

Étude de l'efficacité thérapeutique de la combinaison Ivermectine

II.1. Présentation de la zone d'étude

II.1.1. Site d'étude

L'étude a été réalisée du 16 Juillet au 19 Août 2018 au sein des populations de Dielmo (13°43'N- 16°24'W) et Ndiop (13° 41'N-16° 22'W) (Figure 4) et de cinq autres villages environnants tels que Sabouya (13°43'N-16°25'W), Touba-Nding (13°43'N-16°25'W), Néma-Nding (13°42'N-16°25'W), Médina Santhie (13°42'N-16°24'W), Passy Ndenderling (13°42'N-16°22'W) dans le Sine Saloum, au Sénégal. Ces sept villages ont été répartis en cinq sites d'intervention présentés comme suit :

- ✓ Site de Dielmo, Sabouya, Touba-Nding,
- ✓ Site de Néma-Nding
- ✓ Site de Médina Santhie,
- ✓ Site de Passy Ndenderling,
- ✓ Site de Ndiop

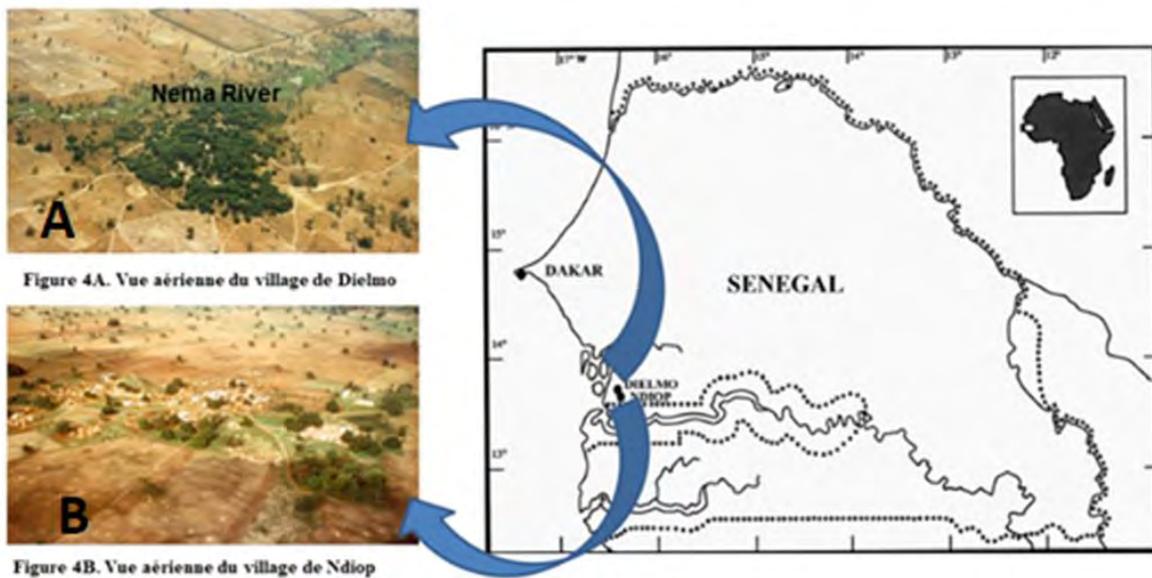


Figure 4 : Carte de localisation des villages de Dielmo (A) et Ndiop (B) au Sine Saloum, Sénégal (C. Rogier)

II.1.2. Population d'étude

Les participantes de l'étude étaient constituées d'enfants, adolescents et adultes de sexe féminin infestés de poux de tête ou de lentes, éligibles pour satisfaire aux critères d'inclusion et de non inclusion. La population totale des sites d'étude était de 3663 personnes dont 2066 femmes, soit 877 habitants dont 539 femmes dans le site de Dielmo, Touba Nding et Sabouya, 1173 dont

585 femmes à Néma Nding composés majoritairement de Sérères. Le site de Médina Santhie essentiellement peulh a une population totale de 413 habitants dont 206 femmes alors que celui de Passy Ndenderling où les Ouolofs prédominent a 690 habitants dont 349 femmes. Enfin le site de Ndiop cohabité par des Ouolofs et Sérères a une population totale de 510 habitants dont 387 femmes. Parmi les 2066 femmes, 315 ont été enrôlées et traitées.

II.2. Matériel

Matériel de terrain

Il est constitué de pots de recueil de selles, de tests de grossesse, de balances pour la pesée, de thermomètres axillaires, de peignes à cheveux grand et petit modèle, de peignes à cheveux fins, de brosses à cheveux, de draps blancs coussinets pour recouvrir le lit de couchage, de bonnets de tête pour les participantes, de gants latex, de ciseaux pour couper les cheveux, de tubes eppendorfs pour la collecte de cheveux, de stylos et feutres indélébiles, et un véhicule pour les urgences et déplacements quotidiens. Des bassines, des pots de 1 litre, des serviettes en coton ont été prévus pour le traitement des cas inéligibles infestés de poux.

II.2.2. Médicaments de l'étude

Les médicaments utilisés étaient constitués de l'Ivermectine 3mg et l'Azithromycine 250/500mg pour traiter les participants éligibles. Par contre, l'Azithromycine en suspension buvable 10mg, la lotion Pouxit anti-poux ont été aussi utilisés pour traiter toute personne inéligible infestée afin d'éviter le risque de contamination possible avec une participante au sein d'une famille.

II.2.3. Matériel de laboratoire

Matériel pour l'analyse microscopique

Ce matériel était constitué d'échantillons de selles, tubes à hémolyses, de l'eau physiologique, du lugol, d'ensemenceurs, des lames et lamelles et d'un microscope photonique BH2 olympus.

II.2.3.2. Matériel pour l'analyse de biologie moléculaire

Il s'agit des réactifs, appareils et petit matériel listés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste de matériel utilisé pour les analyses de biologie moléculaire

Matériel utilisé en biologie moléculaire	
<ul style="list-style-type: none">• FFX96• Hotte à flux lumineaire• Centrifugeuse• Réfrigérateur• Bain marie• Pipette 10µl• Pipette 50µl• Pipette 200µl• Pipette 1000µl• Vortex• Portoirs	<ul style="list-style-type: none">• Eppendorf de 1,5ml• Embouts de 10µl• Embouts de 200µl• Embouts de 1000µl• Microtubes PCR en barrettes (8 puits) de 0,2 ml• Barrettes de 8 capuchons plats• Gants médicaux• Blouses• Poubelles spécifiques• kit QIAGEN®,

II.3. Méthodes

II.3.1. Critères d'éligibilité et d'inéligibilité des participants

Toute personne infestée de poux de tête ou de lentes qui a un poids corporel égal ou supérieur à 15 kg et a donné librement son consentement est incluse dans l'étude. Les personnes infestées de moins de 15 kg, les non résidants dans les villages ciblés, les femmes enceintes ou allaitantes et celles présentant une suspicion de grossesse confirmée par un test sont systématiquement non incluses, mais traitées, par contre, avec une lotion Pouxit anti-poux.

II.3.2. Traitements des infestations de poux de tête des participantes

Les participantes incluses dans l'étude ont été admises à jeun pour la prise de la dose IVER + AZITH et mises en observation pendant 1 heure après administration des médicaments avant de leur offrir gratuitement le petit déjeuner. Tous les traitements ont été donnés dans chaque site par le médecin de l'équipe et un infirmier assistant et le dosage a été réalisé en fonction du poids corporel de chaque participante (Tableau 2). Un port de bonnet a été systématiquement appliqué à chaque participante après administration de la dose thérapeutique pour la collecte des poux morts (Annexe 1). Le nombre de comprimés administrés les jours de traitement à J1/J7 et la survenue de

tout événement indésirable ont été enregistrés dans un cahier de rapport de cas (CRF) ou fiches enquêtes. Chaque participant qui a développé un événement indésirable après le traitement des médicaments a été visité et prise en charge sur le plan médical par le médecin de l'équipe. Le Tableau 2 indique la posologie de l'Ivermectine, -333 μ g/kg- appliquée à toute participante dont le poids corporel est supérieur ou égal à 15 kg, à associer avec 1 ou 2 comprimés de 250mg d'Azithromycine ou 1 de 500mg en une seule prise, renouvelée à J7 en cas de persistance de poux ou de lentes.

Tableau 2 : Posologie de l'Ivermectine à la dose de 333 μ g/kg associée à 1 ou 2 comprimés de 250mg d'Azithromycine ou 1 de 500mg

Poids corporel (kg)	Doses à administrer au jour J1/J7 en fonction du poids corporel
15-24	1cp Ivermectine + 1 dose Azythromycine 250mg
25-39	2cp Ivermectine + 2 doses Azythromycine 250mg (ou 1 de 500mg)
40-54	3cp Ivermectine + 2 doses Azythromycine 250mg (ou 1 de 500mg)
54-69	4cp Ivermectine + 2 doses Azythromycine 250mg (ou 1 de 500mg)
70-84	5cp Ivermectine + 2 doses Azythromycine 250mg (ou 1 de 500mg)
\geq 84	6cp Ivermectine + 2 doses Azythromycine 250mg (ou 1 de 500mg)

Collecte de poux de tête chez les participantes

Les cheveux de chaque volontaire ont été vérifiés de façon visuelle et les sujets susceptibles d'être infestés par des poux ou des lentes ont été examinés plus minutieusement. Chaque participante volontaire fait pencher sa tête vers l'avant sur un drap. Un peigne ou une brosse appropriée a été utilisée pour défriser ou écarter les cheveux emmêlés afin de détecter les poux ou lentes. Les poux et lentes qui tombent sur le drap blanc ont été recueillis à l'aide d'une pince souple et transférés dans des tubes eppendorfs portant le code du participant (Annexe 1). Tous les poux morts retrouvés à J2, J3, J5, J7, J8, J15 ont été collectés de même que les poux vivants à J28.

II.3.4. Prélèvement de selles chez les participantes à J1, J7 et J15

Des prélèvements de selles ont été effectués à J1, J7 et J15 chez tout participant pour rechercher la charge intestinale de parasites avant et après administration de la dose. Si l'infestation de poux ou lentes persiste à J7, des prélèvements de selles ont été à nouveau effectués chez des participantes avant l'administration de la deuxième dose.

II.3.5. Examen des prélèvements de selles au laboratoire

Les prélèvements de selles collectés ont été examinés au microscope photonique en procédant par deux étapes. La première étape consiste à faire un examen macroscopique au cours duquel l'aspect des selles (molle, dure, diarrhéique), la présence ou l'absence de parasites visibles à l'œil nu, de mucus, sang ont été notés. La seconde étape est un examen microscopique qui permet de mettre en évidence dans les selles des formes végétatives, des kystes de protozoaires ou œufs ou des larves d'helminthes. Une ose de selle est placée dans un tube à hémolyse avec un enseigneur en ajoutant 3 gouttes d'eau physiologique, puis 2 gouttes de lugol avant d'agiter le tube vigoureusement pour homogénéiser le mélange. Le surnageant est prélevé et étalé sur une lame recouverte d'une lamelle. La préparation doit être examinée aux grossissements 10, puis 40 pour une confirmation (Annexe 2).

II.3.6. Méthode moléculaire d'identification des parasites intestinaux

Une PCR en temps réel a été utilisée pour analyser tous les échantillons des selles.

II.3.6.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un Kit spécial QIAamp (kit QIAGEN®, Hilden, Germany). Des aliquotes suspects de 200 mg de selles ont été placés dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL contenant une pointe de spatule de poudre fine de verre et 250µl de PBS filtré. Les tubes eppendorf de 1,5mL ont été vortexés vigoureusement pendant 1,5 mn, puis chauffés à 100°C pendant 10 minutes. Le culot final a été mis en suspension dans 250µL de tampon de lyse tissulaire (TL buffer) et incubé avec 25µL de protéinase K pendant toute la nuit à 55°C. Le lendemain les échantillons sont vortexés puis centrifugés pendant 3 mn à 10000 tours/mn. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 1,5mL, en ajoutant 220µL de tampon (BL buffer) puis d'incuber à 70°C pendant 10 minutes. Un volume de 220µl d'éthanol a été ajouté avant de vortexer, puis transférer l'échantillon dans une colonne Nucleospin et centrifuger 1 mn à vitesse maximale (13000 tours/mn). Laver successivement avec 500µl de HBC buffer et 700µl de DNA wash buffer avant de déposer 100µl de tampon élution Buffer préchauffé à 70°C, laisser incubé 5 mn à température ambiante puis centrifuger 1 minute à vitesse maximale (13000 tours/mn). L'ADN ainsi extrait a été conservé à +4°C (Annexe 3).

II.3.6.2. Sélection des amorces

Nous avons utilisé des amorces spécifiques de 13 parasites fréquents chez l'Homme pour faire de la PCR simple (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des séquences d'amorces et de sondes utilisées pour détecter les parasites intestinaux par la qPCR

Parasites ciblés	Noms Amorces / Sondes	Séquences Amorces / Sondes
Protozoaires <i>Entamoeba histolytica</i>	Ehf	5'-AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAAA-3'
	Ehr	5'-CTTAGAATGTCAATTTCTCAATTCAT-3'
	Ehp	5'-FAM-ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATTCA-TAMRA-3'
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Giardia</i> -80F	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'
	<i>Giardia</i> -127R	5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3'
	<i>Giardia</i> -105T	5'-FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-TAMRA-3'
<i>Blastocystis</i> spp.	Blasto FWD	5'-CCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCA-3'
	F5 Blasto R	5'-FAM-TCGTGTAATCTTACCATTTAGAGGA-MGBNFQ-3'
	Sonde	5'-GGTCCGGTGAACACTTTGGATTT-3'
<i>Cryptosporidium parvum</i> ; <i>C. hominis</i>	1 PSF	5'-AACTTTAGCTCCAGTTGAGAAAGTACTC-3'
	1PSR	5'-CATGGCTCTTTACCGTTAAAGAATTCC-3'
	crypto	5'-FAM-AATACGTGTAGAACCACCAACCAATACAACATC-TA-
		3'
<i>Cystoisospora belli</i>	Ib-40F	5'-ATATTCCCTGCAGCATGTCTGTTT-3'
	Ib-129R	5'-CCACACGCGTATTCCAGAGA-3'
	Ib-81Taq	5'-FAM-CAAGTTCTGCTCACGCGTTCTGG-TAMRA-3'
Helminthes (métazoaires) <i>Ancylostoma duodenale</i>	Ad125F	5'-GAATGACAGCAAACCTCGTTGTTG-3'
	Ad195R	5'-ATACTAGCCACTGCCGAAACGT-3'
	Ad155-XS	5'-FAM-ATCGTTTACCGACTTTAG-MGB-3'
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Alum96F	5'-GTAATAGCAGTCGGCGGTTTCTT-3'
	Alum183R	5'-GCCCAACATGCCACCTATTC-3'
	Alum124T	5'-FAM-TTGCGGACAATTGCATGCGAT-TAMRA-3'
<i>Hymenolepis diminuta</i>	HymF	5'-GTTGTATCAGGGAGTGGTG-3'
	HymR	5'-AATTCACATCTCGTGCCTTG-3'
	HymP	5'-FAM-TGCTGCAGTTCACTAACCGTGGC-TAMRA-3'
<i>Schistosoma mansoni</i>	SRA1	5'-CCACGCTCTCGAAATAATCT-3'
	SRS2	5'-CAACCGTTCTATGAAAATCGTTGT-3'
	SRP	5'-FAM-TCCGAAACCACTGGACGGATTTTTATGAT-TAMRA-3'

<i>Strongyloides stercoralis</i>	Stro-1530F	5'-GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3'
	Stro-1630R	5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3'
	Stro-1586T	5'-FAM-ACACACCCGGCCGTCGCTGC-TAMRA-3'
<i>Taenia saginata</i>	Tsag_F529	5'-GCGTCGTCTTTGCGTTACAC-3'
	Tsag_R607	5'-TGACACAACCGCGCTCTG-3'
	Tsag_581Tq	5'-FAM-CCACAGCACCAGCGACAGCAGCAA-TAMRA-3'
<i>Trichuris trichiura</i>	TrichF	5'-TTGAAACGACTTGCTCATCAACTT-3'
	TrichR	5'-CTGATTCTCCGTTAACCGTTGTC-3'
	TrichP	5'-FAM-CGATGGTACGCTACGTGCTTACCATGG-TAMRA-3'
<i>Enterobius vermicularis</i>	EnterF	5'-TTTCCAAGCCACAGACTCAC-3'
	EnterR	5'-ATTGCTCGTTTGCCGATTAT-3'
	EnterP	5'-FAM-TCATGTCTGAGCCGGAACGAGA-TAMRA-3'

II.3.6.3. Préparation du mix

Le mix à préparer pour la réaction PCR est constitué de 3,5µl d'eau pure, 0,5µl de chaque amorce Forward (F)/Reverse (R), 0,5µl de la sonde TaqManTM, 10µl de Mix Roche (Taq Polymérase, dNTPs et MgCl₂) et de 5µl de l'ADN à tester soit 20µl au total (Annexe 3).

II.3.6.4. Distribution de l'ADN

La plaque PCR est constituée de puits portant chacun un code correspondant au code de l'ADN du spécimen à analyser. La taille de la plaque est fonction du nombre de spécimens à tester en prenant en compte le témoin négatif et positif. Chaque puits de la plaque doit contenir 15µl de mix initialement préparé, puis 5µl d'ADN de chaque spécimen à étudier seront introduits au niveau de chaque puits. En l'absence d'ADN témoin négatif, 5µl d'eau ultra pure ont été mis dans le puits témoin négatif puis 5µl d'ADN d'un témoin positif dans le puits témoin positif pour garantir la fiabilité de l'analyse (Annexe 3).

II.3.6.5. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

L'amplification par PCR a été réalisée avec un volume réactionnel de 20µl. Des extraits d'ADN de témoin positif des parasites ciblés ont été mis à notre disposition par le laboratoire de parasitologie et mycologie de la faculté de Médecine de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et le dispensaire Espérance des sœurs religieuses de Pikine. L'amplification a été effectuée par le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad) qui permet la révélation des produits amplifiés. Au cours de

l'amplification, la sonde dont l'extrémité est marquée "reporter" (émetteur) FAM-5' et l'autre marquée "quencheur" (suppresseur) TAMRA-3' émet une fluorescence après chaque cycle. En fonction des amorces / sondes de chaque parasite ciblé (Tableau 3), le logiciel CFX manager TM permet de mesurer l'inflorescence de la sonde dont le seuil correspondant au nombre de cycles thresholds (ct) nécessaire pour obtenir une quantité d'amplicons suffisamment visualisables sous forme de courbe. Le critère de positivité d'une PCR quantitative est défini par une valeur seuil pour un échantillon testé qui doit être inférieure à 35 ct. Un échantillon testé est considéré positif lorsque la qPCR ciblant les amorces F/R-sonde spécifiques à un parasite présente un seuil de cycles thresholds inférieur à 35.

II.4. Analyses statistiques

Le logiciel Excel version 2010 a permis de réaliser la saisie et l'analyse descriptive des données. A partir de la distribution de Wilson, un intervalle de confiance (CI) à 95% a été calculé en évaluant l'efficacité thérapeutique à J7, J15 et J28. La sensibilité entre l'examen des selles par la microscopie et la qPCR pour rechercher les parasites intestinaux, ainsi que la variation des proportions de portage des parasites intestinaux par classe d'âge ont été évaluées. Le test de significativité a été réalisé en utilisant le logiciel Stata version 11 à la date du 07/06/2019. Pour comparer les variables, le test du Chi2 Pearson a été appliqué. La différence entre deux valeurs est significative, lorsque la limite de significativité "p" est inférieure à 5% ($p < 0,05$).