**Titre: Bio-analyse pour déterminer l’efficacité résiduelle de l’alphacyperméthrine et du chlorfenapyr sur les moustiquaires Interceptor G2**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Nom complet | Signature | Date (jj/mm/aaaa) |
| Auteur | Seth Irish |  | 03/09/2019 |
| Examinateur d’assurance-qualité |  |  |  |
| Autorité d’approbation |  |  |  |

**Historique des documents :**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Version remplacée / date d’émission**  | **Révisions et raisons de changement** | **Actuelle** **version & date de version** | **Nom de l’examinateur**  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

* 1. Glossaire

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Vivant*** | ***Knockdown (enregistré 60 minutes après l’exposition)*** | ***Mort (enregistré 24 heures après l’exposition)*** |
| -Peut à la fois se tenir debout et voler d’une manière coordonnée | -Tout moustique qui ne peut pas se tenir debout (par exemple, a 1 ou 2 pattes) -Tout moustique qui ne peut pas voler de manière coordonnée -Un moustique qui se trouve sur le dos, les jambes et les ailes en mouvement, mais incapable de décoller  -Un moustique qui peut se tenir debout et decoller brièvement, mais tombe immédiatement  | -Aucun signe de vie: immobile; ne peut pas supporter -Un moustique qui se trouve sur le dos, les jambes et les ailes en mouvement, mais incapable de décoller  |

**Tableau 1. Classification des moustiques adultes comme vivants, abattus ou morts dans les bio-assays de phase I OMS**

1. **But**

Ce SOP décrit les procédures de réalisation des essais biologiques afin d’évaluer l’efficacité résiduelle de l’alphacyperméthrine et de chlorfenapyr sur les moustiquaires Interceptor G2. La moustiquaire imprégnée d’insecticide de longue durée Interceptor G2 (BASF, Ludwigshafen) est une moustiquaire en polyester multifilament produit avec un système de polymères exclusif. La moustiquaire est recouvert de 200mg/m2 de chlorfenapyr et de 100mg/m2 alphacypermethrine. On sait peu de choses sur la bio-efficacité de ces deux insecticides sur les moustiquaires Interceptor G2 qui ont été utilisés dans des conditions de terrain. Pour évaluer la bio-efficacité résiduelle de l’alphacyperméthrine et de chlorfenapyr est nécessaire d’avoir un protocole qui sépare les actions de ces deux composés.

Les bio-essais standards avec des souches sensibles standard ne permettront pas une séparation des effets de l’alphacyperméthrine et du chlorfenapyr. En général, l’alphacyperméthrine aura une action rapide alors que le chlorfenapyr prend généralement plus de temps pour affecter les moustiques. Dans les bio-essais de cône de 3 minutes sur des moustiquaires traitées avec du chlorfenapyr à 200mg/m2 (la même dose présente sur l’Interceptor G2), le renversement de la souche *An. gambiae* s.s. Kisumu était de 0% lorsqu’il était mesuré une heure après le bio-essai, et la mortalité n’était que de 2% à 24 heures (OMS 2017). N’Guessan et coll. (2007) ont constaté une mortalité inférieure à 20 % à 24 heures, qui est passée à près de 80 % à 72 heures. D’autres études ont révélé un impact plus important à 24 heures; Mosha et coll. (2008) ont constaté des augmentations de seulement 15-25% entre les mortalités enregistrées à 24 et 72 heures pour les doses de 100, 250, et 500mg/m2. Pour l’alphacypermethrine, Tungu et coll. (2016) ont constaté que les ITNs Interceptor (avec 200mg/m2 d’alphacypermethrine) ont entraîné un renversement de 100 % d’An. gambiae Kisumu à la ligne de base. Un résultat similaire a été trouvé pour *An. gambiae*  Kisumu exposé à des moustiquaires traités avec l’alphacypermethrine à 100mg/m2 qui a abouti à 98% knockdown (OMS 2017c). Nous proposons que l’efficacité résiduelle de l’alphacyperméthrine sur les moustiquaires Interceptor G2 soit évaluée à l’aide de l’élimination des moustiques sensibles aux pyréthroïdes à 60 minutes après une exposition de 3 minutes au moustiquaire.

Pour mesurer l’efficacité du chlorfenapyr sur les moustiquaires, il faudra plus d’efforts et l’utilisation de souches résistantes à l’alphacyperméthrine des moustiques. Oxborough et coll. (2015) ont constaté que les bio-essais standard de cône de 3 minutes effectués au cours de la journée ne reflétaient pas l’impact du chlorfenapyr dans les études expérimentales sur les huttes. Toutefois, lorsque des moustiquaires ont été fixées à des papiers filtrants et testées dans des cylindres de l’OMS et que le temps d’essai a été prolongé à 30 minutes à une température de 27 °C (essais et maintiens), les résultats à 72 heures après l’essai étaient plus représentatifs des résultats obtenus dans les huttes expérimentales (mortalité complète).

L’autre option décrite ici, est l’utilisation des essais de tunnel. Comme pour les bio-essais de 30 minutes, quand des tests en tunnel ont été utilisés, les résultats ont été beaucoup plus représentatifs des résultats de la hutte, peut-être parce que l’insecticide était disponible la nuit lorsque les moustiques étaient plus métaboliquement actifs. Des *culex quinquefasciatus résistants* aux insecticides ont été utilisés dans les essais de tunnel pour déterminer le temps de régénération des moustiquaires Interceptor G2 (OMS 2017c), et les mêmes principes peuvent être utilisés pour déterminer la bio-efficacité de ces moustiquaires.

**Équipement et matériaux**

* 1. Cônes de l’OMS
	2. Aspirateurs (aspirateurs séparés pour l’introduction et l’élimination des moustiques du cône)
	3. Tasses en plastique
	4. Élastiques
	5. Moustiquaire non traitée
	6. Coton
	7. Minuteries
	8. Plaques en plastique, 30cm x 30cm, solide
	9. Plaques en plastique, 30cm x 30cm, avec 4 trous de 10 cm de diamètre
	10. Binder clips
	11. Solution de sucre ou de miel (5-10%)
	12. Agrafeuse
	13. Papier pour étiquettes
	14. Marqueur permanent
	15. Manteau de laboratoire
	16. Tunnel en verre
	17. Lapin / cobaye
	18. Gants sans latex
	19. Formulaire d’enregistrement de données
	20. Enregistreur de données Tiny Tag

**MOUSTIQUES NÉCESSAIRES**

|  |  |
| --- | --- |
| **Souche** | **Caractéristiques** |
| Sensibles | Mortalité supérieure à 98 % lorsqu’elle est testée dans des tests standard de l’OMS avec des papiers traités par alphacyperméthrine (0,05 %) |
| Résistant | Soit une souche de l’insectarium résistante à l’alphacyperméthrine ou des moustiques sauvages prélevés sur le terrain qui ont moins de 70% de mortalité lorsqu’ils sont testés lors d’un test de tunnel avec un nouveau moustiquaire Interceptor (200mg/m2 alphacypermethrine). Idéalement, une espèce vecteur du paludisme devrait être utilisée, mais une espèce bien caractérisée *d’Aedes* ou *de Culex* pourrait également être utilisée. |

1. **Sécurité**

|  |
| --- |
| **Risques** |
| Répertorier les éléments qui présentent des risques, Ex : manipulation manuelle, tranchants, produits chimiques, biologiques, rayonnements1. *Danger –* Insecticide et réactifs dangereux (moustiquaires traitées par insecticide)
2. *Danger –* La manipulation des animaux peut entraîner des morsures chez l’homme ou des blessures aux animaux.
 |

|  |
| --- |
| **CONTRÔLE DES RISQUES** |
| Énumérez les contrôles mis en place pour minimiser ou réduire le niveau de risque, Ex : PPE, limiter l’utilisation de l’article/produit chimique aux personnes formées, les processus spécifiques de formation et d’induction, les lignes directrices désignées sur l’élimination des déchets, etc.1. *Contrôle des risques –* Portez des manteaux et des gants de laboratoire en tout temps lors de la remise d’insecticides et d’autres réactifs.
2. *Contrôle des risques –*  Protocoles en place pour manipuler les animaux en toute sécurité avant, pendant et après les essais en tunnel
 |

1. **Procédures**

**Tester l’efficacité résiduelle de l’alphacyperméthrine :**

**Préparation pour les bio-essais de cône**

* 1. Préparer les gobelets en plastique en les couvrant de morceaux de moustiquaire non traités et fixer la moustiquaire à l’aide d’un élastique. Couper une petite fente dans la moustiquaire au centre de la tasse pour permettre à l’extrémité de l’aspirateur de passer à travers la moustiquaire et boucher ce trou avec une petite liasse de coton.
	2. Préparer la solution sucre/miel en ajoutant 20 g de sucre ou 20 ml de miel à 180 ml d’eau. Bien mélanger.
	3. Couper les quatre morceaux de moustiquaire à partir des moustiquaires d’intérêt. Assurez-vous de porter des gants tout en manipulant les moustiquaires et couper 30x30cm morceaux de la moustiquaire. Cela doit être fait conformément aux protocoles de l’OMS (2013) comme le montre la figure 1 (à l’exclusion de la position 1, car elle peut être exposée à une abrasion excessive d’être caché sous le lit). Étiqueter immédiatement la moustiquaire à l’aide d’étiquettes de papier agrafées sur le coin d’une moustiquaire. Conserver dans du papier d’aluminium lorsqu’il n’est pas utilisé au réfrigérateur (4°C±3°).

**Figure 1 : Positions recommandées à partir desquelles les pièces de moustiquaire devraient être prises (OMS 2013).**



* 1. Utilisez les plaques en plastique pour fixer les cônes sur la moustiquaire à tester en place. Placez la plaque en plastique solide sur le dessus du banc, puis placez la moustiquaire sur le dessus de la plaque. Placez les 4 cônes sur la moustiquaire et fixez-les en plaçant la plaque en plastique avec 4 trous sur les cônes. Utilisez des pinces de reliure pour fixer les plaques les unes aux autres. Les plaques doivent ensuite être placées à un angle de 60° qui permettent l’accès des moustiques au moustiquaire et serrer les plaques en place.
	2. Pour chaque cône, 5 moustiques sensibles doivent être introduits dans le cône et le cône bloqué avec un morceau de coton. La minuterie peut être démarrée dès que tous les moustiques sont dans le cône. Idéalement, une minuterie séparée devrait être utilisée pour chaque cône.
	3. Une fois que la minuterie atteint 3 minutes, les moustiques doivent être aspirés doucement du cône et dans la tasse en plastique à travers la fente coupée dans la moustiquaire. Couvrir la fente de coton après que les moustiques soient dans la tasse. Fournir aux moustiques une solution miel/sucre en humidifiant un morceau de coton, en le pressant pour enlever l’excès de solution et en le plaçant sur le dessus de la tasse.
	4. Il faut lire le nombre de moustiques incapables de se tenir debout ou de voler à 60 minutes après la fin du bio-essai du cône.
	5. Pour chacun des quatre morceaux de moustiquaires testées, 100 moustiques (2 cônes) devraient être complétés, ce qui donne lieu à 40 moustiques utilisés pour tester les quatre morceaux de moustiquaires (plus 50 moustiques exposés à des moustiquaires témoins (non traités) dans des tests de cônes de 3 minutes pours’assurer que la mortalité est due à l’insecticide). Voir la figure 2. Un ensemble de contrôles peut être utilisé pour tous les tests effectués en une journée.

Figure 2 : Matrice d’enregistrement des résultats des essais biologiques, chaque cellule vide doit être remplie des résultats (nombre de réponses/nombres testés).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Knockdown** | Cône 1 | Cône 2 | Cône 3 | Cône 4 | Cône 5 |
| Pièce 2 (côté) |   |   |   |   |   |
| Pièce 3 (côté) |   |   |   |   |   |
| Pièce 4 (côté) |   |   |   |   |   |
| Pièce 5 (toit) |   |   |   |   |   |
| Contrôle 1 |   |   |   |   |   |
| Contrôle 2 |  |  |  |  |  |

**Tester l’efficacité résiduelle du chlorfenapyr:**

**Détermination d’une souche résistante**

* 1. L’essai de la bio-efficacité de chlorfenapyr est difficile et nécessite soit une souche résistante à l’état sauvage, soit une souche résistante à l’élevage en laboratoire. L’utilisation d’une souche résistante introduit une variabilité considérable dans le bio-essai, car même les souches résistantes au laboratoire peuvent varier dans leur degré de résistance. Pour cette raison, avant chaque série d’essais de tunnel, la souche résistante doit être testée dans un essai de tunnel.
	2. Les essais en tunnel sont constitués de contenants en verre ou en plexiglas de 60x25x25cm. À chaque extrémité du tunnel, une cage à moustiques de 30x30 cm est installée. L’échantillon de moustiquaire LN, conservé dans un cadre en carton jetable, est placé à un tiers de la longueur du tunnel de verre. La surface des moustiquaires disponibles pour les moustiques est de 400 cm2 (20 cm x 20 cm), avec neuf trous de 1 cm de diamètre; un trou est situé au centre de la place, et les huit autres sont équidistants et situés à 5 cm de la frontière. Dans la section plus courte du le tunnel, un appât approprié (p. ex. cobaye ou lapin) est placé, qui est incapable de se déplacer et est disponible pour les piqûres de moustiques (OMS 2013).
	3. Avant de commencer les essais de tunnel, assurez-vous que la température et l’humidité peuvent être surveillées tout au long des périodes d’essai et de détention. Cela peut être fait à l’aide des enregistreurs de données TinyTag ou des enregistreurs de données similaires.
	4. Pour déterminer la souche résistante, deux tunnels seront utilisés. Le premier aura un morceau de moustiquaire d’un nouvel Interceptor (alphacypermethrine 200mg/m2) (diffusé pendant quelques jours avant l’utilisation) et le second aura un morceau de moustiquaire non traité. 2
	5. Cent moustiques femelles nullipares, âgés de 5 à 8 jours et affamés de sucre pendant 6 heures, seront introduits au bout de chaque tunnel en face de l’appât à 18h00. Les lumières de la pièce seront éteintes et ne s’allument que lorsque l’essai du tunnel sera terminé le lendemain matin à 7 h. Selon les lignes directrices de l’OMS (2013), la période d’exposition globale devrait être de 12 à 15h. Les conditions environnementales dans la pièce pendant la nuit doivent être de 27 ± 2 °C et 75 % ± 10 % d’humidité relative
	6. À 7 h, un insert étroit sera glissé entre les deux compartiments du tunnel, afin d’empêcher les moustiques de se déplacer entre les compartiments. Tous les moustiques seront soigneusement prélevés dans le tunnel, en notant le compartiment dans lequel les moustiques ont été recueillis (compartiment initial/compartiment animal), L’état d’alimentation sanguine (nourris/non nourris) et la mortalité (vivant/mort). Les résultats peuvent être enregistrés comme indiqué à la figure 3.
	7. La formule suivante sera utilisée pour évaluer la mortalité dans les essais de tunnel:

Soit X = le pourcentage vivant dans les tunnels de contrôle

Soit Y = le pourcentage vivant dans les tunnels alphacypermethrine

La mortalité corrigée due à l’alphacyperméthrine sera (X-Y)/X × 100

Si la mortalité témoin est supérieure à 20%, le test doit être répété.

* 1. Si la souche résistante montre une mortalité inférieure à 70% dans un tunnel avec un nouveau moustiquaire Interceptor, alors il peut être utilisé pour l’essai de chlorfenapyr dans l’intercepteur G2 test. Si ce seuil n’est pas atteint, soit une autre souche de champ doit être utilisée après l’essai, soit les morceaux de moustiquaires doivent être testés dans un laboratoire qui maintient une souche appropriée de moustiques résistants. Notez qu’il n’est pas nécessaire que la souche vectorielle soit utilisée, car les tests visent à évaluer la quantité d’insecticide sur la moustiquaire, et non la susceptibilité des moustiques. De nombreux sites de terrain peuvent avoir un accès plus facile à *Culex quinquefasciatus* ou *Aedes aegypti* qui répondent à ces critères et l’utilisation de ces souches sont encouragées. Une fois qu’une souche résistante appropriée a été trouvée, elle peut être utilisée dans les essais de tunnel.

**Figure 3 : Tableau d’enregistrement des données des essais de tunnel**

**Essais de tunnel**

* 1. La souche résistante doit être utilisée pour les quatre tunnels décrits ici.
	2. Avant de commencer les essais de tunnel, assurez-vous que la température et l’humidité peuvent être surveillées tout au long des périodes d’essai et de détention. Cela peut être fait à l’aide des enregistreurs de données TinyTag ou d’un enregistreur similaire.
	3. Quatre tunnels seront utilisés pour chaque pièce nette à évaluer. Le premier sera un tunnel avec une moustiquaire de contrôle non traitée. Le second aura la pièce G2 à évaluer. Le morceau du G2 à utiliser (parmi les quatre morceaux coupés ci-dessus) sera déterminé à l’aide d’un générateur de nombre aléatoire. Le troisième aura un morceau d’un nouvelle moustiquaire Interceptor . Le quatrième proviendra d’une nouvelle moustiquaire G2. Notez que s’il y a la possibilité d’exécuter plus de 4 tunnels par nuit, un seul contrôle, un nouveau G2 et un nouveau tunnel Interceptor doivent être exécutés, et les résultats peuvent être partagés entre tous les G2 de champ testé.
	4. Une centaine de moustiques femelles nullipares résistants, âgés de 5 à 8 jours et affamés de sucre pendant 6 heures, seront introduits dans l’extrémité opposée à l’appât à 18:00. Les lumières de la pièce seront éteintes et ne s’allument que lorsque l’essai du tunnel sera terminé le lendemain matin à 7 h. Selon les lignes directrices de l’OMS (2013), la période d’exposition globale devrait être de 12 à 15h. Les conditions environnementales dans la pièce pendant la nuit doivent être de 27 ± 2 °C et 75 % ± 10 % d’humidité relative
	5. À 7 h, un insert étroit sera glissé entre les deux compartiments du tunnel, afin d’empêcher les moustiques de se déplacer entre les compartiments. Tous les moustiques seront soigneusement prélevés dans le tunnel, en notant le compartiment dans lequel les moustiques ont été recueillis (compartiment initial/compartiment animal), l’état d’alimentation sanguine (nourris/non nourris) et la mortalité (vivants/morts). Les résultats peuvent être enregistrés comme indiqué à la figure 4.
	6. Les moustiques vivants des tunnels seront mis dans des tasses couvertes de moustiquaires non traités, et la laine de coton trempée dans la solution de sucre sera placée sur le dessus des tasses, permettant aux moustiques de nourrir *ad libitum*. La mortalité sera enregistrée à 18h00 (24 heures après le début de l’essai du tunnel), puis à nouveau à 48 et 72 heures.
	7. La formule sera utilisée pour évaluer la mortalité dans les essais de tunnel :

Soit X = le pourcentage vivant dans les tunnels alphacypermethrine (Interceptor)

Soit Y = le pourcentage vivant dans les tunnels G2 (champ collecté)

La mortalité corrigée due au chlorfenapyr sera (X-Y)/X × 100

Notez que l’équation ci-dessus ne s’ajuste pas pour toute mortalité dans les tests de contrôle. Si la mortalité témoin est supérieure à 20%, le test doit être répété. Les résultats de la moustiquaire G2 sur le terrain seront examinés ensemble en examinant les résultats des quatre tests.

* 1. Et pour l’analyse de l’inhibition de l’alimentation sanguine dans les tests de tunnel, la formule suivante sera utilisée :

Soit X = le pourcentage d’alimentation dans les tunnels alphacypermethrine

Soit Y = le pourcentage d’alimentation dans les tunnels G2

L’inhibition corrigée de l’alimentation sanguine due au chlorfenapyr sera

(X-Y)/X x 100

Notez que la formule ci-dessus ne s’ajuste pas pour tout manque d’alimentation sanguine dans les tests de contrôle. Si l’alimentation sanguine de contrôle est inférieure à 50%, les tests doivent être répétés

* 1. Les tranches de seuils pour les moustiquaires G2 seront définis ultérieurement après examen des données préliminaires.

Figure 4: Tableau d’enregistrement des données des essais de tunnel.



1. **CONTRÔLE DE LA QUALITÉ**
	1.
	2. Comme décrit ci-dessus, les souches sensibles doivent être caractérisées dans les 2 mois suivant les essais biologiques. La caractérisation de la souche résistante doit avoir lieu juste avant les tests afin de s’assurer que l’état de résistance actuel de la souche de moustique est capturé.
	3. Les pièces de la moustiquaires du nouvel Interceptor (étape 3.12) et du nouvel Interceptor G2 (étape 3.19) devraient être coupées à partir des nouvelles moustiquaires inutilisées. Puisque la concentration d’insecticide devrait être la même dans toute la moustiquaire, n’importe quel morceau carré de 30x30cm peut être employé pour les contrôles. Chaque pièce peut être utilisée jusqu’à 10 fois avant qu’une nouvelle pièce ne soit utilisée. Le nombre de fois que la pièce de la moustiquaire a été utilisée peut être enregistré sur le cadre en carton de la moustiquaire ou d’un ordinateur portable.
2. **Journal de contrôle de copie SOP**

**Objet:** Le journal enregistre le nombre de copies certifiées de ce SOP imprimée et l’endroit où elles ont été distribuées.

**Quand :** Chaque fois que le SOP est examiné : annuellement ou plus souvent si nécessaire.

**Par qui:** Par qa personnel / designee

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de distribution :**  | **Nombre total de copies certifiées** (y compris Master Copy) **: NA** |
| **SOP Distribution (emplacement et nombre d’exemplaires certifiés)** |
|  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **Annexes**

**Annexe I : Journal de formation SOP pour les dossiers de formation du personnel**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Date: | Numéro et titre SOP | Signature des employés | Initiales de superviseur |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |