

PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

REDACTEURS	VERIFICATEURS	APPROBATEUR	DESTINATAIRES
Cédric PENNETIER	ADJA A Maurice, BOYER Sébastien, CHANDRE Fabrice, DJENONTIN Armel, FONTENILLE Didier, KOFFI Alphonsine, LABBO Rabiou, MORLAIS Isabelle, TOURE Mahama	Participants au projet PALEVALUT	Entomologistes
Date : 01/09/2013	Date : 06/09/2013	Date :	

Objet : La procédure définit la méthode d'évaluation du comportement des anophèles vecteurs et des risques de la transmission du paludisme dans une zone en conditions réelles de déploiement des méthodes de lutte contre le paludisme.

Application : Le document est élaboré pour le personnel chargé de l'évaluation entomologique 1) des indicateurs comportementaux des anophèles vecteurs; 2) des indicateurs de la transmission.

Documents associés : néant

Annexes : 1

Historique des modifications :

Date	Version	Nature de la modification
01/09/2013	0	Premier draft
06/09/2013	1	POS approuvé en atelier WP1
05/11/2013	2	Mise en forme définitive

Sommaire :

1	Introduction.....	2
2	Objectifs	2
3	Responsabilités.....	2
4	Matériels et méthodes.....	3
4.1	Méthodes d'échantillonnage des vecteurs	3
4.1.1	Horaires de capture.....	3
4.1.2	Choix des postes de capture	3
4.1.3	Choix et rotation des captureurs.....	4
4.2	Traitement des moustiques au laboratoire.....	5
4.3	Matériel	5
4.4	Analyse des résultats.....	6
5	Faisabilité et points bloquants	6
6	Références.....	7
7	Annexe 1 - ELISA CSP (Circumsporozoite protein de Plasmodium).....	8



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

1 Introduction

Les principales méthodes de lutte entomologiques contre la transmission du paludisme par les anophèles vecteurs sont la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD) et la pulvérisation intra domiciliaire d'insecticides rémanents (PID). La mise en place de ces outils repose sur l'hypothèse que la majeure partie des anophèles responsables de la transmission pique préférentiellement l'homme, la nuit à l'intérieur des habitations et restent s'y reposer après la prise du repas sanguin.

L'efficacité opérationnelle de la lutte anti vectorielle (LAV) déployée repose sur la qualité du support traité avec de l'insecticide (MIILD ou PID), la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides utilisés et sur leurs préférences comportementales. Toute modification de ces trois paramètres est susceptible de diminuer l'efficacité opérationnelle de la LAV. L'évaluation de ces paramètres après le déploiement des outils de LAV est donc indispensable.

Une telle évaluation pour être adéquate devra être composée du contrôle de la qualité des outils de lutte anti vectorielle mis en place (POS CQ MIILD-PID), de l'étude de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides utilisés (POS RES-VECT), de l'étude du comportement des anophèles vecteurs, ainsi que de l'évaluation du risque de transmission dans les zones couvertes (POS MoBe).

La méthodologie proposée ci-dessous concerne:

- 1) les méthodes d'évaluation des indicateurs du comportement trophique des populations d'anophèles présentes dans les zones d'études (l'endophagie/exophagie, et le rythme d'agressivité)
- 2) les méthodes d'évaluation des indicateurs du risque de transmission du paludisme (densité agressive, indice sporozoïtique (IS), Taux d'Inoculation Entomologique(TIE)).

2 Objectifs

- Mesurer pour chaque espèce d'anophèles vecteurs les indicateurs du comportement trophique (endophagie/exophagie et le rythme d'agressivité).
- Mesurer les indicateurs du risque de transmission du paludisme (densité agressive, indice sporozoïtique (IS), Taux d'Inoculation entomologique(TIE)).

3 Responsabilités

Chercheur entomologiste : obtention de la clairance éthique (lorsqu'elle est nécessaire, variable selon les pays) et des autorisations réglementaires ; coordination de la mise en œuvre du protocole, de la formation et de la supervision du personnel responsable de la collecte des données ; rassemblement, vérification et analyse des données collectées ; rédaction du rapport final.

Technicien entomologiste : Prise de contact et inclusion des participantes ; collecte et enregistrement des données sous le format prévu par le protocole ; collecte des moustiques et dissection des ovaires, participation (avec le biologiste) à l'analyse des moustiques collectés pour un diagnostic de l'espèce des



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

différents mécanismes de résistance aux insecticides et de la présence de sporozoïtes de plasmodies humaines.

Biologiste : analyse des moustiques collectés pour un diagnostic de l'espèce des différents mécanismes de résistance aux insecticides et de la présence de sporozoïtes de plasmodies humaines ; enregistrement des résultats des examens sous le format prévu par le protocole en assurant le chainage avec les données entomologiques collectées par les techniciens entomologistes sur le terrain.

4 Matériels et méthodes

4.1 Méthodes d'échantillonnage des vecteurs

Afin de disposer de données pour évaluer les différents indicateurs entomologiques, les moustiques seront capturés sur des volontaires humains éveillés (Coffinet et al. 2009). La méthode de capture des moustiques sur un volontaire humain éveillé vise à mesurer le contact homme/vecteur (densité agressive), le rythme d'agressivité et le taux d'inoculation entomologique.

4.1.1 Horaires de capture

La **période d'agressivité** est une préférence qui évolue et ne se confine pas seulement entre le crépuscule et l'aube. Les heures peuvent varier selon l'environnement et la saison. Une période de capture de 17h ou 18h (selon l'heure de tombée de la nuit) à 9 heures le lendemain matin permettra d'échantillonner les vecteurs du paludisme qui sont agressifs avant la tombée de la nuit et après le lever du jour (Geissbuhler et al. 2007, Bayoh et al. 2010, Moiroux et al. 2012).

4.1.2 Choix des postes de capture

Les captures doivent être organisées simultanément à l'intérieur et à l'extérieur des maisons pour estimer respectivement l'agressivité des vecteurs **endophages et exophages**. L'effort de capture (i.e. le nombre de postes) doit être le même à l'intérieur et à l'extérieur. Ce nombre sera déterminé en tenant compte de la rigueur scientifique et de la faisabilité matérielle et financière (dans le budget prévisionnel pour le WP2, nous avons prévu 3 nuits de captures par village dans les 8 villages de chaque zone d'étude soit un total de 24 nuits de capture à raisons de 4 points (intérieur & extérieur) par nuit de capture).

A l'intérieur, on choisit des locaux habituellement habités (imprégnation «d'odeurs humaines» perçues par les moustiques), calmes, sans déplacement excessif de personnes, ouverts sur l'extérieur par une porte ou une fenêtre (pour laisser entrer les moustiques) en évitant les pièces où des produits chimiques à activité répulsive ont été ou sont stockés (insecticides stockés, imprégnation des moustiquaires ou des murs; carburants,...) ou les pièces qui ont pu être enfumées (cuisines, fours, incinérateurs, buanderies). Idéalement, il faut choisir des chambres ou des salons, éventuellement un couloir ou une entrée.

A l'extérieur, on privilégie les postes à l'abri du vent où quelques personnes ont l'habitude de se retrouver, éloignés des feux, des lieux de rassemblement ou de passages nocturnes trop important (compétition d'attraction des moustiques). On peut choisir des terrasses ou des auvents ouverts sur au moins trois faces mais couverts qui protègent les captureurs de la pluie et du vent.

Les postes de capture doivent être les plus éloignés possible les uns des autres afin de limiter les phénomènes de compétition. Ces postes ne doivent jamais être distants de moins de 10 mètres et doivent être de préférence distants de plus de 30 mètres.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

En pratique, il faut négocier avec les habitants pour le choix des postes de capture. La présence d'un captureur dans une maisonnée peut être perçue comme gênante et il peut être malaisé de la faire accepter dans un salon ou dans une chambre (à moins que le captureur fasse partie de la famille).

4.1.3 Choix et rotation des captureurs

Pour des raisons d'acceptabilité et parfois de sécurité, il est préférable de choisir les captureurs dans les communautés où sont organisées les séances de capture. Il s'agit généralement d'hommes jeunes volontaires (l'emploi de femmes en âge de procréer est proscrit pour éviter l'exposition d'un embryon ou d'un fœtus au paludisme et à une chimioprophylaxie). Les captureurs ne doivent ni se parfumer, ni utiliser de répulsifs ou de cosmétiques, ni fumer (effet répulsif), ni capturer les moustiques ailleurs que sur leur peau, ni s'endormir, ni quitter le poste de capture pendant la période où ils opèrent. Ils doivent être fiables et il ne faut pas hésiter à changer de captureur s'il a enfreint une de ces règles.

Sur le plan de l'organisation de la capture, nous proposons deux variantes d'organisation des séances de capture ci-dessous :

1. Généralement, deux captureurs (un binôme) opèrent successivement sur chaque poste de capture au cours d'une nuit. Chaque captureur est relevé au bout de deux heures (parfois une heure) par le deuxième captureur du binôme. Dans un site donné, les binômes de captureurs alternent sur chacun des postes de capture, à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. De cette manière, les biais d'estimation de l'agressivité en fonction des horaires et des postes de capture qui peuvent être liés à l'attractivité et à l'habileté des captureurs sont minimisés.

2. Chaque captureur opère en continu pendant une durée de 7 à 8 heures (la moitié de la séance). L'unique rotation des captureurs, à 1h ou 2 h du matin, est plus facile à organiser mais expose à des biais d'estimation de l'agressivité horaire : l'agressivité en première et en deuxième moitié de nuit n'est pas estimée par les mêmes captureurs. Ici aussi, il est recommandé de faire tourner les binômes sur les différents postes de capture au cours des séances successives bien que cela ne suffise pas pour diminuer ce biais.

La première méthodologie exige des captureurs qu'ils veillent toute la nuit. Si cela n'est pas réalisable dans certaines zones, la seconde méthodologie sera alors appliquée.

L'objectif du projet 5% est l'évaluation d'une intervention de LAV. Les données comportementales serviront à alimenter une base de données environnementale et entomologique dont l'effet sur le niveau de transmission sera analysé par la suite. La période et le rythme de capture seront donc adaptés en fonction de la campagne de surveillance épidémiologique du projet et de la faisabilité logistique et financière.

Les captureurs sont supervisés par des techniciens entomologistes expérimentés qui sont responsables de la mise en place de postes de capture et de l'organisation des rotations. Les superviseurs doivent vérifier l'activité des captureurs au moins une fois par heure.

La détermination des moustiques capturés (jusqu'au genre) et la dissection des ovaires des anophèles femelles doivent être réalisées par les techniciens entomologistes au plus tard dans la matinée suivant la nuit de capture. Seules les femelles anophèles seront conditionnées pour une analyse ultérieure au laboratoire.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

4.2 Traitement des moustiques au laboratoire

Pour évaluer les indicateurs comportementaux et le risque de transmission, il faut caractériser les moustiques au niveau de l'espèce et déterminer s'ils sont porteurs de sporozoïtes (stade infectant des plasmodies humaines). De plus, les mécanismes de résistance aux insecticides peuvent influencer sur le comportement. Il est donc indispensable de caractériser les principaux mécanismes de résistance aux insecticides utilisés en santé publique qui constitueront des variables explicatives de nos indicateurs comportementaux. Les carcasses d'anophèles sont conservées sur silicagel en vue de leur analyse au laboratoire afin de déterminer l'espèce et la forme moléculaire, la présence ou l'absence de sporozoïtes et la fréquence des deux mutations de cibles *Kdr* et *Ace1^R* qui confèrent une résistance aux pyréthrinoides et organophosphorés et carbamates suivant les protocoles suivants :

1. PCR espèces/formes (POS RES VEC paragraphe 5.1.2 et 5.1.5)
2. CSP ELISA (annexe 1)
3. PCR *Kdr* (POS RES VEC paragraphe 5.1.2, 5.1.3 et 5.1.6)
4. PCR *Ace1R* (POS RES VEC paragraphe 5.1.2, 5.1.4 et 5.1.6)

La recherche de mécanismes de résistance de type enzymatique se fera sur des moustiques issus des bio essais du POS RES VEC car le conditionnement à -80°C n'est pas possible sur le terrain. Les protocoles des analyses biochimiques des enzymes impliquées dans la dégradation des insecticides sont décrits dans le POS RES VEC (paragraphe 5.2).

4.3 Matériel

Pour la capture des moustiques sur des volontaires humains éveillés, leur détermination et leur conservation, il faut:

- Deux chaises ou deux tabourets par poste de capture
- Des sacs de poste de couleur claire sur lequel est inscrit le numéro de poste et le type de poste (intérieur ou extérieur) et qui comprend :
 - 15 sacs horaires, plus petits, de couleur claire sur lesquels sont inscrits le numéro du poste, son type et la tranche horaire (par exemple : 17-18h, 18-19h, 19-20h, etc...). Les sacs horaires sont rangés les uns sur les autres dans l'ordre des heures ;
 - une réserve de tubes à hémolyse en verre ou en plastique qui servent à la capture individuelle des moustiques et dont la transparence permet une détermination rapide des genres et/ou espèces.
 - du coton pour boucher les tubes à hémolyse
 - une lampe torche
 - des piles
 - du café ou du thé, du sucre et de l'eau chaude pour reconforter les captureurs au repos et leur permettre de rester éveillés pendant les phases de travail
 - des loupes binoculaires
 - des tubes eppendorf



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

- du silicagel
- des lames et des lamelles
- un microscope
- des pinces fines
- des marqueurs
- des cryoboîtes de rangement des tubes eppendorf
- un congélateur à -20°C

4.4 Analyse des résultats

A partir des données collectées, les indicateurs entomologiques suivants sont calculés:

Endophagie : Elle représente la proportion de moustiques capturés à l'intérieur des habitations par les volontaires éveillés [100* (nb moustiques capturés à l'intérieur/nb d'Homme-nuits de capture en intérieur)/nb total de moustiques capturés/ nb total d'Homme-nuits de capture)].

Densité agressive (ma) : Elle est égale au nombre de piqûres par homme et par nuit. Elle est calculée en divisant le nombre de moustiques capturés sur les volontaires humains par le nombre d'Homme-nuits de capture.

Indice sporozoïtique (IS) : Il correspond à la proportion de vecteurs ayant des sporozoïtes dans leur glande salivaire (100* Nb vecteurs femelles positifs à l'ELISA CSP/Nb total vecteurs femelles testés).

Taux d'Inoculation entomologique (TIE) est égal au produit de l'IS et de la densité agressive pour un lieu et une période donnée.

$$TIE (24h) = ma \cdot IS$$

5 Faisabilité et points bloquants

Le plan d'échantillonnage est dépendant des contraintes financières et pourra varier selon les pays pour le WP2. Des aspects éthiques peuvent être limitant car cette méthodologie nécessite l'implication de l'homme comme appât. Le protocole sera soumis au comité national d'éthique de chaque pays impliqué dans le projet.

La capture sur homme est complètement dépendante de l'habileté et de la concentration de chaque captureur. La formation et la supervision sont donc des points importants pour assurer la qualité de la capture. Néanmoins il est difficile de se déplacer avec la même équipe de captureurs dans tous les villages car la population peut être réticente à laisser entrer des étrangers dans leurs habitations. Nous avons donc prévu une journée de formation des captureurs recrutés dans chaque village. En revanche les superviseurs seront les mêmes pour tous les villages afin d'assurer le même suivi des captures et limiter la variabilité dans cette tâche de supervision.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

6 Références

Bayoh, M. N., D. K. Mathias, M. R. Odiere, F. M. Mutuku, L. Kamau, J. E. Gimnig, J. M. Vulule, W. A. Hawley, M. J. Hamel, and E. D. Walker. 2010. Anopheles gambiae: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malar J* 9: 62.

Coffinet, T., C. Rogier, and F. Pages. 2009. Evaluation de l'agressivité des anophèles et du risque de transmission du paludisme : méthodes utilisées dans les Armées françaises. *Med Trop* 69: 109-122.

Costantini, C., G. Gibson, J. Brady, L. Merzagora, and M. Coluzzi. 1993. A new odour-baited trap to collect host-seeking mosquitoes. *Parassitologia* 35: 5-9.

Geissbuhler, Y., P. Chaki, B. Emidi, N. J. Govella, R. Shirima, V. Mayagaya, D. Mtasiwa, H. Mshinda, U. Fillinger, S. W. Lindsay, K. Kannady, M. C. de Castro, M. Tanner, and G. F. Killeen. 2007. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J* 6: 126.

Moiroux, N., M. B. Gomez, C. Pennetier, E. Elanga, A. Djenontin, F. Chandre, I. Djegbe, H. Guis, and V. Corbel. 2012. Changes in Anopheles funestus biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *J Infect Dis* 206: 1622-1629.

Service, M. W. 1993. Mosquito ecology: Field sampling methods, Springer; 2nd edition.

Wirtz, R. A., F. Zavala, Y. Charoenvit, G. H. Campbell, T. Burkot, I. Schneider, K. M. Esser, R. L. Beaudoin, and R. G. Andre. 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* 65: 39-45.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

7 Annexe 1 - ELISA CSP (Circumsporozoite protein de *Plasmodium*)

La détermination des anophèles infectés par *P. falciparum* dans sa forme sporozoïte sera faite par la technique ELISA – CSP. Cette méthode est basée sur la détection du circumsporozoite protein qui est un antigène spécifique de la surface du sporozoïte (Wirtz et al. 1987).

7.1. Protocole expérimental

La technique est décrite comme suit (D'après Wirtz, Burkot et al.; technique Fontenille LIN Mpl 2002) :

- 01 - Si nécessaire préparer les tampons PBS - BB - tween 20 - NP 40 +BB.
- 02 - Préparer les moustiques (tête - thorax dans tube numéroté)
* ajouter 20 µl de NP 40/BB laisser au moins 1 h (ou la nuit au réfrigérateur).
- 03 - Préparer le plan de la plaque sur la feuille (n° des moustiques, date, ...).
- 04 - Broyer les moustiques : 2 fois 190 µl de BB (conservation des tubes à - 20°C).
- 05 - Si nécessaire reconstituer les ACm de capture (cf. Fiche), conserver à -20°C.
- 06 - Sensibiliser les plaques ELISA : Préparer les solutions d'ACm de capture aux dilutions voulue : il faut faire les essais de dilution à chaque nouvelle commande – vortexer
Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pointe jaune) de chaque ACm de capture
* SCREEN : mélange des plasmodiums a tester (n x 50 µl)
* monospécifique : uniquement du plasmodium étudié (1 x 50 µl).
Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. à 4°C).
- 07 - Vider les plaques, ne pas laver.
- 08 - Ajouter 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique)
Laisser 1 heure sur paillasse.
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans BB)
- 09 - Vider les plaques, ne pas laver.
- 10 - Ajouter 50 µl du broyat de moustique par puits.
Laisser pendant 2 heures sur paillasse.
- 11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les ACm CONJUGUES,
Si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)
- 12 - Vider la plaque. Laver 2 fois au PBS/TWEEN 20
- 13 - Ajouter 50 µl/puits de l'ACm CONJUGUE, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl). Laisser 1 heure sur paillasse.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le SUBSTRAT de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*)

15 - Vider la plaque. Laver 4 fois au PBS/TWEEN 20.

16 - Ajouter 100 µl/puits de SUBSTRAT.

17 - Incuber 30 minutes dans l'obscurité sans toucher (coloration bleue 620 nm).

18 - Blocage par 50 µl d'acide sulfurique 4N : Coloration jaune.

19 - Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa.

7.2. Réactifs nécessaires

- PBS
- Eau distillée
- NP 40
- BB
- Casein
- Thiomérosal
- Phenol Red
- BSA
- Tween 20

7.3. Préparation des réactifs pour les ELISA

Préparation du PBS

- Reconstituer le PBS en poudre Sigma :
- 9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

Préparation du NP 40/BB

- Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml)
- Pour une plaque 2 ml = 25 µl NP 40 + 2 ml BB, agiter (préparer pour 5 plaques 10 ml + 125 µl NP 40)

Préparation du BB

Dans un litre PBS, ajouter :

- 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 0,04 g de Phenol red (Sigma P 4758)
- 10 g de BSA (Sigma A 7906)

Agiter 2h



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

(pour une plaque, moustiques à broyer compris : 100 ml de BB)



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

Préparation du PBS/TWEEN

20 - 500 µl de Tween 20 dans 1l de PBS, agiter (Sigma P 1379)

Préparation du Substrat de Peroxydase, selon Lhuillier, Sarthou et al. (Pour 3 plaques):

5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide

30 ml de Tampon citrate

12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

Préparation du Tampon Citrate pH4

Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H₂O 11,77 g

Hydroxyde de Sodium 4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N. Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

Reconstitution des anticorps monoclonaux lyophilisés (Acm)

Les ACm sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

Pour les ACm conjugués à la peroxydase dans BB, : il faut faire les essais de dilution à chaque nouvelle commande

Milieu reconstitution = 1/2 volume H₂O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)

- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

Quantités d'ACm nécessaires:

1. Sensibilisation : ACm capture dans du PBS (*Dilutions recommandées (Wirtz)*):

P. falciparum capture = 0.10µg / 50µl PBS (soit 10 µg par plaque, 20 µl par plaque / 5 ml PBS)

P. vivax-210 capture = 0.025µg / 50µl PBS (soit 2,5 µg par plaque, 5 µl par plaque / 5 ml PBS)

P. vivax-247 capture = 0.05µg / 50µl PBS (soit 5 µg par plaque, soit 10 µl par plaque / 5 ml PBS)

Pour 1 plaque : *P.falciparum* : 15 µl/5 ml PBS

P. vivax 210: 5µl/5ml PBS

P. vivax 247 : 10 µl/5 ml PBS

P. malariae : 60 µl/5 ml PBS

P. ovale: 15 µl/5 ml PBS



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

2. Révélation : ACm conjugués à Peroxydase dans BB (Dilutions recommandées (Wirtz)) :

P.falciparum peroxidase = 0.05µg/50µl BB (soit 5 µg par plaque, soit 10µl par plaque dans 5 ml BB)

P.vivax-210 peroxidase = 0.05µg/50µl BB (soit 5 µg par plaque, soit 10µl par plaque dans 5 ml BB)

P.vivax-247 peroxidase = 0.01µg/50µl BB (soit 1 µg par plaque, soit 2µl par plaque dans 5 ml BB)

Pour 1 plaque : *P.falciparum* 7,5µl/5 ml BB

P. vivax 210 10 µl/5ml BB

P. vivax 247 2 µl/5 ml BB

P. malariae 15 µl/5 ml BB

P. ovale 15 µl/5 ml BB

Témoins

Dilutions pour les témoins positifs CSP antigène de *P. f.*, *P. v* 210 et *P. v* 247.

Attention reconstitution du lyophilisat dans eau distillée, puis dilution dans BB.

Ces témoins sont fournis par le CDC.



PROCEDURE	MoBe-TIE
Evaluation des préférences comportementales des anophèles vecteurs et du risque de transmission du paludisme en zone de déploiement de mesures de lutte antipaludique	Version : 2
	Date : 05/11/2013

Espèce plasmodiale	Numéro de la Solution	Volume de l'antigène controle positif	Volume de Blocking Buffer (BB)	Concentration en antigène dans 50 µl
P. falciparum	Stock	Pf lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist.	----
	I	5µl de stock	500µl BB	500ng
	II	10µl de I	1000µl BB	5000pg
	* III Témoin pos	20µl de II	1000µl BB	100pg
P. vivax 210	Stock	Pv210 lyophilisé (25 µg)	25 µl d'eau dist	----
	A	5µl de stock	500µl BB	500ng
	B	10µl de A	1000µl BB	5000pg
	C	20µl de B	500µl BB	200pg
	D Témoin pos	200µl de C	800µl BB	40pg
P. vivax 247	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3 Témoin pos	100µl de 2	700µl BB	2.5ng

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

