant les moustiques en position verticale dans un carton ou mieux dans un bac.
- Couvrir les gobelets avec un linge mouillé et entretenir l'humidité jusqu'à l'arrivée au laboratoire.
- Prendre garde de garder les moustiques dans un lieu non contaminé par des insecticides.
- Avant le transport, bourrer des journaux ou autres matériaux de remplissage entre les gobelets pour éviter les chocs

4.2. Les MIILDA

Il est important de savoir déterminer le taux de couverture de la population après une distribution de masse de MIILDA. Le calcul du taux est fait sur la base d'une MIILDA pour 1,8 personne. Le taux de couverture est calculé selon la formule ci-après :

- Taux de couverture = $\frac{\text{Nombre de MIILDA distribuées x 1,8}}{\text{Population de la zone couverte}} \times 100$

5. 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 simulies), 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 évaluées. Une de ces méthodes est celle dite ''de test en bouteille'' mise au point par le CDC d'Atlanta (Center for Disease Control). Le test en bouteille présente une fiabilité similaire au test selon l'OMS. Le test en bouteille a été testé sur le terrain essentiellement parce que le système OMS d'acquisition des kits et des papiers imprégnés n'a pas bien fonctionné, à un moment donné (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.

5.1. 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 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 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 diagnostique 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 approuve des concentrations diagnostiques provisoires.

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 des tests (incluant le test de sensibilité, les analyses biochimiques et moléculaires) doit être réalisée pour réunir le plus d'informations sur la résistance détectée, le niveau et les mécanismes impliqués. Dans la pratique, les tests de sensibilité sont habituellement réalisés selon le protocole ci-dessous décrit.

5.2. Tests de susceptibilité 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. Dans tous les cas, les tests sur les larves ne peuvent être réalisés hors des

laboratoires spécialisés. Ainsi, tenant compte de ce qui précède, dans le cadre de la surveillance de la résistance, **les tests de sensibilité doivent être réalisés exclusivement sur des moustiques adultes**.

5.3. 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) et qui nécessite 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.

5.3.1. Critères de choix des moustiques du test

Les anciennes directives de l'OMS pour les tests de sensibilité recommandaient l'utilisation des femelles "gorgées", récoltées sur le terrain. Cependant, des variations furent observées dans les résultats obtenus de tests effectués avec des pyréthrinoïdes. 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 à 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. Notons aussi que les femelles âgées de moins de 2 jours sont fragiles et leur manipulation par des agents pas très expérimentés peut entraîner une augmentation de la mortalité. En outre, les tests avec des femelles âgées de plus de 5 jours entraînent une forte variabilité dans les résultats. **En conséquence, il a été retenu que seules des femelles "à jeun" de 2 – 5 jours doivent être utilisées pour la surveillance de routine de la sensibilité aux insecticides**. Si pour une quelconque raison seules des femelles collectées sur le terrain sont utilisées (et non celles issues de larves ou nymphes récoltées sur le terrain ou de femelles sauvages gravides), 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**.

5.3.2. 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 (HR) 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. Tous les individus endommagés sont supprimés du test durant cette période.

5.3.3. Détail sur la position des tubes

Il est 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 knock-down (KD) rapide observé avec les pyréthrinoïdes 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 KD est un indicateur de résistance aux pyréthrinoïdes 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). 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.

5.3.4. 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.

5.3.5. 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 20mm.
- 40 pièces de papier (12 x 15 cm) pour couvrir les tubes d'observation.
- des 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.
- des fiches d'instruction, 20 fiches de rapport et 3 papiers de log-probit pour le tracé des droites de régression.

5.3.6. Détails de la Procédure

- 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.
- Collecter environ 200 femelles de moustiques avec l'aspirateur. Les moustiques doivent être prélevés un à un et délicatement transférés dans le tube d'observation à travers le trou de la lame / tube, 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
- 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 moustiques moribonds à l'issue de la période d'observation pré-test.
- Introduire dans le tube d'exposition une pièce de Papier Imprégné (PI), enroulée dans le cylindre et maintenue par un anneau en bronze.
- Ajuster (visser) le tube d'exposition à la lame de fermeture du tube d'observation des spécimens du test. 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.
- Reposer le tube d'exposition pour la période de contact souhaitée dans les conditions de lumière diffuse modérée, de température et d'humidité relative (HR) adéquates.
- 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. 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.

- Garder les tubes d'observation pendant 24 heures dans un espace sombre à température adéquate (< 30 º 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 plate-forme 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.
- 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 risque d'être endommagés (plastique)*.**
- Les résultats sont portés sur les fiches de test.
- Chaque série de test consiste à utiliser 5 tubes d'exposition et 1 tube témoin. Au moins deux séries de test par insecticide sont nécessaires pour une localité donnée.
- 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 :

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

- Toutefois si la moralité 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.

5.3.7. Interprétation des résultats

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 :

Tableau 1 : Indications sur les seuils de susceptibilité (OMS)

Statut	Test avec au moins 80 spécimens
Sensible	Mortalité comprise entre 98-100%
Résistance suspectée	Mortalité comprise entre 90-97%
Résistance	Mortalité inférieure à 90%

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

- Comparativement au DDT, la Dieldrine ou les Organophosphorés, les faibles concentrations de pyréthrinoïdes sont plus appropriées pour les tests de sensibilité. Le même papier imprégné ne devrait pas être utilisé plus de 3 fois dans les tests de routine. Dans les cas exceptionnels, le même

papier imprégné pourrait être utilisé au plus 5 fois en le précisant sur les fiches de test. Entre deux séries de test, les PI doivent être rangés dans leurs emballages d'origine correctement fermés et gardés au réfrigérateur.

- Après avoir enlevé le papier imprégné, l'emballage contenant les papiers imprégnés non utilisés doit être rapidement bien refermé avec du scotch. Une conservation prolongée à une température élevée doit être évitée et les papiers imprégnés 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.
- L'exposition à des concentrations élevées de pyréthrinoïdes 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.

6. Contrôle de la qualité de l'application / efficacité de l'insecticide (Bio-essais)

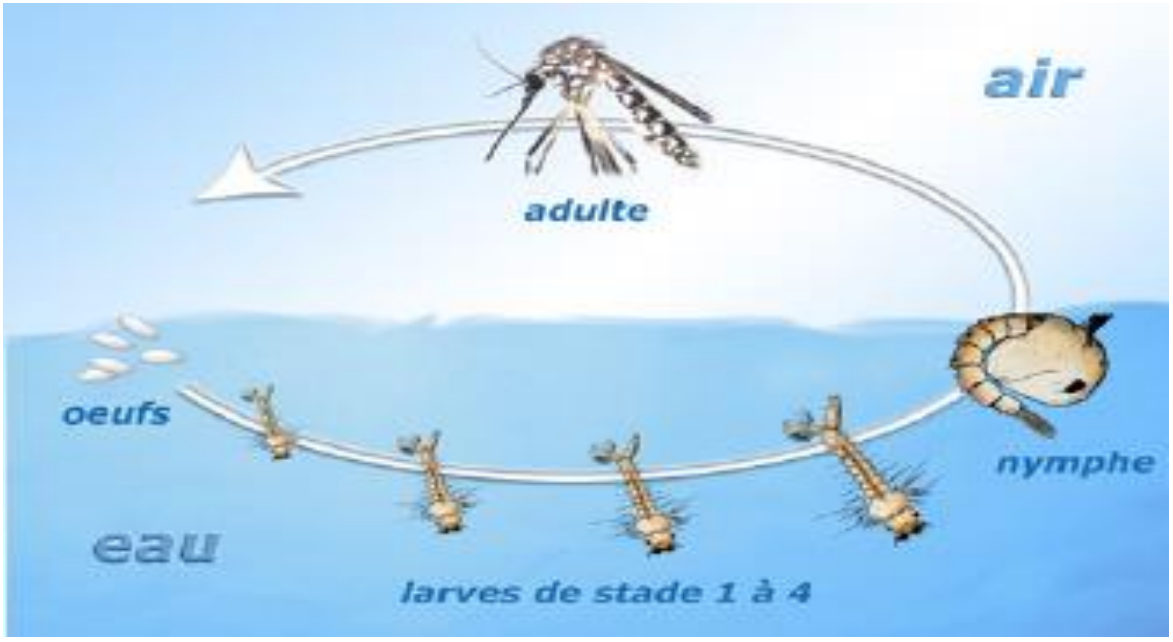
Le contrôle de l'efficacité des pulvérisations intra-domiciliaires (PID), des MIILDA et de la rémanence de l'insecticide peut être réalisé sur les surfaces traitées. Les essais biologiques (bio-essais) sont effectués suivant le protocole OMS avec des cônes. Les tests sont faits avec des femelles de 3-5 jours d'*Anopheles gambiae* ss / *An coluzzii* (et si possible une souche sensible ex. *An gambiae* souche Kisumu entretenue en insectarium) dans au moins 6 pièces/chambres d'habitation par site (5 pièces traitées et une pièce témoin/contrôle non traitée) pour les PID et 6 MIILDA par site (5 MIILDA et une moustiquaire ou un pan de tissu non traité). Le choix des pièces/chambres et/ou des MIILDA dans les villages est fait par tirage au sort et les pièces/chambres retenues sont maintenues pendant toute la période du suivi de l'efficacité.

Pour les lots tests, trois (3) cônes fixés sur la surface traitée sont utilisés pour chaque pièce/chambre (Rappel : les tests sont faits dans au moins 6 pièces/chambres) et pour les témoins, quatre (4) cônes sont placés dans une ou deux chambres non traitées par village et par passage. 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. Dix (10) moustiques sont mis dans les cônes fixés sur la surface traitée ou témoin. La durée d'exposition des moustiques est de 30 minutes. Après l'exposition, les moustiques sont retirés des cônes pour être placés dans des gobelets avec un tampon de jus sucré. Les gobelets sont ensuite 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 (cf. plus haut).

ANNEXES

Annexe 1

Cycle biologique des Culicidés (moustiques)



Annexe 2

Caractères distinctifs des différents groupes de Culicidés (1)

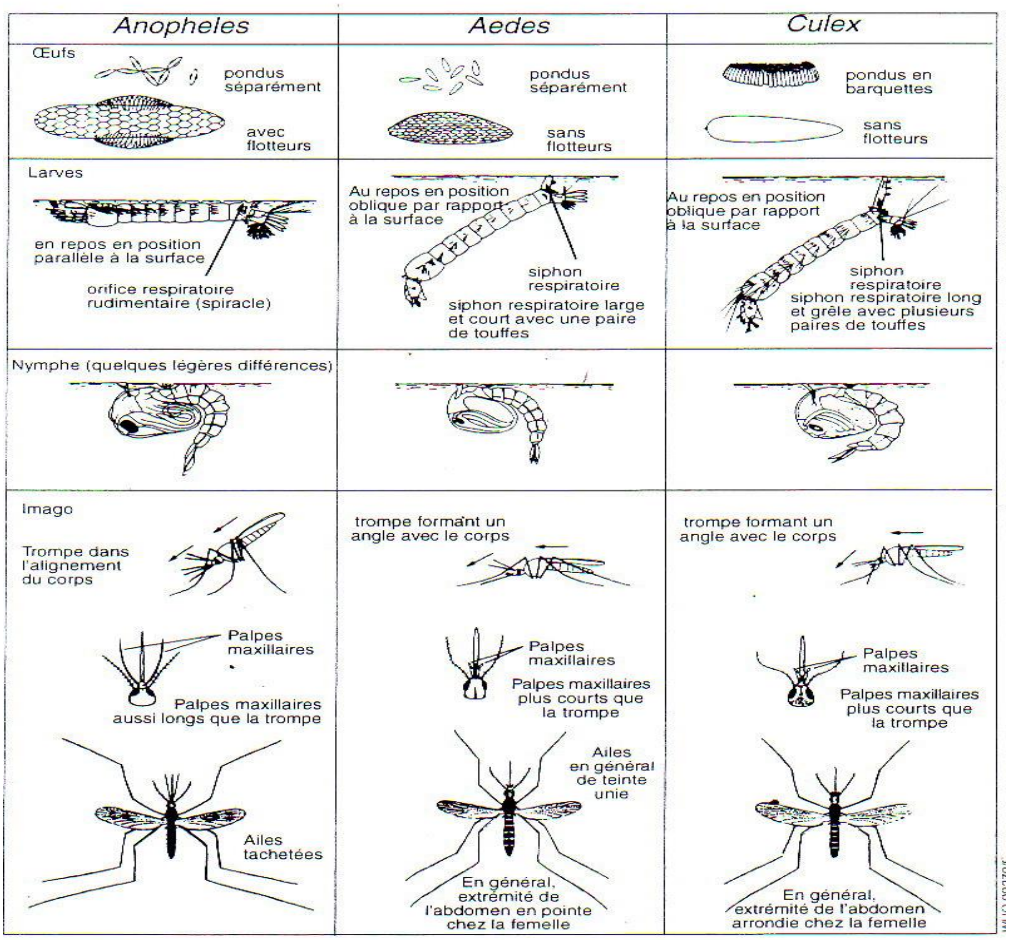
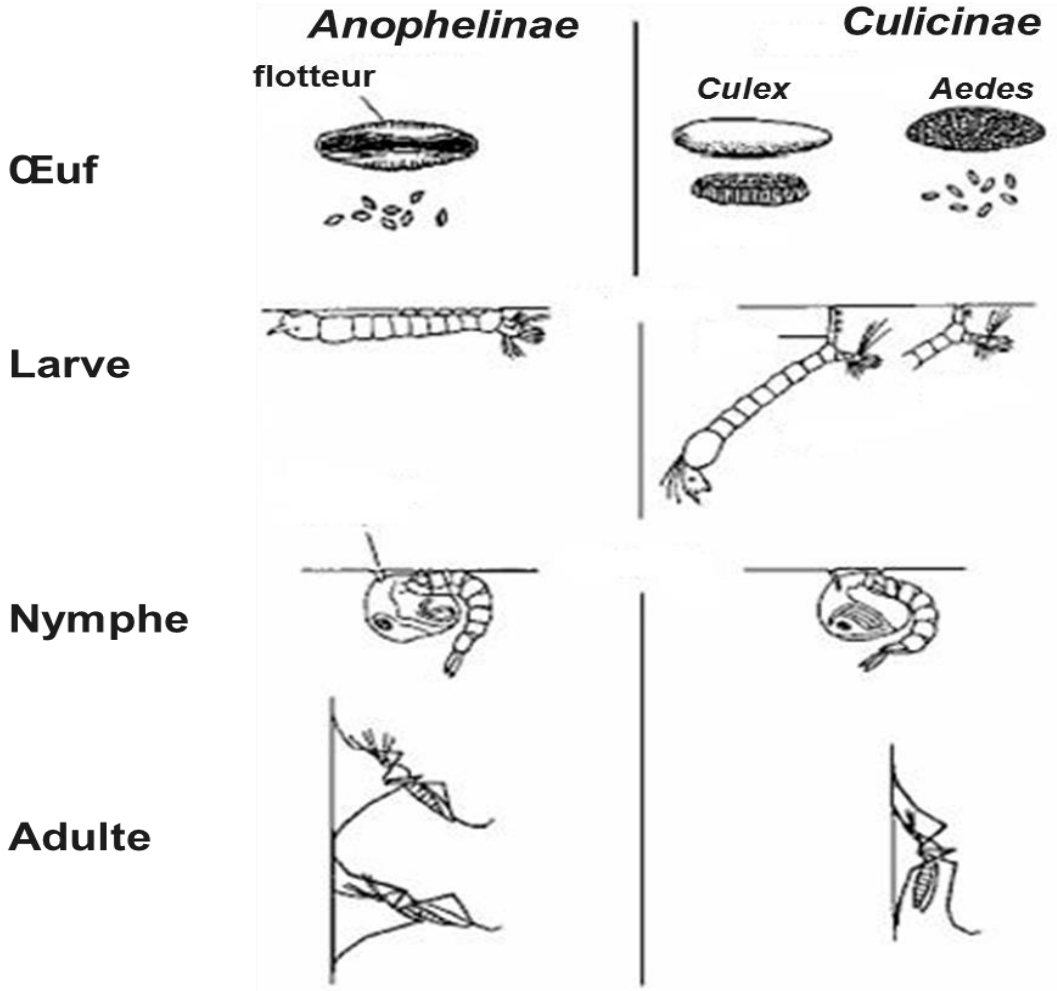


Fig. 4
Quelques-uns des principaux caractères distinctifs des moustiques des genres *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (© OMS).

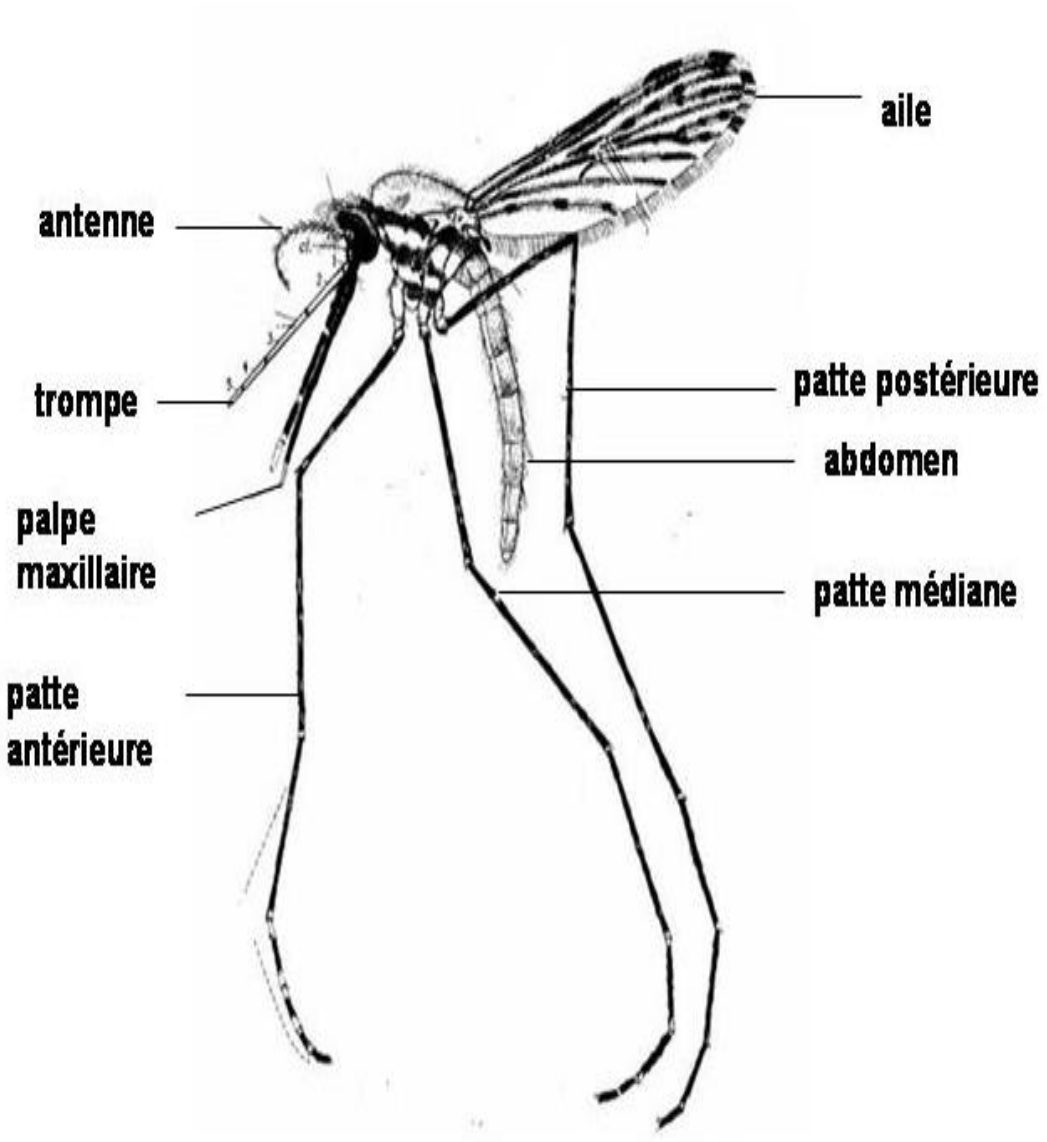
Annexe 3

Caractères distinctifs des différents groupes de Culicidés (2)



Annexe 4

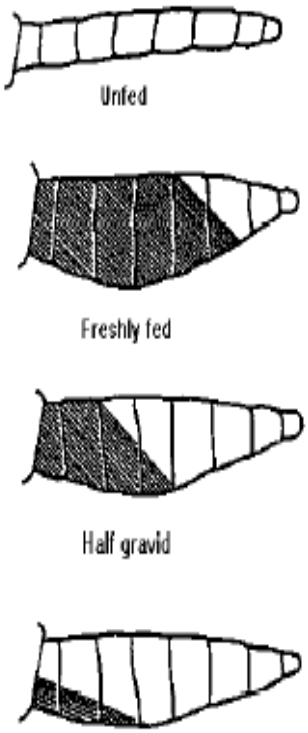
Imago d'*Anopheles gambiae sl*



Annexe 5

Etat physiologique d'un moustique femelle

Ci-dessous de haut en bas, abdomen de :
Femelle à jeun
Femelle gorgée
Femelle semi-gravide
Femelle gravide



Annexe 6

Dissection des glandes salivaires

L'observation des glandes salivaires au microscope permet de déterminer le taux d'infection (is) ou proportion de femelles infectées dans une population d'anophèles.

Dissection du moustique au niveau du cou pour sortir les glandes salivaires

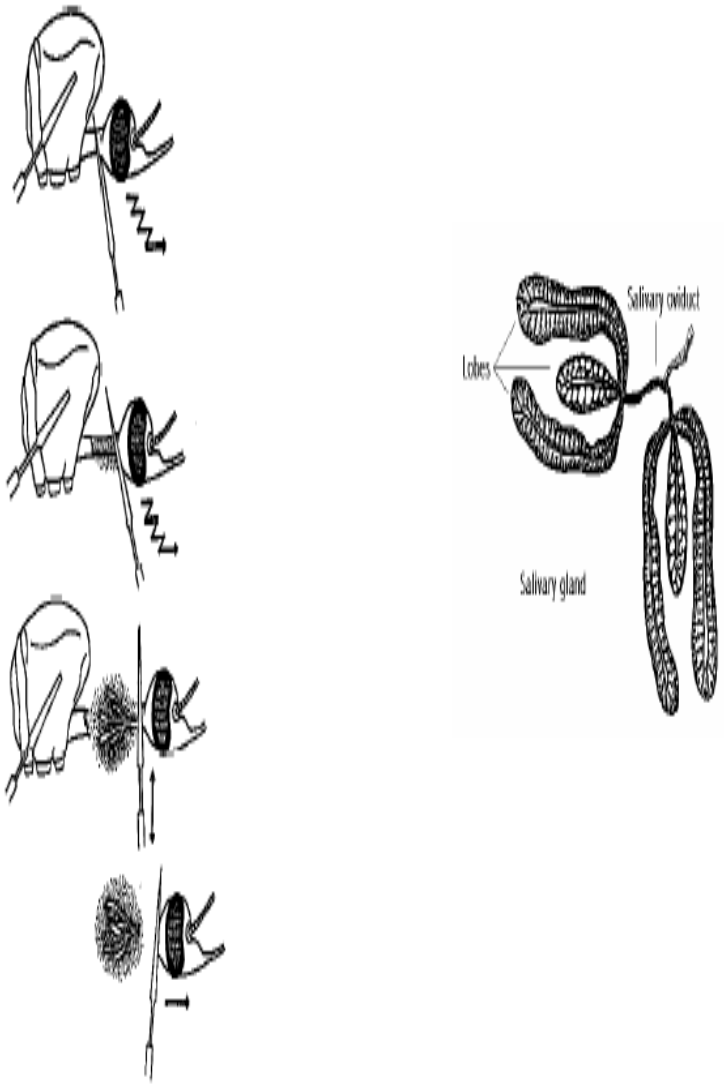


Figure 5.5 Dissection des glandes salivaires

Annexe 7

Dissection des ovaires

L'observation des ovaires avec une loupe permet de distinguer: les ovaires de femelles nullipares avec des trachéoles pelotonnées ; les ovaires de femelles pares avec des trachéoles déroulées.
Cette distinction permet de déterminer: l'âge physiologique d'une population de moustiques et le taux de parturité ou proportion de femelles pares.

Dissection de l'extrémité caudale de l'abdomen pour sortir les ovaires

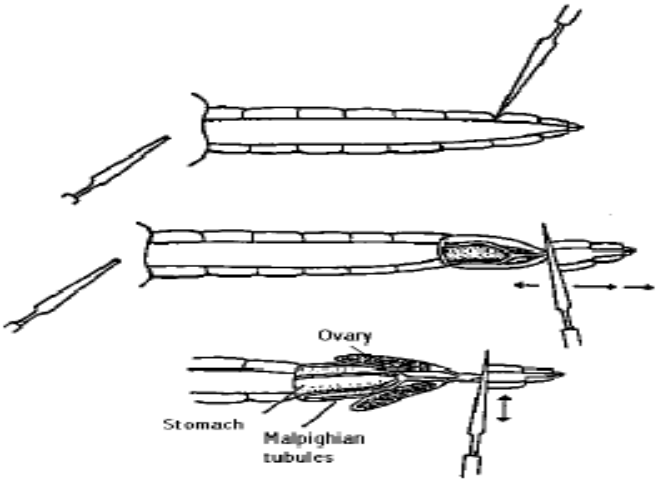
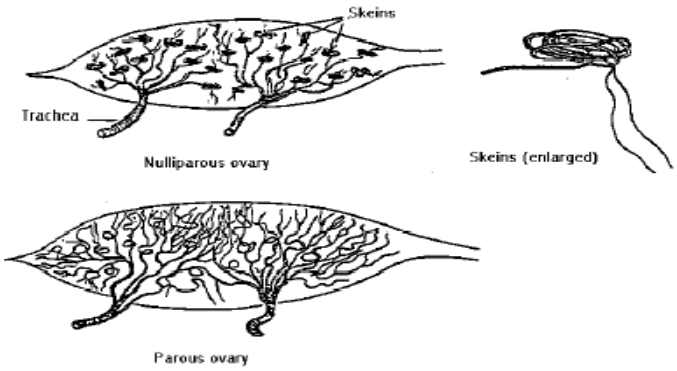


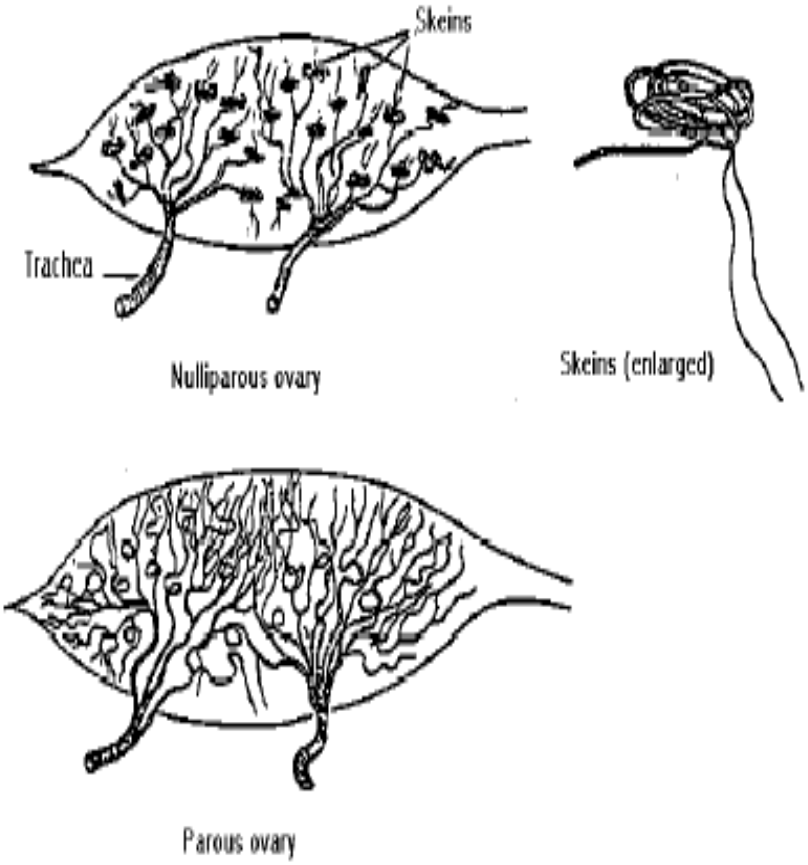
Figure 5.3 Dissection des ovaires

Ovaire nullipare (les trachéoles se terminent en boule) et ovaire pare (les trachéoles sont déroulées)



Annexe 8

Ovaire nullipare et ovaire pare

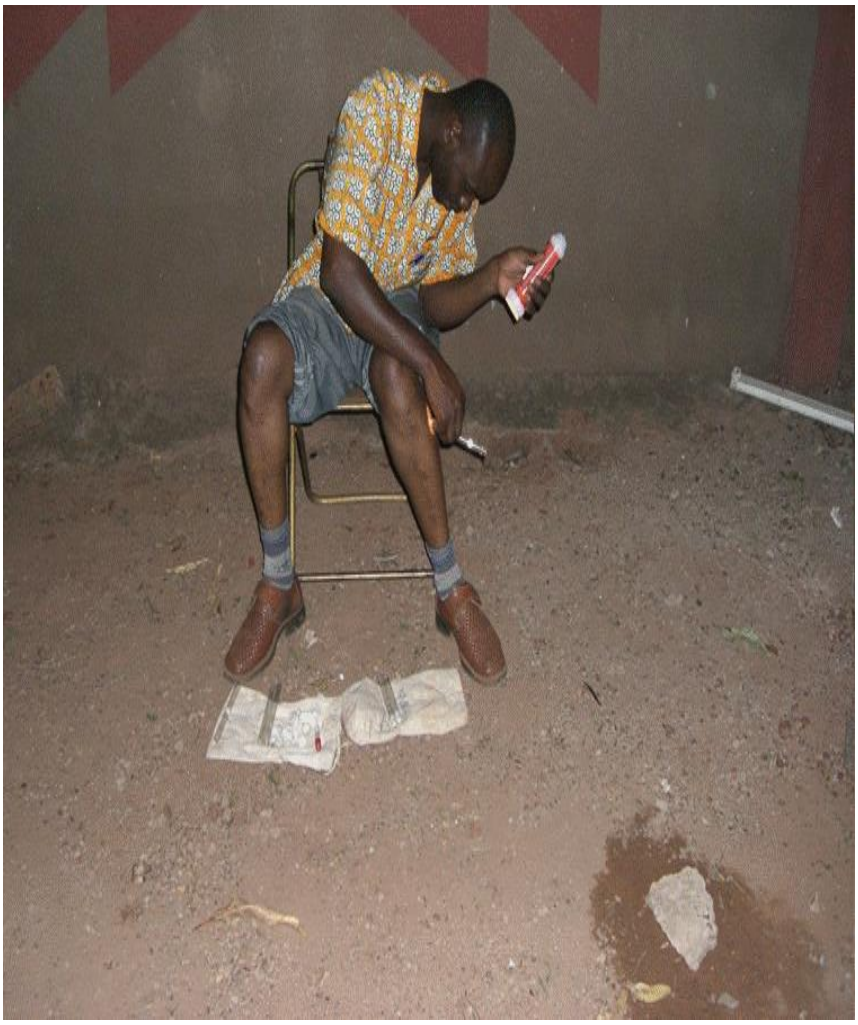


Annexe 9

Collecte de larves dans un gîte

Annexe 10

Capture de la faune nocturne agressive sur appât humain



Annexe 11

Capture de la faune résiduelle au pyrèthre ou "spray catch"

1. Etalement des draps

2. Pulvérisation d'insecticide

3. Récolte des moustiques

Annexe 12

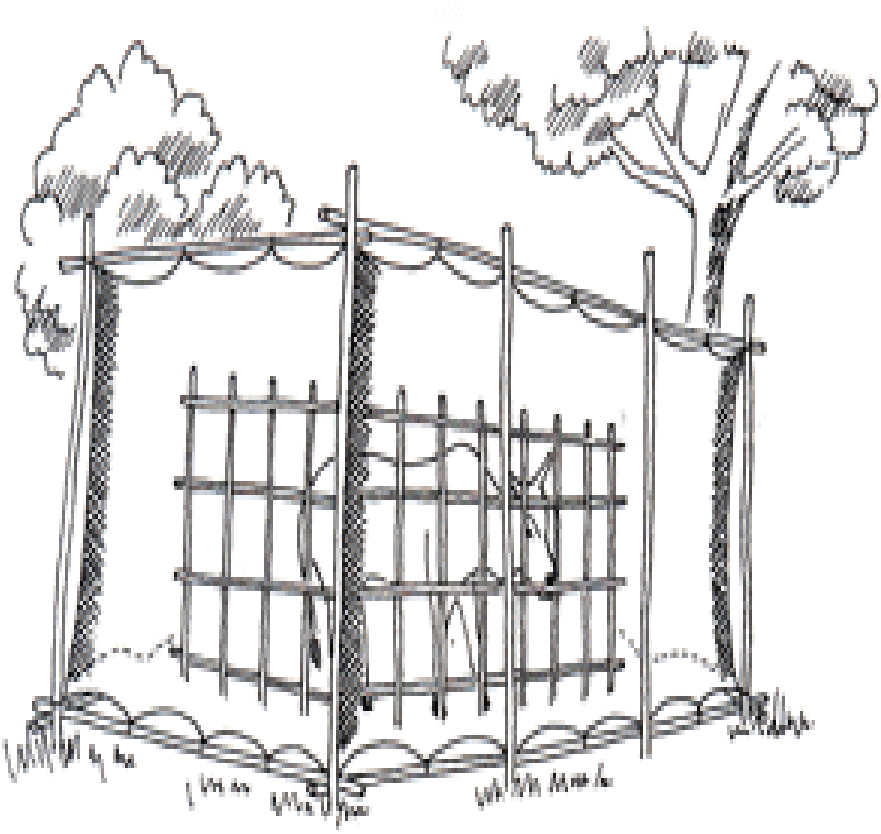
Piège lumineux ou "CDC miniature light Trap"

Annexe 13

Piège de sortie ou piège fenêtre

Annexe 14

Capture de la faune agressive avec appât sous double moustiquaire



Annexe 15

Piège extérieur : Abri-tranchée ou Puits de Murhied-Thompson

Annexe 16

Exercice d'application sur la détermination des indicateurs de surveillance des vecteurs

Exercice 1 : à la suite d'une supervision, le rapport indique que dans la localité B, 39 gites larvaires ont été recensés. De tous ces gîtes :

- 20 gites ont été traités,
- avant le traitement, 15 gîtes avaient des larves de moustiques.
- 150 larves (81 de **stade I**, 55 de **stade II**, 10 de **stade III**, 3 de **stade IV** et 1 **pupe**) après 35 louchées.

Déterminez :

- la densité larvaire par louche ;
- la densité larvaire de (stades IV + pupe)
- la proportion des gites positifs ;
- la proportion des gîtes traités.

Formules pour la détermination des indicateurs

$$\text{Densité larvaire} = \frac{\text{Nombre de larves et de pupes collectées}}{\text{Total nombre de louchées}}$$

$$\text{Proportion de gîtes positifs} = \frac{\text{Nombre de gîtes positifs}}{\text{Nombre total de gîtes prospectés}} \times 100$$

$$\text{Proportion de gîtes traités} = \frac{\text{Nombre de gîtes traités}}{\text{Nombre total de gîtes prospectés}} \times 100$$

Exercice 2 : des captures de nuit de la faune agressive donnent les résultats suivants :

- 3 séances de captures avec 2 collecteurs à l'extérieur et à l'intérieur de 2 maisons ;
- les captures ont donné 45 anophèles à l'intérieur et 135 à l'extérieur des maisons ;
- 120 moustiques ont été disséqués, 60 étaient pares et 5 avaient des sporozoïtes dans les glandes salivaires

Déterminez :

- la densité agressive à l'intérieur et à l'extérieur des maisons ;
- le taux de parturité ;
- l'indice sporozoïtique ;
- le taux entomologique d'inoculation.

Formules pour la détermination des indicateurs

- Densité agressive **(ma)** $= \frac{\text{Nombre de vecteurs collectés}}{\text{Nombre de collecteurs}}$

Calculez la densité pour l'intérieur et pour l'extérieur des maisons

- Taux de parturité $= \frac{\text{Nombre de femelles observées avec des ovaires pares}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100$

- Taux d'infection **(is)** $= \frac{\text{Nombre de moustiques observés avec des sporozoïtes}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100$

- Taux d'inoculation = ma x is

Calculez ce taux pour l'intérieur et pour l'extérieur des maisons

Exercice 3 : une distribution de masse de 944 MILDA a été réalisée dans une localité de 2350 habitants.

- Déterminez le taux de couverture en MILDA de la population si la distribution a été faite sur la base de 1,8 personne pour une moustiquaire.

Annexe 16 (suite)

Formule pour la détermination de l'indicateur

- Taux de couverture en MILDA = $\frac{\text{Nombre de MILDA} \times 1{,}8}{\text{Population}} \times 100$

Exercice 4 : une séance de capture de la faune résiduelle matinal a donné les résultats suivants :

- 10 chambres à coucher ont été visitées ;
- 23 personnes au total ont dormi la nuit avant l'enquête dans ces chambres ;
- 70 femelles d'anophèles ont été collectées dont 30 gorgées, 22 semi-gravides, 13 gravides et 5 à jeun.

Déterminez :

- la densité moyenne d'anophèles par chambre ;
- la proportion des spécimens de chaque état physiologique
- la densité agressive des anophèles collectés

Les formules pour déterminer les différents indicateurs sont :

$$\text{Densité moyenne par chambre} = \frac{\text{Nombre total d'anophèles}}{\text{Nombre de chambres visitées}}$$

$$\text{Proportion de femelle gorgées} = \frac{\text{Nombre de femelles gorgées}}{\text{Nombre de femelles collectées}} \times 100$$

$$\text{Proportion de femelle Semi-gravides} = \frac{\text{Nombre de femelles S-gravides}}{\text{Nombre de femelles collectées}} \times 100$$

$$\text{Proportion de femelle gravides} = \frac{\text{Nombre de femelles gravides}}{\text{Nombre de femelles collectées}} \times 100$$

$$\text{Proportion de femelle à jeun} = \frac{\text{Nombre de femelles à jeun}}{\text{Nombre de femelles collectées}} \times 100$$

$$\text{Densité agressive} = \frac{\text{Femelles gorgées} + \text{Femelles semi-gravides}}{\text{Nombre de personnes ayant dormi dans les chambres}}$$

Annexe 17

Corrigé des Exercices d'application : détermination des indicateurs de surveillance des vecteurs

Exercice 1 : à la suite d'une supervision, le rapport indique que dans la localité B, 39 gites larvaires ont été recensés. De tous ces gîtes :

- 20 gites ont été traités,
- avant le traitement, 15 gîtes avaient des larves de moustiques.
- 150 larves (81 de **stade I** ; 55 de **stade II** ; 10 de **stade III** ; 3 de **stade IV** et 1 **pupe**) après 35 louchées.

Déterminez :

- la densité larvaire par louche ;
- la densité larvaire de (stades IV + pupe)
- la proportion des gites positifs ;
- la proportion des gîtes traités.

Formules pour la détermination des indicateurs :

$$\text{Densité larvaire} = \frac{\text{Nombre de larves et de pupes collectées}}{\text{Total nombre de louchées}} = \frac{150}{35} = 4{,}3 \text{ larves par louchée}$$

$$\text{Densité larvaire (Stade IV + pupe)} = \frac{\text{Stade IV + pupe}}{\text{Nombre de louchées}} = \frac{4}{35} = 0{,}1 \text{ (stade IV+ pupe) par louchée}$$

$$\text{Proportion de gîtes positifs} = \frac{\text{Nombre de gîtes positifs}}{\text{Nombre total gîtes prospectés}} \times 100 = \frac{15}{39} \times 100 = 38{,}5\%$$

$$\text{Proportion de gîtes traités} = \frac{\text{Nombre de gîtes traités}}{\text{Nombre total de gîtes prospectés}} \times 100 = \frac{20}{39} \times 100 = 51{,}3\%$$

Exercice 2 : des captures de nuit de la faune agressive donnent les résultats suivants :

- 3 séances de captures avec 2 collecteurs à l'extérieur et à l'intérieur de 2 maisons ;
- les captures ont donné 45 anophèles à l'intérieur et 135 à l'extérieur des maisons ;
- 120 moustiques ont été disséqués, 60 étaient pares et 5 avaient des sporozoïtes dans les glandes salivaires

Déterminez :

- la densité agressive à l'intérieur et à l'extérieur des maisons ;
- le taux de parturité ;
- l'indice sporozoïtique ou taux d'infection ;
- le taux entomologique d'inoculation.

Formules pour la détermination des indicateurs

- $$\text{Densité agressive (ma)} = \frac{\text{Nombre de vecteurs collectés}}{\text{Nombre de collecteurs}} = \frac{45}{3} = \mathbf{15\ An/H/nuit\ (intérieur)}$$

  En faisant la même chose pour l'extérieur on aura (ma) = 135/3 = **45 An/H/nuit (extérieur)**

- $$\text{Taux de parturité} = \frac{\text{Nombre de femelles observées avec des ovaires pares}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100 = \frac{60}{120} = 50\%$$

$$\text{Taux d'infection (is)} = \frac{\text{Nombre de moustiques observés avec des sporozoïtes}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times 100 = \frac{5}{120} \times 100 = 4{,}2\%$$

Taux entomologique d'inoculation (intérieur) = ma x is = 15 x 4,2/100=0,6 p i par nuit (1pi tous les 2jrs)
Taux entomologique d'inoculation (extérieur) = ma x is = 45 x 4,2/100=1,9 p i par nuit (1pi tous les jours)

Annexe 17 (suite)

Exercice 3 : une distribution de masse de 944 MILDA a été réalisée dans une localité de 2350 habitants.

- Déterminez le taux de couverture en MILDA de la population si la distribution a été faite sur la base de 1,8 personne pour une moustiquaire.

Formule pour la détermination de l'indicateur

- Taux de couverture en MILDA = $\frac{\text{Nombre de MILDA x 1,8}}{\text{Population}}$ x 100

Taux de couverture en MILDA = $\frac{944 \times 1,8}{2350}$ x 100 = 72,3% de population couverte

Exercice 4 : une séance de capture de la faune résiduelle matinal a donné les résultats suivants :

- 10 chambres à coucher ont été visitées ;
- 23 personnes au total ont dormi la nuit avant l'enquête dans ces chambres ;
- 70 femelles d'anophèles ont été collectées dont 30 gorgées, 22 semi-gravides, 13 gravides et 5 à jeun.

Déterminez :

- la densité moyenne d'anophèles par chambre ;
- la proportion des spécimens de chaque état physiologique
- la densité agressive des anophèles collectés

Les formules pour déterminer les différents indicateurs sont :

Densité moyenne par chambre = $\frac{\text{Nombre total d'anophèles}}{\text{Nombre de chambres visitées}} = \frac{70}{10}$ = 7 anophèles / chambre

Proportion de femelle gorgées = $\frac{\text{Nombre de femelles gorgées}}{\text{Nombre de femelles collectées}}$ x 100 = $\frac{30}{70}$ x 100= 42,9%

Proportion de Semi-gravides = $\frac{\text{Nombre de femelles S-gravides}}{\text{Nombre de femelles collectées}}$ x 100 = $\frac{22}{70}$ x 100= 31,4%

Proportion de femelle gravides = $\frac{\text{Nombre de femelles gravides}}{\text{Nombre de femelles collectées}}$ x 100 = $\frac{13}{70}$ x 100 = 18,6%

Proportion de femelle à jeun = $\frac{\text{Nombre de femelles à jeun}}{\text{Nombre de femelles collectées}}$ x 100 = $\frac{5}{70}$ x 100 = 7,1%

Densité agressive = $\frac{\text{Femelles gorgées + Femelles semi-gravides}}{\text{Nombre de personnes ayant dormi dans les chambres}} = \frac{30 + 22}{23}$ = 2,3 anophèles/H/n

Annexe 18

FICHE DE CAPTURE DE LA FAUNE AGRESSIVE

Luta Contra o Vector FICHA N°

District : …… Localité : …..... Latitude / Longitude : ….....

Date : …..... Zone traitée : __/ Zone non traitée : __/

N° ou adresse de la maison de capture : .....

Collecteur intérieur : …..... Collecteur extérieur : …....

Observations : ….....

Heure	Intérieur		Extérieur	
	Anophèles	Autres genres	Anophèles	Autres genres
18 -19 h				
19 - 20 h				
20 - 21 h				
21 – 22 h				
22 – 23 h				
23 – 24 h				
24 – 01 h				
01 – 02 h				
02 – 03 h				
03 – 04 h				
04 – 05 h				
05 – 06 h				
TOTAL				

Annexe 19

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 jeun /……/ 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

Annexe 19 (suite)

Conditions du test

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

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

Résultats du Test

	Lot 1	**Lot 2**	**Lot 3**	**Lot 4**	Total de moustiques testés	Nombre de moustiques du lot témoin
Nombre de moustiques testés						
Nombre de moustiques tombés (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 pyréthrinoïdes seulement* **= *là où c'est possible*

Annexe 20

Fiche de suivi des Bio-Essais

Une fiche par test (case ou MIILDA)

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

Informations géographiques

District:…… Localité : ……..... Latitude/Longitude : ….....

Dernière date de la PID ? …..... Insecticide utilisé ? …..... A quelle dose ?.....

N° ou adresse de la maison : …..... Latitude/Longitude : ….....

Type d'habitation : Madeira__ / Alvenaria __/ MIILDA ___/

Principales cultures :…….....

Brève description de la zone .....

.....

Testes Bio-ensaio

N° de cônes	Hora		N° de mosquitos	N° de mosquitos mortos				Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida
	Inicio	fim		30 min		24 h			
				Vivo	Morto	Vivo	Morto		
Controlo									
1									
2									
Teste									
1									
2									
3									

Annexe 21

HISTOIRE DE L'UTILISATION DES INSECTICIDES A SAO TOME ET PRINCIPE

Collecter les informations ci-dessous là où des insecticides sont utilisés

Enquêteur :……
Pays : ……Région/Province :……..……..……
District :……..……Localité/village :……

Principales méthodes d'application

A : aspersion intra domiciliaire; **B** : imprégnation de moustiquaires;
C : Traitement spatial; **D** : Traitement larvicide; **E** : Usage agricole

Nom du pesticide	Méthode d'application	Année d'introduction	Formulation	Dosage	Fréquence de traitement	Année d'arrêt	Cycle de traitement/ an
DDT	A	1940	PM	2 g/m^2	/semestre	1984	2
Mal + DDT	A	1983	PM	2 g/m^2	/semestre	1984	2
Alpha-cyperméthrine	A	2003	CE	0,5mg/m^2	annuel	2012	1
Bendiocarb	A	2013	PM	0,4 puis 0,2mg/m^2	/semestre		2

Formulations : PM : Poudre mouillable ; CE : Concentré émulsifiable, SC : Suspension concentrée

Annexe 22

REPUBLICA DEMOCRÁTICA DE SAO TOME E PRINCIPE

Luta Contra o Vector FICHA N°

FICHE DE SUIVI ET DE TRAITEMENT DES GITES LARVAIRES DES ANOPHELES

District :_____ ; Localité :_____ ; Latitude/Longitude : _____ ; Date :_____ ; N° du gîte :_____ ; Latitude/Longitude : _____ ;

Gîte déjà traité ? Oui__ / Non__/ ; Si Oui, date du dernier traitement :_____ ; Nom de l'enquêteur : _____ Epandage du Bti Oui__/ Non__/

Caracterizaçao do criadouros : **1)** Dentro do recinto da habitaçao S__ N__ **2)** Perto ( )metros **3)** Longe ( ) ms **4)** Exposto ao sol S__ N__ 5) Vegetaçao S__ N__

6) Agua limpida S___ N___ 7) Permanente___ Semi permanente___Temporario___ 8) Poça de agua das chuvas S___ N___ 9) Outros_____

10) Outros gégéros de mosquitos associados S___ N___ (especifiar) _____ ; 11) Densidade larvar/Conchada :_____

Data	Hora		Estadios larvares	"N° de conchadas" / Quantidade de larvas colhidas															Total
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	Inicio	Fim	I																
			II																
			III																
			IV																
			Pupas																
Total géral																			

Annexe 23

FICHE DE CAPTURE PAR PIEGE LUMINEUX

Luta Contra o Vector FICHA N°3

District : …….....… Localité : …..... Latitude / Longitude : …..... Date : …....

Maison traitée : __/ Maison non traitée : __/ Date du dernier traitement : …..... Insecticide utilisé : …....

N° ou adresse de la maison de capture : ..... Distance du plus proche gîte : …....

Météorologie : Normale _____/ Pas de Vent ____/ Vent fort _____/ Vent faible _____/ Pluie Oui ____/ Non ____/

Spécimens collectés		Piège intérieur							Piège extérieur							P/TD
		Etat physiologique			Etat trophique				Etat physiologique			Etat trophique				
		Vivants	Morts	Total	A jeun	Gorgés	S gravides	Gravides	Vivants	Morts	Total	A jeun	Gorgés	S gravides	Gravides	
Anophèles vecteurs	*A coluzzii*															
	A coustani															
	A funestus															
	Autre															
Autres moustiques																
TOTAL																

P/TD : Pares/Total disséqués

Annexe 24

Ficha para colheita de mosquitos adultos (Faune Résiduelle)

Fiche N°4

Districto:..... Localidade :..... Latitude/Longitude : …..... Date :..... Heure Début :..... Fin : …....

Zone traitée : __/ Zone non traitée : __/ Date du dernier traitement : …..... Insecticide utilisé : ….....

Méthode de collecte : Spray catch _____/ Capture manuelle avec aspirateur à bouche ____/ Autre : ….....

Equipe N° : …..... Noms des enquêteurs : …..... .....

N°C	TC	N° pessoas	*An gambiae sl*					Autres moustiques					DMC	PID	MIILDA	Observação
			M	J	Al	SG	G	M	J	Al	SG	G				
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
TOTAL																

N°C : N° da casa ; TC : Typo de casa (ciment, planche) ; M : Machos ; J : Je jun ; Al : Alimentadas ; SG : Semi-gravida ; G : Gravida
DMMC : Densidade média de mosquitos por casa ; PID : Casa pulverizada com insecticida ; MIILDA : Moustiquaire imprégnée

Densité agressive : Al + SG/N° pessoas :..... ; % (+) : (Anophèles +/Total Disséqués) x 100 ; % Parturité : (N° pares/Total disséqués) x 100