

**Surveillance simplifiée de la durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) distribuées lors de la campagne de masse de [année] en [pays]**

**Protocole d'étude**

[Mois Année]

Table des matières

[1 Contexte 5](#_Toc256000001)

[1.1 Évolution du suivi de la durabilité des MII 5](#_Toc256000002)

[1.2 Aperçu de la campagne de distribution massive de [année] 6](#_Toc256000003)

[1.3 Aperçu de la surveillance simplifiée de la durabilité des MII en [Pays] 7](#_Toc256000004)

[1.3.1 Sites de surveillance 7](#_Toc256000005)

[1.3.2 Caractéristiques des marques de MII surveillées 7](#_Toc256000006)

[1.3.3 Calendrier des activités 7](#_Toc256000007)

[1.4 Objectifs 7](#_Toc256000008)

[1.5 Avantages et valeur attendus 7](#_Toc256000009)

[2 Méthodes 8](#_Toc256000010)

[2.1 Conception de l'étude 8](#_Toc256000011)

[2.2 Sites d'étude 9](#_Toc256000012)

[2.3 Marques de MII 11](#_Toc256000013)

[2.4 Taille de l'échantillon 12](#_Toc256000014)

[2.5 Procédures d'échantillonnage 13](#_Toc256000015)

[2.5.1 Première étape : sélection des grappes 13](#_Toc256000016)

[2.5.2 Deuxième étape : sélection des ménages et du cadre d'échantillonnage des moustiquaires de l'étude 14](#_Toc256000017)

[2.5.3 Troisième étape : sélection des moustiquaires pour l'analyse 15](#_Toc256000018)

[2.6 Questionnaires 15](#_Toc256000019)

[2.7 Procédures de terrain 16](#_Toc256000020)

[2.7.1 Phase préparatoire 16](#_Toc256000021)

[2.7.2 Travail sur le terrain 17](#_Toc256000022)

[2.8 Activités de laboratoire 20](#_Toc256000023)

[2.8.1 Évaluation des trous de la moustiquaire 20](#_Toc256000024)

[2.8.2 Analyses de laboratoire 20](#_Toc256000025)

[2.8.3 Essais biologiques sur cône 21](#_Toc256000026)

[2.8.4 Tests en tunnel 23](#_Toc256000027)

[2.8.5 Résidu chimique 23](#_Toc256000028)

[2.9 Mesures des résultats 24](#_Toc256000029)

[2.9.1 Résultats des essais biologiques 24](#_Toc256000030)

[2.9.2 Résidu chimique 24](#_Toc256000031)

[2.9.3 Intégrité de la moustiquaire 24](#_Toc256000032)

[2.9.4 Taux d'attrition net 25](#_Toc256000033)

[2.10 Analyse des données et rapports 25](#_Toc256000034)

[3 Considérations éthiques 26](#_Toc256000035)

[3.1 Consentement éclairé 26](#_Toc256000036)

[3.2 Respect des personnes et autonomie individuelle 27](#_Toc256000037)

[3.3 Bienfaisance (maximiser les avantages et minimiser les inconvénients) 28](#_Toc256000038)

[4 Calendrier de mise en œuvre et personnel de l'étude 29](#_Toc256000039)

[4.1 Rôles et responsabilités 29](#_Toc256000040)

[4.2 Calendrier 29](#_Toc256000041)

[4.3 Personnel de l'étude 30](#_Toc256000042)

[5 Bibliographie 31](#_Toc256000043)

[6 Annexe 1 : Liste des cycles de surveillance de la durabilité réalisés depuis 2013 32](#_Toc256000044)

[7 Annexe 2 : Essais biologiques pour déterminer l'efficacité résiduelle du butoxyde de pipéronyle (PBO) et des pyréthrinoïdes sur les moustiquaires synergiques au PBO 33](#_Toc256000045)

[8 Annexe 3 : Essais biologiques pour déterminer l'efficacité résiduelle de l'alphacyperméthrine et du chlorfénapyr sur les moustiquaires 50](#_Toc256000046)

# Contexte

## Évolution du suivi de la durabilité des MII

Entre 2010 et 2018, la proportion de ménages en Afrique subsaharienne disposant d'au moins une moustiquaire imprégnée d'insecticide[[1]](#footnote-2) (MII) est passée de 47% à 72%. Le pourcentage de la population qui pourrait être protégée par une MII en supposant que chaque MII dans un ménage peut être utilisée par deux personnes a augmenté de 33% à 57% sur la même période[[2]](#footnote-3). Il est important de maintenir la couverture et de surveiller la durabilité et la durée de vie moyenne d'une moustiquaire. L'OMS recommande aux pays de surveiller systématiquement la durabilité des moustiquaires après les campagnes de distribution massive[[3]](#footnote-4) et a fourni des conseils techniques sur l'estimation de la survie physique et de la bio-efficacité en 2013[[4]](#footnote-5),[[5]](#footnote-6),[[6]](#footnote-7).

Depuis 2013, des études de surveillance de la durabilité ont été lancées et achevées dans 11 pays pour 10 marques de MII standard à base de pyréthrinoïdes uniquement (voir annexe 1)[[7]](#footnote-8). Les études ont mesuré l'effet d'une utilisation quotidienne normale sur : l'attrition (mesurée par la perte de moustiquaires pour quelque raison que ce soit ainsi qu'en raison de l'usure dans les ménages) ; la durabilité physique (mesurée par le nombre et la taille des trous dans la moustiquaire) ; et l'efficacité de l'insecticide (mesurée par le test biologique au cône, le test du tunnel et l'analyse du contenu chimique, selon le type de moustiquaire). Les résultats de ces études suggèrent que la durabilité physique de produits similaires peut varier de manière significative, entre moins de deux ans et quatre ans ou plus, et que les différences sont largement déterminées par des facteurs environnementaux et comportementaux. L'attrition médiane toutes causes confondues pour les mêmes études a été estimée à 12,5% des MII dans les 6 premiers mois suivant la distribution, le plus souvent en raison de la réaffectation des moustiquaires à d'autres ménages et membres de la famille. Entre 6 et 36 mois, l'attrition médiane des moustiquaires par mois était de 2,1%. La mortalité moyenne sur 24 heures dûe au MII à la deltaméthrine variait entre 29% Et 97%, tandis que la variation était moindre pour les moustiquaires à l'alpha-cyperméthrine (64% à 85%).

Bien que la lutte antivectorielle ait contribué de manière substantielle à la réduction mondiale de la charge du paludisme enregistrée depuis 2000, les progrès mondiaux visant la lutte contre le paludisme et son élimination ont marqué le pas ces dernières années et l'efficacité à long terme de la lutte antivectorielle est menacée par l'émergence et l'intensification de la résistance aux insecticides chez les principales populations de moustiques. De nouveaux types de MII utilisant plus d'un ingrédient actif et efficaces contre les moustiques résistants aux insecticides ont été mis au point, mais leur adoption à grande échelle a été lente avant 2020 et les données de surveillance de la durabilité de ces nouveaux produits sont très limitées.

L'Initiative du Président des États-Unis de lutte contre le paludisme (PMI) soutient depuis longtemps la surveillance de la durabilité des MII. À ce jour, la PMI a soutenu un protocole complet de surveillance de la durabilité pour générer des informations de base sur l'intégrité physique et la bio-efficacité des MII ainsi que des informations sur l'entretien et l'utilisation des MII. Ces études comparent généralement deux types de moustiquaires dans une zone ou un type de moustiquaire dans deux zones d'un pays donné. Plus récemment, la PMI a développé un protocole plus rationalisé pour la surveillance de la durabilité pour les pays qui ont déjà généré des données considérables sur la durabilité des MII et qui ont des questions plus ciblées, notamment sur la durabilité des nouveaux types de moustiquaires.

Ce protocole décrit l'approche de la surveillance simplifiée de la durabilité des MII en [pays] pour les MII distribuées dans le cadre de la campagne de masse de [année].

## Aperçu de la campagne de distribution massive de [année]

*Décrivez la campagne récente de distribution massive de MII en termes de dates, de couverture, de caractéristiques des marques de MII déployées (matériau de filet, denier, ingrédient(s) actif(s)) et de quantités distribuées (ou prévues si la campagne n'a pas encore eu lieu).*

Tableau 1 Caractéristiques de la campagne de masse MII de [pays] [année].

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Zone géographique** | **Marque de MII** | **Type de MII** | **Ingrédients actifs** | **Quantité** | **Date de distribution** |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

## Aperçu de la surveillance simplifiée de la durabilité des MII en [Pays]

### Sites de surveillance

*Nommez et décrivez les sites de surveillance.*

### Caractéristiques des marques de MII surveillées

*Nommez et décrivez brièvement la ou les marques de MII incluses dans l'activité de surveillance.*

*Par exemple, les MII de marque PermaNet 3.0, fabriquées par Vestergaard, sont rectangulaires, blanches, avec des côtés en polyester et le haut en polyéthylène. Le fil sur les côtés contient de la deltaméthrine à 2,8 g/kg, tandis que le fil du haut contient de la deltaméthrine à 4,0 g/kg combinée à un synergiste, le butoxyde de pipéronyle, à 25 g/kg.*

### Calendrier des activités

*Complétez le tableau ci-dessous pour décrire le calendrier prévu des tournées de surveillance.*

Tableau 2 Calendrier des activités de surveillance

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  | **Date des tournées d'enquête** | | |
| **Site d'étude** | **Marque de MII** | **Type de MII** | **Date de la campagne** | **12 mois** | **24 mois** | **36 mois** |
| *ex. : Nord* | *Marque A* | *Synergique au PBO* | *Mars 2021* | *Mars 2022* | *Mars 2023* | *Mars 2024* |
| *ex. : Ouest* | *Marque B* | *Double IA* | *Mars 2021* | *Mars 2022* | *Mars 2023* | *Mars 2024* |

## Objectifs

1. Évaluer l'efficacité de l’insecticide de [la ou les marques à surveiller] dans [« un » ou « plusieurs », selon le cas] lieux, mesurée par des tests biologiques sur cône, des tests en tunnel et des tests chimiques, sur une période de trois ans d'utilisation sur le terrain ; comparer l'efficacité insecticide entre ces [« lieux » ou « marques », selon le cas] et identifier les principaux déterminants de la performance sur le terrain (par exemple, les caractéristiques des utilisateurs de moustiquaires, les comportements de lavage, etc.)
2. Contrôler l'intégrité physique des moustiquaires, mesurée par une évaluation des trous de moustiquaires et un bref questionnaire.
3. Estimer indirectement le niveau d'attrition des moustiquaires à chaque tour.

## Avantages et valeur attendus

Les résultats de l'étude proposée permettront de :

* Fournir au PNLP, à la PMI et aux partenaires de Roll Back Malaria (RBM) des informations précieuses concernant les nouvelles marques de MII distribuées lors de la campagne de masse, par exemple l'efficacité insecticide, et si et comment celle-ci varie selon [« lieu » ou « marque », selon le cas].

# Méthodes

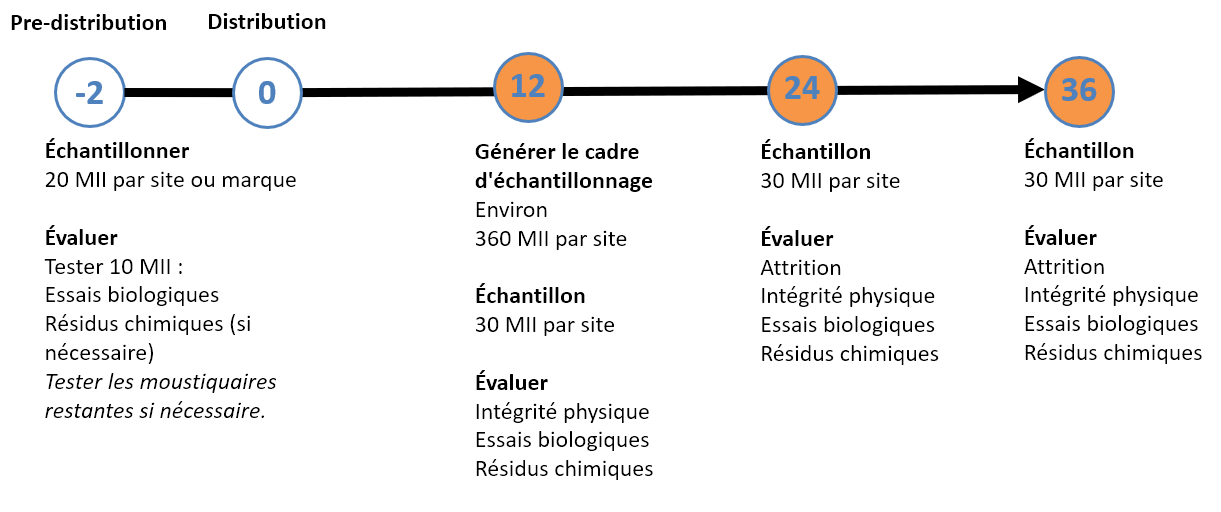
## Conception de l'étude

La conception principale de la surveillance simplifiée de la durabilité des MII est une étude prospective utilisant des visites transversales répétées dans les grappes échantillonnées avec des MII échantillonnées au hasard et retirées des ménages sélectionnés à chaque tour.

Une fois que les ITN ont atterri dans le pays et avant le début de la campagne de distribution des ITN, 20 ITN par site/marque seront prélevés dans les magasins centraux pour subir des tests biologiques et des tests de résidus chimiques. Les 20 ITN subiront d'abord des essais biologiques, puis effectueront des tests chimiques sur une sélection aléatoire de 10 des 20 mêmes moustiquaires, en suivant les méthodes décrites plus loin dans ce protocole. Si les résultats sont conformes aux attentes de la marque, aucun autre test ne sera effectué. Si les résultats ne sont pas ceux attendus (par exemple, s'ils ne répondent pas aux spécifications du fabricant), une analyse chimique sera effectuée sur les 10 moustiquaires restantes. Les résultats de ces tests constitueront le point de temps de pré-distribution auquel les résultats de l'étude seront comparés.

12 mois après la campagne de masse, un échantillon représentatif d'environ 258 moustiquaires de campagne de chaque site d'étude sera identifié par une enquête par grappes auprès des ménages, toutes les moustiquaires de campagne des ménages consentants constituant le cadre d'échantillonnage. Ces moustiquaires seront étiquetées avec un identifiant unique. Au départ, un échantillon aléatoire de 30 moustiquaires de campagne sera sélectionné dans le cadre d'échantillonnage et retiré pour des tests biologiques et une évaluation de l'intégrité physique ; les échantillons de ces moustiquaires pourront être soumis à des tests de résidus chimiques, en fonction des résultats des tests biologiques. A chaque cycle d'enquête ultérieur (24 et 36 mois), un échantillon aléatoire de 30 moustiquaires de campagne sera sélectionné dans le cadre d'échantillonnage et retiré pour des tests biologiques, des tests de résidus chimiques et une évaluation de l'intégrité physique. Une enquête sur les ménages portant sur les caractéristiques des ménages et les comportements en matière de soins des moustiquaires sera réalisée dans chaque ménage où une ou plusieurs moustiquaires de la campagne sont retirées. Les moustiquaires retirées seront remplacées par des MII neuves, marquées de la date afin qu'elles ne soient pas échantillonnées lors des prochains cycles. Avant de subir les tests destructifs d'efficacité des insecticides, l'intégrité physique des MII échantillonnées sera mesurée à chaque tour en utilisant la méthode standard d'évaluation des trous[[8]](#footnote-9). A chaque tour d'enquête, l'attrition des MII sera indirectement estimée sur la base du nombre de moustiquaires de campagne sélectionnées au hasard qui doivent être remplacées dans l'échantillon jusqu'à ce que le contingent complet de 45 moustiquaires ait été identifié et retiré.

Figure 1 Vue d'ensemble de la conception de l'étude



## Sites d'étude

*Modifiez la description ci-dessous en fonction de la conception de votre étude (comparaison de différentes marques dans des lieux similaires ou de la même marque dans des lieux différents).*

L'étude sera réalisée à [Lieu(x)] (Tableau 3).

Tableau 3 Caractéristiques du site d'étude

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Lieu 1** | **Lieu 2** | **Lieu 3** |  |
| Site d'étude |  |  |  |  |
| Marque de MII |  |  |  | **Source** |
| **Environnement** | | | | |
| Altitude (m) |  |  |  |  |
| Précipitations annuelles (mm) |  |  |  |  |
| Température moyenne maximale (°C) |  |  |  |  |
| Température moyenne minimale (°C) |  |  |  |  |
| Classification climatique (Koppen-Geiger) |  |  |  |  |
| Principale activité économique de la population |  |  |  |  |
| **Démographie et santé** | | | | |
| Population (Province) |  |  |  |  |
| Taux de fécondité total |  |  |  |  |
| Pourcentage d'enfants de moins de 5 ans ayant eu de la fièvre au cours des deux dernières semaines |  |  |  |  |
| **Épidémiologie du paludisme** | | | | |
| Description de la ou des saisons de transmission du paludisme |  |  |  |  |
| Prévalence de l'anémie chez les enfants de moins de 5 ans |  |  |  |  |
| Pourcentage de ménages disposant d'au moins une MII pour 2 personnes (%) |  |  |  |  |
| Accès de la population aux MII (%) |  |  |  |  |
| Utilisation de MII par la population (%) |  |  |  |  |
| Ratio d'utilisation de la MII : accès |  |  |  |  |
| Prévalence du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans, par TDR (%) |  |  |  |  |
| Prévalence du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans, par microscopie (%) |  |  |  |  |
| *Accès de la population* : Proportion de la population qui serait en mesure d'utiliser une MII si chaque MII dans un ménage était utilisée par deux personnes.  *Rapport utilisation/accès* : Rapport entre l'utilisation par la population et l'accès par la population | | | | |

Figure 2: Sites de surveillance simplifiée de la durabilité des MII

*Carte des sites de surveillance simplifiée de la durabilité des MII*

## Marques de MII

*Remplissez le tableau ci-dessous pour chaque marque de MII incluse dans l'activité de surveillance. Ajoutez ou supprimez des colonnes si nécessaire en fonction du nombre de marques surveillées.*

Tableau 4 Caractéristiques des marques de MII

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Marque** |  |  |  |
| **Type *Pyréthrinoïde uniquement PBO-synergiste Double IA*** |  |  |  |
| **Teneur en produits chimiques (g/kg et mg/m2)** |  |  |  |
| **Tissu** |  |  |  |
| **Denier** |  |  |  |
| **Forme** |  |  |  |
| **Fabricant** |  |  |  |

## Taille de l'échantillon

La détermination de la taille de l'échantillon pour cette activité s'appuie sur les directives standard de l'OMS pour les tests de terrain des moustiquaires[[9]](#footnote-10). Trente (30) MII par site seront collectées à chaque cycle d'évaluation (12, 24, 36 mois). D'un point de vue logistique, ces MII seront échantillonnées en tant que 2 MII dans les ménages de chacun des 15 clusters. En supposant, dans le pire des cas, que le niveau de la principale mesure de résultat d'intérêt (qui variera en fonction du type de MII) est de 50% après trois ans, l'échantillon fournira une précision de 12%-points dans une analyse unilatérale.

La taille de l'échantillon analytique de 30 MII à la fin de la surveillance (cycle de 36 mois) doit être traduite en un échantillon opérationnel pour informer la taille du cadre d'échantillonnage requise au départ. L'analyse secondaire des données d'attrition de 12 études de surveillance de la durabilité financées par la PMI, achevées ou lancées depuis 2015, a permis d'identifier les estimations mensuelles de l'attrition présentées dans le tableau 5[[10]](#footnote-11). Les valeurs médianes ont été utilisées dans cette analyse.

Tableau 5 Estimations de l'attrition des MII

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Délai** | **Attrition médiane mensuelle** | **Attrition mensuelle du quartile supérieur** |
| De la base de référence à 12 mois | 2,0% | 3,5% |
| De 12 mois à 36 mois | 2,1% | 3,0% |

En supposant qu'à 36 mois, il est souhaitable d'avoir au moins 100 MII présentes dans le cadre d’échantillonnage de chaque site (parmi lesquelles seront sélectionnées les 30 dernières moustiquaires), alors au départ, un minimum de 258 MII doit figurer dans le cadre d’échantillonnage pour le cycle d’évaluation de 12 mois. Ces 258 MIIs à 12 mois sont les MIII survivantes de 360 MII distribuées en supposant que les MII sont soumises à l’attrition mensuelle médiane.

Pour des raisons de cohérence avec l'approche d'échantillonnage utilisée pour la surveillance standard de la durabilité, l'étude travaillera avec 15 grappes dans chaque site. Le nombre requis de ménages par grappe dépendra de la taille moyenne des ménages, en supposant que la stratégie de distribution standard de 1 MII pour 1,8 personne a été suivie lors de la planification de la distribution. Afin de réduire la corrélation intra-grappe en considérant les MII provenant potentiellement du même ménage, tout en maintenant l'efficacité de la conception de l'étude, le nombre de MII incluses dans le cadre d'échantillonnage provenant d'un même ménage est plafonné à 2. Le tableau 6 fournit une référence pour le nombre de ménages par grappe, sur la base de la taille moyenne des ménages dans une localité. Pour utiliser le tableau, la taille des ménages dans les localités étudiées est arrondie à l'entrée la plus proche.

Tableau 6 Tailles de grappes requises

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **La taille moyenne des ménages dans les sites étudiés est d'au moins...** | **Campagne de distribution de MII par ménage (en supposant 1 pour 1,8 personne)** | **Taille requise des grappes (ménages)** |
| 3,2 | 1,8 | 14 |
| 3,4 | 1,9 | 13 |
| 3,7 | 2,1 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 4 | 2,2 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 4,3 | 2,4 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 4,7 | 2,6 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 5,2 | 2,9 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 5,8 | 3,2 | 12 avec un plafond de moustiquaires |
| 6,6 et plus | 3,7 | 12 avec un plafond de moustiquaires |

La taille moyenne des ménages dans [localité(s)] est de [taille moyenne des ménages] et cette étude échantillonnera donc 15 grappes avec [nombre] ménages par grappe pour chaque localité.

## Procédures d'échantillonnage

### Première étape : sélection des grappes

Les registres de distribution de MII de la campagne pour les sites de l'étude proviendront du Programme national de lutte contre le paludisme. Une grappe sera définie comme la zone géographique de niveau le plus bas utilisée pour la planification de la campagne. La sélection des grappes se fera par échantillonnage de probabilité proportionnelle à la taille (PPS), le nombre de MII distribuées par grappe étant la mesure de la taille. Si les registres ne sont pas disponibles, les zones d'énumération du recensement seront échantillonnées en utilisant la PPS avec la population comme mesure de la taille.

### Deuxième étape : sélection des ménages et du cadre d'échantillonnage des moustiquaires de l'étude

Dans chaque grappe sélectionnée, [nombre] ménages seront sélectionnés selon la méthodologie suivante : si la grappe compte moins de 200 ménages, l'équipe de terrain dressera une liste ou une carte de toutes les maisons habitées et le chef d'équipe échantillonnera de manière aléatoire le nombre requis de ménages avec une probabilité égale en utilisant des listes de numéros aléatoires. En outre, la moitié du nombre de ménages requis (arrondis à l'unité supérieure) sera sélectionnée comme ménages alternatifs, qui seront utilisés si un ménage échantillonné déclare n'avoir jamais reçu de moustiquaires lors de la campagne. Suivant la définition de ménage utilisée dans la campagne de distribution de MII, la définition d'un ménage sera « les personnes mangeant dans le même plat ».

Si la grappe dépasse 200 ménages, une approche par section de taille égale sera utilisée. Avec l'aide des chefs locaux, la grappe sera divisée en sections de taille à peu près égale (80-100 ménages). L'une de ces sections sera choisie au hasard par le chef d'équipe à l'aide d'un générateur de nombres aléatoires et, dans cette section, tous les ménages seront répertoriés et/ou cartographiés. La sélection des ménages se fera ensuite comme indiqué ci-dessus. Le nombre de sections sera enregistré par le chef d'équipe afin que les pondérations puissent être correctement appliquées pour l'analyse. Pour faciliter la sélection des ménages, l'utilisation d'images satellites et d'empreintes de bâtiments pour cartographier les ménages avant le début du travail sur le terrain sera étudiée.

Les ménages échantillonnés seront sélectionnés pour déterminer s'ils ont participé à la campagne de distribution de MII. La sélection consistera en une brève introduction par l'équipe de l'étude et une série de questions pour déterminer l'éligibilité des répondants et des ménages. Si un ménage n'est pas éligible pour l'étude parce qu'il n'a pas participé à la campagne de masse ou parce qu'il y a participé mais qu'il ne reste aucune MII de la campagne dans le ménage, il sera éliminé et ne sera pas inclus dans le cadre d'échantillonnage. Si un ménage confirme sa participation à la campagne et la présence d'une ou plusieurs MII de la campagne, des informations sur l'étude seront données et un consentement oral sera demandé en utilisant le script de consentement. La fiche d'information et le formulaire de consentement seront disponibles en [« anglais », « français » ou « portugais »] et en [langue(s) écrite(s) locale(s)] et seront lus au répondant dans sa langue locale par un membre de l'équipe de terrain maîtrisant cette langue. Si le ménage ne donne pas son consentement, il sera abandonné et un autre ménage sera visité jusqu'à ce que le total de [nombre] ménages soit atteint.

Pour chaque ménage consentant, les coordonnées GPS et le nom complet du chef de famille seront enregistrés et inscrits sur le formulaire de la *Liste des moustiquaires et échantillonnage* qui seront utilisés pour identifier les ménages lors des visites de surveillance annuelles.

Dans chaque ménage, toutes les MII de la campagne seront identifiées par l'équipe de terrain sur la base de l'étiquette de la moustiquaire, de ses caractéristiques et de la confirmation de la source de la moustiquaire par les membres du ménage. Chaque moustiquaire de la campagne sera étiquetée avec un numéro d'identification unique qui sera utilisé pour créer une liste principale de moustiquaires qui servira de cadre d'échantillonnage au cycle d’évaluation de 12 mois.

### Troisième étape : sélection des moustiquaires pour l'analyse

En utilisant le cadre d'échantillonnage des MII généré au cours de la deuxième étape, 2 MII par grappe seront sélectionnées au hasard et retirées pour être analysées à chaque cycle d'évaluation. Pour les évaluations de surveillance à 24 et 36 mois, les MII non sélectionne par grappe seront également sélectionnées dans le cadre de l'échantillonnage. Ces MII alternatives seront utilisées dans l'ordre au cas où l'une des MII prévues pour l'échantillonnage serait perdue ou ne serait pas disponible pendant la visite (par exemple, si la MII identifiée n'est pas disponible le jour de la visite). Il ne devrait pas être nécessaire d'utiliser d'autres MII au cycle d’évaluation de 12 mois, car la sélection des MII et les entrevues auront lieu immédiatement après la création du cadre de l'échantillonnage et tous les ménages et MII devraient être disponibles. Le consentement oral du chef de famille ou de son représentant sera demandé avant de commencer et les répondants recevront une version abrégée du questionnaire standard de surveillance de la durabilité des MII. Les ménages recevront une nouvelle MII pour remplacer celle qui a été retirée ; la nouvelle MII sera de la même marque que celle qui a été retirée ou, si cela n'est pas possible, aura les mêmes ingrédients actifs. Les MII de l'étude seront réétiquetées et emballées dans des sacs plastiques individuels pour le transport vers le laboratoire.

## Questionnaires

L'activité de surveillance utilisera deux questionnaires. Le premier, intitulé *Liste des moustiquaires et échantillonnage*, permettra de recueillir des informations sur les grappes d'étude, les emplacements des ménages sélectionnés et les MII de campagne étiquetées au moment de la sélection. Le second permettra de recueillir des informations sur les MII sélectionnées à chaque cycle d'évaluation. Ces informations seront ensuite analysées.

Le questionnaire intitulé *Liste des moustiquaires et échantillonnage* sera utilisé pour identifier les ménages éligibles et répertorier les ménages éligibles et leurs MII de campagne dans le cadre d'échantillonnage. Il comprend des sections sur les points suivants :

* Les questions de dépistage pour déterminer l'éligibilité des ménages à l'inscription sur la liste (elles seront administrées dans le cadre du partage des informations sur l'étude avec les ménages sélectionnés ; aucune information ne sera enregistrée pour les ménages inéligibles ou ceux qui refusent de participer, sauf pour le résultat de la visite de dépistage [inéligible/refus]).
* Identification du ménage, y compris les coordonnées GPS et le nom complet du chef de famille.
* Identification des MII, en enregistrant le nombre de MII de la campagne présentes et en attribuant à chacune un identifiant unique.

Le questionnaire principal de surveillance sera utilisé pour saisir les informations associées aux MII sélectionnées pour analyse en laboratoire à chaque cycle. Il comprend des sections sur les points suivants :

* Les caractéristiques du ménage (composition, actifs et autres facteurs potentiellement associés à la détérioration de l'insecticide)
* Les habitudes de manipulation et d'utilisation des MII de la campagne sélectionnée, ainsi que les habitudes de lavage et de séchage
* Évaluation des trous en laboratoire

Cette étude utilisera des questionnaires sur le terrain en utilisant le logiciel Open Data Kit (ODK) disponible publiquement pour effectuer la collecte électronique des données (EDC). En outre, au début de l'étude, la *Liste des moustiquaires et échantillonnage* sera générée sur papier afin de permettre une sélection aléatoire immédiate des MII pour la première série d'analyses. Les questionnaires seront adaptés à partir des questionnaires de surveillance de la durabilité de l'ODK et testés à plusieurs reprises pour s'assurer que des versions parfaitement opérationnelles sont disponibles au début du travail sur le terrain. Les questionnaires intégreront des modèles de saut et des filtres, ainsi que des contrôles de cohérence interne, des contrôles d'intervalle et des contrôles logiques pour renforcer la qualité des données. Les questionnaires seront utilisés pour la collecte électronique des données et seront disponibles en [« anglais », « français » ou « portugais »] et en [langue(s) écrite(s) locale(s)].

## Procédures de terrain

### Phase préparatoire

Au cours de la phase préparatoire, les registres de distribution de la campagne de distribution des MII seront obtenus et l'échantillonnage en grappes sera réalisé dans chaque site de l'étude. Après des expériences dans d'autres pays où la marque de MII trouvée lors de la collecte des données n'était pas celle prévue, des mesures seront prises pour vérifier que les moustiquaires cibles ont été distribuées dans les lieux d'étude à travers des discussions et une confirmation avec le PNLP et le personnel le plus proche des lieux. Un ensemble détaillé de matériel de formation principal sera modifié pour s'adapter au contexte du pays. Un support visuel pour l'identification de la marque des MII sera également préparé à l'avance. Il s'agira d'une feuille laminée contenant des photographies des marques de MII de la campagne, avec une photographie de l'étiquette et une autre de la moustiquaire. Des aides visuelles et des feuilles de pointage pour l'évaluation des trous seront également préparées à l'avance.

En collaboration avec [nom du partenaire de mise en œuvre local], des descriptions de poste pour les équipes de surveillance seront élaborées et un personnel compétent ainsi qu'un laboratoire capable de réaliser les tests biologiques requis seront identifiés. Les tests de résidus chimiques seront effectués par [nom du laboratoire]. Le même laboratoire sera utilisé pour les analyses de tous les points de collecte de données pendant la durée de l'activité.

### Travail sur le terrain

#### Équipes et formation

Chaque site de surveillance aura sa propre équipe de mise en œuvre, composée de deux techniciens et d'un chauffeur [à personnaliser en fonction de la configuration du pays]. On estime à 18 jours par site le temps nécessaire au départ pour lister/cartographier les ménages, générer le cadre d'échantillonnage des MII et interroger les ménages dans chacune des 15 grappes, y compris les déplacements vers et depuis les sites d'étude. Cela suppose que pour chaque grappe, la liste des ménages, l'échantillonnage et les entretiens peuvent être réalisés en une journée en plus des 3 jours de voyage. Pendant les cycles de surveillance, chaque site peut être réalisé par une équipe en 8 jours (en supposant que les routes soient praticables, car le déplacement d'une grappe à l'autre sera le facteur déterminant du temps de travail sur le terrain pendant les cycles de surveillance).

Les techniciens seront soigneusement sélectionnés de manière à ce qu'ils soient culturellement acceptables, qu'ils aient une bonne connaissance des langues locales, qu'ils aient de l'expérience dans la réalisation de tests biologiques et dans la surveillance entomologique ou les enquêtes sur les ménages. Avant le tour de l'étude de base, il y aura une formation de trois jours qui comprendra les éléments suivants :

* Compréhension de la conception de l'étude et des procédures pour générer le cadre d'échantillonnage.
* Approche générale de l'éthique du travail sur le terrain (consentement et entretien)
* Introduction et utilisation pratique du logiciel de saisie des données
* Étude détaillée de l'entrevue avec jeu de rôle
* Étiquetage et conditionnement des MII retirées pour analyse
* Évaluation pratique des trous au laboratoire à l'aide du cadre
* Vue d'ensemble des procédures opérationnelles standard (SOP) des essais biologiques

Juste avant chaque cycle de surveillance, une formation de remise à niveau de deux jours sera dispensée, en prévoyant que les mêmes techniciens seront engagés pendant la durée de l'étude. La durée exacte de la formation dépendra du niveau d'expérience des techniciens engagés dans l'activité. La formation de base sera dirigée dans le pays par une équipe d'experts locaux, régionaux et/ou internationaux en matière de surveillance de la durabilité. Les formations de remise à niveau seront menées à distance et dirigées par la même équipe que lors de la formation de base, à l'aide d'un logiciel de vidéoconférence.

#### Logistique et administration

Les laboratoires partenaires ou les agences de l'équipe de terrain s'assureront qu'un personnel administratif et logistique suffisant est prévu au budget pour soutenir le travail sur le terrain.

#### Sensibilisation

Dès que les grappes sont sélectionnées, les autorités locales et les personnes influentes, telles que les chefs, seront informées de l'objectif et du calendrier prévu de l'enquête et leur soutien sera sollicité. Les communautés au sein des clusters seront sensibilisées aux objectifs et aux activités de l'étude afin d'obtenir une coopération maximale pour les enquêtes.

#### Consentement et entrevues avec les ménages

Au cours de la sélection visant à créer le cadre d'échantillonnage des MII, les ménages sélectionnés seront visités et le chef de famille ou son représentant sera interrogé pour déterminer si le ménage remplit les conditions requises pour l'étude. Les informations sur l'étude seront fournies en [« anglais », « français » ou « portugais »] et en [langue écrite locale] et, si nécessaire, seront lues au répondant dans sa langue locale par un membre de l'équipe de terrain maîtrisant cette langue. Un consentement écrit sera demandé pour inclure le ménage dans le cadre d'échantillonnage de l'étude et saisir les coordonnées GPS et le nom complet du chef de famille. Chaque ménage recevra un numéro d'identification unique composé de la grappe et du numéro du ménage. Si un ménage sélectionné n'est pas disponible pour une raison quelconque (refus ou déplacement hors de la grappe lors des cycles de surveillance), le ménage sera abandonné et l'un des suppléants échantillonnés sera utilisé à la place.

Pendant le premier cycle et le cycle de surveillance, les MII seront échantillonnées pour être retirées du cadre d'échantillonnage. Après l'échantillonnage des MII, les ménages respectifs d'une grappe seront visités. Lors des visites de surveillance, des informations sur l'étude seront à nouveau fournies et - pour toutes les visites - le consentement oral sera demandé avant que la MII échantillonnée ne soit retirée et que le questionnaire court ne soit administré au chef de famille ou à son représentant. Si un ménage sélectionné n'est pas disponible au moment de la visite pour une raison quelconque, l'équipe poursuivra la sélection des MII restantes dans la grappe avant de retourner dans les ménages non disponibles. Si toutes les autres MII ont été échantillonnées et que les ménages sélectionnés ne sont toujours pas disponibles, ces MII/ménages seront abandonnés et une ou plusieurs MII de remplacement seront ciblées pour être incluses, à partir de la liste prédéterminée de MII de remplacement pour la grappe.

#### Identification et étiquetage de la moustiquaire de campagne

Afin d'identifier une MII comme provenant de la campagne de masse et de créer le cadre d'échantillonnage des MII, les techniciens inspecteront chaque moustiquaire dans les ménages sélectionnés pour le cadre d'échantillonnage et compareront l'étiquette et les caractéristiques de la moustiquaire avec les supports visuels préparés précédemment. Si l'étiquette correspond à la marque de la moustiquaire de la campagne, les répondants seront interrogés sur la source et le moment où ils ont obtenu la moustiquaire. Si cette information confirme que la moustiquaire est une moustiquaire de campagne, elle sera étiquetée avec un identifiant unique à l'encre indélébile. Les moustiquaires qui ne peuvent être vérifiées comme étant des moustiquaires de campagne ne seront pas incluses dans le cadre d'échantillonnage.

Avant chaque cycle de surveillance, le cadre d'échantillonnage des MII sera mis à jour pour retirer les moustiquaires retirées lors du cycle précédent et une nouvelle sélection aléatoire de 45 moustiquaires par site sera effectuée. Pour chaque moustiquaire sélectionnée, l'identifiant de la moustiquaire, l'identifiant du ménage associé et le nom du chef de famille seront imprimés par grappe. L'équipe de terrain utilisera ces détails pour localiser les ménages et les MII pour la surveillance. Tous les formulaires papier seront détruits par les chefs d'équipe sur le terrain lorsque les équipes auront terminé la collecte des données.

#### Retrait et remplacement des moustiquaires pour l'analyse

Après avoir reçu le consentement oral, les techniciens administreront le questionnaire, retireront la moustiquaire et l'emballeront dans un sac plastique individuel pour la transporter au laboratoire pour l'évaluation des trous, les tests biologiques et l'envoi d'échantillons pour les tests de résidus chimiques. Une nouvelle moustiquaire de remplacement identique sera ensuite remise au ménage et marquée de la date afin qu'il ne soit pas échantillonné lors des prochains cycles.

#### Collecte, gestion et sécurité des données

Pour la collecte des données, on utilisera des dispositifs électroniques qui permettent une programmation détaillée des schémas de saut et des contrôles internes pour garantir que toutes les données nécessaires sont collectées et cohérentes. En fonction des conditions locales, les données de chaque entretien seront téléchargées dans une base de données sécurisée sur Internet à la fin de chaque journée, ou dès qu'une connexion de données pourra être établie par la suite.

À partir de ces données, une liste maîtresse des MII (le cadre d'échantillonnage des MII) sera créée et mise à jour après chaque cycle d'évaluation (en plus des données transversales collectées dans le cadre du cycle).

La liste principale des MII comprendra l'identifiant de la MII de la campagne, les coordonnées GPS du ménage, le nom complet du chef de famille, un enregistrement indiquant si la moustiquaire a déjà été échantillonnée et retirée, et un enregistrement indiquant si les MII ou des ménages entiers ne sont plus disponibles pour l'échantillonnage. Entre les enquêtes, ce fichier sera crypté par un mot de passe et conservé en toute sécurité sur un dispositif de stockage de données fixe et sécurisé (serveur), également protégé par un mot de passe. Seuls les enquêteurs de l'étude de surveillance pourront y accéder. Le(s) fichier(s) de la liste principale des MII contenant les noms et les coordonnées GPS seront supprimés immédiatement après la collecte finale des données au bout de 36 mois.

Il est important d'enregistrer la géolocalisation précise de la surveillance de la durabilité. Afin de permettre une précision suffisante pour l'analyse géographique des résultats, mais sans permettre la localisation des ménages étudiés, les coordonnées GPS seront modifiées en introduisant une petite erreur aléatoire lors du nettoyage des données. Les données relatives au nom complet seront supprimées pendant le nettoyage afin que les fichiers de données analytiques ne contiennent aucun identifiant personnel.

#### Supervision et soutien sur le terrain

Les rapports quotidiens, y compris les difficultés imprévues, seront communiqués à l'EP de l'étude pour discussion et résolution. Le contrôle qualité externe sera assuré par [partenaire de mise en œuvre/poste] qui surveillera la collecte des données à distance en temps réel et fournira un retour d'information aux équipes locales par WhatsApp, e-mail et appels téléphoniques.

## Activités de laboratoire

Les MII échantillonnées seront envoyées au laboratoire partenaire de l'étude pour l'évaluation des trous, les tests biologiques et la préparation des échantillons en vue de leur expédition à [Nom du laboratoire].

### Évaluation des trous de la moustiquaire

Avant d'effectuer les tests biologiques et de couper les échantillons pour les tests de résidus chimiques, chaque moustiquaire sera évaluée pour vérifier son intégrité physique et les signes de réparation en utilisant un cadre pour suspendre la moustiquaire dans le laboratoire. En inspectant séparément chaque côté et la face du dessus de la moustiquaire, les techniciens compteront et classeront les trous présents en quatre tailles différentes, selon les directives de l'OMS : 0,5 à <2 cm, 2 à <10 cm, 10 à <25 cm et plus de 25 cm de diamètre. Des règles de mesure et des gabarits de trous seront utilisés pour assurer une mesure précise. La présence et le nombre de trous réparés seront notés, mais ils ne seront pas comptés comme des trous. Les données seront saisies à l'aide de la collecte électronique des données dans une copie du questionnaire principal pour la MII sélectionnée.

### Analyses de laboratoire

Les tests d'efficacité insecticide seront réalisés conformément aux directives modifiées de l'OMS pour les moustiquaires à base de pyréthrinoïdes uniquement et aux procédures opérationnelles standard développées en collaboration avec la PMI pour tester les moustiquaires à base de PBO-synergiste et à double IA. Des échantillons de moustiquaires adjacentes seront découpés dans chaque panneau de moustiquaires pour les tests biologiques et les tests de résidus chimiques. Le tableau 7 donne un aperçu des méthodes utilisées pour les nouveaux types de MII pour lesquels il existe des approches standard ; une brève description des méthodes de laboratoire suit ensuite. Les modes opératoires normalisés complets sont fournis dans les sections 7 (PBO) et 8 (double IA).

Tableau 7 Aperçu des procédures d'essai biologique

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Type de MII** | **Ingrédient cible** | **Essais sur cône** | **Tests en tunnel** |
| Pyréthroïde standard uniquement | Alpha-cyperméthrine, deltaméthrine, perméthrine | Souche sensible sur les échantillons de terrain et contrôle négatif |  |
| PBO-synergiste | Pyréthroïde | Souche sensible sur les échantillons de terrain des côtés et de la face du dessus et contrôle négatif |  |
| Butoxyde pipéronyle (PBO) | Souche résistante aux pyréthroïdes sur la face du dessus des échantillons de terrain, sur le contrôle positif PBO-synergiste, sur le contrôle positif pyréthroïde seulement et sur le contrôle négatif |  |
| Double IA avec Chlorfénapyre | Chlorfénapyre |  | Déformation résistante aux pyréthroïdes sur deux pièces par filet échantillonné sur le terrain et sur un contrôle négatif \*. |
| Double IA avec pyriproxyfène | Pyréthroïde | Souche sensible sur les échantillons de terrain et contrôle négatif |  |
| pyriproxyfène\*\* | Souche résistante aux pyréthroïdes sur des échantillons de terrain, sur un contrôle positif de pyréthroïde + pyriproxyfène contrôle et sur un contrôle négatif |  |
| \* Un nouveau contrôle positif double IA et un contrôle positif du précurseur à base de pyréthrinoïdes uniquement du réseau double IA (lorsqu'il existe) utilisés pour caractériser la souche avant le test  \*\* Oviposition mesurée à la suite des essais biologiques au cône | | | |

### Essais biologiques sur cône

*Résumez les procédures opérationnelles normalisées pour les essais biologiques sur cône et les essais en tunnel, en fonction des marques de MII incluses dans l'activité de surveillance. Le texte est inclus ci-dessous à titre d'exemple.*

#### Préparation de la moustiquaire

*MII contenant uniquement des pyréthrinoïdes*

Pour chaque filet échantillonné, quatre morceaux de 30 cm × 30 cm seront coupés dans les positions standard 2, 3, 4 et 5 (la position standard 1 sera incluse pour les tests de pré-distribution mais exclue des tests de post-distribution car elle peut être exposée à une abrasion excessive en utilisation courante en rentrant et en dépliant sous le lit ou la surface de couchage). Les échantillons de filet seront étiquetés avec l'ID du filet et la position de coupe et seront stockés dans un endroit frais et sec à 4 degrés Celsius jusqu'au début des tests.

*MII double AI (contenant du chlorfénapyre ou du pyriproxyfène) et MII synergiste PBO*

Pour chaque filet échantillonné, quatre morceaux de 30 cm x 30 cm seront coupés : 2 morceaux des positions latérales et 2 morceaux coupés du toit. Les échantillons de filet seront étiquetés avec l'ID du filet et la position de coupe et seront stockés dans un endroit frais et sec à 4 degrés Celsius jusqu'au début des tests.

#### Test de l'efficacité résiduelle des pyréthroïdes

Pour tester l'efficacité résiduelle des pyréthroïdes, on utilisera des femelles non nourries, âgées de 2 à 5 jours et élevées sous insecticide, d'une souche sensible aux pyréthroïdes. Pour chaque pièce de moustiquaire testée (voir 2.8.3.1 ci-dessus), cinq moustiques à la fois seront introduits dans deux cônes de l'OMS (10 moustiques par pièce au total). Le nombre total de moustiques testés sera de 40 ou 60, selon la marque de la MII. La même procédure de coupe sera surveillancee pour un échantillon de moustiquaire non traitée servant de contrôle négatif, et le même nombre de moustiques testés contre le contrôle négatif. Les résultats de la moustiquaire témoin peuvent être partagés par tous les tests biologiques effectués le même jour. Si la mortalité du contrôle est supérieure à 10 %, le test sera répété. L'effet knock-down sera mesuré 60 minutes après l'exposition (KD60) et la mortalité sera enregistrée après 24 heures.

#### Test de l'impact global des moustiquaires PBO sur les moustiques résistants

Afin d'évaluer l'impact global des moustiquaires PBO sur les moustiques résistants, une souche résistante aux pyréthrinoïdes sera utilisée dans les essais biologiques de cônes. Les souches seront caractérisées avant le début des tests biologiques selon les procédures normalisées. Les tests biologiques sur cônes effectués sur des échantillons de terrain suivront les mêmes procédures que celles décrites au point 2.8.3.2 ci-dessus. Ainsi, le même nombre de moustiques sera testé contre les mêmes morceaux de moustiquaire provenant des mêmes endroits pour les souches sensibles et résistantes. En outre, les contrôles suivants seront utilisés lors des tests des MII PBO : un contrôle négatif de moustiquaire non traitée, cinq nouvelles moustiquaires de la marque PBO comme contrôles positifs et une nouvelle MII avec le même ingrédient actif pyréthroïde (par exemple PermaNet 2.0 lors du test de PermaNet 3.0).

### Tests en tunnel

#### Test de l'efficacité résiduelle du chlorfénapyre

Trois tunnels seront utilisés pour chaque morceau de filet à évaluer à l'aide d'une souche résistante aux pyréthroïdes. Le premier sera un tunnel avec un filet de contrôle non traité ; le deuxième et le troisième auront deux pièces de l'échantillon de terrain IG2 à évaluer. Une pièce latérale et une pièce de toit seront utilisées. Si plus de 3 tunnels par nuit peuvent être exécutés, un seul ensemble de contrôles positifs et négatifs doit être exécuté et les résultats peuvent être partagés entre tous les échantillons de terrain IG2 testés. Un minimum de 10 MII de contrôle IG2 positives seront utilisées à des fins de comparaison pendant le test, compte tenu de la forte variation de mortalité enregistrée lors des tests sur les nouvelles moustiquaires IG2 enregistrées au Burkina Faso.

Cinquante moustiques femelles nullipares résistantes, âgées de 5 à 8 jours et privées de sucre pendant 6 heures, seront introduites dans l'extrémité opposée à l'appât à 18h00. Les lumières de la pièce seront éteintes, et ne seront rallumées qu'à la fin du test du tunnel le lendemain matin à 7h00. La période d'exposition totale devrait être de 12 à 15 heures. Les conditions environnementales dans la pièce pendant la nuit doivent être de 27 ± 2 °C et 75% ± 10% d'humidité relative.

A 7h, 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 collectés dans le tunnel, en notant le compartiment dans lequel les moustiques ont été collectés (compartiment initial/compartiment animal), le statut d'alimentation en sang (nourri/non nourri), et la mortalité (vivant/mort).

Les moustiques survivants des tunnels seront placés dans des coupes recouvertes d’une moustiquaire non traité, et de la ouate imbibée de solution sucrée sera placée sur le dessus des coupes, permettant aux moustiques de se nourrir ad libitum. La mortalité sera enregistrée à 18 heures (24 heures après le début de l'essai en tunnel), puis à nouveau à 48 et 72 heures. Les données sur l'alimentation sanguine seront également enregistrées pour estimer l'inhibition corrigée de l'alimentation sanguine due au chlorfénapyr.

### Mesure de la Oviposition

#### Tester l'efficacité résiduelle du pyriproxyfène

Les procédures décrites au point 2.8.3.2 sont mises en œuvre pour les souches de moustiques sensibles et résistantes aux pyréthrinoïdes en utilisant des moustiques *Anophèles* femelles nourris avec du sang âgé de 3 à 5 jours. Les moustiques doivent être nourris avec du sang 6 à 12 heures avant l'exposition. Les moustiques doivent rester dans leurs contenants jusqu'au jour 4 (trois jours après l'exposition). Les moustiques vivants au jour 4 doivent être transférés individuellement dans leur propre chambre de ponte artificielle et recevoir un repas sucré. Au jour 8 (quatre jours après la mise en chambre), le nombre de moustiques vivants et morts est enregistré, ainsi que si chaque moustique a pondu des œufs. À la fin du test, jetez les moustiques en toute sécurité.

### Résidu chimique

Pour l'analyse du contenu insecticide, quatre ou six échantillons de 10 cm x 10 cm seront découpés dans chaque moustiquaire échantillonnée à des endroits adjacents à ceux découpés pour les essais biologiques. Ils seront étiquetés avec le numéro d'identification de la moustiquaire, emballés dans des enveloppes en aluminium par moustiquaire et expédiés au [Nom du laboratoire] pour l'analyse des résidus chimiques en utilisant la méthode analytique RESMM002 accréditée ISO 17025.

## Mesures des résultats

### Résultats des essais biologiques

Le résultat primaire de l'efficacité insecticide sera basé sur les résultats du test biologique en utilisant les critères suivants. Les dénombrements seront enregistrés pour chaque morceau de filet et répliqués individuellement, et les données répliquées seront regroupées pour analyse.

Pour les **MII à la pyréthrinoïde uniquement** et les **MII synergiques au PBO**, la proportion de MII ayant atteint une efficacité optimale et minimale sera estimée à chaque cycle d'évaluation.

L'efficacité optimale est définie comme suit :

* KD60 ≥ 95% ou mortalité sur 24 heures ≥ 80% par le test du cône

L'efficacité minimale est définie comme suit :

* KD60 ≥ 75% ou mortalité sur 24 heures ≥ 50% par le test du cône, ou
* Mortalité ≥ 80 % ou inhibition de la prise de sang ≥ 90 % par l'essai en tunnel (lorsqu'il est réalisé)

Pour les **MII synergiques au PBO**, des critères d'efficacité supplémentaires seront quantifiés en utilisant la définition :

* La proportion d'échantillons qui se situent à moins de 10% des valeurs du contrôle positif de KD60 ou de mortalité sur 24 heures

Pour les **MII à double IA contenant du chlorfénapyr**, les mesures de résultats suivantes seront enregistrées :

• La proportion de moustiques morts à 72 heures (la mortalité à 24 heures et à 48 heures sera également enregistrée), rapportée par compartiment et statut d'alimentation en sang

• La proportion de moustiques nourris par le sang

• Inhibition de l'alimentation sanguine

Si la mortalité des témoins est > 10 % ou si l'alimentation par le sang est < 50 % pour le jour, les résultats du test doivent être rejetés et le test répété.

Pour les **MII à double IA contenant du pyriproxyfène**, les dénombrements de moustiques au jour 4 et au jour 8 seront utilisés en plus des dénombrements par essai biologique au cône pour calculer les mesures de résultats suivantes :

• La proportion de moustiques renversés à une heure (KD60)

• La proportion de moustiques morts t 24 heures (mortalité sur 24 heures)

• La ponte, définie comme le nombre de moustiques (vivants ou morts) qui ont pondu des œufs divisés par le nombre total de moustiques survivants nourris de sang placés dans des chambres de ponte.

• L'inhibition de la ponte, définie comme la différence entre la proportion de femelles gavées survivantes du groupe témoin qui ont pondu (Oc) et la proportion de femelles gavées survivantes du traitement qui ont pondu (Ot), divisée par Oc.

### Résidu chimique

Deux paramètres seront utilisés pour rendre compte des résultats des tests de résidus chimiques :

1. La teneur moyenne en insecticide dans l'ensemble de l'échantillon et pour chaque site.
2. La proportion de moustiquaires dont la valeur en g/kg pour chaque ingrédient actif se situe dans le niveau approuvé défini par la spécification de préqualification de l'OMS ou par la spécification du fabricant

### Intégrité de la moustiquaire

L'intégrité de la moustiquaire sera mesurée à chaque tour en utilisant l'indice de trou proportionnel (pHI) tel que recommandé par l'OMS. Les données de l'évaluation des trous de la moustiquaire seront transformées en indice de trou proportionnel (pHI) pour chaque moustiquaire de la manière suivante :

*pHI= # trous de taille 1 + (# trous de taille 2 x 23) + (# trous de taille 3 x 196) + (# trous de taille 4 x 576)*

Sur la base du pHI, chaque moustiquaire est ensuite classée comme « utilisable » ou « déchirée », avec un sous-ensemble de moustiquaires utilisables classées comme « bonnes », comme suit [2-3] :

En bon état : surface totale du trou ≤ 0,1 m² ou pHI ≤ 642

Déchirée : surface totale du trou > 0,1 m² ou pHI > 642

Bon : surface totale des trous < 0,01 m² ou pHI ≤ 64

### Taux d'attrition net

L'attrition nette sera indirectement estimée à chaque tour d'évaluation en fonction du nombre de MII de remplacement dans la liste de l'échantillon qui doivent être recherchées avant que les 30 MII requises soient identifiées et retirées. Un taux d'attrition plus faible sera associé à une proportion plus élevée de MII échantillonnées encore présentes dans les ménages et pouvant être retirées.

## Analyse des données et rapports

Les fichiers de données électroniques seront disponibles immédiatement après la fin de la collecte des données auprès des ménages. Les résultats de l'évaluation des trous seront ajoutés aux fichiers de données spécifiques aux MII dans le laboratoire. Les fichiers de données complétés seront exportés de la base de données en ligne sécurisée et importés dans Stata. Des fichiers Stata standard adaptés aux études précédentes de surveillance de la durabilité seront utilisés pour appliquer des étapes cohérentes de nettoyage, de gestion et d'analyse. Le personnel de [nom du partenaire de mise en œuvre] ou un consultant qualifié examinera et nettoiera les données, en effectuant des contrôles de cohérence supplémentaires et en préparant les fichiers pour l'analyse. Les identifiants personnels seront supprimés des ensembles de données finaux qui pourront être partagés, sur demande, en dehors de l'équipe d'étude. Tous les processus seront documentés à l'aide de fichiers Stata do afin que tout partenaire intéressé puisse répéter les étapes sur sa propre copie de l'ensemble de données.

Les données relatives aux essais biologiques seront saisies dans des feuilles de calcul Excel standard, avec des informations sur le nombre de moustiques testés, le nombre de moustiques assommés : 3 min, le nombre de moustiques assommés : 60 min, le nombre de moustiques morts : 24 heures, le nombre de moustiques vivants : 24 heures. Les données récapitulatives de ces feuilles de calcul seront produites dans Excel et exportées vers Stata pour le nettoyage et l'analyse standard des données. L'analyse finale suivra les mesures de résultats définies précédemment (voir ci-dessus). Les feuilles Excel seront utilisées jusqu'à ce que les données de surveillance de la durabilité soient ajoutées à VectorLink Collect (prévu pour 2021).

Les résultats seront partagés et discutés entre les partenaires après chaque cycle d'évaluation et un rapport de synthèse sera publié pour chaque cycle. Une fois le rapport final terminé, une réunion de diffusion sera organisée pour présenter les résultats et les recommandations aux parties prenantes et aux partenaires de la lutte antivectorielle dans le pays. Après le dernier cycle d'étude, les données d'étude anonymes seront partagées avec PMI/USAID pour être archivées sur le portail de données ouvertes du gouvernement américain, [www.data.gov](http://www.data.gov). Les rapports finaux et les données d'étude anonymisées seront également publiés sur le site Web, www.durabilitymonitoring.org.

# Considérations éthiques

L'étude proposée sera menée conformément aux principes de la Déclaration d'Helsinki et aux Directives internationales pour l'examen éthique des études épidémiologiques.

Cette étude a été considérée comme une « recherche sur des sujets humains » et ne sera lancée qu'après avoir reçu l'approbation écrite d'un comité d'éthique local reconnu et du conseil d'examen institutionnel (CEI) de [nom du partenaire chargé de la mise en œuvre]. Les personnes chargées de la mise en œuvre de cette étude se conformeront à toutes les politiques et procédures de tous les comités d'examen. Le consentement éclairé de tous les participants à cette étude sera demandé.

Cette étude a été conçue pour répondre aux principes éthiques suivants : respect des personnes, bienfaisance et justice. Des efforts sont faits pour protéger l'autonomie des personnes, minimiser les préjudices, maximiser les avantages et répartir équitablement les risques et les avantages en utilisant des procédures conformes à des conceptions de recherche solides qui prennent ces questions en considération. Comme il s'agit d'une enquête par entretiens exclusifs sans prélèvement d'échantillons d'aucune sorte, aucun préjudice n'est attendu pour les participants.

## Consentement éclairé

Les personnes interrogées dans les ménages sélectionnés pour former le cadre d'échantillonnage seront informées du but et de la nature de l'étude, de ce qu'exige la participation à l'étude et des risques et avantages éventuels. Le consentement écrit du chef de famille ou de son représentant sera obtenu. Les répondants des ménages sélectionnés pour le retrait d'une MII à des fins d'analyse seront informés comme indiqué ci-dessus et un consentement oral sera obtenu avant le retrait et le remplacement de la MII et l'administration du questionnaire de l'étude.

Les participants seront informés de tous les risques et protections par le biais de la fiche d'information de l'étude. Les participants seront également informés de leur droit de se retirer de l'étude et de ne pas répondre aux questions auxquelles ils ne se sentent pas à l'aise. Les répondants recevront les coordonnées de l'IP et des co-investigateurs qui seront disponibles pour répondre à toute question concernant l'étude.

Les fiches d'information et les formulaires de consentement seront rédigés en [« anglais », « français » ou « portugais »] et en [langue écrite locale] et, si nécessaire, seront lus au répondant dans sa langue locale par un membre de l'équipe de terrain maîtrisant cette langue.

## Respect des personnes et autonomie individuelle

*Risques potentiels*

Les risques potentiels pour les sujets sont la violation de la confidentialité.

*Violation de la confidentialité*

Le risque le plus important est la violation de la confidentialité. Dans le cadre de cette étude, une violation de la confidentialité pourrait se produire si des informations privées tirées des enquêtes pouvaient être reliées à un répondant individuel et que ces informations étaient obtenues par une ou plusieurs personnes extérieures au projet de recherche ou si des propos tenus par un participant étaient entendus ou découverts par quelqu'un d'autre.

*Stratégies pour faire face aux risques*

Des mesures seront prises pour protéger les participants contre les risques potentiels posés par leur participation à cette recherche. Les participants seront encouragés à contacter les co-enquêteurs locaux à tout moment pour discuter de toute préoccupation qu'ils pourraient avoir. Toutes les données et autres informations seront traitées de manière confidentielle et anonyme dans toute la mesure du possible. Les mesures suivantes seront prises pour éviter toute violation de la confidentialité.

*Identification des sources de données*

Aucune des informations enregistrées n'est sensible. La localisation GPS des ménages et les noms complets des membres des ménages pour le cadre d'échantillonnage seront enregistrés dans les fichiers de données brutes. Les listes maîtresses des MII conserveront un enregistrement de ces identifiants afin que des visites de surveillance puissent être effectuées. Cette liste sera un fichier de données électronique uniquement et sera conservée dans un endroit sécurisé avec une protection par mot de passe et dont l'accès sera réservé à l'EP et aux co-enquêteurs. Cette base de données sera détruite après le cycle d'évaluation final.

Les coordonnées GPS seront modifiées en introduisant une petite erreur aléatoire lors du nettoyage des données. Cela permettra une précision suffisante pour l'analyse géographique des résultats mais ne permettra pas de localiser les ménages de l'étude. Les données relatives au nom complet seront supprimées pendant le nettoyage afin que les fichiers de données analytiques ne contiennent aucun identifiant personnel. Les fichiers anonymisés sont les seuls qui seront partagés publiquement, par exemple avec le dépôt [www.data.gov](http://www.data.gov).

Les documents de consentement écrit seront stockés dans des conteneurs verrouillés et détruits à la fin du cycle d'évaluation final.

*Rapport sur les données*

Tous les résultats de l'étude seront communiqués de manière anonyme.

*Formation éthique du personnel*

Tout le personnel de recherche, y compris les enquêteurs et les superviseurs, sera formé à la protection des sujets humains, en particulier à l'importance de la protection de la vie privée et de la confidentialité.

## Bienfaisance (maximiser les avantages et minimiser les inconvénients)

Il est peu probable qu'il y ait un bénéfice direct pour les participants eux-mêmes au moment de l'étude ou après celle-ci. Cependant, l'étude proposée peut déboucher sur des connaissances pouvant être appliquées à la conception d'interventions futures visant à promouvoir l'utilisation des moustiquaires et les soins aux moustiquaires afin d'accroître leur durabilité. Les résultats de l'étude primaire aideront les bailleurs de fonds de la santé publique, les gouvernements et les fabricants de MII à mieux concevoir, planifier et mettre en œuvre les produits et les campagnes de MII sur la base des résultats de terrain sur l'efficacité des insecticides.

# Calendrier de mise en œuvre et personnel de l'étude

## Rôles et responsabilités

La mise en œuvre de l'étude sera menée conjointement par le Programme national de lutte contre le paludisme, [nom du partenaire de mise en œuvre], [nom de tout laboratoire supplémentaire] et la PMI. Alors que tous les partenaires apporteront leur contribution aux outils, à l'analyse et à l'interprétation de l'étude, [Nom du partenaire principal de mise en œuvre], avec le soutien technique des autres partenaires, sera responsable de l'assurance qualité de la conception, de la mise en œuvre et de l'analyse de l'étude.

## Calendrier

Le calendrier de l'étude proposé pour les 12 premiers mois de mise en œuvre est présenté ci-dessous (couvrant 2 cycles de collecte de données).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **Pré-distribution** | | | | | **Post-distribution (mois)** | | | | | | | | | |
| **Activité** | | **4** | **3** | **2** | **1** | **0** | **1** | **2** | **//** | **11** | **12** | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** |
|  | **Mise en place** | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rédaction du protocole et partage avec la PMI et le PNLP pour révision | | X | X |  |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Finalisation du protocole et des outils pour la soumission au CEI | |  |  | X |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Campagne de distribution des MII | |  |  |  |  | X |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **Activités de pre-distribution** | | | | | | | | | | | | | | | |
| Retirer les MII des magasins centraux | |  |  | X |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Essais biologiques sur 10 échantillons | |  |  | X |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Tests supplémentaires si nécessaire | |  |  |  | X | X |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Reportage de pre-distribution | |  |  |  | X |  | X |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **Cycle de 12 mois** | | | | | | | | | | | | | | | |
| Examen éthique par [nom du partenaire de mise en œuvre] | |  | X | X |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Examen éthique par le CEI de [pays] | |  |  | X | X |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  |  |
| Formation de cycle de 12 mois | |  |  |  |  |  |  |  | / |  | X |  |  |  |  |  |
| Travail de terrain de base de 12 mois | |  |  |  |  |  |  |  | / |  | X |  |  |  |  |  |
| Évaluation de base des trous de 12 mois | |  |  |  |  |  |  |  | / |  |  | X |  |  |  |  |
| Essais biologiques de 12 mois | |  |  |  |  |  |  |  | / |  |  | X | X |  |  |  |
| Essais de 12 mois sur les résidus chimiques | |  |  |  |  |  |  |  | / |  |  | X | X | X |  |  |
| Nettoyage et analyse des données de 12 mois | |  |  |  |  |  |  |  | / |  |  | X |  | X | X |  |
| Projet de rapport de 12 mois sur la surveillance de la durabilité des MII soumis à la PMI | |  |  |  |  |  |  |  | / |  |  |  |  |  |  | X |

Le calendrier des cycles de surveillance (cycles 24 et 36 mois) est présenté ci-dessous, en prenant pour exemple le cycle de 24 mois

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Activité** | **M**  **21** | **M**  **22** | **M**  **23** | **M**  **24** | **M**  **25** | **M**  **26** | **M**  **27** | **M**  **28** | **M**  **29** |
| **Cycle de surveillance (12 mois)** | | | | | | | | | |
| Élaboration de l'échantillon et des outils du programme pour 12 mois | X |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Réviser le matériel de formation | X |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Soumettre à l'examen continu du CEI de [pays] |  |  | X | X |  |  |  |  |  |
| Formation de 12 mois |  |  |  | X |  |  |  |  |  |
| Travail sur le terrain pendant 12 mois |  |  |  | X |  |  |  |  |  |
| Surveillance de l'évaluation des trous |  |  |  |  | X |  |  |  |  |
| Surveillance des essais biologiques |  |  |  |  | X | X |  |  |  |
| Surveillance des tests de résidus chimiques |  |  |  |  | X | X | X |  |  |
| Nettoyage et analyse des données de surveillance |  |  |  |  |  |  | X | X |  |
| Projet de rapport de suivi de la surveillance de la durabilité des MII soumis à la PMI |  |  |  |  |  |  |  |  | X |

## Personnel de l'étude

Les personnes suivantes sont les enquêteurs nommés pour cette étude.

Enquêteur principal :

Co-enquêteur :

# Bibliographie

World Health Organization: **Estimating functional survival of long-lasting insecticidal nets from field data**. Vector Control Technical Expert Group Report to MPAC September 2013. <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_sep13_vcteg_llin_survival_report.pdf>.

WHO: **Guidelines for laboratory and field testing of long‐lasting insecticidal nets.** Geneva 2013, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.3 <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/80270/1/9789241505277_eng.pdf?ua=1>

WHOPES: **Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions**, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2011.5 <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501705_eng.pdf>

World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.

World Health Organization: **WHO guidance note for estimating the longevity of Long-lasting Insecticidal nets in Malaria Control.** Geneva: 2013. <http://www.who.int/entity/malaria/publications/atoz/who_guidance_longevity_llins/en/>.

# 

# Annexe 1 : Liste des cycles de surveillance de la durabilité réalisés depuis 2013

Source : www.durabilitymonitoring.org

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Pays** | **Produit** | **Zones de surveillance** |
| Birmanie  2016-2019 | DawaPlus 2.0  PermaNet 2.0 | Canton de Tamu |
| RDC  2016-2019 | DuraNet/MAGNet  DawaPlus 2.0 | Sud-Ubangi / Mongala |
| Guinée  2016-2019 | PermaNet 2.0 | Boffa / Dinguiraye |
| Tanzanie (Zanzibar)  2016-2019 | Olyset  PermaNet 2.0 | Wete / North B |
| Malawi  2016-2019 | Yorkool  Royal Sentry | Mangochi / Kasungu |
| Nigeria  2015-2018 | DawaPlus 2.0 | Zamfara / Ebonyi / Oyo |
| Mozambique  2015-2018 | MAGNet  Royal Sentry | Inhambane / Tete / Nampula |
| Madagascar  2015-2017 | PermaNet 2.0 | Nosy / Varika / Maintirano / Tulear II / Ankazobe |
| Zimbabwe  2015-2019 | DawaPlus 2.0  DuraNet | 13 districts endémiques au paludisme dans les provinces de Mashonaland centre et ouest |
| Éthiopie  2015-2018 | PermaNet 2.0  MAGNet | Oromia / Tigray / SNNP / Amhara |
| Bénin  2014-2017 | PADNET  LifeNet  PermaNet 3.0 | Oueme |
| Madagascar  2013-2015 | NetProtect  Yorkool  Royal Sentry | Ambanja / Morondava / Diego-Suarez / Mandoto / Sakaraha / Toamasina II, Randriamaherijaona |
| Nigeria  2012-2014 | PermaNet 2.0  DawaPlus 2.0 | Zamfara / Nasarawa / Cross River |
| Madagascar  2011-2015 | Yorkool  Royal Sentry  NetProtect | Toamasinall / Morondava / Mandoto / Sakaraha / Ambanja / Diego |

# Annex 2: I2I-SOP-001: Methods for monitoring the durability of dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus piperonyl butoxide (PBO)



[1. Purpose 1](#_Toc89425408)

[2. Background 2](#_Toc89425409)

[3. Materials & Equipment 2](#_Toc89425410)

[4. Procedure 3](#_Toc89425411)

[4.1. Test mosquitoes 3](#_Toc89425412)

[4.2. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing) 3](#_Toc89425413)

[4.3. Control net samples 4](#_Toc89425414)

[4.4. Cone bioassay setup 6](#_Toc89425415)

[4.5. Cone bioassay procedure 6](#_Toc89425416)

[4.6. Measured outcomes 7](#_Toc89425417)

[5. Data priority list 8](#_Toc89425418)

[6. Deviations from standard protocol 9](#_Toc89425419)

[7. Supplementary data 9](#_Toc89425420)

[8. Glossary of terms 9](#_Toc89425421)

[9. References 9](#_Toc89425422)

1. Purpose

This standard operating procedure (SOP) describes the methods to determine the bioefficacy of the pyrethroid and piperonyl butoxide (PBO) components of insecticide-treated nets (ITNs) used under operational conditions. The process used to determine the methodology detailed in this SOP, and justifications for key methodological parameters can be found in ‘I2I-MD-001: Durability monitoring method development: Dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus piperonyl butoxide (PBO)’.

1. Background

Several ITNs containing pyrethroid plus PBO (pyrethroid + PBO nets) are prequalified (PQ) by the WHO (WHO, 2020). These nets products have different specifications. They contain different pyrethroid insecticides at various concentrations, and PBO is located on varying parts of the net (e.g. roof only). Monitoring the bioefficacy of the active ingredients (AI) in the nets is a vital part of establishing the durability of these nets under operational conditions.

1. Materials & Equipment

**General**

* Data collection sheets
* Lab coat
* Gloves
* Test pyrethroid + PBO nets
* Control untreated net
* Control new pyrethroid + PPO net
* Control new pyrethroid only net
* Aspirator (manual/electronic), separate for each insecticide
* Mosquito strains
* Pen/permanent markers

**Collection and storage of net samples**

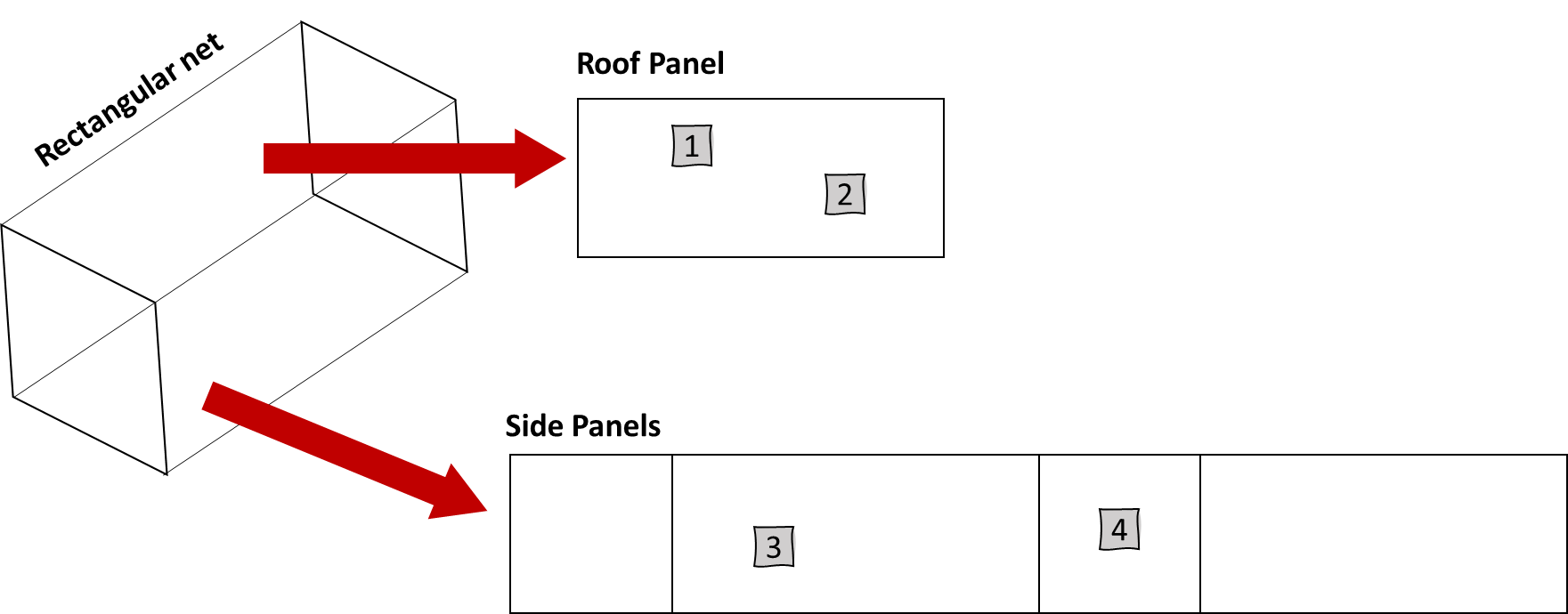
* Net frame
* Scissors
* Paper labels
* Aluminium foil

**Cone bioassay**

* Tape
* Mosquito holding containers (e.g. paper cups covered with untreated netting held by elastic bands)
* Cone holding frame (x 2), with holes to hold standard WHO plastic cones
* Cone holder frame stand, which holds frame at 45°
* WHO plastic cones
* Binder clips or clamps
* Cotton wool or rubber stoppers
* Temperature and humidity data logger
* Timer
* 10% sucrose solution (e.g. sugar or honey and water)
* Cotton wool

1. Procedure
   1. Test mosquitoes

* Use 2-to-5-day-old non-blood fed female *Anopheles* mosquitoes. Mosquitoes should be well characterized lab strains with respect to insecticide susceptibility (Lees et al, In Prep). F0 adults collected from larval breeding sites should only be used when lab strains are unavailable and should following the same insecticide resistance characterisation methods as lab strains (see Section 6. Deviations from standard protocol).
* For a pyrethroid-only test net panel: Use pyrethroid-susceptible mosquito strains (Lees et al, In Prep).
* For a pyrethroid + PBO test net panel: Use pyrethroid-susceptible and pyrethroid-resistant mosquito strains (Lees et al, In Prep).
* Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strain should be tested (See Section 5. Data priority list).
* For negative and positive control net panels: Test all mosquito strains being used on that experimental day against each control panel.
  1. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing[[11]](#footnote-12))
* Whole nets and net pieces may need to be stored before and after testing and may be transported between study sites. When collecting and storing whole net and net samples always ensure they are kept separately to avoid cross-contamination of AIs. Store nets in a cool dry place at <5°C out of direct sunlight.
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Hang sample net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the labs cleaning protocols.
* Cut 4 pieces (30 x 30 cm) from each test net (2 from the roof panel, 2 from the sides panels). Scissors should be changed or cleaned between cutting net panels with different AIs. Recommended sampling positions can be found in Figure 1.
* Label net pieces with the sample position (i.e. 1 - 4) and net ID on paper labels secured to the corner of each piece.
* Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°C.



*Figure 1. Recommended sampling position of net pieces from bednet. The lower 25 cm of the net should not be sampled as it is likely to have been exposed to abrasion from being tucked under a bed. Two samples should be taken from the net roof panel and two samples should be taken from the net side panels. Image adapted from (WHO, 2011).*

* 1. Control net samples
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Control nets should be aired, but unwashed. Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing.
* Only one piece of control netting is needed per assay. However, control pieces should not be used >5 times, so multiple pieces will be needed.
  + Hang net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the labs cleaning protocols.
  + Cut 10 pieces (30 x 30 cm) from each control net.
  + Label net pieces with the control net ID on paper labels and secure to the corner of each piece.
  + Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°C.
* On each experimental testing day, a negative control and two positive control nets (Table 1) should be tested alongside test nets.

*Table 1. Specifications of control nets.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Net Type** | **Description** |
| Negative control: Untreated net | Untreated netting of the same material as the test netting (e.g. polypropylene). Record the number of times the net piece has been used and do not use the same piece >5 times.  If 24-hour mortality in the negative control on a particular testing day is >10% results should be discarded and testing repeated. If 24-hour control mortality for the day is <10% the test results should be corrected using Abbot’s formula[[12]](#footnote-13) (Abbott, 1925; WHO, 2013). |
| Positive control 1: New pyrethroid + PBO net panel | Brand new pyrethroid + PBO netting of the same brand as the test net. Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing. Record the number of times the net has been used and do not use the same piece >5 times. |
| Positive control 2: New pyrethroid-only net panel | Brand new pyrethroid-only netting of the same material, treated using the same impregnation method, insecticide, and dose as the test netting. If such netting is not available, the closest non-PBO commercial equivalent should be used (e.g. if testing PermaNet 3.0, a new PermaNet 3.0 side panel could be used). Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing. Record the number of times the net has been used and do not use the same piece >5 times. |

* 1. Cone bioassay setup
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Clean testing area and equipment as specified by the labs cleaning protocols.
* Prepare test mosquitoes. The numbers of mosquitoes required for testing different types of pyrethroid + PBO net can be found in Table 3, Section 5. ‘Data priority list’). Carefully transfer required mosquitoes to holding containers, 5 mosquitoes per container using an aspirator.
* Test mosquitoes and net samples should be acclimatised to the climatic conditions of the testing room for a minimum of one hour before testing. Remove any knocked-down mosquitoes from holding containers before testing.
* Prepare cone testing board(s).
  + Place 1st cone holder frame in stand.
  + Secure control and test nets to 1st cone holder frame with tape. Make sure nets do not overlap to avoid cross-contamination, that they are correctly labelled, and that the labels are visible.
  + Place the plastic cones over the nets and secure the cones in place by placing the 2nd cone holder frame over the top. The two cone holder frames can be secured together using binder clips or clamps.
  + Make sure that the board is stable and situated at a 45˚ angle.
  + Cover the opening of the plastic cones with a stopper (e.g. rubber plug or cotton wool).
  1. Cone bioassay procedure
* Record the temperature and humidity during testing. Preferably continuously with a data logger, or alternatively manually at the start and end of exposure, and the end of the mosquito holding period.
* Exposed batches of 5 mosquitoes to netting pieces for 3 minutes for a total of 2 replicates per net piece:
  + Remove the stopper from the cone and transfer 5 mosquitoes from the holding container into the plastic cone using an aspirator. Take care not to touch the net with the aspirator end as this may result in contamination.
  + Cover the cone with the stopper to prevent mosquitoes from escaping.
  + Expose mosquitoes to the netting sample for 3 minutes.
  + Transfer mosquitoes from the cone back to their holding container with an aspirator. Take care not to touch the net with the aspirator end as this may result in contamination. Ensure containers are correctly labelled with the net sample ID (Net ID and position), test rep, mosquito species, and testing date.
  + Repeat until 2 replicates of 5 mosquitoes have been exposed to each net sample.
* Provide mosquitoes with a sugar meal (10% sucrose solution soaked onto a relevant substrate such as cotton wool).
* Record the number of mosquitoes in each holding container to give the total numbers exposed.
* After 1 hour post-exposure record the number of mosquitoes knockdown (Table 2).
* After 24 hours post-exposure record the number of dead mosquitoes (Table 2).
* At the end of testing, ensure mosquitoes are stored correctly (i.e. in individual tubes with silica gel) for future analysis. If mosquitoes are not required for future analysis, discard mosquitoes safely.

*Table 2. The definitions used for classifying alive, knocked down or dead mosquitoes, adapted from* (WHO, 2013)

|  |  |
| --- | --- |
| **Mosquito status** | **Definition** |
| Alive | The mosquito is mobile or able to stand or fly in a coordinated manner |
| Knocked down | The mosquito is immobile or unable to stand or take off, at 1-hour following net exposure |
| Dead | The mosquito is immobile or unable to stand or take off, at 24-hours following net exposure |

* 1. Measured outcomes
* The number of mosquitoes exposed, knocked down after 1-hour, and dead after 24-hours should be recorded for each net piece and replicate individually.
* For each panel type (i.e. pyrethroid-only panel or pyrethroid + PBO panels) sample and replicate data should be pooled and the 1-hour knockdown %[[13]](#footnote-14) and 24-hour mortality %[[14]](#footnote-15) calculated for each panel type.
* Panel types should then be pooled to calculate the 1-hour knockdown %[[15]](#footnote-16) and 24-hour mortality %[[16]](#footnote-17) calculated for each net.

1. Data priority list

* All testing should be carried with the same resistant and susceptible strains over time. Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strains should be tested. However, it is more important to have a full data set with one strain, so resources should be prioritised to ensure this before considering testing with secondary strains.
* Ad hoc testing with secondary strains when available will provide useful data.
* The ideal methodological parameters (i.e. net samples, replicates, controls) can be found in Table 3. All methodological parameters and deviations from standard testing should be recorded at the time of testing.

*Table 3. The number of mosquitoes required per test net and for daily controls for a pyrethroid + PBO net treated with PBO all over and for a pyrethroid + PBO net treated with PBO on the roof only. Numbers are based on testing 5 mosquitoes per replicate, with 2 replicates per net piece. For test nets 4 net pieces (2 from the roof, 2 from the sides) are used. For control nets 1 piece is used (3 control nets tested per day: untreated, new pyrethroid + PPO net, and new pyrethroid only net).*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Net with PBO on all panels** | | | |
| Strain | Test net | Daily control | Total |
| Resistant | 40 | 30 | 70 |
| Susceptible | 40 | 30 | 70 |
| Total | 80 | 60 | 140 |
| **Net with PBO only on roof panel** | | | |
| Strain | Test net | Daily control | Total |
| Resistant | 20 | 30 | 50 |
| Susceptible | 40 | 30 | 70 |
| Total | 60 | 60 | 120 |

1. Deviations from standard protocol

* All deviations from the standard protocol should be noted in the data collections sheets.
* When insecticide characterised lab strains are unavailable, wild larval collected mosquitoes could be used. Details on larval collected should be recorded, such as location of sampling sites (including co-ordinates), number of sampling sites, and type of sampling site (e.g. rainwater puddle, permanent water body). The wild larval collected population should be insecticide characterised using the same methods as those used to characterise lab strains (Lees et al, In Prep).

1. Supplementary data

* Additional information that should be recorded:
  + Time of testing
  + The light-dark rearing cycle of test mosquitoes (including times where possible)

1. Glossary of terms

AI Active ingredient

I2I Innovation to Impact

ITN Insecticide-treated net

PBO Piperonyl butoxide

PQ Prequalification

SOP Standard operating procedure

WHO World Health Organization

1. References

Abbott, W.S. (1925) “A method of computing the effectiveness of an insecticide.,” *Journal of Economic Entomology*, 18(2), pp. 265–267. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3333059 (Accessed: January 4, 2017).

Lees, R. *et al.* (In Prep) “Strain Characterisation for Measuring Bioefficacy of ITNs Treated with Two Active Ingredients (Dual-AI ITNs) for Dura-bility Monitoring: Developing a Robust Protocol by Building Consensus,” *Insects* [Preprint].

WHO (2011) *Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions Control of Neglected Tropical Diseases WHO Pesticide Evaluation Scheme and Global Malaria Programme Vector Control Unit*.

WHO (2013) *Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets*, *WHO/HTM/NTD/WHOPES/20131*. Geneva: World Health Organization.

WHO (2020) *List of WHO Prequalified Vector Control Products*. Available at: https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/VCP\_PQ-List\_26August2020.pdf?ua=1 (Accessed: February 18, 2021).

# Annex 3: I2I-SOP-002: Methods for monitoring the durability of dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus pyriproxyfen (PPF)



[1. Purpose 1](#_Toc89433933)

[2. Background 2](#_Toc89433934)

[3. Materials & Equipment 2](#_Toc89433935)

[4. Procedure 3](#_Toc89433936)

[4.1. Test mosquitoes 3](#_Toc89433937)

[4.2. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing) 4](#_Toc89433938)

[4.3. Control nets samples 5](#_Toc89433939)

[4.4. Mosquito blood-feeding 6](#_Toc89433940)

[4.5. Cone bioassay setup 6](#_Toc89433941)

[4.6. Cone bioassay procedure 7](#_Toc89433942)

[4.7. Measuring sterility - Method for scoring oviposition using chambering. 8](#_Toc89433943)

[4.8. Measuring sterility - Method for scoring ovary development using ovary dissection 9](#_Toc89433944)

[5. Data priority list 11](#_Toc89433945)

[6. Deviations from standard protocol 12](#_Toc89433946)

[7. Supplementary data 12](#_Toc89433947)

[8. Glossary of terms 12](#_Toc89433948)

[9. References 13](#_Toc89433949)

1. Purpose

This standard operating procedure (SOP) describes the methods to determine the bioefficacy of the pyrethroid and pyriproxyfen (PPF) components of insecticide-treated nets (ITNs) used under operational conditions. The process used to determine the methodology detailed in this SOP, and justifications for key methodological parameters can be found in ‘I2I-MD-002: Durability monitoring method development: Dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus pyriproxyfen (PPF)I2I-MD-002: Durability monitoring method development: Dual AI ITNs containing pyriproxyfen’. This SOP details two methods to evaluate durability of pyrethroid + PPF nets, measuring mortality, and either (i) oviposition or (ii) dissection of ovaries following net exposure in a standard WHO cone bioassay. The same method should be used for all test nets throughout the durability trial.

1. Background

Pyrethroid + pyriproxyfen (PPF) nets are PQ listed (i.e. Royal Guard, **Error! Reference source not found.**) and being deployed in RCTs and pilot deployment schemes. The WHO cone test is a suitable method for exposing mosquitoes to pyrethroid + pyriproxyfen (PPF) nets for measuring the nets durability, but different endpoints are needed for each active ingredient. Knockdown and mortality can be used to assess the bio-efficacy of the pyrethroid but the most suitable endpoints for PPF, a juvenile hormone analogue that affects fertility and fecundity in mosquitoes, need to be defined. We are proposing two methods to evaluate durability of pyrethroid + PPF nets, measuring either (i) oviposition or (ii) dissection of ovaries following net exposure in a standard WHO cone bioassay. Monitoring the bioefficacy of the active ingredients (AI) in the nets is a vital part of establishing the durability of these nets under operational conditions.

1. Materials & Equipment

**General**

* Data collection sheets
* Lab coat
* Gloves
* Test pyrethroid + PPF nets
* Control untreated net
* Control new pyrethroid + PPF net
* Aspirator (manual/electronic), separate for each insecticide
* Mosquito strains
* Pen/permanent markers

**Collection and storage of net samples**

* Net frame
* Scissors
* Paper labels
* Aluminium foil

**Cone bioassay**

* Tape
* Mosquito holding containers (e.g. paper cups covered with untreated netting held by elastic bands)
* Cone holding frame (x 2), with holes to hold standard WHO plastic cones
* Cone holder frame stand, which holds frame at 45°
* WHO Plastic cones
* Binder clips or clamps
* Cotton wool or rubber stoppers
* Temperature and humidity data logger
* Timer
* 10% sucrose solution (e.g. sugar or honey and water)
* Cotton wool

**Measuring sterility - Oviposition using chambering.**

* Artificial egg laying chambers (e.g. falcon tubes containing damp water-soaked cotton wool covered with filter paper. Tube is covered with untreated netting secured in place with an elastic band)

**Measuring sterility - Ovary development using ovary dissection**

* Dissecting microscope
* Glass slides
* Dissection kit (e.g. dissection pins, forceps)
* Distilled water
* Plastic pipette/water dropper

1. Procedure
   1. Test mosquitoes

* Use 3-to-5-day-old blood-fed female *Anopheles* mosquitoes. Mosquitoes should be blood-fed 3-9 hours prior to exposure. Mosquitoes should be well characterized lab strains with respect to insecticide susceptibility (Lees *et al*, In Prep). F0 adults collected from larval breeding sites should only be used when lab strains are unavailable and should following the same insecticide resistance characterisation methods (see Section 6. Deviations from standard protocol).
* A pyrethroid-susceptible strain should be tested to monitor the durability of the pyrethroid insecticide, and a pyrethroid-resistant strain should be used to monitor the durability of the PPF (Lees, *et al*, In Prep). Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strain should be tested (See Section 5. Data priority list).
* For negative and positive control net panels: Test all mosquito strains being used on that experimental day against each control panel.
  1. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing[[17]](#footnote-18))
* Whole nets and net pieces may need to be stored before and after testing and may be transported between study sites. When collecting and storing whole net and net samples always ensure they are kept separately to avoid cross-contamination of AIs. Store nets in a cool dry place at <5°c out of direct sunlight.
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Hang sample net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the labs cleaning protocols.
* Cut 4 pieces (30 x 30 cm) from each test net (2 from the roof panel, 2 from the sides panels). Scissors should be changed or cleaned between cutting net panels with different AIs. Recommended sampling positions can be found in Figure 1.
* Label net pieces with the sample position (i.e. 1 - 4) and net ID on paper labels secured to the corner of each piece.
* Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°c.



*Figure 1. Recommended sampling position of net pieces from bednet. The lower 25 cm of the net should not be sampled as it is likely to have been exposed to abrasion from being tucked under a bed. Three samples should be taken from the net roof panel and three samples should be taken from the net side panels. Image adapted from (WHO, 2011).*

* 1. Control nets samples
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Control nets should be aired, but unwashed. Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing.
* Only one piece of control netting is needed per assay. However, control pieces should not be used >5 times, so multiple pieces will be needed.
  + Hang net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the labs cleaning protocols.
  + Cut 10 pieces (30 x 30 cm) from each control net.
  + Label net pieces with the control net ID on paper labels and secure to the corner of each piece.
  + Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°c.
* Only one piece of control netting is needed per assay. However, the methods for preparing control nets should follow the same procedure as test nets:
* On each experimental testing day, a negative control and a positive control net (Table 1) should be tested alongside test nets.

*Table 1. Specifications of control nets.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Net Type** | **Description** |
| Negative control: Untreated net | Untreated netting of the same material as the test netting (e.g. polypropylene). Record the number of times the net piece has been used and do not use the same piece >5 times.  If 24-hour mortality in the negative control on a particular testing day is >10% results should be discarded and testing repeated. If 24-hour control mortality for the day is <10% the test results should be corrected using Abbot’s formula[[18]](#footnote-19) (Abbott, 1925; WHO, 2013). |
| Positive control: New pyrethroid + PPF net panel | Brand new pyrethroid + PFF netting of the same brand as the test net. Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing. Record the number of times the net has been used and do not use the same piece >5 times. |

* 1. Mosquito blood-feeding
* Blood-feed mosquitoes 3-9 hours before exposure. Mosquitoes should be blood fed using method of feeding standard for the test population (e.g. Hemotek membrane feeding system, arm feed, animal fed to repletion)
* Only visibly blood-fed[[19]](#footnote-20) mosquitoes should be used for the assay.
  1. Cone bioassay setup
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Clean testing area and equipment as specified by the labs cleaning protocols.
* Prepare test mosquitoes. The numbers of mosquitoes required can be found in Table 6, Section 5. Data priority list). Carefully transfer required mosquitoes to holding containers, 5 mosquitoes per container using an aspirator.
* Test mosquitoes and net samples should be acclimatised to the climatic conditions of the testing room for a minimum of one hour before testing. Remove any knockdown mosquitoes from holding containers before testing.
* Prepare cone testing board(s).
  + Place 1st cone holder frame in stand.
  + Secure control and test nets to 1st cone holder frame with tape. Make sure nets do not overlap to avoid cross-contamination, that they are correctly labelled, and that the labels are visible.
  + Place the plastic cones over the nets and secure the cones in place by placing the 2nd cone holder frame over the top. The two cone holder frames can be secured together using binder clips or clamps.
  + Make sure that the board is stable and situated at a 45˚ angle.
  + Cover the opening of the plastic cones with a stopper (e.g. rubber plug or cotton wool).
  1. Cone bioassay procedure
* Record the temperature and humidity during testing. Preferably continuously with a data logger, or alternatively manually at the start and end of exposure, and the end of the mosquito holding period.
* Exposed batches of 5 mosquitoes to netting pieces for 3 minutes for a total of 2 replicates per net piece:
  + Remove the stopper from the cone and transfer 5 mosquitoes from the holding container into the plastic cone using an aspirator. Take care not to touch the net with the aspirator end as this may result in contamination.
  + Cover the cone with the stopper to prevent mosquitoes from escaping.
  + Expose mosquitoes to the netting sample for 3 minutes.
  + Transfer mosquitoes from the cone back to their holding container with an aspirator. Take care not to touch the net with the aspirator end as this may result in contamination. Ensure containers are correctly labelled with the net sample ID (Net ID and position), test rep, mosquito species, and testing date.
  + Repeat until 2 replicates of 5 mosquitoes have been exposed to each net sample.
* Provide mosquitoes with a sugar meal (10% sucrose solution soaked onto a relevant substrate such as cotton wool). Ensure sugar meal is changed daily throughout assay, as this can impact mosquito health.
* Record the number of mosquitoes in each holding container to give the total numbers exposed.
* After 1 hour post-exposure record the number of mosquitoes knockdown (**Error! Reference source not found.**Table 2).
* After 24 hours post-exposure record the number of dead mosquitoes (Table 2).

*Table 2. The definitions used for classifying alive, knocked down or dead mosquitoes, adapted from (WHO, 2013)*

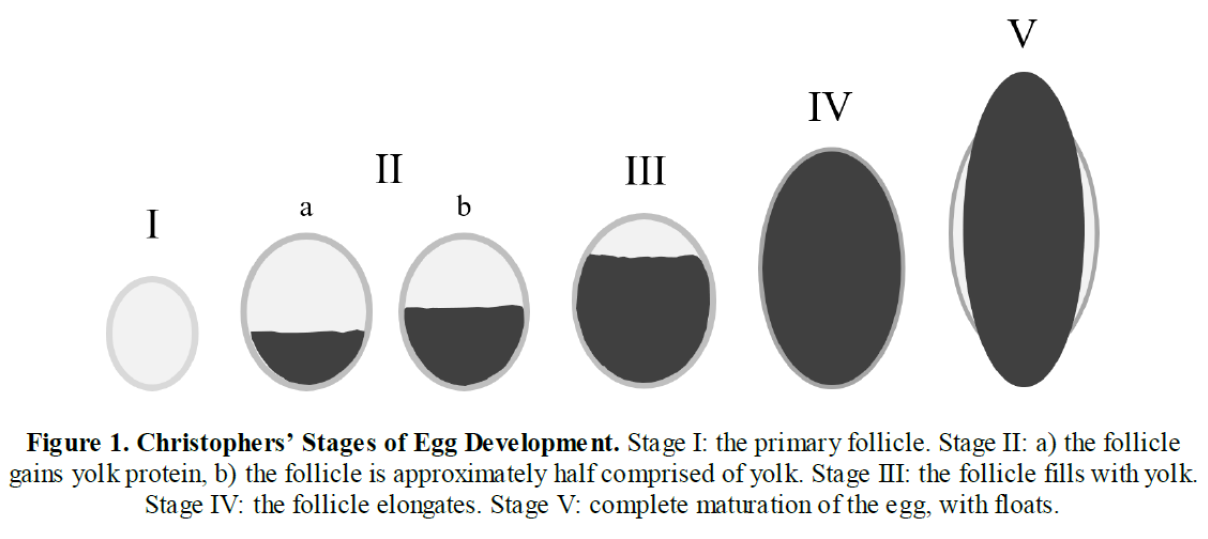
|  |  |
| --- | --- |
| **Mosquito status** | **Definition** |
| Alive | The mosquito is mobile or able to stand or fly in a coordinated manner |
| Knocked down | The mosquito is immobile or unable to stand or take off, at 1-hour following net exposure |
| Dead | The mosquito is immobile or unable to stand or take off, at 24-hours following net exposure |

* 1. Measuring sterility - Method for scoring oviposition using chambering.
* The sterilising effect of PPF can be measured in several ways. This SOP details two methods; (i) chambering to observe oviposition or (ii) ovary dissection to observe ovary development. Either method can be used, however the same method should be used for all nets throughout the durability trial.
* On Day 3 (three days post-exposure), record the number of dead mosquitoes in holding containers (Table 2).
* Set up artificial egg laying chambers using method used in your lab.
* Transfer alive mosquitoes individually into their own egg laying chamber using an aspirator.
* Ensure egg laying chambers are correctly labelled with a mosquito ID number, the net sample ID (Net ID and position), test rep, mosquito species, and testing date.
* Provide mosquitoes with a sugar meal (10% sucrose solution soaked onto a relevant substrate such as cotton wool).
* Place egg laying chambers in a dark area. Ensure sugar meal is changed daily throughout assay, as this can impact mosquito health.
* On Day 7 (four days post-chambering), record if each individual mosquito is alive or dead (Table 2). Record if each individual mosquito has laid eggs or not.
* At the end of testing, ensure mosquitoes are stored correctly (i.e. in individual tubes with silica gel) for future analysis. If mosquitoes are not required for future analysis, discard mosquitoes safely.
  + 1. *Measured outcomes*
* The number of mosquitoes exposed, knocked down after 1-hour, and dead after 24-hours should be recorded for each net piece and replicate individually.
* Replicate data should then be pooled and the 1-hour knockdown %[[20]](#footnote-21) and 24-hour mortality %[[21]](#footnote-22) calculated for each individual net.
* On Day 3, number of mosquitoes dead, and number of alive mosquitoes chambered should be recorded for each test net.
* On Day 7, for each individual chambered mosquito status (alive or dead), and egg laying (laid eggs or did not lay eggs) should be recorded.
* Individual mosquito data should then be pooled to calculate oviposition and oviposition inhibition using the definition in Table 3.

*Table 3. The definitions used for classifying oviposition and calculation of oviposition inhibition.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Mosquito status** | **Definition** |
| Oviposition | Where *O* is the number of mosquitoes (living or dead) which laid eggs and *T* is the total number of surviving blood-fed mosquitoes placed into oviposition chambers. |
| Oviposition inhibition | Where Oc is the proportion of surviving blood-fed females from the control which laid eggs while Ot is the proportion of surviving blood-fed females from a given treatment which laid eggs. |

* 1. Measuring sterility - Method for scoring ovary development using ovary dissection
* On Day 3 (three days post-exposure), record the number of dead mosquitoes in holding containers (Table 2).
* Dissect mosquito ovaries:
  + Mount mosquito onto glass slide on its back
  + Use a dissecting pin or forceps to hold the mosquito stationary by the thorax
  + Add a drop of distilled water on to the last two segments of the mosquitoes abdomen.
  + Use a dissection pin to gently pulling off the last two segments of the mosquito abdomen
  + For better visualisation of the ovaries, use the needle to separate the ovaries from other internal material and wash off fat and other debris by rinsing the ovaries with distilled water.
  + Leave the slide with dissected ovaries to air dry
* Two individuals should classify ovary development and they should be blinded to the net exposure treatment. Where disagreement on ovary classification occurs, a third individual should be consulted. If ovaries cannot be classified on the same day as dissection, photographs should be taken of the ovaries on the day and these should examined to classify ovaries.
* Record the developmental status of the eggs in each mosquitos’ ovaries according to Christopher’s stage of egg development (Figure 2).
* Record if the mosquito is fertile, Infertile, or inconclusive (Table 4)



*Figure 2. Christopher’s stages of egg development in female Anopheles mosquitoes, adapted from Christophers (1911).*

*Table 4. The definitions used for classifying egg development*

|  |  |
| --- | --- |
| **Ovary status** | **Definition** |
| Fertile | Female *Anopheles* eggs have fully developed to Christophers’ stage V = normal elongated, boat/sausage-shaped eggs with lateral floats (Figure 2). |
| Infertile | Female *Anopheles* eggs have not fully developed and remain in Christophers’ stages I –IV = less elongated, round shape, lacking floats (Figure 2). |
| Inconclusive | If both stage IV and stage V eggs are observed, record this as “inconclusive”. |

* + 1. *Measured outcomes*
* The number of mosquitoes exposed, knocked down after 1-hour, and dead after 24-hours should be recorded for each net piece and replicate individually
* Replicate data should then be pooled and the 1-hour knockdown %[[22]](#footnote-23) and 24-hour mortality %[[23]](#footnote-24) calculated for each individual net.
* On Day 3, number of mosquitoes dead, and number of alive mosquitoes dissected should be recorded for each test net.
* For each dissected mosquito the developmental status of the eggs in each mosquitos’ ovaries should be recorded, and this should be used to classify the mosquito as fertile, infertile or inconclusive.

1. Data priority list

* All testing should be carried with the same resistant and susceptible strains over time. Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strains should be tested. However, it is more important to have a full data set with one strain, so resources should be prioritised to ensure this before considering testing with secondary strains.
* Ad hoc testing with secondary strains when available will provide useful data.
* The ideal methodological parameters (i.e. net samples, replicates, controls) can be found in Table 5. When resources are reduced the number of mosquitoes required can be altered by changing the net samples required (Option B). All methodological parameters and deviations from standard testing should be recorded at the time of testing.

*Table 5. The number of mosquitoes required per test net and for daily controls. Examples are provided for a pyrethroid + PPF net treated with PPF all over. Green highlight is current ideal testing. Grey highlight shows suggested changes to reduce sample size.*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | | **A** | **B** |
| Roof panels samples | | 2 | 2 |
| Side panel samples | | 2 | 1 |
| Control samples (2 net types) | | 2 | 2 |
| Replicate per panel | | 2 | 2 |
| Mosquitoes per rep | | 5 | 5 |
| Per test net | Resistant Strain | 40 | 30 |
|  | Susceptible strain | 40 | 30 |
| Daily controls | Resistant Strain | 20 | 20 |
|  | Susceptible strain | 20 | 20 |
| Total | | 120 | 100 |

1. Deviations from standard protocol

* All deviations from the standard protocol should be noted in the data collections sheets.
* When insecticide characterised lab strains are unavailable, wild larval collected mosquitoes could be used. Details on larval collected should be recorded, such as location of sampling sites (including co-ordinates), number of sampling sites, and type of sampling site (e.g. rainwater puddle, permanent water body). The wild larval collected population should be insecticide characterised using the same methods as those used to characterise lab strains (Lees, *et al*, In Prep).

1. Supplementary data

* Additional information that should be recorded:
  + Time of testing
  + The light-dark rearing cycle of test mosquitoes (including times where possible)

1. Glossary of terms

AI Active ingredient

I2I Innovation to Impact

ITN Insecticide-treated net

PPF Pyriproxyfen

PQ Prequalification

SOP Standard operating procedure

WHO World Health Organization

1. References

Abbott, W.S. (1925) “A method of computing the effectiveness of an insecticide.,” *Journal of Economic Entomology*, 18(2), pp. 265–267. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3333059 (Accessed: January 4, 2017).

Lees, R. *et al* (In Prep) “Strain Characterisation for Monitoring Durability of Bioefficacy in ITNs Treated with Two Active Ingredients (Dual AI ITNs): Developing a Robust Protocol by Building Consensus,” *Insects* [Preprint].

WHO (2011) *Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions Control of Neglected Tropical Diseases WHO Pesticide Evaluation Scheme and Global Malaria Programme Vector Control Unit*.

WHO (2013) *Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets*, *WHO/HTM/NTD/WHOPES/20131*. Geneva: World Health Organization.

# Annex 4: I2I-SOP-003: Methods for monitoring the durability of dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus chlorfenapyr

Icon

Description automatically generated with low confidence

[1. Purpose 1](#_Toc89434328)

[2. Background 2](#_Toc89434329)

[3. Materials & Equipment 2](#_Toc89434330)

[4. Procedure 3](#_Toc89434331)

[4.1. Test mosquitoes 3](#_Toc89434332)

[4.2. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing) 3](#_Toc89434333)

[4.3. Control net samples 4](#_Toc89434334)

[4.4. Tunnel test setup 5](#_Toc89434335)

[4.5. Tunnel test procedure 6](#_Toc89434336)

[4.6. Measured outcomes 7](#_Toc89434337)

[5. Data priority list 8](#_Toc89434338)

[6. Deviations from standard protocol 9](#_Toc89434339)

[7. Supplementary data 9](#_Toc89434340)

[8. Glossary of terms 9](#_Toc89434341)

[9. References 10](#_Toc89434342)

1. Purpose

This standard operating procedure (SOP) describes the methods to determine the bioefficacy of the pyrethroid and chlorfenapyr (CFP) components of insecticide-treated nets (ITNs) used under operational conditions. The process used to determine the methodology detailed in this SOP, and justifications for key methodological parameters can be found in ‘I2I-MD-003: Durability monitoring method development: Dual AI insecticide-treated nets containing a pyrethroid plus Chlorfenapyr2I-MD-003: Durability monitoring method development: Dual AI ITNs containing Chlorfenapyr’.

1. Background

Pyrethroid + chlorfenapyr nets are PQ listed (i.e. Interceptor G2) and being deployed in randomised control trials (RCTs) and pilot deployment schemes. There is therefore an urgent need for a method to measure the bioefficacy of these nets, to collect baseline data and subsequently measure the durability of biological efficacy in nets collected from the field after fixed periods of use. Monitoring the bioefficacy of the active ingredients (AI) in the nets is a vital part of establishing the durability of these nets under operational conditions.

1. Materials & Equipment

**General**

* Data collection sheets
* Lab coat
* Gloves
* Test pyrethroid + CFP nets
* Control untreated net
* Aspirator (manual/electronic), separate for each insecticide
* Mosquito strains
* Pen/permanent markers

**Collection and storage of net samples**

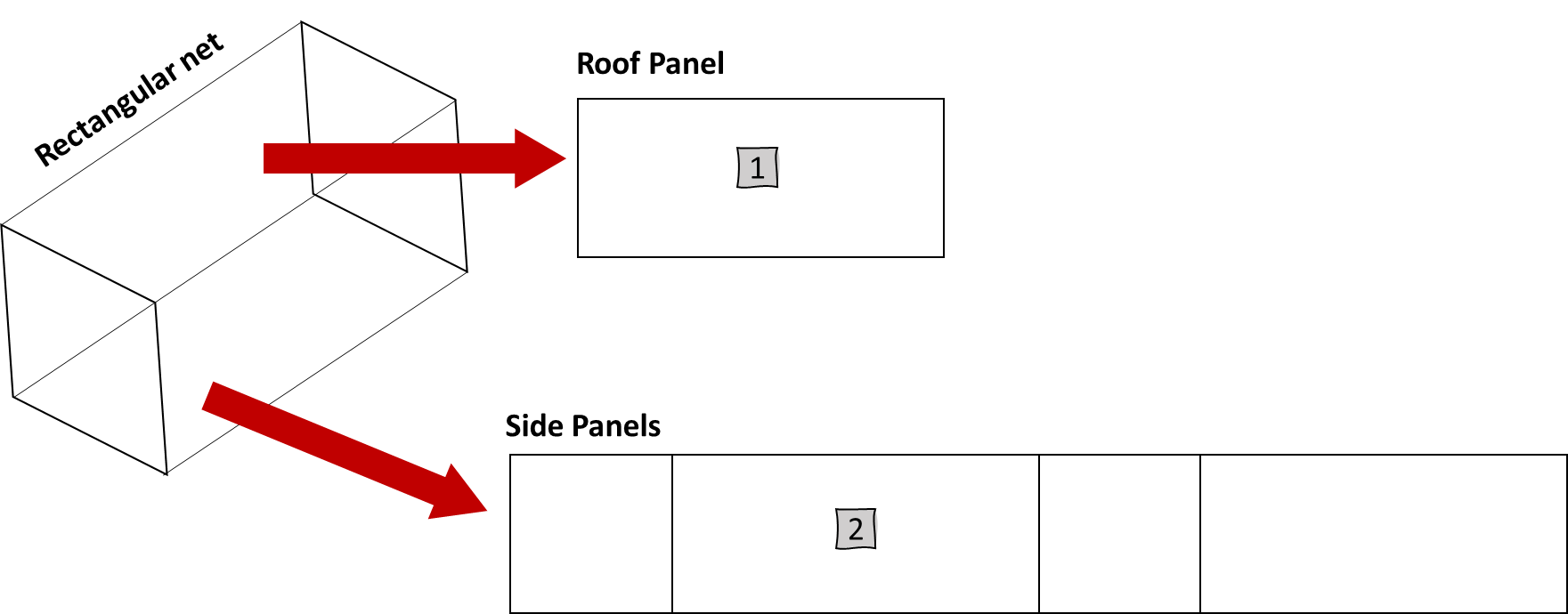
* Net frame
* Scissors
* Paper labels
* Aluminium foil

**Tunnel Test**

* Mosquito holding/collection containers (e.g. paper cups covered with untreated netting held by elastic bands)
* 60 cm glass/plastic tunnels (25 cm x 25 cm square section), separate for each net type (i.e. untreated or dual-AI CFP net)
* Netted capture cages, 25 cm2 (2 per tunnel)
* Net frame holder (1 per tunnel)
* Animal bait (specify what animal bait is being used)
* Temperature and humidity data logger
* Timer
* 10% sucrose solution (e.g. sugar or honey and water)

1. Procedure
   1. Test mosquitoes

* Use 5-to-8-day-old nulliparous non-blood fed female *Anopheles* mosquitoes. Mosquitoes should be sugar starved for a minimum of 6 hours before exposure (the exact starvation period should be recorded). Mosquitoes should be well characterized lab strains with respect to insecticide susceptibility (Lees et al, In Prep). New IG1 & IG2 should be used to characterise strain prior to testing as these will not be used for daily controls.
* F0 adults collected from larval breeding sites should only be used when lab strains are unavailable and should following the same insecticide resistance characterisation methods as lab strains (see Section 6. Deviations from standard protocol).
* A pyrethroid-susceptible strain should be tested to monitor the durability of the pyrethroid insecticide, and a pyrethroid-resistant strain should be used to monitor the durability of the CFP (Lees et al, In Prep). Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strain should be tested (See Section 5. Data priority list). As testing is conducted overnight, the different strains may need to be conducted on different days. Test all mosquito strains being used on that experimental day against each control panel.
  1. Collection and storage of test net samples (for bioefficacy testing[[24]](#footnote-25))
* Whole nets and net pieces may need to be stored before and after testing and may be transported between study sites. When collecting and storing whole net and net samples always ensure they are kept separately to avoid cross-contamination of AIs. Store nets in a cool dry place at <5°C out of direct sunlight.
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Hang sample net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the lab’s cleaning protocols.
* Cut 2 pieces (20 x 20 cm) from each test net (1 from the roof panel, 1 from the sides panels). Scissors should be changed or cleaned between cutting net panels with different AIs. Recommended sampling positions can be found in Figure 1.
* Label net pieces with the sample position (i.e. 1 - 2) and net ID on paper labels secured to the corner of each piece.
* Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°C.



*Figure 1. Recommended sampling position of net pieces from dual-AI CFP bednet,* *when the net is treated with the same AIs all over. The lower 25 cm of the net should not be sampled as it is likely to have been exposed to abrasion from being tucked under a bed. One sample should be taken from the net roof panel and one sample should be taken from the net side panels. Image adapted from* (WHO, 2011)*.*

* 1. Control net samples
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Control nets should be aired, but unwashed. Air new nets away from direct sunlight for a minimum of 7-days before testing.
* Two pieces of control netting are needed per assay. However, control pieces should not be used >5 times, so multiple pieces will be needed.
  + Hang net on net frame. Net frame should be cleaned between nets as specified by the labs cleaning protocols.
  + Cut 10 pieces (20 x 20 cm) from each control net.
  + Label net pieces with the control net ID on paper labels and secure to the corner of each piece.
  + Wrap each piece individually in aluminium foil and refrigerate. If a refrigerator is not available store nets a cool dry place at <5°C.
* On each experimental testing day, two negative untreated control nets (Table 2) should be tested alongside test nets.

*Table 2. Specifications of control nets.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Net Type** | **Description** |
| Negative control: Untreated net | Untreated netting of the same material as the test netting (e.g. polypropylene). Record the number of times the net piece has been used and do not use the same piece >5 times.  If mortality in the negative control on a particular testing day is >10% (24-hours) or >20% (72-hours) results should be discarded, and testing repeated. If control mortality for the day is <10% (24-hours) or <20% (72-hours) the test results should be corrected using Abbott’s formula[[25]](#footnote-26) (Abbott, 1925; WHO, 2013).  If blood-feeding in the negative control on a particular testing day is <50% the results should be discarded and testing repeated. |

* 1. Tunnel test setup
* Gloves and a lab coat should always be worn when handling the nets and should be changed between handling different nets/net panels with different AIs to avoid cross-contamination.
* Clean testing area and equipment as specified by the labs cleaning protocols.
* Prepare test mosquitoes. The numbers of mosquitoes required can be found in Table 4, Section 5. Data priority list). Carefully transfer required mosquitoes to holding containers, 50 mosquitoes per container using an aspirator.
* Prepare test and control nets. Cut 9 holes into the 20 x 20 cm net piece (holes 1 cm in diameter; one hole is located at the centre of the square net sample, and the other eight are equidistant and located 5cm from the border). Secure the holed net onto the net holder.
* Test mosquitoes and net samples should be acclimatised to the climatic conditions of the testing room for a minimum of one hour before testing. Remove any knocked-down mosquitoes from holding containers before testing.
* Assemble the tunnel netted capture cages.
* Place the net sample in its holder into the tunnel, one third along its distance.
* Prepare and label 8 mosquito collection containers per tunnel, 4 for each compartment (compartment 1 & compartment 2[[26]](#footnote-27)): labelled dead blood-fed, dead unfed, alive blood-fed, alive unfed.
  1. Tunnel test procedure
* Record the temperature and humidity during testing. Preferably, continuously with a data logger or alternatively manually at the start and end of tunnel exposure, and the end of the mosquito holding period.
* Place the animal bait into compartment 2 (the shorter section of the tunnel). Ensure that the selected animal has not been used for testing for at least 2 weeks before this test and that it is placed in a position in the compartment where it will not injure itself.
* Secure the netted capture cages to either end of the tunnel. Ensure the netted cage on compartment 1 (the longer section of the tunnel) has an opening to allow the test mosquitoes to be added.
* Transfer 50 mosquitoes from the holding container into the netted cage on compartment 1 using an aspirator.
* Expose mosquitoes to the net in the tunnel for 12-15 hours. Record the start and end time of the exposure on the data collection sheet. Testing should be conducted in darkness during the ‘night phase’ of the mosquitoes circadian rhythm.
* At the end of the exposure period, determine the mosquitoes compartment location, mortality and blood-feeding status (Table 3). Transfer mosquitoes from the tunnel into their corresponding collection container using an aspirator (i.e. compartment 1 dead blood-fed). Return the animal to its enclosure and ensure it is provided with food and water.
* Ensure mosquito collection containers are correctly labelled with the net sample ID (Net ID and position), test rep, mosquito species, and testing date.
* Provide mosquitoes with a sugar meal (10% sucrose solution soaked onto a relevant substrate such as cotton wool).
* Record the number of mosquitoes in each holding container (i.e. compartment 1 or compartment 2, dead blood-fed, dead unfed, alive blood-fed, alive unfed).
* For remaining mosquitoes, record the number dead at 24, 48, and 72 hours from the start of exposure. Remove dead mosquitoes each day to avoid duplicate counting.
* At the end of testing, ensure mosquitoes are stored correctly (i.e. in individual tubes with silica gel) for future analysis. If mosquitoes are not required for future analysis, discard mosquitoes safely.

*Table 3. The definitions used for classifying alive, dead, unfed and blood-fed mosquitoes, adapted from* (WHO, 2013)

|  |  |
| --- | --- |
| **Mosquito status** | **Definition** |
| Alive | The mosquito is mobile or able to stand or fly in a coordinated manner |
| Dead | The mosquito is immobile or unable to stand or take off in a coordinated manner following net exposure |
| Unfed | No blood-meal is visible by eye |
| Blood fed | A partial or complete blood-meal is visible by eye |

* 1. Measured outcomes
* The number of mosquitoes in each compartment (1 & 2) on collection separated by dead blood-fed, dead unfed, alive blood-fed, alive unfed for each net/tunnel replicate.
* The number of mosquitoes dead at 24, 48, and 72hr, separated by their collection compartment (1 & 2) and blood-feeding status (unfed or blood-fed).
* Individual data should then be pooled to calculate blood-feeding %[[27]](#footnote-28), blood-feeding inhibition[[28]](#footnote-29), immediate mortality%[[29]](#footnote-30), 24-hour mortality%[[30]](#footnote-31) and 72-hour mortality %[[31]](#footnote-32) for each net/tunnel replicate.
* If control mortality is >10% or blood-feeding is <50% for the day the test results should be discarded, and the test repeated.

1. Data priority list

* All testing should be carried with the same resistant and susceptible strains over time. Where resources allow it and mosquitoes are available a second resistant and susceptible strain should be tested. However, it is more important to have a full longitudinal data set with one strain, so resources should be prioritised to ensure this before considering testing with secondary strains.
* Ad hoc testing with secondary strains when available will provide useful data.
* The ideal methodological parameters (i.e. net samples, replicates, controls) can be found in Table 4. All methodological parameters and deviations from standard testing should be recorded at the time of testing.

*Table 4. The number of net samples, and mosquitoes required from each strain per test net and for daily controls.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Parameter** | **Amount** |
| CFP roof panel sample | 1 |
| CFP side panel sample | 1 |
| Untreated control samples | 2 |
| Replicate per panel | 1 |
| Mosquitoes per rep | 50 |
| Mosquito per CFP test net | 100 |
| Mosquito per untreated control net (daily) | 100 |
| Total | 200 |

1. Deviations from standard protocol

* All deviations from the standard protocol should be noted in the data collections sheets.
* When insecticide characterised lab strains are unavailable, wild larval collected mosquitoes could be used. Details on larval collected should be recorded, such as the location of sampling sites (including coordinates), the number of sampling sites, and the type of sampling site (e.g. rainwater puddle, permanent water body). The wild larval collected population should be insecticide characterised using the same methods as those used to characterise lab strains (Lees, et al, In Prep).

1. Supplementary data

* Additional information that should be recorded:
  + Time of testing
  + The light-dark rearing cycle of test mosquitoes (including times where possible)

1. Glossary of terms

|  |  |
| --- | --- |
| AI | Active ingredient |
| CFP | Chlorfenapyr |
| I2I | Innovation to Impact |
| ITN | Insecticide-treated net |
| PBO | Piperonyl butoxide |
| PQ | Prequalification |
| RCT | Randomised control trial |
| SOP | Standard operating procedure |
| WHO | World Health Organization |

1. References

Abbott, W.S. (1925) “A method of computing the effectiveness of an insecticide.,” *Journal of Economic Entomology*, 18(2), pp. 265–267. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3333059 (Accessed: January 4, 2017).

Lees, R. *et al* (In Prep) “Strain Characterisation for Monitoring Durability of Bioefficacy in ITNs Treated with Two Active Ingredients (Dual AI ITNs): Developing a Robust Protocol by Building Consensus,” *Insects* [Preprint].

WHO (2011) *Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions Control of Neglected Tropical Diseases WHO Pesticide Evaluation Scheme and Global Malaria Programme Vector Control Unit*.

WHO (2013) *Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets*, *WHO/HTM/NTD/WHOPES/20131*. Geneva: World Health Organization.

1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILD) jouent un rôle important dans la prévention du paludisme depuis 2000. Le terme MILD est réservé aux produits de lutte antivectorielle préqualifiés par l'OMS. Etant donné que plusieurs nouvelles moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) sont actuellement à l'essai mais n'ont pas encore été préqualifiées par l'OMS, nous utilisons le terme plus large de MII plutôt que celui de MILDA dans ce protocole. [↑](#footnote-ref-2)
2. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. [↑](#footnote-ref-3)
3. WHOPES: **Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions**, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2011.5 <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501705_eng.pdf> [↑](#footnote-ref-4)
4. World Health Organization: **WHO guidance note for estimating the longevity of long-lasting insecticidal nets in malaria control.** Geneva: 2013. <http://www.who.int/entity/malaria/publications/atoz/who_guidance_longevity_llins/en/index.html>. [↑](#footnote-ref-5)
5. World Health Organization: **Estimating functional survival of long-lasting insecticidal nets from field data**. Vector Control Technical Expert Group Report to MPAC September 2013. <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_sep13_vcteg_llin_survival_report.pdf>. [↑](#footnote-ref-6)
6. WHO: **Guidelines for laboratory and field testing of long‐lasting insecticidal nets.** Geneva 2013, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.3 <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/80270/1/9789241505277_eng.pdf?ua=1> [↑](#footnote-ref-7)
7. Bénin, Birmanie, RDC, Ethiopie, Guinée, Madagascar, Malawi, Mozambique, Nigeria, Tanzanie (Zanzibar), Zimbabwe (Source : www.durabilitymonitoring.org) [↑](#footnote-ref-8)
8. World Health Organization: **WHO guidance note for estimating the longevity of long-lasting insecticidal nets in malaria control.** Geneva: 2013. [↑](#footnote-ref-9)
9. WHO: **Guidelines for laboratory and field testing of long‐lasting insecticidal nets.** Geneva 2013, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.3 <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/80270/1/9789241505277_eng.pdf?ua=1> [↑](#footnote-ref-10)
10. Burkina Faso, Birmanie, Burundi, RDC, Ghana, Kenya, Liberia, Madagascar, Mozambique, Niger, Nigeria, Tanzanie (Zanzibar). [↑](#footnote-ref-11)
11. The number of sample pieces listed is for conducting the bioefficacy testing specified in this protocol. Additional samples may be required for chemical analysis. [↑](#footnote-ref-12)
12. Abbott’s formula: Adjusted mortality (%) = 100 x (X–Y) / (100–Y), where X is the percentage mortality with the test netting, and Y is the percentage mortality with the untreated control sample [↑](#footnote-ref-13)
13. 1-hour knockdown (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes knocked down at 1-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-14)
14. 24-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead at 24-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-15)
15. 1-hour knockdown (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes knocked down at 1-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-16)
16. 24-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead at 24-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-17)
17. The number of sample pieces listed is for conducting the bioefficacy testing specified in this protocol. Additional samples may be required for chemical analysis. [↑](#footnote-ref-18)
18. Abbott’s formula: Adjusted mortality (%) = 100 x (X–Y) / (100–Y), where X is the percentage mortality with the test netting, and Y is the percentage mortality with the untreated control sample. [↑](#footnote-ref-19)
19. Visibly blood-fed mosquitoes: The mosquitoes’ abdomen is engorged, and red. Filled with a bloodmeal and not a sugar meal. [↑](#footnote-ref-20)
20. 1-hour knockdown (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes knocked down at 1-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-21)
21. 24-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead at 24-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-22)
22. 1-hour knockdown (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes knocked down at 1-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-23)
23. 24-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead at 24-hour and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net. [↑](#footnote-ref-24)
24. The number of sample pieces listed is for conducting the bioefficacy testing specified in this protocol. Additional samples may be required for chemical analysis. However, it is advisable that the same samples be used for biological and chemical testing. [↑](#footnote-ref-25)
25. Abbott’s formula: Adjusted mortality (%) = 100 x (X–Y) / (100–Y), where X is the percentage mortality with the test netting, and Y is the percentage mortality with the untreated control sample. [↑](#footnote-ref-26)
26. Compartment 1 = long section of tunnel into which mosquitoes are released; compartment 2 = short section where animal bait is housed. [↑](#footnote-ref-27)
27. Blood-feeding (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of blood fed mosquitoes collected from the tunnel and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net in the tunnel. [↑](#footnote-ref-28)
28. Blood feeding inhibition (%) = , where X is the blood feeding % in the untreated net tunnel and Y is the blood-feeding % in the test net tunnel. [↑](#footnote-ref-29)
29. Immediate mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of dead mosquitoes collected from the tunnel and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net in the tunnel. [↑](#footnote-ref-30)
30. 24-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead within 24 hours and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net in the tunnel. [↑](#footnote-ref-31)
31. 72-hour mortality (%) = (X/Y) x 100, where X is the total number of mosquitoes dead within 72 hours (including mosquitoes dead on collection and at 24- and 48-hours) and Y in the total number of mosquitoes exposed to the test net in the tunnel.

    [↑](#footnote-ref-32)