

a 60848

WORLD HEALTH
ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ

CONFERENCE SUR LE PALUDISME
EN AFRIQUE



WHO/Ma1/154
Lagos Conf./26
15 février 1956

ORIGINAL : ANGLAIS

EVALUATION DES RESIDUS D'INSECTICIDES : METHODE BIOLOGIQUE
UTILISANT LES LARVES D'AEDES AEGYPTI AU PREMIER STADE

par

R. ELLIOTT

Entomologiste, Service du Paludisme,
Département des Services médicaux, Fédération de la Nigéria

1. INTRODUCTION

Il est très important de pouvoir évaluer la perte en principe actif des produits insecticides utilisés pour les pulvérisations à action rémanente. On peut choisir entre deux méthodes principales : le dosage chimique (ou physico-chimique) et la détermination de l'activité biologique.

Un certain nombre de méthodes chimiques et physico-chimiques simples et utiles ont été mises au point. Dans le cas du DDT, par exemple, la détermination colorimétrique (Alessandrini 1950) donne des résultats satisfaisants lorsqu'on ne cherche pas une très grande précision; pour des déterminations plus précises, on utilise la technique de la déshydrochloruration (dosage du chlore total) et la détermination du chlore hydrolysable. Les dépôts de DDT appliqués dans les opérations antipaludiques courantes sont tels qu'une quantité de produit suffisante pour un dosage se trouve sur les surfaces traitées. Il en est de même des dépôts d'HCH, lorsque la préparation utilisée a une teneur en isomère gamma de 6,5 % à 10 %. Dans ce cas, un résidu équivalent à 10 mg d'isomère gamma par pied carré* fournit de 100 à 154 mg d'hexachlorocyclohexane total pour la déshydrochloruration. En admettant que le degré de perte des autres isomères présents dans les dépôts est le même que celui de l'isomère gamma, la

* 0,1 g par m²

détermination de l'hexachlorocyclohexane total nous permet de calculer la quantité d'isomère toxique. Dans le cas contraire, il faut procéder à une détermination directe de l'isomère gamma, et on devra alors recourir à des méthodes plus sensibles. Ce sont notamment la spectroscopie dans l'infrarouge, la polarographie ou même l'emploi d'isotopes radioactifs. Lorsque des préparations d'isomère gamma d'HCH (lindane) ou des préparations de dieldrine sont appliquées aux doses habituelles, la quantité de matériel disponible pour l'analyse est beaucoup plus faible que dans le cas du DDT et des préparations d'HCH à faible teneur. Pour la dieldrine comme pour le lindane, la méthode habituelle pour doser de petites quantités est la spectroscopie dans l'infrarouge. Plus récemment, on a décrit un procédé permettant la déshydrochloruration de petites quantités de dieldrine et la détermination du chlore total sous forme de chlorure d'argent par la méthode turbidimétrique (Fuell, 1955, communication privée). Comme d'autres procédés physico-chimiques, cette méthode demande un laboratoire bien équipé, disposant d'un turbidimètre.

Il a donc paru utile de mettre au point certaines techniques plus simples qui fournissent une indication sur le sort des résidus insecticides et qui puissent être utilisées en l'absence d'un chimiste ou lorsqu'on ne dispose pas d'un laboratoire doté des appareils nécessaires. Ces techniques ont été élaborées au cours du projet de démonstration de lutte antipaludique à Ilaro (Bruce-Chwatt et al. 1955) et au cours des premiers stades du projet pilote de lutte antipaludique du Sokoto occidental. Nous pensons que ces techniques peuvent être utiles aux personnes qui travaillent sur le terrain dans des conditions analogues.

Certaines parties du procédé proviennent des laboratoires de la station expérimentale des Imperial Chemical Industries, Jeallot's Hill, Royaume-Uni, sous la direction de M. J.F. Newman. Les travaux décrits au paragraphe 7 ont été effectués en étroite collaboration avec le Dr Langbridge du Colonial Research Service, chimiste attaché au projet du Sokoto occidental. C'est lui qui a effectué les prélèvements, l'extraction et l'analyse chimique du matériel, dont des parties aliquotes ont été réservées pour les essais biologiques.

2. TECHNIQUE DE PRELEVEMENT

Pour récupérer les résidus d'insecticides sur les parois de terre, le grattage à l'intérieur d'une surface délimitée par un cadre métallique a donné de bons résultats. Après l'essai de plusieurs instruments, le choix s'est arrêté sur un couteau de peintre en acier, à tête triangulaire; comme pochoir, on se sert d'une feuille de fer blanc, d'environ 10 pouces de large, relevée à la partie inférieure de façon à former une gouttière de 3 pouces de large. Sur la face plate, une ouverture de 3 x 3 pouces délimite la zone à gratter. La partie postérieure, c'est-à-dire la partie touchant le mur, est garnie de ruban adhésif autour des bords de l'ouverture, de façon à empêcher les poussières de grattage de tomber entre le pochoir et le mur, et de se perdre. Quatre grattages effectués dans un local déterminé ont donné, pour une surface de 6 x 6 pouces, des échantillons pesant de 20 à 50 g, et tenant commodément dans la cartouche d'un appareil à extraction Soxhlet d'une capacité de 100 ml.

On peut également employer la méthode de Barlow (1953) qui prélève ses échantillons en appliquant du ruban adhésif en cellophane sur la paroi de terre. Ceci a l'avantage de ne retirer que le produit toxique qui peut être prélevé directement par l'insecte, mais ce procédé ne peut être utilisé sur les surfaces très rugueuses des parois qu'on rencontre ordinairement dans les cases africaines. Pour l'HCH, dont la toxicité dépend aussi de l'action fumigante de la substance profondément adsorbée et pas seulement des particules solides que l'insecte peut prélever, cette méthode de prélèvement peut donner des résultats erronés.

3. EXTRACTION DES ECHANTILLONS

L'extraction à froid par l'acétone ou par un autre solvant organique est fréquemment employée, bien qu'elle entraîne en général une perte appréciable d'insecticide. On place l'échantillon sur un papier filtre dans un entonnoir et on le lave avec des quantités successives d'acétone; puis on concentre l'extrait obtenu ou bien on le fait évaporer jusqu'à siccité et on le redissout.

Si l'on fait l'extraction dans un appareil Soxhlet, on obtiendra des résultats plus sûrs et on économisera du solvant. L'échantillon d'un maniement plus facile obtenu par la méthode de Barlow peut également être extrait à froid en le couvrant de solvant dans une capsule plate.

Jusqu'ici les opérations ne diffèrent pas de celles qui précéderaient une analyse chimique. Comme on l'a déjà dit, dans le cas du DDT et de l'HCH à faible teneur en isomère gamma, le dosage chimique est relativement simple et constitue probablement la meilleure méthode. En revanche dans le cas des dosages colorimétriques, comme par exemple la méthode d'Alessandrini, une complication peut se présenter. Il n'est pas rare, en effet, que les parois soient couvertes d'un dépôt de suie et de goudron de bois, et les extraits qu'on obtient sont souvent si foncés qu'il n'est pas possible d'apprécier la coloration développée. Dans le cas du dosage de la dieldrine utilisant la réduction par le sodium, suivie du dosage du chlore par la méthode de Volhard, la teinte de virage du titrage final est souvent identique à celle de la substance interférente (Langbridge, communication privée). Si l'on cherche à éliminer cette substance gênante par absorption, on risque d'enlever également une partie de l'insecticide. Dans un essai biologique, ces matières colorantes étrangères peuvent être négligées car elles sont relativement peu toxiques, et entièrement inoffensives à la dilution finale.

Si l'essai biologique doit avoir lieu immédiatement après l'extraction, on peut utiliser l'extrait original, qui est le plus souvent dans l'acétone, pour mettre le produit en contact avec le matériel biologique. Si l'on désire conserver des échantillons pour s'y reporter ultérieurement, on peut évaporer l'acétone et redissoudre le résidu dans un solvant moins volatil, tel que l'alcool éthylique. Lorsque les échantillons doivent être expédiés par la poste, le plus commode est de faire évaporer les solutions d'acétone dans des tubes de 3 x 1 pouce et de redissoudre le résidu à l'arrivée.

4. MATERIEL BIOLOGIQUE

Il va sans dire que les essais biologiques effectués sur des moustiques ou autres insectes adultes donnent les renseignements les plus valables, car ils s'approchent le plus des conditions naturelles. Malheureusement, les techniques sont laborieuses et le transport d'insectes adultes, notamment d'anophèles, est très difficile. Il n'est donc pas possible d'employer souvent des insectes adultes pour évaluer les dépôts d'insecticides sur le terrain.

Pal et Sharma (1952) ont décrit l'utilisation, au laboratoire, de larves d'Aedes aegypti pour doser des insecticides employés au cours d'opérations antipaludiques. Ils ont utilisé des larves parvenues au quatrième stade et ont construit une courbe étalon de la mortalité en fonction de la dose; au moyen de cette courbe, ils ont déterminé la teneur en DDT d'extraits alcooliques de produits de grattage. On a toutefois constaté que les différents lots de larves déjà âgées sont de sensibilité très variable, surtout lorsqu'elles ont été élevées dans des conditions naturelles. Il vaut donc mieux prendre des larves au premier stade car, si les conditions de température etc. sont assez stables, leurs réactions sont remarquablement uniformes, surtout quand elles proviennent de sous-groupes successifs du même lot d'oeufs. Le lot initial se compose évidemment des descendants de très nombreuses femelles de la colonie-mère dont les oeufs ont été pondus au cours d'une journée environ; les variations à l'intérieur du lot suffisent à donner une échelle de sensibilité assez étendue pour assurer la validité du traitement mathématique des résultats des essais biologiques. L'autre grand avantage que présente ce matériel est qu'on peut l'envoyer par la poste et le stocker pendant de longues périodes. Une immersion dans de l'eau chaude provoque l'éclosion complète en environ 30 minutes des oeufs d'Aedes stockés, qui constituent donc une source très commode de matériel biologique.

5. PREPARATION DU PRODUIT TOXIQUE ET TECHNIQUE D'EXPOSITION

Sur des larves nouvellement écloses, le produit insecticide doit être essayé sous forme d'une solution aqueuse ou d'une dilution aqueuse préparée à partir d'une solution concentrée dans un solvant organique. Dans le cas du DDT, on obtiendra une suspension colloïdale; l'HCH et la dieldrine sont assez solubles pour que la dilution finale soit une vraie solution aqueuse. Le solvant peut être de l'éthanol ou de l'acétone. Ginsburg (1949) a travaillé avec des solutions aqueuses contenant 1 % d'éthanol; Wharton (1955) a utilisé de l'acétone à une partie pour 250; au cours des travaux rapportés ici, ces proportions de solvant par rapport à l'eau n'ont pas été dépassées.

On prépare donc des dilutions aqueuses à partir des extraits à essayer et, en même temps, on prépare une série de dilutions témoins à partir de quantités connues d'insecticide dissous dans le même solvant.

Il est important que toute la verrerie employée à partir de ce stade soit parfaitement propre, car des quantités minimes de graisse peuvent absorber sélectivement assez de l'insecticide contenu dans une solution aqueuse, pour causer des erreurs considérables.

Dans de petits tubes ou de petits flacons de verre, ayant une capacité de 4 ml environ, on introduit à la pipette des quantités aliquotes - habituellement un ml - des dilutions témoins et des dilutions à essayer. On ajoute à chaque tube un lot d'environ 20 larves qu'on introduit, à la pipette, dans un certain volume d'eau, le même partout. La durée d'exposition doit se rapprocher autant que possible de 24 heures, ce qui donne assez de temps pour établir une nette distinction entre les larves moribondes ou mortes et celles qui survivent et nagent activement. Lorsque les solutions sont plus fortes, la période d'exposition est plus courte et ne permet pas à cette distinction d'apparaître, car toutes les larves deviennent plus ou moins moribondes. S'il s'écoule plus de 24 heures, des morts par inanition commencent à se produire et à fausser le résultat.

Il convient donc de choisir les concentrations finales de façon à obtenir des pourcentages de mortalité convenablement échelonnés. Les concentrations nécessaires dépendent de l'insecticide à essayer et de la sensibilité naturelle de la souche d'Aedes utilisée. Pour les dilutions témoins de DDT, de dieldrine et de lindane, la concentration létale moyenne (DL_{50}) se situe en général entre 3 et 15 parties d'insecticide pour 100 millions de parties d'eau.

6. DETERMINATION DE LA MORTALITE

Après un temps de contact de 20 à 28 heures, on dénombre dans chaque tube les larves vivantes (c'est-à-dire capables de nager normalement) et les larves mortes ou moribondes (c'est-à-dire dont les mouvements sont réduits à des contractions désordonnées). Pour faire le dénombrement, il est préférable de retirer, à la pipette, l'eau et les larves des tubes et de les placer sur une lame de perspex ou de verre enduite de silicone. De cette manière, les larves restent dans une goutte circulaire délimitée où il est facile de les compter. Pour les résultats les plus significatifs, les mortalités doivent se situer entre 80 % (à la concentration la plus forte) et 20 % (à la plus faible) et se répartir assez également de part et d'autre des 50 %. Cette distribution est souhaitable parce que la corrélation entre la dose et la mortalité est plus étroite dans le voisinage de la dose létale moyenne (DL_{50}).

Si nécessaire, des échantillons ayant des teneurs en insecticide très différentes seront traités en lots séparés et les séries témoins seront adaptées à chaque lot. C'est ainsi que l'on a procédé pour les échantillons de DDT qui figurent dans les tableaux du paragraphe 7.

Après avoir obtenu une série de résultats concordants avec les dilutions étalons, on peut établir la ligne de régression de la mortalité par rapport à la dose, soit en portant sur les coordonnées les probits des mortalités et les logarithmes des doses, soit en portant directement sur les coordonnées les pourcentages de mortalité et les doses, en utilisant du papier

quadrillé en log-probits (figure 1). Si on exprime la teneur en insecticide des étalons en mg par unité de surface initialement traitée, la teneur en insecticide des échantillons à doser peut alors être lue à partir de la ligne de régression, suivant les taux de mortalité observés. Il est nécessaire de procéder à un ou plusieurs essais préliminaires, pour vérifier si l'on a bien choisi la gamme de dilutions du témoin et pour choisir les dilutions les plus appropriées pour les étalons et pour les échantillons inconnus. Trois à six essais parallèles sur des séries identiques devraient ensuite suffire pour obtenir les renseignements désirés.

7. DISCUSSION DE LA METHODE ET EXEMPLES D'APPLICATION

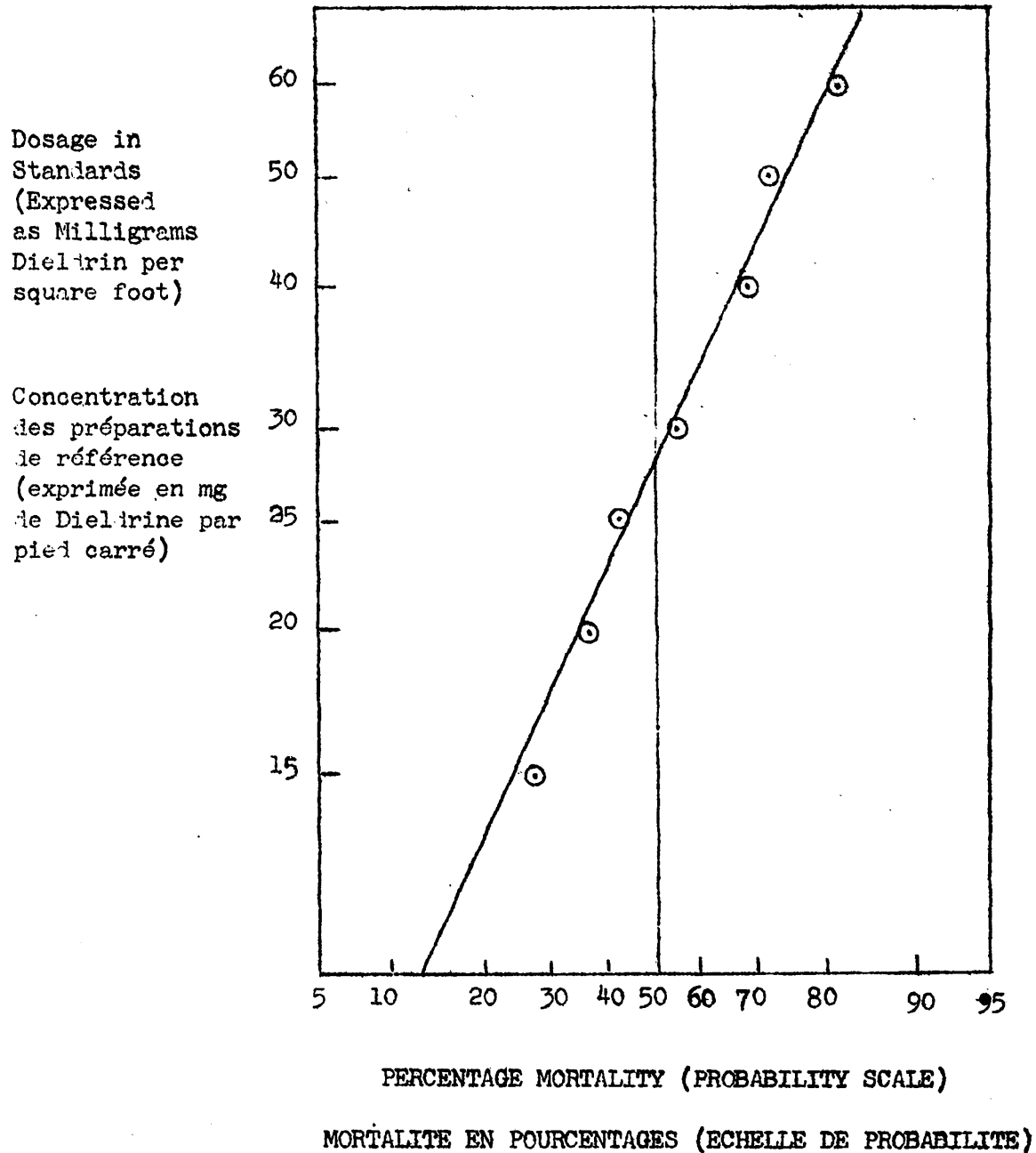
Nous ne prétendons pas que la méthode décrite ici est plus rapide que l'analyse chimique, bien qu'elle permette de traiter simultanément un grand nombre d'extraits et d'obtenir des renseignements assez nombreux en un temps relativement court. En ce qui concerne sa précision, elle est également inférieure aux méthodes chimiques bien établies, mais il est probable qu'elle supporte bien la comparaison avec les méthodes colorimétriques, qui sont moins exactes. Les résultats de l'analyse chimique peuvent être faussés non seulement par les matières colorantes mentionnées au paragraphe 3, mais également par la présence de produits de dégradation non toxiques de l'insecticide. La technique biologique tire son avantage principal du fait que l'activité insecticide de l'extrait constitue le seul critère de la quantité d'insecticide présente. Par conséquent, lorsque l'on ne peut recourir aux méthodes chimiques, l'essai biologique fournit des renseignements suffisants sur le sort des résidus d'insecticide; en tout cas, il permet de contrôler utilement les résultats de l'analyse chimique.

Les tableaux 1 et 2 comparent certains résultats obtenus par l'essai biologique avec ceux qu'a donnés l'analyse chimique. Dans les deux cas, la plus grande partie de l'échantillon a été utilisée pour le dosage chimique, tandis qu'une partie aliquote était réservée pour l'essai biologique. Le tableau 1 porte sur une série d'échantillons de DDT, dosés colorimétriquement, après

FIGURE 1

STANDARD DOSAGE - MORTALITY CURVE FOR
DIELDRIN BIOASSAY REPORTED IN SECTION 7

DOSES DE LA PREPARATION DE REFERENCE : COURBE DE
MORTALITE CORRESPONDANT AUX ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES
AVEC DE LA DIELDRINE ET DECRITS A LA SECTION 7



nitration et traitement au méthylate de sodium. Un dosage colorimétrique, qui est basé sur 40 à 200 microgrammes de DDT, ne requiert qu'une petite partie de l'extrait. Dans ce cas on peut répéter le dosage sur autant de prises d'essai que l'on désire, et la méthode physico-chimique est supérieure à l'essai biologique. Dans le tableau 2, qui concerne des échantillons de dieldrine, on a choisi la méthode turbidimétrique pour déterminer le chlore total précipité par le nitrate d'argent, après réduction par le sodium. Dans ce cas, 95 % de l'extrait original ont été soumis à la réduction, et 5 % réservés pour l'essai biologique. Le dosage turbidimétrique a pu être effectué sur une série de prises identiques, mais ceci n'a pas été possible pour la réduction initiale.

En revanche, la méthode biologique a permis de faire un grand nombre d'essais, tout en n'utilisant que 5 % de l'extrait. La précision qu'on peut obtenir avec ces deux méthodes est probablement la même, mais la méthode biologique a l'avantage d'éviter l'emploi d'appareils coûteux et délicats, comme par exemple un turbidimètre. Bien qu'il n'y ait pas une concordance parfaite entre les deux séries de résultats, on estime cependant que l'approximation est assez bonne, et que l'une ou l'autre série de résultats donnerait une image assez fidèle de la perte en insecticide du dépôt résiduel.

Tableau 1

Echantillons de DDT. Comparaison des résultats
obtenus par la méthode biologique et par la méthode chimique

Echantillon No	Dosage biologique (mg par pied carré)	Dosage chimique (mg par pied carré)
12	280 - 360	378
9	280 - 360	344
8	280 - 360	320
10	200 - 280	266
1	200 - 280	258
11	160 - 200	240
7	160 - 200	198
3	120 - 160	216
6	80 - 120	126
5	80 - 120	104
4	40 - 80	54
2	40 - 80	38

Tableau 2

Echantillons de dieldrine. Comparaison des résultats
obtenus par la méthode biologique et par la méthode chimique

Age du dépôt (en jours)	Dépôt théorique de 50 mg par pied carré		Dépôt théorique de 25 mg par pied carré	
	Essai biologique	Essai chimique	Essai biologique	Essai chimique
0	42	50,1	33	33,9
4	26	24,2	27	15,8
11	14	16,2	17	15,6
26	9	11,0	11	10,7
76	9	9,6	3	2,8
120	7	5,2	8	4,0

La figure 1 représente la ligne de régression du pourcentage de la mortalité par rapport à la dose pour les dilutions témoins préparées pour la série d'échantillons de dieldrine du tableau 2. Les pourcentages de mortalité et les doses ont été portés sur du papier à log-probits et on a tracé la droite autour de laquelle se groupent le plus étroitement les différents points. A l'aide de cette droite, on a lu directement sur le graphique les doses présentes dans les échantillons inconnus.

8. RESUME

1. Pour évaluer la perte en principe actif des insecticides employés dans les pulvérisations à action rémanente, les méthodes chimiques et physico-chimiques sont satisfaisantes dans le cas des préparations de DDT et des préparations d'HCH à faible teneur en isomère gamma, mais peuvent se heurter à certaines difficultés, en raison des faibles quantités de matériel récupérable, dans le cas des préparations de dieldrine et de lindane. En outre, il faut disposer d'un laboratoire bien équipé, car ces méthodes comportent l'emploi d'un néphélomètre ou d'un spectroscope. Pour des travaux sur le terrain, on propose donc de recourir à l'essai biologique qui peut donner des résultats satisfaisants avec un appareillage simple.

2. Description de plusieurs méthodes permettant de prélever des échantillons sur les parois. Extraction de ces échantillons et leur traitement ultérieur.

3. Description de plusieurs types de matériel biologique; avantages que présente l'emploi de larves d'Aedes aegypti au premier stade, nouvellement écloses.

4. Méthodes pour mettre les larves en contact avec le produit insecticide. Description d'une semi-microméthode.

5. Avantages et inconvénients de la méthode décrite et de la méthode chimique; comparaison des résultats obtenus par les deux procédés dans l'essai de deux séries d'échantillons, l'une contenant du DDT, l'autre de la dieldrine.

On estime que les résultats sont suffisamment concordants et que l'une ou l'autre méthode donnerait des renseignements satisfaisants sur le comportement des dépôts d'insecticide.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. ALESSANDRINI, M.E. (1950) "Residual DDT content", Bull. Org. mond. Santé, 2, 629-636
2. BARLOW, F. (1953) "A method for removing insecticide residues of wettable powders from sprayed surfaces", WHO/Insecticides/22
3. BRUCE-CHWATT, L.J., ARCHIBALD, H.M., ELLIOTT, R., FITZ-JOHN, R.A. & BALOGUN, I.A. (1955) "An experimental malaria control scheme in Ilaro, a holoendemic area of Southern Nigeria", Information Bulletin No 3, Malaria Service, Department of Medical Services, Federation of Nigeria
4. GINSBURG, J.M. (1949) "Toxicological tests with two new insecticides on mosquitos and fish", New Jersey Mosquito Extermination Association, mars 1949, 88-91
5. WHARTON, R.H. (1955) "The susceptibility of various species of mosquito to DDT, Dieldrin and BHC", Bull. Ent. Res. 46, 301-309