UNIVERSITE DE PARIS SUD
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD
Ecole Doctorale 420 Santé Publique, Paris Sud - Paris Descartes

ANNEE 2012 **N°|__|__|__|__|__|__|__|__|**

THESE

Pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

Discipline : Santé Publique - Epidémiologie

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2012

Par

Mathurin Cyrille TEJIOKEM

Prise en charge précoce de l'infection VIH chez les nourrissons dans un pays d'Afrique Subsaharienne à moyenne prévalence du VIH

Thèse dirigée par :

Madame le Professeur Laurence MEYER

Madame le Docteur Josiane WARSZAWSKI

JURY

Monsieur le Professeur Arnaud FONTANET	**Président**
Monsieur le Docteur Michel COT	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur Nicolas NAGOT	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur Christian LAURENT	**Examinateur**
Madame le Professeur Laurence MEYER	**Directrice de thèse**
Madame le Docteur Josiane WARSZAWSKI	**Co-Directrice de thèse**
Madame le Professeur Françoise BARRE-SINOUSSI	**Membre invité**

Lieu de préparation de cette thèse :

INSERM CESP U1018
Equipe 4 : VIH et IST
82, rue du Général Leclerc
94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex - France
Tél : +(33) 1 49 59 53 22
Fax: +(33) 1 45 21 22 86

Centre Pasteur du Cameroun
Service d'Epidémiologie et de Santé Publique
B.P : 1274 Yaoundé, rue Henri Dunant
Tél : +(237) 22 23 10 15
Fax : +(237) 22 23 15 64

« L'excellence en Biologie accessible à tous »

Le financement de cette thèse a été assuré par :

Financement de l'étude ANRS-PEDIACAM, source de données pour cette thèse.

Financement de l'étude ACIP-EPIPEV, source de données pour cette thèse.

EMPLOYEURS

« L'excellence en Biologie accessible à tous »

Soutien de la Fondation Total pour mes déplacements et séjours en France (nombre : 2 ; durée moyenne : 1 mois)

Bourse du Gouvernement français. Prise en charge de mes déplacements et séjours en France (nombre : 4 ; durée moyenne : 1 mois), frais universitaires et sécurité sociale

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes encadreurs :

Madame le Professeur Laurence MEYER

Vous avez accepté très spontanément d'encadrer ce travail et de m'accueillir dans votre unité. Pendant ces quatre années, vos conseils, vos remarques et vos encouragements m'ont permis d'acquérir une grande autonomie dans le travail. Merci de m'avoir permis de profiter de votre expérience et de vos connaissances.

Madame le Docteur Josiane WARSZAWSKI

Pour avoir accepté de co-encadrer ce travail. Votre ardeur au travail m'a impressionné et modifié mon rythme de travail. Votre rigueur, votre implication dans ce travail et votre soutien amical ont été d'un grand apport dans sa réalisation. J'espère très vivement que nous allons poursuivre cette collaboration.

Je voudrais également remercier ***Monsieur le Professeur Albert FAYE****, qui coordonne avec moi l'étude ANRS-Pediacam. Bien que n'étant pas listé comme encadreur, Albert a énormément influencé la conduite de ce travail de thèse. Son expertise clinique, ses commentaires et son sens du travail bien fait ont facilité la mise en place de notre programme de recherche et sa valorisation.*

Je remercie très sincèrement les membres de mon Jury de thèse

Monsieur le Professeur Arnaud FONTANET

J'ai eu la chance de bénéficier à mes débuts dans cette discipline de vos conseils pendant les enseignements à l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie ou lors de mes passages dans votre unité. Merci d'avoir accepté de prendre part à ce jury et de le présider. Votre expertise dans le domaine de l'épidémiologie des maladies infectieuses va certainement être d'un grand apport dans l'amélioration de ce travail.

Monsieur le Docteur Michel COT

Vous avez accepté très spontanément de rapporter ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect. Votre regard critique sur ce travail nous permettra sans doute de l'améliorer.

Monsieur le Docteur Nicolas NAGOT

Vous avez accepté de rapporter cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude. Vos commentaires et remarques permettront d'alimenter la discussion lors de la soutenance et d'améliorer ce travail.

Monsieur le Docteur Christian LAURENT

Vous avez accepté d'examiner ce travail. Votre présence dans ce jury nous fait très plaisir. Vos remarques vont certainement contribuer à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Madame le Professeur Françoise BARRE-SINOUSSI

Je ne pourrais vous remercier assez. Votre soutien de longue date ainsi que votre appui ont été déterminants dans la mise en place des programmes de recherche sur lesquelles nous avons préparé cette thèse. Votre sens de l'écoute, vos précieux conseils et vos encouragements tout au long de ce parcours ont été très utiles. Trouvez en cette thèse la concrétisation de toutes ces actions et le témoignage de ma profonde reconnaissance. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse. Merci !!!

Mes remerciements vont également :

Aux autorités du Centre Pasteur du Cameroun et de la "Division International" du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP)

Vous nous avez ouvert les portes du monde de la recherche. Vous avez mis à notre disposition, toute la logistique nécessaire pour mener conjointement notre activité professionnelle et la préparation de cette thèse. Recevez toute ma gratitude et trouvez en ce travail, le fruit de votre investissement et un élément de plaidoyer dans l'une de vos principales missions, celle de la formation.

Aux autorités du Service de Coopération et d'action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France à Yaoundé, de l'Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales et de la Fondation TOTAL

Pour le financement de nos travaux et la prise en charge de nos déplacements et séjours en France dans le cadre de cette thèse. Je vous remercie très sincèrement car sans vos financements, rien n'aura été possible.

C'est l'occasion de remercier très sincèrement Madame Annick Mallet du SCAC pour son professionnalisme dans la gestion de nos dossiers.

Aux autorités des formations sanitaires de nos différents sites d'études et à travers eux l'ensemble du personnel du Centre Hospitalier d'Essos, du Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, du Centre d'Animation et d'Action Sanitaire et Social, de l'Hôpital Central, du Centre Pasteur du Cameroun à Yaoundé, de l'Hôpital Laquintinie à Douala, de l'Hôpital Pédiatrique et de l'Institut Pasteur à Bangui.

Pour cette collaboration exemplaire. Votre implication dans la mise en place et votre sérieux dans la conduite de ce travail ont été déterminants dans la réalisation de ce travail. Je vous en suis très reconnaissant.

A tous les parents ainsi qu'à leurs enfants

Pour avoir accepté de nous faire confiance en participant à ces activités de recherche.

Aux autorités en charge de la santé publique, aux institutions réglementaires et associations

Pour avoir facilité la mise place de ces études. Nous espérons que les résultats de ces travaux aideront à améliorer les pratiques dans le cadre du Programme Elargi de Vaccination et de l'accès des enfants infectés par le VIH aux ARV.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

Madame le Docteur Laurence Baril

Très tôt dans ma découverte du monde de la recherche, je t'ai croisé et tout au long de cette dizaine d'années, nous avons travaillé ensemble. Ton soutien multiforme, tes réflexions, les échanges très productifs et ton amitié ont fait de toi une référence pour moi. A travers ce travail, trouve une certaine reconnaissance de ma part. J'espère que nous allons poursuivre cette collaboration.

A Monsieur le Docteur Pascal Boisier

J'ai trouvé en toi un vrai soutien pendant les trois années de ta mission en tant que Chef du Service d'Epidémiologie du Centre Pasteur du Cameroun. C'est vraiment avec plaisir que je continue à profiter de tes précieux conseils. Tes relectures attentives ont contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Merci du fond du cœur

Cette thèse regroupe les résultats des travaux conduits entre 2004 et 2011. C'est le résultat de la collaboration entre plusieurs personnes. Je tiens à les remercier tous ici pour leur implication dans la l'accomplissement de ce travail. Je pense en particulier à Ida Penda, Francis Ateba, Suzie Tetang, Gisèle Chewa, Félicité Owona, Nicaise Makwet, Claire Reckacewicz, Dominique Rousset, Régis Pouillot, Gilbert Téné, Frédéric Tangy, Daniel Scott, Rémy Despesse. Je voudrais également rendre un hommage à la mémoire du Dr Chantal SAME EKOBO et celle du Pr Félix TIETCHE pour ce qu'ils ont fait en leur temps pour la bonne marche de nos projets.

Je remercie tous mes amis et collègues pour leurs encouragements et suggestions : Joseph Kamgno, Patrice Tchendjou, Ahidjo Ayouba, Anfumbom Kfutwah, Maurice Demanou, Blaise Nguendo, Antoinette Ngandjio, Sara Eyangoh, Richard Njouom, Marie Claire Endegue, Gaëtan Texier, Jean Claude Tchuindibi, Falucar Njuieyon, Guy Bikoum.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'Equipe 4 (IST et VIH) et particulièrement le personnel de l'unité EPF pour leur accueil, la bonne humeur et l'appui technique qu'ils m'ont toujours réservé lors de mes différents séjours : Jérôme Lechenadec avec les différentes soirées "déguisées" ou non qu'il m'a fait découvrir, Faroudi Boufassa, Paulo Teglas, Marlène, Nelly, Carine, Thierry, Parfait, Stéphane, Jacques, Naïma etc.

A ceux qui de loin ou de près se sont toujours souciés ou préoccupés de l'état d'avancement de cette thèse et dont je ne peux tous citer ici. Merci !!!

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille, particulièrement :
Mon épouse Valérie, mes enfants Alan, Loïc, Mathis et Grace qui ont traversé des moments difficiles pendant mon absence. Merci pour votre patience ! Que ce travail vous apporte un peu de réconfort. Votre amour, votre affection et votre présence dans ma vie ont été déterminants dans la préparation de ce document.
Ma mère Angèle Tsago et mon père Gaston Kemmo, mes oncles Joseph et Christophe, mes frères et cousins, mes amis du CARBY qui ont toujours été là, à m'encourager pour ce travail.

Résumé en français

Les recommandations de l'OMS sur la prise en charge des enfants nés de mères infectées par le VIH évoluent en fonction des nouvelles données scientifiques souvent issues d'essais thérapeutiques. Leur application en routine, surtout dans les pays à ressources limitées, devrait prendre en compte les contraintes opérationnelles locales pour guider les pratiques. Ce travail de thèse a été développé dans cette optique, avec pour objectif d'évaluer l'ensemble du processus de prise en charge de ces enfants avant l'âge de sept mois, depuis le dépistage précoce de l'infection VIH jusqu'à la mise en œuvre du traitement antirétroviral (ARV) systématiquement proposé dès le diagnostic de l'infection VIH, et leurs réponses aux vaccins administrés dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV).

Ce travail est issu de l'analyse des données collectées dans deux enquêtes : la cohorte ANRS-PEDIACAM initiée en 2007 et toujours en cours, menée dans trois hôpitaux urbains du Cameroun, et l'enquête transversale ACIP-EPIPEV, menée de novembre 2004 à Mai 2005 dans cinq hôpitaux du Cameroun et de la République Centrafricaine.

Nos résultats ont montré que le diagnostic précoce du VIH et l'initiation des ARV chez les nourrissons étaient faisables et largement acceptés en routine dans les services de pédiatrie urbains. Parmi les nourrissons nés de mères séropositives inclus dans PEDIACAM, 89,7% ont été ramenés pour le test VIH à un âge médian de 1,5 mois (IQ : 1,4-1,6) et 83,9% ont complété le processus de diagnostic en revenant chercher les résultats du test avant l'âge de 7 mois. Les facteurs associés au processus incomplet reflétaient plus la qualité des soins prénataux et l'urgence du contexte obstétrical que les conditions environnementales. Parmi les nourrissons infectés par le VIH, 83,5% ont initié les ARV avant l'âge de 7 mois. Mais le processus d'initiation précoce des ARV a été considéré comme suboptimal chez environ un tiers d'entre eux. Les facteurs associés à ce retard étaient liés au système de soins, à la gestion des prélèvements et des résultats du test VIH. Enfin, dans l'étude EPIPEV, nous avons observé des proportions plus faibles de réponses vaccinales adéquates chez les enfants infectés que non infectés par le VIH, nés de mères séropositives. Cette différence était plus marquée pour le vaccin contre la rougeole (20% vs 60%). Le niveau de réponse observé chez les enfants non infectés nés de mères séropositives était néanmoins faible par rapport à celui attendu chez les enfants en population générale. Ce dernier résultat suggérerait que l'exposition au VIH pendant la grossesse pourrait entrainer un dysfonctionnement immunologique, même en l'absence de transmission du VIH à l'enfant.

L'ensemble de ces travaux nous ont permis de cibler certains aspects pour améliorer le processus de prise en charge précoce des nourrissons exposés au VIH, portant sur l'organisation des sites, l'application effective des recommandations établies et la mise en place d'une coordination active.

Mots clés : diagnostic précoce VIH, traitement antirétroviral précoce, faisabilité, enfants, vaccination du PEV, réponse vaccinale, Cameroun.

Résumé en anglais

Early follow-up of infants living in a sub-Saharan African country with intermediate prevalence of HIV

Updates on the World Health Organization's (WHO) recommendations for the follow-up of HIV-infected children are based on new data obtained mostly from clinical trials. Their implementation in routine practice, especially in resource-limited countries, should consider local operational constraints in order to draw up guidelines for good clinical practice. We designed this study with the objective of evaluating the early follow-up process of HIV-exposed infants less than 7 months old. This early follow-up process starts from the early diagnosis of HIV to the initiation of antiretroviral therapy (ART) to HIV infected infants thereafter, and to the immune responses to vaccines administered in the context of the Expanded Program on Immunization (EPI).

Our data were collected from two surveys: the current ANRS-PEDIACAM cohort which started in 2007, in three urban hospitals located in Cameroon, and the ACIP-EPIPEV cross sectional study conducted from November 2004 to May 2005, in five urban hospitals based in Cameroon and the Central African Republic.

Our results strongly suggested that both early HIV diagnosis and initiation of ART in infants were feasible and well accepted in "real life" pediatric urban settings. Among HIV-exposed infants enrolled in the PEDIACAM study, 89.7% were tested for HIV at a median age of 1.5 months and 83.9% completed the process by returning for their results before 7 months of age. Incomplete process was associated to factors related to the quality of antenatal care and obstetrical emergency than environmental. Among HIV-infected infants, 83.5% started ART before 7 months of age. However, ART initiation was considered as suboptimal in approximately one third of them. Risk factors associated with this delay were related to the care delivery system, including delays in sample collection and turn around procedures. Finally, the EPIPEV study showed that antibody levels to EPI vaccines in HIV-uninfected children born to HIV-infected mothers were higher compared to levels in HIV-infected children (60% vs 20% concerning measles vaccine), but lower than the levels described for children born to HIV-uninfected mothers. This result suggested an immunological dysfunction that could occur in HIV-exposed children during pregnancy even in the absence of HIV transmission and could affect their survival.

The overall data collected in these studies has enabled us to focus on certain aspects that could help in improving early care and follow-up in HIV-exposed infants. These include the structural and functional organization of health structures, the effective implementation of current recommendations, and the active coordination.

Key words: early infant diagnosis of HIV, early ARV treatment, feasibility, children, EPI vaccines, Immune response to EPI vaccines, Cameroon.

Publications

Publications scientifiques issues de cette thèse

❖ Articles

Tejiokem MC, Josiane Warszawski, Francis Ateba Ndongo, Gisèle Chewa, Nicaise Makwet, Jean Audrey Ndongo, Suzie Tetang, Georgette Guemkam, Félicité Owona, Paul Alain Ngoupo, Patrice Tchendjou, Anfumbom Kfutwah, Ida CalixtePenda, Albert Faye. Feasibility in routine practice of early combined antiretroviral therapy in HIV infected infants in resources limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon. Soumis à **JAIDS**

Tejiokem MC, Faye A, Penda IC, Guemkam G, Ateba Ndongo F, Chewa G, Rekacewicz C, Rousset D, Kfutwah A, Boisier P, Warszawski J; ARNS 12140-PEDIACAM study group. Feasibility of early infant diagnosis of HIV in resource-limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon. **PLoS One**. 2011;6(7):e21840.

Tejiokem MC, Njamkepo E, Gouandjika I, Rousset D, Béniguel L, Bilong C, Tene G, Penda I, Ngongueu C, Gody JC, Guiso N, Baril L. Whole-cell pertussis vaccine induces low antibody levels in human immunodeficiency virus-infected children living in sub-Saharan Africa. **Clin Vaccine Immunol**. 2009 Apr;16(4):479-83.

Tejiokem MC, Gouandjika I, Béniguel L, Zanga MC, Tene G, Gody JC, Njamkepo E, Kfutwah A, Penda I, Bilong C, Rousset D, Pouillot R, Tangy F, Baril L. HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the Expanded Program on Immunization. **PLoS One**. 2007 Dec 5;2(12):e1260.

❖ Communications orales

Tejiokem MC, Josiane Warszawski, Anfumbom Kfutwah, et al. Faisabilité des multithérapies anti-rétrovirales précoces systématiques chez les nourrissons âgés de moins de 7 mois infectés par le VIH dans un pays à ressources limitées: ANRS 12140 - PEDIACAM". **5^{e} Conférence VIH Francophone, Casablanca, Mars 2010**

Tejiokem MC. for the ANRS-PEDIACAM study group. Accès au diagnostic précoce de l'infection VIH et faisabilité des multithérapies antirétrovirales administrées en pratique de routine chez les nourrissons infectés par le VIH âgés de moins de 7 mois au Cameroun. **5^{e} Journées scientifiques du Site ANRS Cameroun, Yaoundé, 15-16 Novembre 2011**

❖ Communications affichées

Tejiokem MC, Josiane Warszawski, Francis Ateba Ndongo, Gisèle Chewa, Nicaise Makwet, Jean Audrey Ndongo, Suzie Tetang Ndiang, Georgette Guemkam, Félicité Owona, Paul Alain Ngoupo, Patrice Tchendjou, Anfumbom Kfutwah, Ida Calixte Penda, Albert Faye and the ANRS-PEDIACAM Study Group. Feasibility in routine practice of early combination antiretroviral therapy in HIV infected infants in Cameroon: the ANRS 12140-PEDIACAM study. MOPE048. 19th AIDS 2012 international Conference, Washington DC, USA, July 2012.

Autres publications scientifiques pendant la période de préparation de cette thèse.

❖ Articles

Félicitée Nguefack, David Chelo, **Tejiokem MC**, Angèle Pondy, Mina Julie Njiki kinkela, Roger Dongmo, Hubert Désiré Mbassi Awa, Jean Taguebue, Georgette Guemkam, Clémence Vougmo Njua, Paul Olivier Koki Ndombo. Fréquence des anémies sévères chez les enfants âgés de 2 mois à 15 ans au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, Yaoundé, Cameroun. **Pan Afr Med J**. 2012;12:46

Kfutwah AK, **Tejiokem MC**, Njouom R. A low proportion of HBeAg among HBsAg-positive pregnant women with known HIV status could suggest low perinatal transmission of HBV in Cameroon. **Virol J**. 2012 Mar 8;9:62.

Vougmo Meguejio Njua C, Nguefack F, Chelo D, **Tejiokem MC**, Kago I, Kobela M.[[Booster doses outside of the Expanded Program on Immunization in two schools in basic education in Yaounde, Cameroon]]. **Pan Afr Med J**. 2011;10:20.

Kfutwah AK, **Tejiokem MC**, Ateba FN, Ndongo JA, Penda IC, Ngoupo PA, Tchendjou P, Chewa G, Boisier P, Rouzioux C, Warszawski J, Faye A; ANRS 12140-Pediacam Study Group. Seronegativation in Early Treated HIV-Infected Infants: Frequency and Potential Implications on Care and Follow-up in a Resource-Limited Country. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2011 Oct 1;58(2):e43-e46

Tchendjou PT, Koki PN, Eboko F, Malateste K, Essounga AN, Amassana D, Mossus T, **Tejiokem MC**, Boisier P, Orne-Gliemann J. Factors Associated With History of HIV Testing Among Pregnant Women and Their Partners in Cameroon: Baseline Data From a Behavioral Intervention Trial (ANRS 12127 Prenahtest). **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2011 Jul;57 Suppl 1:S9-S15.

Félicitée Nguefack, **Tejiokem MC**, Andreas Chiabi et al. Morbidity and Mortality from Measles in Cameroonian Children: Implications for Measles Control. The Open Area Studies Journal, 2011, 4, 7-13 (http://benthamscience.com/open/toarsj/articles/V004/7TOARSJ.pdf).

Tchendjou P, Same-Ekobo C, Nga A, **Tejiokem MC** et al. Effectiveness of multidrug antiretroviral regimens to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in routine public health services in Cameroon. **PLoS One**. 2010 Apr 29;5(4):e10411.

❖ Communications orales

Sofeu Casimir Ledoux, **Tejiokem MC**, Ateba Ndongo Francis et al. Fréquence et facteurs associés au retard de croissance intra-utérin chez les nouveaux nés de mères infectées et non infectées par le VIH au Cameroun. 6e Conférence Francophone sur le VIH/SIDA. 25-28 mars 2012, Genève, Suisse.

Ateba Francis, **Tejiokem MC**, Fomenou Amélie et al. Devenir d´une cohorte de jeunes nourrissons exposés au VIH et suivis au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya à Yaoundé (Cameroun). 16th International Conference on AIDS and STIs in Africa (ICASA 2011) Addis Ababa, Ethiopia 4-8 December 2011

Tejiokem MC, G. Guemkam, C. Same Ekobo et al. Why do HIV negative mothers refuse to participate in a clinical research involving HIV positive mothers in Cameroon?" **5th Dominique Dormont Conference, Paris, March 2009.**

❖ Communications affichées

Tejiokem MC, J. Warszawski, A Kfutwah, et al. The impact of different antiretroviral regimens on mother to child transmission of HIV in routine practice in Cameroon (ANRS 12140-PEDIACAM)". abstract reference number, MOPE271. **18th AIDS 2010 international Conference, Vienna, july 2010**

Tejiokem MC, Guemkam Georgette, Ateba Ndongo Francis et al. Non-disclosure to partner of maternal HIV status: frequency and risk factors from the ANRS-PEDIACAM study in Cameroon. Accepted at the **16th International Conference on AIDS and STIs in Africa (ICASA 2011) Addis Ababa, Ethiopia 4-8 December 2011**

❖ Chapitre d'ouvrage

Tardieu Marc, **Tejiokem MC**, Nguefack Séraphin. Virus-induced lesions and the fœtal brain: examples of the transmission of HIV-1 and CMV from mother to offspring. In Dulac, Lassonde and Sarnat. Pediatric Neurology (Handbook of clinical neurology) Volume 2; Section 13 (Inflammatory and infectious diseases); chapter 113, 5 pages. Elsevier (in press)

❖ Distinction honorifique

2012 : Prix DEDONDER – CLAYTON pour l'année 2011 : décerné par le Réseau International des Instituts Pasteur pour récompenser la qualité des travaux scientifiques de chercheurs en Afrique et en Asie dans le domaine de la recherche sur le VIH et les pathologies associés.

Liste des tableaux

Tableau I-1: Calendrier National Camerounais du PEV 19

Tableau III-1 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : prise en charge de la grossesse, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009 52

Tableau III-2 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : état du nourrisson à la naissance, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009 53

Tableau III-3 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : facteurs sociodémographique et environnemental, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009 54

Tableau III-4 : Régression logistique multivariée (modèle complet N=1285) : Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009) 55

Tableau III-5 : Régression logistique multivariée (modèle final N=1285) : Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009) 56

Tableau IV-1 : Critères de définition d'un processus suboptimal d'initiation des ARV, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun 64

Tableau IV-2: Caractéristiques maternelles, obstétricales et néonatales des 4 groupes de nourrissons inclus en phase II, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun 72

Tableau IV-3 : Caractéristiques des enfants inclus en phase II dans les 4 groupes de nourrissons, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun 73

Tableau IV-4 : Détail du processus d'initiation des ARV chez les 176 enfants infectés inclus en phase II : analyse de sensibilité selon différentes définitions, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun 74

Tableau IV-5 : Age au test VIH et différents délais écoulés entre le test VIH, l'annonce des résultats et l'initiation des ARV selon le site de recrutement des nourrissons infectés par le VIH, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun 75

Tableau IV-6 : Régression logistique bi et multivariée: facteurs associés au processus suboptimal d'initiation des ARV chez les nourrissons infectés par le VIH inclus en phase II, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010 76

Tableau V-1 : Comparaison des caractéristiques sociodémographiques et cliniques des enfants inclus dans l'étude EPIPEV en fonction du statut VIH, 2004-2006, Cameroun et RCA 89

Tableau V-2 : Comparaison des caractéristiques biologiques des enfants inclus dans EPIPEV en fonction du statut VIH, 2004-2006, Cameroun et RCA 90

Tableau V-3 : Proportion d'enfants avec une réponse vaccinale adéquate et moyenne géométrique des titres (MGT) pour les anticorps contre la rougeole, la diphtérie, le tétanos, la

coqueluche et la poliomyélite selon le statut VIH de l'enfant, EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA 91

Tableau V-4 : Analyse bivariée : Réponse inadéquate contre le vaccin rougeole et caractéristiques des enfants inclus dans EPIPEV, 2004-2006.....92

Tableau V-5 : Analyse bivariée : relation entre la réponse inadéquate contre les vaccins contre la coqueluche (AGG), la diphtérie, le tétanos et les caractéristiques des enfants (50 infectés par le VIH et 78 non infectés par le VIH), EPIPEV, 2004-2006.....93

Tableau V-6 : Régression logistique multivariée : facteurs associés à une réponse inadéquate contre les vaccins du PEV, ACIP-EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA.....95

Tableau VIII-1 : Classification clinique en 3 stades de l'infection et de la maladie VIH chez l'enfant 123

Tableau VIII-2 : Classification clinique en 4 stades de l'infection et de la maladie VIH chez le nourrisson et l'enfant 124

Tableau VIII-3 : Critères biologiques (lymphocytes CD4 et totaux) permettant de définir un déficit immunitaire sévère en prélude à la mise sous ARV 125

Tableau VIII-4 : Système de classement en pédiatrie du déficit immunitaire associé au VIH basé sur la numération et le taux de lymphocytes CD4 en fonction de l'âge.....125

Tableau VIII-5: Calendrier vaccinal chez l'enfant: vaccins recommandés mais non pris en charge par le PEV, administrés dans le cadre de l'étude ANRS-PEDIACAM, Cameroun ...125

Liste des figures

Figure I-1 : Evolution de la charge virale VIH au cours du temps après l'infection et ampleur de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au VIH chez les adultes et enfants infectés non traités 6

Figure I-2: Algorithme de prise en charge des nourrissons exposés au VIH âgés de moins de 18 mois.....17

Figure II-1 : inclusion d'enfants dans EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA.....31

Figure II-2 : Diagramme décrivant l'inclusion d'enfants, EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA 35

Figure II-3 : Interactions entre les différentes équipes impliquées dans l'étude ANRS-PEDIACAM 42

Figure II-4 : Inclusion des enfants dans l'étude ANRS-PEDIACAM (2007-2010), Cameroun43

Figure II-5 : Inclusion dans les phases I et II de l'étude ANRS-PEDIACAM, 2007-2011, Cameroun 44

Figure II-6: Statut vital des enfants à l'âge d'un an après inclusion dans la phase II de l'étude ANRS-PEDIACAM, 2007-2012, Cameroun 45

Figure III-1: Processus de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009) 51

Figure IV-1 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis la naissance, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun..69

Figure IV-2 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis la naissance et allaités, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun 70

Figure IV-3 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis le diagnostic avant l'âge de 7 mois, ANRS-PEDIACAM, Cameroun 71

Figure IV-4 : Courbes de survie brute à partir de la naissance et jusqu'à un an selon le mode d'inclusion et le statut VIH de l'enfant et de la mère (Méthode de Kaplan Meier), ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun.....77

Figure VIII-1: Bilans biologiques détaillés des enfants inclus dans la cohorte Pediacam 128

Liste des abréviations

ACIP	Actions Concertées Inter-Pasteuriennes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANRS	Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales
ARN	Acide Ribonucléique
ARV	Antirétroviral
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
DBS	Dried Blood Spot
DTCoq	vaccin Diphtérie-Tétanos-Coqueluche
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PED	Pays en Développement
PEV	Programme Elargi de Vaccination
PTME	Prévention de la Transmission Mère et Enfant
RCA	République Centrafricaine
SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
TME	Transmission Mère et Enfant
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPDV	Vaccine Derived PolioViruses
VPO	Vaccin Polio Oral

Sommaire

Remerciements ..... **iii**
Résumé en français ..... **vii**
Résumé en anglais ..... **viii**
Publications ..... **ix**
Liste des tableaux ..... **xii**
Liste des figures ..... **xiv**
Liste des abréviations ..... **xv**
Chapitre I : Contexte et Objectifs **1**
I.1 Infection VIH pédiatrique 2
I.1.1 Epidémiologie 2
I.1.2 Evolution naturelle de l'infection VIH chez l'enfant 3
I.1.3 Infection VIH et système immunitaire 5
I.1.4 Impact des multithérapies antirétrovirales sur les nourrissons infectés par le VIH et évolution des recommandations de traitement 7
I.2 Prise en charge précoce des nourrissons exposés au VIH : Diagnostic de l'infection et initiation précoce du traitement antirétroviral 9
I.2.1 Diagnostic précoce de l'infection VIH : avantages, inconvénients et recommandations 9
I.2.2 Modalités de diagnostic précoce 10
I.2.2.1 Cinétique de disparition des anticorps maternels contre le VIH chez l'enfant exposé 10
I.2.2.2 Techniques utilisées 11
I.2.2.3 Prélèvements et transports 13
I.2.3 Couverture et difficultés du dépistage précoce 13
I.2.4 Initiation précoce du traitement antirétroviral chez les enfants infectés par le VIH 15
I.3 Vaccination des nourrissons dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) 18
I.3.1 Intérêt et risque de la vaccination des enfants infectés par le VIH 18
I.3.2 Recommandations de l'OMS sur la vaccination des nourrissons 18
I.3.3 Implémentation en routine du PEV dans les PED 20
I.3.4 Evaluation de la réponse vaccinale chez les nourrissons 21
I.3.5 Réponses vaccinales des nourrissons aux vaccins du PEV 21
I.4 Objectifs de la thèse 25
Chapitre II : Sources de données **27**
II.1 Mon implication dans les projets de recherche 28
II.2 Etude ACIP-EPIPEV : Comparaison de la réponse aux vaccins utilisés dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) chez les enfants infectés et non infectés par le VIH-1 en Afrique sub-saharienne 30

II.2.1 Objectifs 30
II.2.2 Schéma de l'étude 30
II.2.2.1 Critères d'inclusion 30
II.2.2.2 Origine des vaccins utilisés dans le PEV au Cameroun et en RCA 31
II.2.3 Recueil des données 32
II.2.4 Evaluation de la réponse humorale aux vaccins du PEV 32
II.2.5 Autres analyses biologiques 34
II.2.6 Estimation de la taille des groupes 34
II.2.7 Nombre de sujets inclus dans l'étude ACIP-EPIPEV 34
II.3 Etude ANRS 12140-PEDIACAM : Impact des multithérapies antirétrovirales et du PEV sur l'évolution des nourrissons infectés par le VIH suivis au Cameroun 36
II.3.1 Objectifs 36
II.3.2 Schéma de l'étude 36
II.3.2.1 Inclusions et suivi des nourrissons 37
II.3.2.2 Méthode de détermination du statut VIH des nourrissons en phase I 38
II.3.2.3 Description de l'intervention 39
II.3.3 Recueil des données 39
II.3.4 Bilans biologiques 40
II.3.5 Effectif attendu dans l'étude ANRS-PEDIACAM 41
II.3.6 Nombre de sujets inclus et calendrier de l'étude 41
Chapitre III : Processus de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons exposés - faisabilité, facteurs associés à un processus incomplet 46
III.1 Matériels et méthodes 47
III.1.1 Population de l'étude 47
III.1.2 Définition de la variable d'intérêt : processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH 47
III.1.3 Description des autres variables utilisées 47
III.1.4 Stratégie d'analyses statistiques 48
III.2 Résultats 49
III.2.1 Description de la population étudiée 49
III.2.2 Description du processus de diagnostic précoce 49
III.2.3 Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce 50
III.3 Discussion 57
III.4 Conclusion 60
Chapitre IV : Prise en charge précoce des nourrissons infectés par le VIH : fréquence et facteurs de risque d'un processus suboptimal d'initiation du traitement antirétroviral 62
IV.1 Matériels et Méthodes 63
IV.1.1 Population de l'étude 63
IV.1.2 Variables d'intérêt : processus suboptimal d'initiation des ARV et mortalité infantile des nourrissons suivis depuis la naissance 63
IV.1.3 Autres variables utilisées 65

IV.1.4 Stratégie d'analyses statistiques 65
IV.2 Résultats 66
IV.2.1 Population étudiée 66
IV.2.2 Processus d'initiation précoce du traitement ARV chez les nourrissons infectés par le VIH 66
IV.2.3 Facteurs associés à un processus suboptimal d'initiation des antirétroviraux 67
IV.2.4 Survie des nourrissons au cours de la première année de vie 68
IV.3 Discussion 78
IV.4 Conclusion 82
Chapitre V : La vaccination des enfants nés de mères séropositives pour le VIH dans le contexte du Programme Elargi de Vaccination. Comparaison de la réponse humorale à type de persistance des anticorps chez les enfants infectés et non infectés 83
V.1 Méthodes utilisées 84
V.1.1 Population d'étude 84
V.1.2 Définition de la variable d'intérêt : persistance d'anticorps post-vaccinaux 84
V.1.3 Description des autres variables utilisées 84
V.1.4 Stratégie d'analyses statistiques 85
V.2 Résultats 86
V.2.1 Population étudiée 86
V.2.2 Facteurs associés à une réponse vaccinale inadéquate contre les antigènes vaccinaux chez les enfants nés de mères séropositives 87
V.3 Discussion 96
V.4 Conclusion 100
Chapitre VI : Discussion générale et perspectives 101
VI.1 Discussion générale 102
VI.2 Perspectives 108
Chapitre VII : Références 110
Chapitre VIII : Annexes 122
VIII.1 Annexe 1 : Tableaux complémentaires de la revue de littérature 123
VIII.2 Annexe 2 : Description de la procédure de sélection des témoins en phase II de Pediacam 126
VIII.3 Annexe 3 : Calendrier de suivi des enfants inclus dans Pediacam 128
VIII.4 Annexes 4 : Projets associés à Pediacam 129
VIII.5 Annexe 5 : Publications scientifiques issues de cette thèse et distinctions 130

Chapitre I : Contexte et Objectifs

I.1 Infection VIH pédiatrique

I.1.1 Epidémiologie

Selon les estimations de l'OMS/ONUSIDA (UNAIDS, 2010), 33,3 millions de personnes vivaient avec le VIH/SIDA dans le monde à la fin de l'année 2009, dont 2,5 millions d'enfants de moins de 15 ans. Au cours de la même année, 1,8 million de décès ont été rapportés au VIH dont 260 000 d'enfants de moins de 15 ans.

L'Afrique sub-saharienne regroupe environ deux tiers (68%) de la population infectée, qui est en majorité féminine (52% en moyenne). L'épidémie de l'infection VIH en Afrique subsaharienne varie considérablement selon les régions. L'Afrique australe reste la région du monde la plus affectée avec pratiquement 11,3 millions (34%) de personnes vivant avec le VIH. Dans cette région, l'épidémie dans la République d'Afrique du Sud est la plus importante avec 5,6 millions de cas. Le Swaziland, avec 25,9% d'adultes infectés présente la plus importante prévalence dans le monde. En Afrique de l'Est, on observe un déclin de l'épidémie depuis le début des années 2000. Le Kenya est passé d'une prévalence de 14% dans les années 90 à 5% en 2006 (NACC-KENYA, 2010). La prévalence est, comparativement faible dans les pays de l'Afrique de l'Ouest et du Centre (2% en moyenne dans 12 pays), mais reste relativement élevée au Cameroun (5,3%), en République Centrafricaine (4,7%), en Côte d'Ivoire (3,4%), au Gabon (5,2%), et au Nigéria (3,6%) (UNAIDS, 2010).

En 2009, 2,6 millions de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH, dont 370 000 enfants de moins de 15 ans. Ceci représentait une réduction de 21% par rapport à 2007, qui correspond au pic d'incidence (3,2 millions de personnes). Cette réduction est la résultante d'une combinaison de plusieurs facteurs liés aux mesures de prévention, mais aussi à l'évolution de l'épidémie (UNAIDS, 2010).

La transmission de l'infection VIH en Afrique subsaharienne est surtout liée aux rapports hétérosexuels non protégés. Chez les enfants de moins de 15 ans, plus de 90% des infections résultent d'une transmission de la mère à l'enfant (TME) (UNAIDS, 2010), au cours de la grossesse, du travail, de l'accouchement ou de l'allaitement maternel. Environ 65% de ces transmissions sont péripartum (Rouzioux C et al, 1995; Chouquet C et al, 1999). Le risque de TME augmente avec une charge virale VIH élevée et/ou une immunodépression maternelle, surtout dans le dernier trimestre de grossesse (>100000 copies/ml), une infection choriale, un accouchement par voie basse en l'absence de multithérapies antirétrovirales, et une durée prolongée depuis l'ouverture de l'œuf (Semprini AE et al, 1995; Cooper ER et al, 1998 ; Mandelbrot L, 1998 ; Newell ML et al, 1998).

Dans les pays développés, le risque de TME est pratiquement maîtrisé avec des niveaux de transmission à moins de 2%, voire moins de 0,5% dans les situations optimales, grâce à des stratégies combinant l'administration de multithérapies antirétrovirales pendant la grossesse, une césarienne programmée en cas de charge virale mal contrôlée et des mesures nutritionnelles de substitution du lait maternel (Townsend CL et al, 2008; Warszawski J et al, 2008).

Dans les pays en développement (PED), les programmes de prévention de la transmission de la mère à enfant du VIH (PTME) conduisent à des taux inférieurs à 5% dans certains sites de recherche et de santé publique en Afrique subsaharienne (WHO, 2008b; Tejiokem MC et al, 2010). Lors de la session de l'Assemblée Générale des Nations Unies en 2001, de nombreux états ont pris un engagement ambitieux, celui de réduire de moitié d'ici à l'an 2010, la proportion d'enfants infectés par le VIH par voie verticale en s'assurant que 80% des femmes enceintes admises en consultation prénatale auront accès à l'information, au conseil et à la prophylaxie antirétrovirale pour la prévention de la transmission mère enfant du VIH (UN, 2001). Mais les données publiées en 2010 montrent que l'accès au dépistage de l'infection VIH est variable selon les régions et ne couvre en moyenne que 26% des femmes enceintes. La couverture du dépistage chez les femmes enceintes était inférieure à 30% dans 13 des 25 pays ayant les prévalences de l'infection VIH les plus élevées dans le monde (WHO et al, 2010). En 2009, 53% des femmes enceintes séropositives pour le VIH avaient eu accès aux antirétroviraux prophylactiques. Certains auteurs considèrent même cette proportion comme surestimée par des méthodes inadéquates d'évaluation (Stringer JS et al, 2004). En Côte d'Ivoire, la présence de névirapine dans le sang du cordon (principal traitement prophylactique en Afrique subsaharienne) a été décelée chez seulement 24% de femmes infectées par le VIH pour lesquelles un dosage anonyme systématique avait été fait au moment de l'accouchement, beaucoup faible que la couverture de la prophylaxie estimée par les méthodes classiques à 70% (proportion de femmes enceintes infectées par le VIH ayant reçu les antirétroviraux) (Coffie PA et al). Ces données illustrent la difficulté actuelle à contrôler la TME du VIH dans les pays en développement.

I.1.2 Evolution naturelle de l'infection VIH chez l'enfant

L'évolution de l'infection VIH acquise par voie verticale chez l'enfant se présente sous deux formes : la première forme ressemble à celle de l'adulte avec une progression lente vers le SIDA après 8 à 10 ans. La seconde est une forme précoce sévère survenant dans les premiers mois de vie de l'enfant et conduisant rapidement à l'apparition d'infections opportunistes précoces (muguet, diarrhée chronique, troubles de la croissance, hépatosplénomégalie et lymphadénopathie), associées à un déficit immunitaire, et, parfois à

la survenue d'une atteinte neurologique dramatique, l'encéphalopathie liée au VIH. Les infections respiratoires sévères causées par *Pneumocystis jirovecii*, le cytomégalovirus ou les deux font également partie du tableau et surviennent classiquement autour de 10-14 semaines de vie avec des conséquences importantes sur la survie (Williams AJ et al, 2001).

La fréquence de survenue de cette forme sévère est estimée entre 10 et 20% dans les pays développés (Tovo PA et al, 1992 ; Blanche S et al, 1997 ; Prendergast A et al, 2007) et entre 35 et 54% dans les pays en développement (Bobat R et al, 1997; Mbori-Ngacha D et al, 2001 ; Obimbo EM et al, 2004). Sa plus grande fréquence dans les PED pourrait en partie s'expliquer par la plus grande fréquence de certains facteurs de risque de cette forme sévère : stade avancé de la maladie chez les mères pendant la grossesse, niveaux de charges virales particulièrement élevés chez les nourrissons, co-infections, en particulier par CMV, tuberculose (Jeena PM et al, 2002) qui, malgré les difficultés diagnostiques, reste parmi les premières causes de mortalité (Chintu C et al, 2004), ou encore le paludisme et les helminthiases (Otieno RO et al, 2006), les facteurs viraux et les spécificités génétiques de l'hôte. En outre, les problèmes nutritionnels dans les PED pourraient augmenter la mortalité précoce et la qualité de la réponse immunitaire (Blanche S et al, 1994 ; Spira R et al, 1999 ; Ioannidis JP et al, 2004; Obimbo EM et al, 2004).

Aucun facteur ne permet de prédire formellement l'évolution vers une forme sévère. A l'échelon individuel et avant l'âge d'un an, les paramètres biologiques prédictifs classiques d'évolution, comme le pourcentage de lymphocytes CD4 et la charge virale ARN VIH-1 plasmatique, ont une moins bonne valeur que chez le grand enfant. Une méta-analyse dans les pays du Nord a mis en évidence une fréquence importante de progressions à un an chez les nourrissons, malgré des niveaux de pourcentage de lymphocytes CD4 élevés ou des niveaux de charge virale modérés (Mayaux MJ et al, 1996; Dunn D, 2003). Quelques marqueurs potentiels de développement des formes rapides ont été identifiés, à l'instar de l'hépatomégalie, de la splénomégalie, de la faible proportion de CD4 et de l'identification du virus (culture ou PCR) dans les premières semaines de vie en l'absence de traitement antirétroviral (Mayaux MJ et al, 1996).

En Afrique sub-saharienne, l'évolution de l'infection à VIH-1 chez le nourrisson et l'enfant en l'absence de traitement antirétroviral est particulièrement préoccupante (Rogerson SR et al, 2004). Une méta-analyse, portant sur les nourrissons inclus dans les essais de PTME, a estimé l'incidence des décès chez les enfants infectés par le VIH-1 à 35,2% à l'âge de 1 an et à 52,5 % à l'âge de 2 ans contre respectivement 4,9% et 7,6% chez les enfants non infectés (Newell ML et al, 2004a; Newell ML et al, 2004b). Les nourrissons infectés sont particulièrement difficiles à prendre en charge dans un contexte de ressources limitées, avec

des problèmes d'accessibilité aux soins, mais aussi des réticences des parents ou des tuteurs à participer aux activités de soins de l'infection VIH, en raison de nombreuses conséquences discriminatoires et stigmatisantes qui peuvent découler de la divulgation de leurs statuts (Vreeman RC et al, 2008).

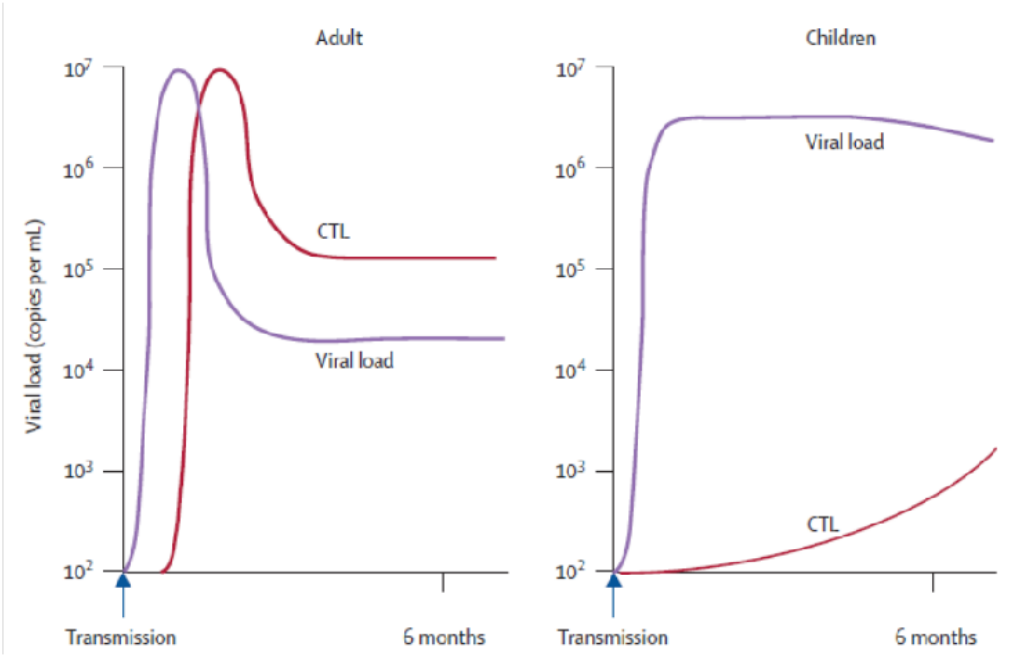
I.1.3 Infection VIH et système immunitaire

L'infection VIH pédiatrique entraîne des perturbations complexes du système immunitaire, pouvant aboutir à la destruction de certains compartiments avant que toute réponse immunitaire n'ait eu le temps de se développer. Pourtant, le système immunitaire a les capacités, même transitoires de contenir l'infection VIH. Cette capacité, moins fréquente chez l'enfant que chez l'adulte, reposerait selon plusieurs auteurs sur un défaut de lymphocytes T helper, nécessaires au maintien de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CD8) (Borrow P et al, 1994; Koup RA et al, 1994; Rosenberg ES et al, 2000; Mphatswe W et al, 2007).

Au cours de la première année de vie, au moment où on observe des charges virales élevées chez l'enfant infecté par le VIH, l'activité spécifique des lymphocytes T cytotoxiques est difficilement détectable (Figure I-1) (Prendergast A et al, 2007). Même si de nombreuses similitudes ont été décrites sur la pathogénèse de l'infection VIH chez l'enfant et chez l'adulte, certains aspects sont cependant observés uniquement chez les enfants infectés au cours de la période périnatale (Burns DN et al, 1999). D'abord, l'infection de l'enfant intervient très souvent à un moment où son système immunitaire est immature. La plupart de ces enfants infectés ont hérité des gènes maternels HLA de classe I (HLA*B1801 et HLA*B5802) associés à un mauvais contrôle de la charge virale VIH et par conséquent une charge virale maternelle élevée, facteur de risque connu de la transmission mère enfant (Prendergast A et al, 2007). De plus, le transfert passif des anticorps maternels peut avoir un effet négatif sur la capacité de l'enfant à générer une réponse immunitaire spécifique à l'infection VIH. Mais de l'autre côté, le jeune âge de l'enfant lui confère certains avantages sur le plan immunologique, car contrairement aux adultes, les enfants disposent d'un thymus en pleine activité. Par conséquent, ils ont la capacité de générer les lymphocytes cytotoxiques adaptés aux différentes mutations virales, ou échappements et même de produire des lymphocytes T helper spécifiques après initiation des traitements ARV (Shearer WT et al, 1997; Prendergast A et al, 2007). Même si on assiste à une involution thymique avec l'âge, certains auteurs estiment que les fonctions thymiques persistent tout de même à l'âge adulte (Cohen Stuart JW et al, 1998).

Il apparaît de plus en plus probable que des perturbations du système immunitaire existent également chez les enfants *non infectés* nés de mères séropositives pour le VIH. En effet,

les cellules T (helper et cytotoxic) spécifiques au VIH ont été retrouvées chez eux. Ces résultats ont été renforcés par certaines études montrant des anomalies thymiques chez des produits d'avortement des femmes séropositives pour le VIH, même en l'absence d'infection thymique par le VIH (Papiernik M et al, 1992). Plus récemment, l'activation immunitaire et la dénaturation post thymique des lymphocytes T ont été retrouvées chez les enfants exposés au VIH mais non infectés (Vigano A et al, 2007). L'ensemble de ces données suggère une influence de l'environnement maternel riche en particules virales et protéines solubles sur le système immunitaire de l'enfant en cours de développement. Ces anomalies de développement et de maturation portent uniquement sur le compartiment des cellules T, avec quelques défauts sur les cellules CD4, CD8 et un accroissement des cellules T immatures périphériques qui traduisent une perturbation du parcours thymique. Ces anomalies peuvent persister pendant l'enfance (Clerici M et al, 2000).



Source : Prendergast et al, Lancet 2007; 370: 68–80

Figure I-1 : Evolution de la charge virale VIH au cours du temps après l'infection et ampleur de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au VIH chez les adultes et enfants infectés non traités

I.1.4 Impact des multithérapies antirétrovirales sur les nourrissons infectés par le VIH et évolution des recommandations de traitement

Depuis 1996, une diminution majeure de la mortalité et de la morbidité de l'infection à VIH-1 a été observée chez l'enfant dans les pays industrialisés, essentiellement grâce à la mise à disposition des multithérapies antirétrovirales (Teglas JP et al, 2000; Gortmaker SL et al, 2001 ; Murphy EL et al, 2001). En Afrique, les données préliminaires et observationnelles ont montré aussi un impact clinique et biologique significatif des multithérapies antirétrovirales sur la mortalité et la morbidité de l'infection à VIH-1 chez l'enfant (Fassinou P et al, 2004 ; Wamalwa DC et al, 2007 ; Sutcliffe CG et al, 2008 ; Ciaranello AL et al, 2009).

L'OMS a déclaré lors de la session extraordinaire des Nations Unies en septembre 2003, le manque d'accès au traitement antirétroviral comme une urgence sanitaire mondiale. Au décours de cette session, les premières directives de traitement antirétroviral des enfants ont été élaborées et intégrées aux recommandations du traitement du VIH en vue de renforcer l'initiative "3 by 5" (3 millions de personnes au moins auront accès au traitement antirétroviral dont elles ont besoin d'ici à l'an 2005) (WHO, 2003). Dans ces toutes premières directives concernant les enfants, l'OMS encourageait le développement des tests virologiques applicables dans les pays à ressources limitées et la prise en compte de l'âge de l'enfant, de la possibilité ou non d'effectuer un test virologique ou une numération lymphocytaire (CD4 et/ou lymphocytes totaux) et la classification clinique de la maladie VIH (Tableau VIII-1 ; Tableau VIII-2 ; Tableau VIII-3 et Tableau VIII-4, annexe 1). Dans ces classifications, un grand nombre de symptomes ont été très rapidement jugée peu spécifique de l'infection VIH dans les pays à ressources limitées, car retrouvés également chez l'enfant sans VIH.

Suite à ces directives de l'OMS, des progrès remarquables ont été notés en matière d'accès au traitement ARV chez les adultes. Mais, cette évolution n'a malheureusement pas touché les enfants en raison d'un ensemble de contraintes spécifiques : l'accès limité au diagnostic précoce de l'infection VIH et l'absence de méthode de diagnostic simple, le manque de ressources humaines et de sensibilisation à l'efficacité des ARV chez les enfants, l'expérience limitée d'utilisation de ces traitements dans le contexte pédiatrique, et l'absence de formulations pédiatriques adaptées (WHO, 2006).

Pour faciliter l'accès large aux ARV des enfants infectés par le VIH, l'OMS a publié en 2006 dans un document à part, les premières directives avec une approche de santé publique. Selon ces recommandations, la décision de mettre un enfant sous traitement antirétroviral était conditionnée par les critères cliniques et immunologiques. De plus, il était indiqué très clairement de toujours procéder à l'évaluation de l'environnement familial de l'enfant avant toute mise sous ARV, en vue d'identifier une personne capable de bien comprendre le

maniement des antirétroviraux (conservation, traitement à vie, résistances, effets secondaires) et le pronostic de l'infection VIH afin de faciliter le suivi (WHO, 2006).

Dans le même temps, de nombreuses études observationnelles dans les pays développés montraient déjà l'intérêt des traitements ARV précoces (avant l'âge de 6 mois) (Faye A et al, 2002 ; Dunn D, 2003 ; Chiappini E et al, 2006), dans le contrôle de la morbidité et de la mortalité. Les résultats de l'essai clinique CHER (Children with HIV Early Antiretroviral Therapy) réalisée en Afrique du Sud viendront confirmer ces hypothèses et montrer une réduction de 75% de la mortalité à 1 an chez les nourrissons infectés par le VIH mis sous traitement avant l'âge de 12 semaines (Violari A et al, 2008). Ceci a amené l'OMS a modifié les directives en matière de traitement ARV des enfants en 2008, pour recommander désormais de mettre sous traitement ARV tout nourrisson chez qui le diagnostic de l'infection par le VIH aura été porté avant l'âge de 1 an (WHO, 2008a). Plus récemment, cette recommandation a été étendue jusqu'à l'âge de 2 ans (WHO, 2010b).

I.2 Prise en charge précoce des nourrissons exposés au VIH : Diagnostic de l'infection et initiation précoce du traitement antirétroviral

I.2.1 Diagnostic précoce de l'infection VIH : avantages, inconvénients et recommandations

Le diagnostic précoce de l'infection VIH chez les enfants est la pierre angulaire de l'accès au traitement ARV dans les premiers mois de vie dont l'impact majeur sur la survie a été démontrée dans les conditions d'essais thérapeutiques en Afrique du Sud, et de routine en Europe (cf. § I.1.4).

La connaissance précoce du statut VIH de l'enfant au cours des premières semaines de vie permet de sensibiliser et préparer les parents à l'importance de son suivi médical s'il est infecté. Cette stratégie permet d'encourager le recours systématique aux services de santé à la moindre alerte chez l'enfant infecté pour prévenir les maladies opportunistes, et, surtout pour initier rapidement un traitement antirétroviral systématique. La connaissance précoce de l'absence d'infection par le VIH peut, quant à elle, favoriser le lien mère-enfant, améliorer les interactions avec l'équipe soignante et permettre de maintenir un niveau de vigilance élevée pour éviter la transmission par allaitement

Au niveau des services de santé, la disponibilité des résultats du test de dépistage précoce entraine un allégement du calendrier de visites des nourrissons non infectés par le VIH, et donc une diminution de la charge de travail, même si cette réduction sera moins perceptible avec les nouvelles recommandations en matière d'allaitement protégé.

Enfin, le diagnostic précoce permet de disposer d'un indicateur plus rapide que la sérologie de 18 mois, pour évaluer l'efficacité des interventions visant la réduction de la transmission de la mère à l'enfant

Néanmoins, il ne faut pas méconnaitre le risque de réactions néfastes liées à un dépistage trop précoce de l'infection et qu'il convient d'évaluer : l'annonce de cette infection peut plonger la famille dans un pessimisme sur l'avenir de l'enfant, aboutissant à une perturbation des relations familiales à son égard et une faible sollicitation des services de santé. Cette situation peut s'aggraver avec le décès des parents de l'enfant car certains auteurs ont rapporté que la famille éloignée s'occupe plus facilement des orphelins non infectés que de ceux infectés par le VIH (Varga CA et al, 2005).

Le choix de l'âge pour le diagnostic de l'infection chez les enfants exposés au VIH dépend des programmes de chaque pays. Il prend en compte, en particulier, la disponibilité des ARV

et la durée d'exposition à l'allaitement maternel, etc. Mais tout retard au diagnostic augmente le risque de progression vers la maladie et le décès, et c'est pour cela que l'OMS recommande de réaliser le diagnostic de l'infection autour de l'âge de 4 à 6 semaines et de retourner le résultat sur le site clinique ou à la famille au plus tard 4 semaines après le prélèvement (WHO, 2010b).

Dans la plupart des pays en développement, le diagnostic précoce de l'infection VIH est couplé au calendrier de vaccination du PEV. Le test VIH est proposé aux parents lorsqu'ils viennent pour la première dose de vaccination prévue à l'âge de 6 semaines. Cette chronologie permet non seulement de limiter les visites dans les structures de santé, mais aussi de profiter de l'attractivité du PEV, programme qui draine de nombreux parents pour la vaccination des enfants. Les résultats positifs doivent être gérés de façon particulière afin de permettre à la famille d'être informée le plus rapidement possible et de prendre les dispositions qui s'imposent.

Un algorithme de dépistage de l'infection VIH chez les enfants de moins de 18 mois tenant compte de l'âge au premier contact avec les parents et des disponibilités technologiques, a été proposé par l'OMS pour faciliter la conduite de ce processus (Figure I-2).

I.2.2 Modalités de diagnostic précoce

I.2.2.1 Cinétique de disparition des anticorps maternels contre le VIH chez l'enfant exposé

Le diagnostic précoce de l'infection VIH chez le nourrisson exposé est complexe, en raison du passage à travers la barrière placentaire d'anticorps maternels contre le VIH. Dans ces conditions, un résultat positif de la sérologie VIH traduit tout simplement l'exposition du nourrisson et non l'infection. Cette présence d'anticorps maternels chez le nourrisson rend les techniques courantes de diagnostic de l'infection VIH utilisées chez l'adulte sans valeur.

La cinétique de disparition de ces anticorps est variable. La perte des anticorps maternels se situe pour certains enfants nés de mères séropositives pour le VIH autour de l'âge de 12 mois, et, la plupart de temps, ils ont complètement disparu à l'âge de 18 mois (Palasanthiran P et al, 1994). Une étude réalisée en Afrique du Sud portant sur 117 nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH a montré que 94,5% des nourrissons non infectés avaient perdu les anticorps maternels contre le VIH à l'âge de 12 mois et tous à l'âge de 15 mois (Palasanthiran P et al, 1994). D'autres auteurs ont montré que l'âge médian à la disparition des anticorps maternels contre le VIH était de 13,3 mois (étendue : 10,4-15,6 mois) (Moodley D et al, 1995).

I.2.2.2 Techniques utilisées

Avant l'âge d'un an, le diagnostic de l'infection VIH ne peut être établi de façon fiable que par des techniques virologiques permettant de mettre en évidence le virus lui-même. Auparavant, ce diagnostic nécessitait un travail intense de culture virale dans des laboratoires sécurisés. A ce jour, deux techniques sont régulièrement utilisées : *1)* la Polymerase Chain Reaction (PCR) qui permet d'amplifier et de détecter le matériel génétique du virus dans le plasma (VIH-ARN) ou dans les cellules mononuclées (ADN proviral du VIH) ; *2)* la détection de l'antigène ultrasensible p24 qui nécessite juste des équipements minimum dans le laboratoire. Ces techniques peuvent permettre de détecter des enfants infectés par le VIH dès le premier jour de vie (Ngo-Giang-Huong N et al, 2008).

La Polymerase Chain Reaction - acide désoxyribonucléique (PCR ADN)

C'est la technique standard de diagnostic virologique. Elle consiste à amplifier et détecter l'ADN proviral intracellulaire (qui résulte de la copie de l'ARN viral grâce à la trancriptase inverse et peut ainsi s'intégrer au génome de la cellule hôte avec l'aide d'une autre enzyme virale, l'intégrase). Très répandue dans les pays développés, elle a facilité le développement d'une variété de techniques commerciales et techniques-maison avec des cibles différentes en fonction des types de VIH circulants. Par exemple, la technique commerciale Amplicor® HIV1 PCR ADN version 1.5 (Roche Diagnostics) avec les « primers » universels (SSK145 et SKCC1B) est la méthode standard, simplifiée, très utilisée dans les laboratoires de biologie clinique pour la détection de tous les sous-types de VIH1 - M (A, B, C, D, AE etc.) avec une excellente sensibilité et spécificité (Young NL et al, 2000; Sherman GG et al, 2005). La technique de PCR (Generic HIV Charge Virale, Biocentric, Bandol, France - ANRS) donne des résultats comparables aussi bien sur le diagnostic que sur le suivi (Rouet F et al, 2005; Rouet F et al, 2010)

Cette technique détecte environ 50% des transmissions *in utéro* et périnatale à la naissance et pratiquement toutes à 6 semaines chez les enfants non allaités (Benjamin DK, Jr. et al, 2001). La sensibilité et la spécificité de la PCR-ADN à la naissance sont de 50% et 99% respectivement. La sensibilité s'améliore fortement avec l'âge passant à 90% ou plus à l'âge d'un mois.

La Polymerase Chain Reaction - acide ribonucléique (PCR ARN)

Cette technique consiste à la détection de l'ARN viral dans le plasma. Ses résultats sont très fiables chez le nourrisson avec une sensibilité et une spécificité comparable à celle de la PCR ADN (Delamare C et al, 1997 ; Cunningham CK et al, 1999 ; Brambilla D et al, 2003 ; Rouet F et al, 2005).

Les paramètres intrinsèques de la PCR-ARN sont liés à l'âge de l'enfant au moment du diagnostic et ne sont pas modifiés par l'exposition de l'enfant et/ou de la mère à une prophylaxie par Zidovudine, ni par le niveau de charge virale initiale de l'enfant (Nesheim S et al, 2003). Neishem et al rapportent une sensibilité de 29% au cours des 7 premiers jours de vie, 79% entre 8 et 28 jours, 91% entre 29 et 60 jours. La spécificité est de 100% aux deux premières périodes et de 93% entre 29 et 60 jours. Young et al rapportent une sensibilité de 38% à la naissance, et de 100% à 2 mois ainsi qu'à 6 mois pour la PCR ADN, tandis qu'avec la PCR-ARN, la sensibilité était respectivement de 47% et 100%, avec une spécificité dans tous les cas autour de 100% (Young NL et al, 2000).

Dans un contexte où la réduction de la TME est efficace avec un taux de transmission inférieur à 10%, la valeur prédictive négative d'un test PCR est supérieure à 90% à la naissance et 100% à deux mois. Le résultat d'un seul test positif à n'importe quel âge ou d'un seul test négatif à l'âge de 2 mois suffit pour établir le statut VIH de l'enfant. Néanmoins, en raison des possibilités de contamination dans les laboratoires, il est conseillé d'effectuer deux tests séparés pour affirmer le diagnostic d'infection VIH chez un enfant non allaité.

On distingue deux variantes de la technique moléculaire : la PCR classique et la PCR en temps réel. Cette dernière offre au technicien l'avantage de voir l'accroissement du matériel génétique ADN ou ARN en raison de l'amplification. Cette technique est rapide, sensible, spécifique, reproductible et réduit fortement les risques de contamination ainsi que les coûts (Zhao Y et al, 2002 ; Rouet F et al, 2005; Katsoulidou A et al, 2006). Les résultats sont rendus plus rapidement qu'avec la PCR classique et cette technique ne nécessite pas d'avoir deux salles, une pour l'amplification et l'autre pour la détection. Plusieurs groupes ont développé cette PCR pour la rendre plus performante par la détection de plusieurs régions du gène du VIH1 (Rouet F et al, 2005).

L'antigène P24

Le test de détection de l'antigène ultrasensible p24 est une technique ELISA, accessible dans la plupart des pays en développement. Les résultats obtenus de différentes études sont variables. Certains auteurs ont montré qu'il était moins sensible que les techniques moléculaires mais de spécificité comparable. D'autres ont par contre montré que ces tests sont de sensibilité et spécificité comparables (Fiscus SA et al, 2007 ; Knuchel MC et al, 2007).

La réalisation du diagnostic de l'infection VIH par ces techniques virologiques chez les nourrissons exposés âgés de 4 à 6 semaines permet d'identifier environ 95% des enfants infectés in utero et peripartum (Young NL et al, 2000; Lambert JS et al, 2003).

I.2.2.3 Prélèvements et transports

La PCR VIH dans la première semaine de vie est devenue un examen de routine dans les pays développés. Cette technique commence à être disponible dans les pays à ressources limitées, mais est plus coûteuse que les tests sérologiques VIH utilisés chez l'enfant de plus de 18 mois. La mise en place de la technique PCR nécessite un plateau technique de qualité avec les équipements et le personnel qualifié qu'on ne retrouve pas toujours dans ces pays à ressources limitées.

En outre, la logistique de conservation et de transport sur les longues distances retarde fréquemment l'acheminement des échantillons vers le laboratoire avec pour conséquence, parfois, l'abandon du processus de dépistage VIH par la famille découragée par la lenteur du rendu des résultats. Il est pratiquement impossible d'avoir en routine des transports sur de longues distances en respectant des températures autour de +2℃ à 10℃ dans les pays à ressources limités. Une alternative a été proposée avec l'utilisation des échantillons de sang séché sur papier buvard (Dried Blood Spot - DBS) débuté vers la fin des années 1990, afin de rendre accessible les techniques complexes d'identification virale au nombre le plus large possible de personnes vivant dans des zones enclavées et éloignées des laboratoires. Cette technique de collecte est simple à réaliser, et évite la phlébotomie. Le conditionnement et le transport sont faciles à organiser, contrairement aux échantillons liquides qui doivent être soigneusement emballés et dont la qualité peut être fortement dégradée par l'exposition aux hautes températures ambiantes pendant l'acheminement.

I.2.3 Couverture et difficultés du dépistage précoce

En 2010, seuls 15% des enfants exposés au VIH ont eu accès au dépistage de l'infection VIH avant l'âge de 2 mois dans le monde (WHO et al, 2010). La plupart des enfants infectés par le VIH sont ainsi dépistés tardivement, ou meurent avant de l'être, de pathologies opportunistes qu'on aurait pu prévenir. Les études réalisées en milieu hospitalier en Afrique australe, montraient ainsi que la plupart des enfants diagnostiqués pour le VIH à l'occasion d'un conseil et dépistage ou au decours d'une hospitalisation étaient sévèrement malades au moment de leur inclusion (Chintu C et al, 2004; Laufer MK et al, 2006).

En dehors des difficultés techniques, logistiques et humaines au niveau des structures de soins, l'accès au diagnostic précoce est également limité par le non respect du calendrier des visites de suivi des enfants nés de mères séropositives pour le VIH après la sortie de la maternité.

Dans un hôpital de référence à Johannesburg offrant les possibilités de prise en charge à la fois des mères et des enfants dans le cadre de la PTME, 49% des 2243 nourrissons inclus

pendant une période de deux ans n'avaient pas été revus à la première visite de suivi prévue 2 semaines après la sortie de la maternité et 82% n'avaient pas été revus à un an pour le dépistage de l'infection VIH. Avec la mise en place de mesures incitatives, telles que le remboursement de frais de transport et les relances téléphoniques, cette proportion a diminuée pour passer à 22% à un an (Jones SA et al, 2005).

Au Malawi, en zone rurale, 81% de 646 mères enceintes infectées par le VIH incluses dans un programme de PTME étaient perdues de vue 6 mois post accouchement (Manzi M et al, 2005). Toujours au Malawi, mais cette fois en zone urbaine, 36,9% (797/2156) des nourrissons suivis dans un programme offrant un test par PCR sur DBS à partir de l'âge d'un mois n'avaient pas été testés (Ioannidis J et al, 1999). Les femmes peu scolarisées et celles provenant des communautés agricoles étaient plus souvent absentes aux visites postnatales que les autres femmes. Le faible poids de l'enfant à la naissance était associé au non retour des enfants, peut être en raison d'un nombre de décès plus fréquent, d'autant plus que le faible poids était lié à la transmission de la mère à l'enfant du VIH. En Ouganda, la moitié seulement des 1037 femmes enceintes testées positives pour le VIH avaient été enrôlées dans un programme de PTME soutenu par Médecin Sans Frontières, et 53% étaient perdues de vue à 18 mois (Ahoua L et al, 2010).

Des études ont montré que certaines mères ne récupèrent pas les résultats du test de dépistage effectué pour leur enfant, avec pour conséquence une prise en charge inadéquate pour ceux de ces enfants qui, malheureusement, sont infectés. Ces études montrent des taux de retour pour le retrait des résultats de 55% (242/441) en Tanzanie (Nuwagaba-Biribonwoha H et al, 2010), 65% (153/233) en Afrique du Sud (Rollins N et al, 2009) et 81% (753/930) au Botswana (Creek T et al, 2008). Au Kenya, 7,4% des 2477 nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH, inclus à un âge médian de 6,1 semaines, étaient perdus de vue à 3 mois (Nyandiko WM et al, 2010).

Peu d'études cependant ont étudié les motifs de non compliance des familles au processus de diagnostic précoce des nourrissons, notamment parce qu'il est difficile de joindre les parents concernés pour recueillir ces raisons. Dans une étude transversale, en Afrique du Sud, montrant que seulement 61,7% de 311 enfants exposés au VIH maternel, âgés de 3-6 mois, avaient été testés, les raisons rapportées par les mères de non réalisation du test étaient multiples : test jugé trop précoce, avec le soutien du personnel qui avait engagé la famille à revenir le faire quand elle serait prête, insuffisance d'informations reçues; test jugé inutile compte tenu du bon état de l'enfant; difficultés de transports entre le lieu de résidence et la structure médicale; refus du père ou du partenaire. Des défaillances du système de santé étaient également soulignées, avec quelquefois, l'absence de personnel chargé des

prélèvements. En analyse multivariée, la non réalisation du test VIH précoce de l'enfant restait associée uniquement à des facteurs indiquant une méconnaissance ou une absence de PTME (Peltzer K et al, 2010).

Une autre étude en Ouganda, menée auprès de 197 couples mère-enfant, rapportait que le non retour aux visites de suivi était associé à : l'absence de compréhension des bénéfices du suivi (29,9%), au décès de l'enfant (27,4%), à la maladie ou le décès de la mère (3,1%), à l'absence d'implication du partenaire (13,2%), au déménagement de la famille (12,2%) et à la peur de la stigmatisation (6,1%) (Ahoua L et al, 2010). Le risque de perdu de vue était également liée à la précocité du sevrage, l'allaitement prolongé, l'absence de prophylaxie ARV ou une prophylaxie incomplète. De manière non surprenante, la survenue d'un épisode aigu de maladie au cours du suivi favorisait le retour vers la structure de soins.

En Afrique du Sud, la faible mobilité, les longues distances et le coût du transport sont identifiés comme des obstacles au suivi des enfants (McCoy D et al, 2002). Ces facteurs sont également rapportés dans l'étude de Jones et *al* montrant aussi que ce suivi est négativement associé aux mauvaises conditions socioéconomiques, au déménagement, au manque de partage des informations avec le père de l'enfant ou avec la personne s'occupant de l'enfant (Jones SA et al, 2005).

I.2.4 Initiation précoce du traitement antirétroviral chez les enfants infectés par le VIH

Dans une étude menée dans 4 pays d'Afrique et d'Asie sur l'accès au diagnostic précoce de l'infection VIH et l'utilisation des résultats pour la prise en charge des enfants, les auteurs ont montré une attrition significative des cohortes conduisant à des proportions faibles de nourrissons avec une PCR positive finalement mis sous traitement antirétroviral : 22% au Sénégal, 37% en Ouganda et 38% au Cambodge. Cette proportion était moins faible en Namibie (70%) qui, contrairement aux autres, recommandait déjà le traitement précoce avant la publication des recommandations de l'OMS sur les traitements antirétroviraux des nourrissons infectés (Chatterjee A et al, 2011).

Mais l'utilisation des multithérapies antirétrovirales chez le nourrisson est complexe, du fait de l'absence de présentations galéniques réellement adaptées au nourrisson et des difficultés potentielles de gestion des effets secondaires, surtout dans des situations d'accès limité aux soins. A court terme, une intolérance digestive, une diarrhée pourrait ainsi avoir des conséquences dramatiques chez un nourrisson dans un contexte d'accès limité aux structures de soins de santé primaire. A moyen et long terme, la survenue d'anomalies du

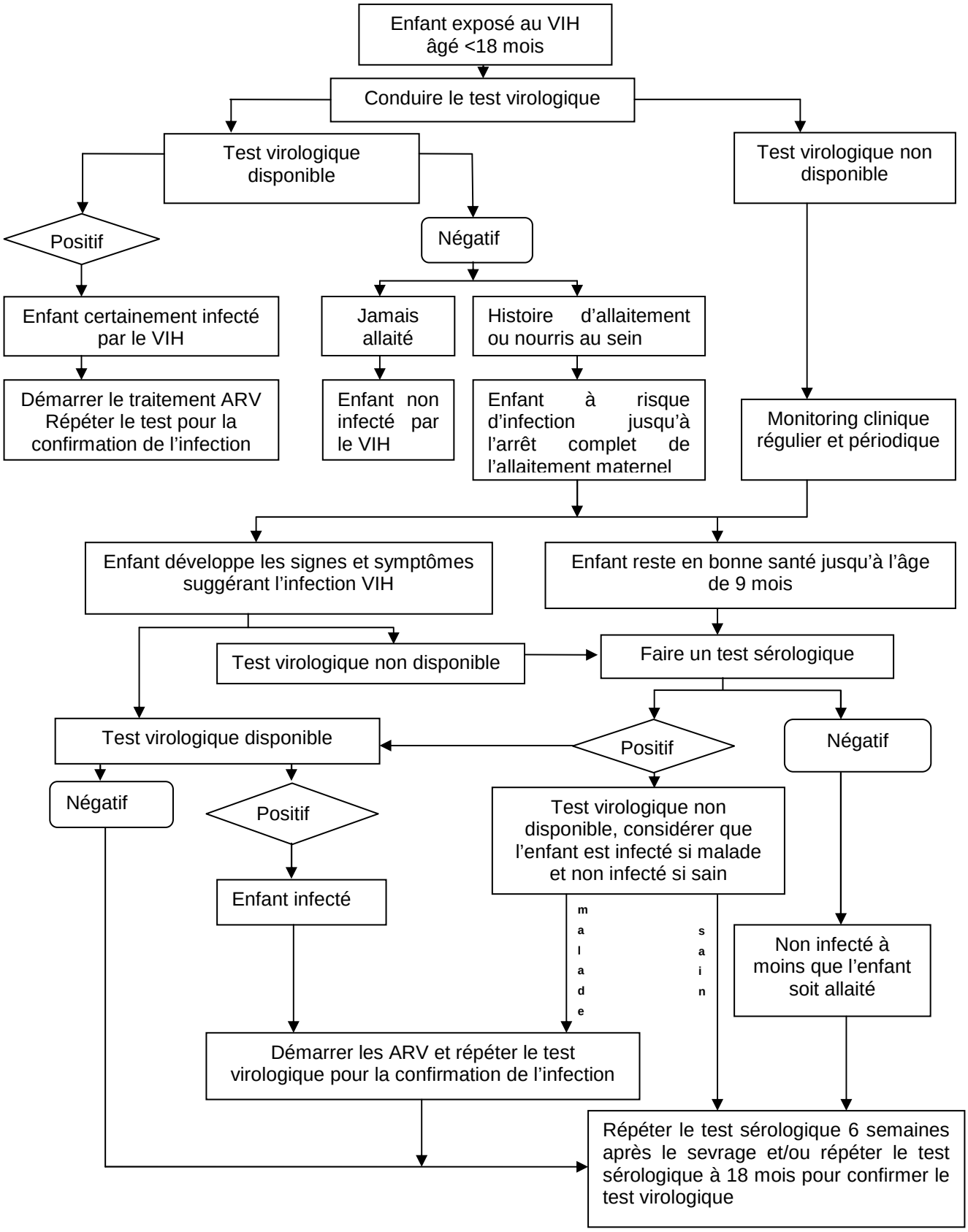
métabolisme lipido-glucidique et de lipodystrophies chez l'enfant (Jaquet D et al, 2000; Beregszaszi M et al, 2005).

Le traitement précoce systématique du nourrisson pose aussi la question du rapport bénéfice-risque d'un traitement lourd et prolongé chez un enfant qui n'aurait peut-être pas progressé vers une forme sévère.

Par ailleurs, des études obervationnelles menées dans les pays du Nord ont montré une fréquence importante des échecs virologiques, en particulier chez les nourrissons, allant de 38 à 72%, contrastant toutefois avec l'amélioration clinique et immunologique de ces enfants. Ces échecs virologiques peuvent entrainer des mutations de résistance du virus aux antirétroviraux (Luzuriaga K et al, 2000 ; Faye A et al, 2002 ; Levy Y et al, 2003). Un certain nombre de déterminants de ces échecs ont pu être identifiés. La connaissance limitée de la pharmacocinétique pédiatrique de certains antirétroviraux a probablement conduit à des concentrations plasmatiques sub-optimales (Litalien C et al, 2003). L'immaturité des enzymes du métabolisme hépatique mais aussi des facteurs comme l'alimentation chez le nourrisson pourraient expliquer certaines spécificités de la pharmacocinétique des ARV à cet âge de la vie. La lourdeur du traitement associée à des formes galéniques mal adaptées au nourrisson peut, par ailleurs, conduire à des difficultés d'observance (Watson DC et al, 1999; Gibb DM et al, 2003).

Les échecs thérapeutiques sont particulièrement préoccupants dans les PED où les choix de traitements antirétroviraux de 2ème ou 3ème ligne sont, pour le moment, très limités. Par ailleurs, les formes galéniques sont inadaptées pour beaucoup d'ARV ; et surtout leur accès reste limité. Dans le cadre d'une trithérapie de première ligne chez le nourrisson, l'association de 2 inhibiteurs nucléosidiques à 1 inhibiteur non nucléosidique, la névirapine est recommandée par l'OMS dans les cas où cette molécule n'aurait pas été utilisé pour la PTME chez l'enfant et ou la mère (WHO, 2010b). L'utilisation de la névirapine en première ligne peut être discutée pour 2 raisons.

- La barrière génétique de cette molécule est faible conduisant à l'apparition très rapide de mutations de résistance en cas de traitement sub-optimal avec par exemple les difficultés minimes d'observance.
- Un autre élément pouvant conduire à un échec précoce d'un traitement comportant de la névirapine est la possibilité de la transmission au nourrisson de virus résistants aux ARV utilisés pour la PTME. Cette transmission de virus résistant à la névirapine de la mère à l'enfant a pu être démontrée dans certaines études (Eshleman SH et al, 2005) et pourrait compromettre l'efficacité de certaines multithérapies antirétrovirales chez le nourrisson.



Source: WHO, 2010. Retrieved April 24, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf

Figure I-2: Algorithme de prise en charge des nourrissons exposés au VIH âgés de moins de 18 mois.

I.3 Vaccination des nourrissons dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV)

I.3.1 Intérêt et risque de la vaccination des enfants infectés par le VIH

Avec l'introduction des traitements antirétroviraux précoces dans les pays à ressources limitées, l'espérance de vie des enfants infectés par le VIH va certainement s'accroitre et la question de la réponse aux vaccins du Programme Elargi de Vaccination (PEV), en particulier sous la forme de la persistance des anticorps vaccinaux, est une préoccupation grandissante. En effet, si ces enfants sont insuffisamment protégés, ils pourraient constituer des populations vulnérables entravant le processus d'élimination de certaines maladies à prévention vaccinale.

A des questions portant sur la capacité des enfants infectés à générer une réponse immunitaire protectrice contre l'antigène vaccinal, s'ajoutent des interrogations sur le risque de développer les maladies associées à la vaccination surtout avec des vaccins vivants atténués, notamment sur le risque d'accélération de l'immunosuppression provoquée par la stimulation de la réplication virale VIH post vaccination (Glesby MJ et al, 1996; Moss WJ et al, 2003 ; Pancharoen C et al, 2004). La question de l'aggravation de la pathologie VIH suite à la prise des vaccins est évoquée mais reste peu étudiée. Quelques études observationnelles ou expérimentales ont rapporté un faible risque de survenue d'effets indésirables liés à la vaccination chez les enfants infectés (Dabis F et al, 1994). Les données mondiales recueillies par l'OMS indiquent seulement deux cas de poliomyélite paralytique post vaccinale parmi environ 500 000 enfants infectés par le VIH vaccinés par le VPO depuis la reconnaissance de la pandémie (Ion-Nedelcu N et al, 1994; Chitsike I et al, 1999). Ces paralysies sont liées aux VPDV (Vaccine Derived Polioviruses) qui sont des virus issus du vaccin oral, ayant recouvré par mutation ou par recombinaison des caractères de pathogénicité et de transmissibilité. Le risque lié à la vaccination contre la rougeole n'est pas clairement identifié avec des données contradictoires (Sprauer MA et al, 1993; Moss WJ et al, 1999). Un cas de complication sévère chez un sujet adulte infecté par le VIH très immunodéprimé aux Etats-Unis a été signalé (Angel JB et al, 1998). Certaines études soulignent également la possibilité d'excrétion continue du virus de la rougeole après la vaccination (Permar SR et al, 2001).

I.3.2 Recommandations de l'OMS sur la vaccination des nourrissons

Le calendrier de vaccination des nourrissons est variable d'un pays à l'autre selon le niveau de prévalence des maladies. On y retrouve, de façon constante, les vaccins vivants atténués (contre la tuberculose, la poliomyélite, la rougeole, la fièvre jaune) et les vaccins inactivés

(contre la coqueluche, la diphtérie, le tétanos, l'hépatite B, les infections à Haemophilus influenzae sérotype b et à pneumocoques).

Au Cameroun et dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne, le PEV prend en charge gratuitement les vaccins pour les enfants de moins d'un an (

Tableau I-1). Il recommande une dose de vaccin BCG et de vaccin polio oral (VPO) à la naissance, 3 doses de vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (germe entier) (DTCoq), de VPO et de vaccin contre l'hépatite B (HB, introduit en 2006 au Cameroun), de vaccin contre Haemophilus influenzae sérotype b (ActHib, introduit en 2008 au Cameroun), de vaccin contre le pneumocoque (Pneumo 13, introduit en juillet 2011 au Cameroun) à 6, 10 et 14 semaines et, enfin, une dose de vaccin anti-rougeoleux et une dose de vaccin anti-amaril à 9 mois.

Tableau I-1: Calendrier National Camerounais du PEV

Age de l'enfant	Enfant né de mère séronégative pour le VIH ou de statut inconnu	Enfant né de mère séropositive pour le VIH	
		asymptomatique	symptomatique
Naissance	BCG Polio oral 0	BCG Polio oral 0	Polio oral 0*
6, 10, 14 semaines	DTCoq + Polio Oral, Hépatite B, *Haemophilus* B, pneumo	DTCoq + Polio Oral, Hépatite B, *Haemophilus B* *Pneumo*	DTCoq + Polio Oral, Hépatite B, *Haemophilus* B Pneumo
6 mois		Rougeole	Rougeole†
9 mois	Antiamarile Rougeole	Antiamarile Rougeole	Rougeole†

**Remplacer par polio injectable si disponible*
†*Ne pas l'administrer dans les cas de déficit immunitaire sévère (%CD4 < 15%)*
Source : PEV, 2011. République du Cameroun

L'âge auquel les vaccins doivent être administrés est conditionné par (Galazka A, 1993a) :

- le risque spécifique de maladie lié à l'âge ;
- la capacité à répondre aux vaccins en fonction de l'âge (immaturité immunologique) ;
- les interférences potentielles avec les anticorps maternels : la présence d'anticorps maternels inhibe probablement la séroconversion après la vaccination ;
- les complications vaccinales associées à l'âge : les encéphalopathies liées à la vaccination contre la fièvre jaune surviennent surtout chez les enfants vaccinés avant l'âge de 4 mois ;
- et enfin la faisabilité du programme.

Chez les enfants infectés par le VIH, le PEV prévoit d'administrer une dose de vaccin rougeole à 6 mois suivie d'une deuxième à 9 mois en raison du risque de rougeole précoce et sévère chez les nourrissons infectés par le VIH. Le BCG et le vaccin contre la fièvre jaune ne sont pas recommandés chez les nourrissons infectés par le VIH et symptomatiques. Les données récentes indiquent un risque accru de BCGite disséminée en cas de SIDA chez les enfants infectés par le VIH ayant reçu le BCG à la naissance. Fort de ces éléments, le Comité Consultatif Mondial de la Sécurité Vaccinale (GACVS) a conseillé à l'OMS de modifier les recommandations afin de contre-indiquer le BCG chez les enfants connus pour être infectés par le VIH, même asymptomatiques (WER, 2007).

I.3.3 Implémentation en routine du PEV dans les PED

Plusieurs études ont montré les difficultés de mise en œuvre du PEV en routine du fait des problèmes logistiques liés à l'approvisionnement et à la conservation des vaccins, des questions liées à la préparation et aux mauvaises techniques d'administration du vaccin ou d'une mauvaise interprétation du calendrier vaccinal. La plupart des vaccins utilisés localement ont des fournisseurs qui varient au gré des procédures d'attribution des marchés publics. Le même vaccin peut être fourni au cours de l'année par différents fabriquants à des périodes différentes.

On observe souvent de faibles couvertures, particulièrement dans les populations d'enfants infectés par le VIH, mal vaccinés en raison des maladies fréquentes survenant chez eux ou chez leurs parents (Setse RW et al, 2006). Les activités supplémentaires de vaccinations (de type journées nationales) se multiplient et deviennent actuellement les leviers principaux, au détriment du PEV de routine, sur lesquels comptent la plupart des pays à ressources limitées pour l'élimination de certaines maladies à prévention vaccinale (Helfand RF et al, 2005).

La dose de rougeole prévue à 6 mois pour les enfants infectés reste peu administrée en routine au Cameroun. De nombreux enfants ne reçoivent pas non plus, la première dose de rappel pour les valences DTCoq et VPO, ni la seconde dose de rattrapage contre la rougeole (Tejiokem MC et al, 2007; Vougmo Meguejio Njua C et al), surtout en raison du coût, car le PEV ne prend pas en charge les vaccinations au-delà de l'âge de un an. Pourtant, dans les pays développés, la plupart des études ont montré l'intérêt de prendre en charge ces doses de rappel pour assurer une protection prolongée des populations (Ramsay ME et al, 1993; Kretsinger K et al, 2006 ; Forsyth KD et al, 2007).

I.3.4 Evaluation de la réponse vaccinale chez les nourrissons

La réponse vaccinale peut être évaluée pour la plupart des antigènes vaccinaux par le dosage des anticorps. Il est admis qu'une personne est protégée contre la maladie due à un type particulier de pathogène lorsqu'elle possède des anticorps spécifiques à une certaine concentration (seuil de protection), fixée soit par l'OMS, soit par le fabricant.

Mais le taux d'anticorps n'est pas le reflet fidèle de l'immunité globale de l'organisme. Certaines personnes vaccinées semblent toujours protégées, même si le taux d'anticorps a diminué ou a disparu, grâce à l'immunité à médiation cellulaire qui joue un rôle dans l'induction d'une immunité protectrice (Galazka A, 1993a). La présence d'anticorps sériques peut aussi signifier que l'individu a déjà rencontré le micro-organisme, en dehors de la vaccination.

Le niveau de protection dépend non seulement de la quantité d'anticorps mesurée mais aussi de leur affinité, de leur classe et de leur capacité à fixer le complément (Cutts F, 1993; Galazka A, 1993a). Enfin, la concentration d'anticorps chez un sujet donné ne reflète pas toujours son degré d'immunisation primaire quand une exposition ultérieure au microorganisme a joué le rôle de rappel (Galazka A, 1993a). Les techniques sérologiques utilisées ne permettant pas de distinguer les anticorps induits par contact avec le microorganisme de ceux induits par la vaccination.

I.3.5 Réponses vaccinales des nourrissons aux vaccins du PEV

Les études sur la question de la réponse vaccinale des enfants infectés par le VIH sont assez discordantes selon les valences vaccinales. Cependant, d'une manière générale, ces études suggèrent fortement que les enfants infectés par le VIH-1, qu'ils soient sous traitement antirétroviral ou non, répondent moins bien aux vaccinations que les enfants non infectés. La réponse vaccinale des enfants infectés par le VIH est liée à l'âge à la vaccination et au statut immunitaire (pourcentage de CD4 et charge virale) (Rousseau MC et al, 1999; Moss WJ et al, 2003; Pancharoen C et al, 2004).

Le rôle de la malnutrition protéino-énergétique sur la réponse aux vaccins du PEV n'est pas très bien connu. Certaines études ont montré que le taux de séroconversion était le même chez les enfants souffrant de malnutrition que bien alimentés, mais les enfants sous alimentés produisent tardivement et à des taux faibles les IgG sécrétoires (Galazka A, 1993a). Selon les recommandations du PEV, il faut vacciner en priorité les enfants sous alimentés car la rougeole entraîne un risque de complications importantes et aggrave l'état nutritionnel.

a) Poliomyélite (vaccin polio oral trivalent – VPO)

- Chez les enfants non infectés par le VIH, une analyse des informations accumulées dans les pays en développement montre que la réponse vaccinale est très variable. Après 3 ou 4 doses de VPO, les taux de séroconversion sont de 73% (de 36 à 99%) pour le sérotype 1, de 90% (de 71 à 100%) pour le sérotype 2 et de 70% (de 40 à 99%) pour le type 3. Certaines études suggèrent que la souche vaccinale de type 2 et d'autres pathogènes entériques interfèrent souvent avec les types 1 et 3, ce qui expliquerait les taux de séroconversion plus faibles pour le sérotype 3 puis pour le sérotype 1 (Robertson S, 1993).

- Chez les enfants infectés par le VIH, une étude menée en République Démocratique du Congo (ex Zaïre) a montré que 97% de 48 enfants vaccinés à moins de 4 mois avaient développé une réponse vaccinale satisafaisante (Ryder RW et al, 1993). Ce résultat, très intéressant, peut être la conséquence de la circulation du virus sauvage dans le pays au moment de l'étude.

b) Diphtérie - tétanos - coqueluche (DTC)

- Chez les enfants non infectés par le VIH, 94 à 100% des enfants présentent une séroconversion pour la diphtérie et le tétanos avec des titres d'anticorps supérieurs à 100 mUI/ml après des trois premières doses du vaccin diphtérie-tétanos-coqueluche (DTC). Mais il existe des différences selon les études en ce qui concerne la durée de l'immunité induite par la primo vaccination pour la diphtérie. Le type de vaccin, le schéma vaccinal et le niveau d'exposition aux corynébactéries peuvent expliquer en partie cette situation (Galazka A, 1993c; Galazka A, 1993b). Dans une étude incluant 221 enfants sénégalais chez qui les vaccins contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite et l'hépatite B avaient été administrés en trois doses à 1 mois d'intervalle à partir de l'âge de 3 à 5 mois, les auteurs ont montré que 86% des enfants présentaient pour la réponse au vaccin contre la coqueluche des titres d'agglutinines supérieurs à 10 (seuil de positivité), quatre mois après la primo vaccination (Relyveld E et al, 1991). Cette protection décroît avec le temps comme l'ont montré dans une autre étude Grimpel *et al*. Chez 360 enfants français ayant reçu quatre doses (primo vaccination et rappel à 18 mois) de diphtérie tétanos coqueluche (germe entier) et testés entre 0,5 et 158 mois après cette série de vaccination les titres d'anticorps contre les différents antigènes *Bordetella pertussis* décroissaient rapidement au cours des 60 premiers mois (Greco D et al, 1996; Grimprel E et al, 1996; Gustafsson L et al, 1996).

- Chez les enfants infectés par le VIH, une revue de la littérature (Rousseau MC et al, 1999; Moss WJ et al, 2003) montre que la proportion des sujets développant des titres d'anticorps protecteurs varie, selon les études, de 40 à 100% pour ces vaccins. L'immunité contre le tétanos est plus proche de celle des enfants non infectés du même âge alors que l'immunité de la diphtérie est beaucoup plus faible (Pancharoen C et al, 2004). En République Démocratique du Congo (ex Zaïre), 96% de 48 enfants infectés par le VIH et âgés de moins de 4 mois avaient développé une réponse aux vaccins contre le tétanos, mais seulement de 71% pour le vaccin contre la diphtérie (Ryder RW et al, 1993). Concernant la coqueluche, une étude en Italie montrait que 75% de 12 enfants âgés de 6 à 107 mois infectés par le VIH1 avaient développé des anticorps à la suite d'une vaccination par un vaccin acellulaire contre la coqueluche, mais avec une moyenne géométrique des titres d'anticorps plus faible que chez les enfants non infectés (de Martino M et al, 1997).

c) Rougeole

- Chez les enfants non infectés par le VIH, les taux de séroconversion se situent entre 80 et 90% après une vaccination réalisée à l'âge de 9 mois. Les anticorps ont été retrouvés 8 à 16 ans après la vaccination chez 85% des sujets même en l'absence d'une nouvelle exposition (Cutts F, 1993).

- Chez les enfants infectés par le VIH, la prévalence des anticorps après la vaccination contre la rougeole chez les enfants infectés par le VIH varie de 17% à 100%, avec une médiane de 60%. Cette large variation de la réponse vaccinale est fonction de l'âge à l'immunisation, du nombre de doses reçues, du test biologique utilisé, du délai depuis la dernière vaccination et du niveau d'immunodépression au moment de la vaccination (Moss WJ et al, 2003). En RDC (ex Zaïre), 65% des 48 enfants avaient des anticorps 3 mois après la vaccination anti-rougeoleuse faite à l'âge de 9 mois. Le temps médian de perte d'anticorps contre la rougeole chez les sujets infectés par le VIH était d'environ 30 mois (al-Attar I et al, 1995).

  Une étude au Brésil chez 21 enfants infectés par le VIH1 et 29 non infectés, âgés de 15 mois à 13 ans, ayant reçu en routine au moins deux doses de vaccin ou au moins une dose de vaccin avant le premier anniversaire, a montré que la proportion d'enfants avec des titres d'anticorps supérieurs ou égaux à 50 mUI/ml (test de neutralisation sur plaques) était de 57% chez les enfants infectés et 100% chez les enfants non infectés (Lindgren-Alves CR et al, 2001).

En Ouganda, une étude incluant 243 enfants infectés et non infectés par le VIH âgés de 17 à 41 mois vaccinés contre la rougeole à l'âge de 9 mois, a montré que la proportion des sujets présentant un titre d'anticorps supérieur ou égal à 15 ELISA UI/ml était de 48% (24/50) chez les sujets infectés et de 63% (121/193) chez les enfants non infectés. La malnutrition était significativement associée à une mauvaise réponse anticorps contre le vaccin antirougeoleux (Waibale P et al, 1999).

Les travaux menés chez des enfants infectés par le VIH sous multithérapies antirétrovirales suggèrent l'intérêt d'une revaccination contre la rougeole et le tétanos après la restauration immunitaire (Melvin AJ et al, 2003; Farquhar C et al, 2009).

I.4 Objectifs de la thèse

Notre travail s'intègre dans le contexte évolutif de l'application des recommandations de l'OMS sur le dépistage de l'infection VIH, le traitement antirétroviral et la vaccination des nourrissons exposés au VIH (WHO, 2008a; WHO, 2010b; WHO et al, 2011).

L'évolution de ces recommandations résulte de la synthèse des connaissances issues d'essais cliniques randomisés ou d'études observationnelles conduits dans les pays développés, mais également de plus en plus souvent, menées dans les pays à forte prévalence.

L'évaluation des difficultés, des contraintes et des aspects positifs de leur mise en œuvre en routine dans les pays à ressources limitées est essentielle pour l'efficacité des programmes et leur appropriation par les utilisateurs.

Nous allons décrire quelques aspects originaux d'un programme de recherche, basé sur une enquête transversale réalisée entre 2004 et 2006 dans des hôpitaux des deux principales villes du Cameroun, Douala et Yaoundé et dans un hôpital de Bangui en République Centrafricaine, et sur une cohorte interventionnelle mise en place à Douala et Yaoundé, à partir de novembre 2007.

Le but est de mettre à la disposition des autorités de ces pays et de la communauté scientifique, des données opérationnelles qui pourront peut-être faciliter le passage à l'échelle de l'application des nouvelles recommandations de l'OMS de prise en charge des nourrissons nés de mères infectées par le VIH.

Nous allons tenter d'apporter, par une approche épidémiologique, des réponses à quelques unes des questions qui se posent actuellement sur la mise en œuvre de ces recommandations.

a) Quelle est la faisabilité du dépistage précoce de l'infection VIH chez les nourrissons nés de mères infectées par le VIH au Cameroun ?

Le dépistage précoce de l'infection VIH chez l'enfant, n'a d'intérêt que si le résultat est rendu au parent ou au tuteur légal, pour initier rapidement la prise en charge médicamenteuse si l'enfant est infecté ou rassurer les parents s'il ne l'est pas. Nous allons :

- décrire l'ensemble du processus de dépistage, depuis la naissance jusqu'au rendu des résultats à la famille
- identifier les facteurs associés à un processus incomplet (absence ou retard à la réalisation du test, retard de rendu du résultat avant l'âge de 6 mois).

b) Quelle est la faisabilité de l'initiation précoce du traitement antirétroviral chez les nourrissons infectés par le VIH au Cameroun ?

Une initiation précoce systématique d'une multithérapie antirétrovirale chez des enfants apparemment en bonne santé peut susciter un refus ou un retard de la part des parents d'enfants concernés, en raison notamment des interrogations et du regard de l'entourage sur le cas d'un enfant recevant un traitement continu bien que ne semblant pas malade. En outre, les difficultés d'administration et des phénomènes d'intolérance peuvent aboutir à un défaut d'observance, l'inefficacité ou l'arrêt des traitements. Très peu de données existent dans le contexte opérationnel des pays à ressources limitées. Nous allons :

- décrire la fréquence et les facteurs associés à une initiation suboptimale du traitement antirétroviral précoce (retard à la mise sous ARV).
- étudier la mortalité au cours de la première année de vie

c) Le niveau de réponse humorale aux vaccins administrés dans le cadre du PEV est-il similaire chez les enfants infectés et enfants non infectés par le VIH ?

Les études réalisées suggèrent fortement une faible réponse humorale chez les enfants infectés par le VIH. Peu d'études ont été réalisées dans le contexte de la pratique de routine du PEV dans les pays à ressources limitées avec leurs particularités (co-infections, malnutrition, difficultés logistiques). Nous allons :

- comparer les niveaux de persistance d'anticorps post-vaccinaux chez les enfants infectés et non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH à distance de la vaccination.
- rechercher les facteurs associés à une persistance inadéquate des anticorps post-vaccinaux selon chaque antigène vaccinal.

Ces trois questions seront abordées dans les chapitres III à V, en adoptant un plan commun comportant : une présentation succincte des méthodes utilisées, les principaux résultats, la discussion et la conclusion en renvoyant pour certains détails aux publications en annexe.

Le chapitre VI, portera sur une discussion générale mettant en rapport nos résultats avec la littérature scientifique afin de tirer si possible les leçons qui s'imposent et d'ouvrir des perspectives. Nous situerons les résultats de notre travail par rapport à l'état des connaissances et aux questions qui nous restent à étudier en vue de faciliter l'accès universel aux traitements antirétroviraux des nourrissons et enfants infectés par le VIH.

Chapitre II : Sources de données

Les données utilisées dans cette thèse ont été collectées dans le cadre de deux études : ACIP-EPIPEV et ANRS 12140-PEDIACAM.

L'étude ACIP-EPIPEV, financée par les Actions Concertées Inter-Pasteuriennes (ACIP) entre 2004 et 2006, portait sur la réponse aux vaccins du PEV des enfants âgés de 18 à 36 mois infectés par le VIH ou non et nés de mères séropositives pour le VIH.

Les résultats obtenus suite à cette étude ont soulevé des questions dont certaines ont été prises en compte dans l'élaboration de l'étude ANRS-PEDIACAM. En particulier, la constitution d'un groupe témoin d'enfants nés de mères séronégatives pour le VIH, le suivi des enfants dès la naissance et la prise en compte des traitements antirétroviraux précoces qui vont certainement améliorer l'espérance de vie des enfants infectés et justifier plus encore d'évaluer la réponse vaccinale. L'étude ANRS-PEDIACAM est en cours et est financée par l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). Elle associe aux questions précédentes, l'évaluation de l'accès précoce aux antirétroviraux des nourrissons infectés par le VIH.

II.1 Mon implication dans les projets de recherche

J'ai assuré dans les deux études susmentionnées un rôle de coordination. D'abord Coordinateur au Cameroun de l'étude ACIP-EPIPEV, avec le Docteur Ionela Ngouandika (Institut Pasteur de Bangui) et le Docteur Laurence Baril (Institut Pasteur de Paris), Je suis actuellement Coordinateur Sud de l'étude ANRS-PEDIACAM avec Professeur Albert FAYE, Coordinateur Nord (Hôpital Robert Debré, Paris).

Sur le plan pratique, j'ai participé aux différentes étapes du processus de préparation des protocoles de ces études. Ensuite, je me suis chargé de la mise en place, du suivi et de la valorisation.

Concernant la mise en place, j'ai assuré toutes les démarches nécessaires pour l'obtention des autorisations réglementaires (autorisation du Comité National d'Ethique du Cameroun, l'autorisation administrative du Ministère de la Santé Publique pour le démarrage des recherches et l'avis des associations des personnes vivant avec le VIH). Puis, j'ai mené les contacts avec les administrations des différents hôpitaux participants pour le lancement des activités. Enfin, j'ai préparé les procédures de mise en place et de suivi du projet, participé à la conception des cahiers d'observation et au recrutement du personnel dédié à l'activité de recherche, à la commande du matériel et des équipements.

Pour le suivi des activités, je suis chargé régulièrement de l'organisation et de la conduite :

- des visites de supervision dans les sites participants afin de s'assurer du respect des procédures dans le déroulement des activités
- des réunions entre différentes équipes impliquées et le Promoteur pour faire le point sur l'avancement des activités et veiller au respect des objectifs (réunions téléphoniques mensuelles, réunions trimestrielles du comité de pilotage, réunions annuelles du comité scientifique)
- la gestion du personnel dédié

Par rapport à la valorisation, j'assure la vérification de la qualité des données, les analyses statistiques et la préparation des drafts d'articles et de communications. Ces derniers sont ensuite envoyés aux partenaires pour recueillir les différentes contributions afin de finaliser le document et procéder à sa soumission.

Enfin, je m'assure toujours que les résultats de nos recherches sont discutés avec les autorités de santé en vue de faciliter le processus d'appropriation et de vulgarisation.

II.2 Etude ACIP-EPIPEV : Comparaison de la réponse aux vaccins utilisés dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) chez les enfants infectés et non infectés par le VIH-1 en Afrique sub-saharienne

II.2.1 Objectifs

L'objectif principal était d'évaluer le rôle de l'infection VIH par transmission verticale sur la réponse aux vaccins utilisés dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) chez les enfants âgés de 18 à 36 mois vivant au Cameroun et en République Centrafricaine (RCA). Il s'agissait plus spécifiquement de :

- Quantifier et comparer la persistance des anticorps aux vaccins du PEV (vaccin contre la poliomyélite, la diphtérie, le tétanos, la coqueluche et la rougeole) chez les enfants infectés et non infectés par le VIH.
- Etudier l'influence des caractéristiques cliniques et biologiques des enfants sur la relation entre l'infection VIH-1 et la réponse des enfants aux vaccins utilisés dans le PEV.

II.2.2 Schéma de l'étude

Il s'agissait d'une étude transversale multicentrique portant sur deux groupes d'enfants nés de mères séropositives pour le VIH. Ces enfants étaient inclus et suivis dans quatre structures hospitalières au Cameroun : le Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya (CME-FCB), le Centre d'Animation et d'Action Sanitaire et Sociale (CASS), le Centre Hospitalier d'Essos (CHE) à Yaoundé et l'Hôpital Laquintinie à Douala (HLD) et dans un site en République Centrafricaine : le Centre Hospitalier National et Universitaire - Hôpital Pédiatrique à Bangui. L'ensemble a été conduit, sous la coordination du Centre Pasteur du Cameroun, de l'Institut Pasteur de Bangui et de l'Institut Pasteur de Paris.

II.2.2.1 Critères d'inclusion

- Enfants nés de mères séropositives pour le VIH, nés à terme (≥37 semaines de grossesse), âgés de 18 à 36 mois et non allaités depuis 6 mois ou plus au moment de l'inclusion dans l'étude.
- infectés (Groupe 1) ou non infectés (Groupe 2) par le VIH-1, sur la base d'une sérologie VIH réalisée à partir du 15^{e} mois de vie.
- ayant reçu, avant l'âge d'un an, au moins 3 doses de vaccins contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite (vaccin oral) et le vaccin rougeole, certifiés par le carnet de vaccination,

- consentement écrit par l'un des parents ou le représentant légal.

Les enfants ayant reçus une corticothérapie, une transfusion sanguine ou des immunoglobulines dans les 3 mois précédant la proposition de participation à l'étude n'étaient pas inclus (Figure II-1).

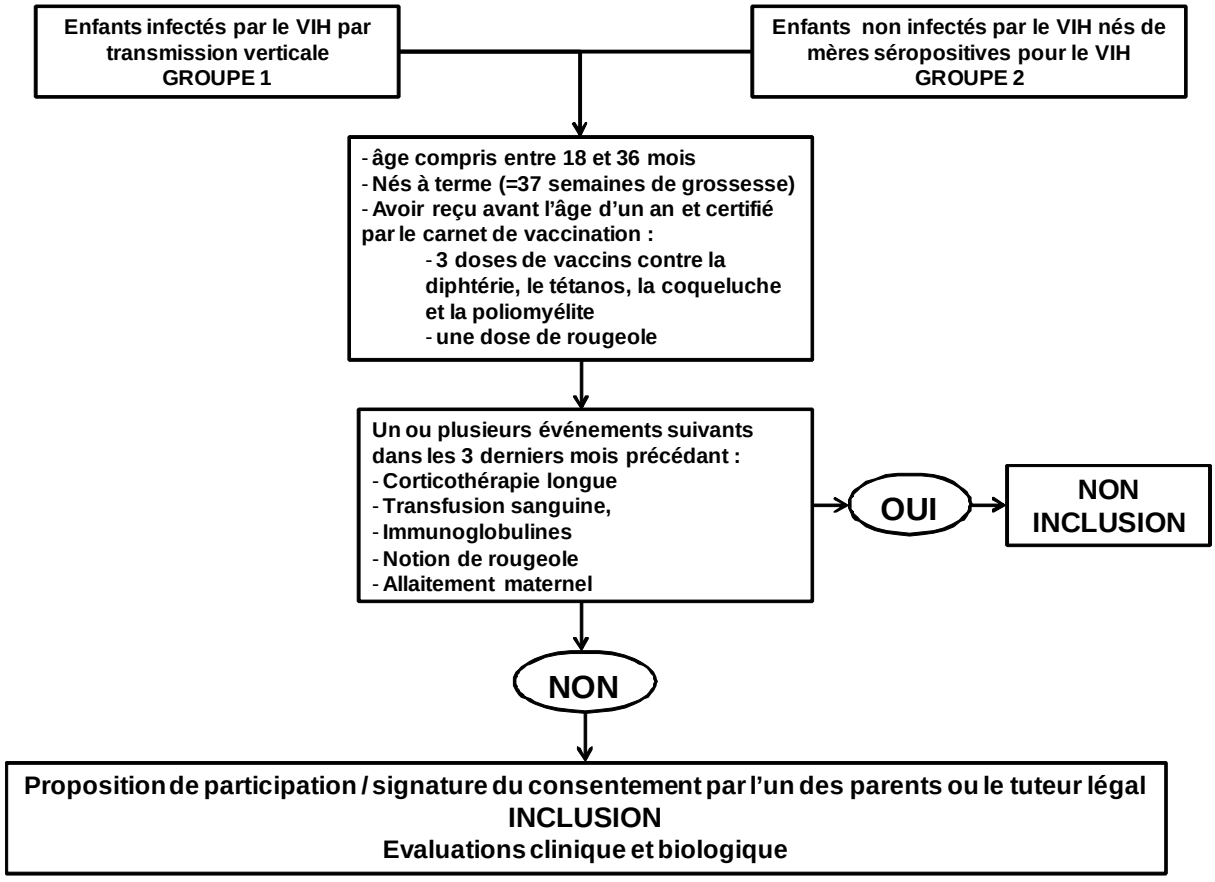


Figure II-1 : inclusion d'enfants dans EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA

II.2.2.2 Origine des vaccins utilisés dans le PEV au Cameroun et en RCA

L'approvisionnement en vaccins dans les Programmes de vaccination au Cameroun et en RCA répond aux procédures des « marchés publics » avec de nombreux fournisseurs qui interviennent dans le domaine. Les enfants concernés par cette étude ont été vaccinés entre 2002 et 2004. A cette époque, les principaux fournisseurs de vaccins aux Programmes des deux pays étaient :

- **Serum Institute of India et Aventis Pasteur** : le vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche
- **Chiron vaccines Sienna Italy et Aventis Pasteur** : le vaccin polio oral trivalent

- **Serum Institute of India** : le vaccin contre la rougeole

II.2.3 Recueil des données

Un questionnaire standardisé a été administré à tous les parents ou tuteurs d'enfants répondant aux critères d'inclusion par le médecin. Les enfants ont été examinés pour compléter les données sociodémographiques, les antécédents familiaux de maladie à prévention vaccinale, les paramètres anthropométriques, les symptômes et signes cliniques et les traitements en cours au moment de l'inclusion des enfants dans l'étude. Ensuite, un prélèvement sanguin unique (d'environ 10 ml chez les enfants infectés par le VIH et 7 ml chez les enfants non infectés) a été effectué et transmis après étiquetage anonyme aux laboratoires des Instituts Pasteur pour les analyses biologiques prévues dans le cadre de l'étude. A ce niveau, les aliquots ont été systématiquement fait pour le titrage des anticorps contre les différents antigènes du PEV et conservés à -20℃.

II.2.4 Evaluation de la réponse humorale aux vaccins du PEV

Le titrage des anticorps contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite (types 1, 2 et 3) et la rougeole a été effectué localement dans chacun des sites coordinateurs (Centre Pasteur du Cameroun et Institut Pasteur de Bangui). Une partie des sérums a été envoyé au Centre National de Référence de la coqueluche et autres Bordetelloses à l'Institut Pasteur de Paris pour la recherche des anticorps contre la coqueluche. Tous les échantillons ont été testés en duplicates et le résultat était la moyenne des deux déterminations. Les seuils de séropositivité choisis pour chaque antigène vaccinal comme seuil de protection correspondaient à ceux fournis par le fabricant du kit ou par l'OMS. La réponse vaccinale a été considérée comme adéquate si elle était égale ou supérieure à ce seuil, inadéquate si elle était sous ce seuil.

Diphtérie et tétanos

Les anticorps contre la diphtérie et le tétanos ont été mesurés en utilisant un test ELISA (Diphtheria ELISA IgG test kit et Tetanus ELISA IgG-Genzyme Virotech, Rüsselsheim, Germany). Les sérums avec un titre d'anticorps ≥100 mUI/ml ont été considérés comme positifs, c'est-à-dire conférant une protection immunitaire.

Coqueluche

Deux types d'anticorps ont été analysés :

- Les agglutinines (AGG) détectées par la technique de microagglutination classique. Ce sont des anticorps agglutinant les bactéries. Ces agglutinines regroupent les anticorps

contre les fimbrae, la pertactine et autres autotransporteurs. Les résultats positifs ont été définis par les valeurs égales ou supérieures à la valeur de la 1ère dilution testée (1/20 dilution). Les titres positifs ont été considérés comme les signes d'une infection en l'absence d'une dose de rappel entre les deux dernières années avant le prélèvement.

- Les anticorps contre la toxine pertussique (TP), spécifique à B. pertussis (Simondon F et al, 1998) détectés par une technique ELISA. Le sérum était considéré positif si le taux d'anticorps était supérieur à 25 EU/ml. Ces anticorps anti-TP ne persistent pas plus de 2 ans après administration du vaccin à germe entier de la coqueluche. De plus, les titres d'anticorps anti-TP>100EU/ml ont été considérés comme prédictif d'une récente infection avec B. pertussis, en l'absence d'une dose de rappel faite dans les deux ans avant la collecte de l'échantillon analysé (Edwards KM et al, 2004).

Rougeole

Les anticorps contre le vaccin de la rougeole ont été initialement mesurés à l'aide d'un kit commercial ELISA (Enzygnost Anti-measles virus/IgG, Dade Behring, Marburg, Germany) dans lequel les plaques sont cotées avec le virus rougeoleux inactivé (Scott S et al, 2005). L'antisérum de référence contre la rougeole (code #92/648, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Hertfordshire, UK) a été utilisé pour calibrer l'analyse. Les résultats étaient classés comme négatif ($\Delta OD < 100$ mUI/ml) ou équivoque ($100 \leq \Delta OD \leq 335$ mUI/ml) ou positif ($\Delta OD > 335$ mUI/ml). Parce que le pourcentage des échantillons positifs était faible dans les deux groupes avec cette technique (16,0% et 62,3% d'enfants infectés par le VIH et non infectés par le VIH, respectivement), tous les échantillons ont été re-testés en utilisant un autre test (Measles IgG capture EIA, Microimmune Ldt, Brentford, UK) (Cohen BJ et al, 2006). Ce test qualitatif a été réalisé par le laboratoire de virologie du CHU de Caen, laboratoire associé au Centre National de référence de la rougeole. Brièvement, les plaques étaient cotées avec les anti-IgG humain et une nucléoproteine récombinante avec l'antigène rougeole a été utilisée pour détecter les anticorps spécifiques contre la rougeole. Les sérums ont été considérés positifs aux IgG contre la rougeole si la DO était 1,25 fois plus élevé que la moyenne des DO des 3 puits de contrôle négatifs.

Poliomyélite

Les titres d'anticorps neutralisants contre chaque type de poliovirus ont été mesurés en utilisant un test de séroneutralisation basé sur une procédure recommandée par l'OMS (WHO/EPI, 1997). La puissance du sérum de référence maison (identique dans les deux sites) a été testée en parallèle avec le 2e réactif international de référence pour les virus vivants atténués (code #66/202, NIBSC) afin que le résultat puisse être converti en unités

internationales (UI). Les dilutions en double du sérum allant de 1/8 à 1/1024 ont été incubées. Le titre d'anticorps neutralisant était la dernière dilution du sérum qui avait protégé 50% des cellules en culture. La détection d'anticorps à la dilution 1:8 était considérée positive pour le sérotype de poliovirus (équivalent de 0,6 UI pour poliovirus 1, 1,1 UI pour poliovirus 2 et 0,3 UI pour poliovirus 3). La moyenne géométrique des titres de chaque type de poliovirus était calculée en UI pour tous les échantillons.

II.2.5 Autres analyses biologiques

Les analyses biochimiques (transaminases, amylasémie et protidémie), charge virale et numération des lymphocytes TCD4, TCD8 et TCD3 ont été réalisées. En dehors des résultats de la sérologie vaccinale, tous les autres résultats biologiques ont été directement rendus aux cliniciens pour la prise en charge des enfants prélevés à l'inclusion.

II.2.6 Estimation de la taille des groupes

L'hypothèse initiale était basée sur un pourcentage de réponse adéquate (au-dessus du seuil de protection attendu pour chaque valence) chez les enfants nés de mères séropositives de : 95% chez les enfants non infectés et 70% chez les enfants infectés. Un ajustement de Bonferroni a été effectué afin de tenir compte des tests multiples (n = 6, alpha = 0,05/6 = 0,008). Avec un risque alpha = 0,008, une puissance à 80%, et un test bilatéral, il fallait inclure 63 enfants par groupes.

II.2.7 Nombre de sujets inclus dans l'étude ACIP-EPIPEV

Au total, 177 enfants étaient éligibles, parmi lesquels 129 ont été inclus entre novembre 2004 et Mai 2005 : 51 enfants infectés par le VIH (groupe 1) et 78 non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH (groupe 2) (Figure II-2). La puissance recalculée sur les hypothèses initiales de 95% et 70% est un peu plus faible que prévu : 76%.

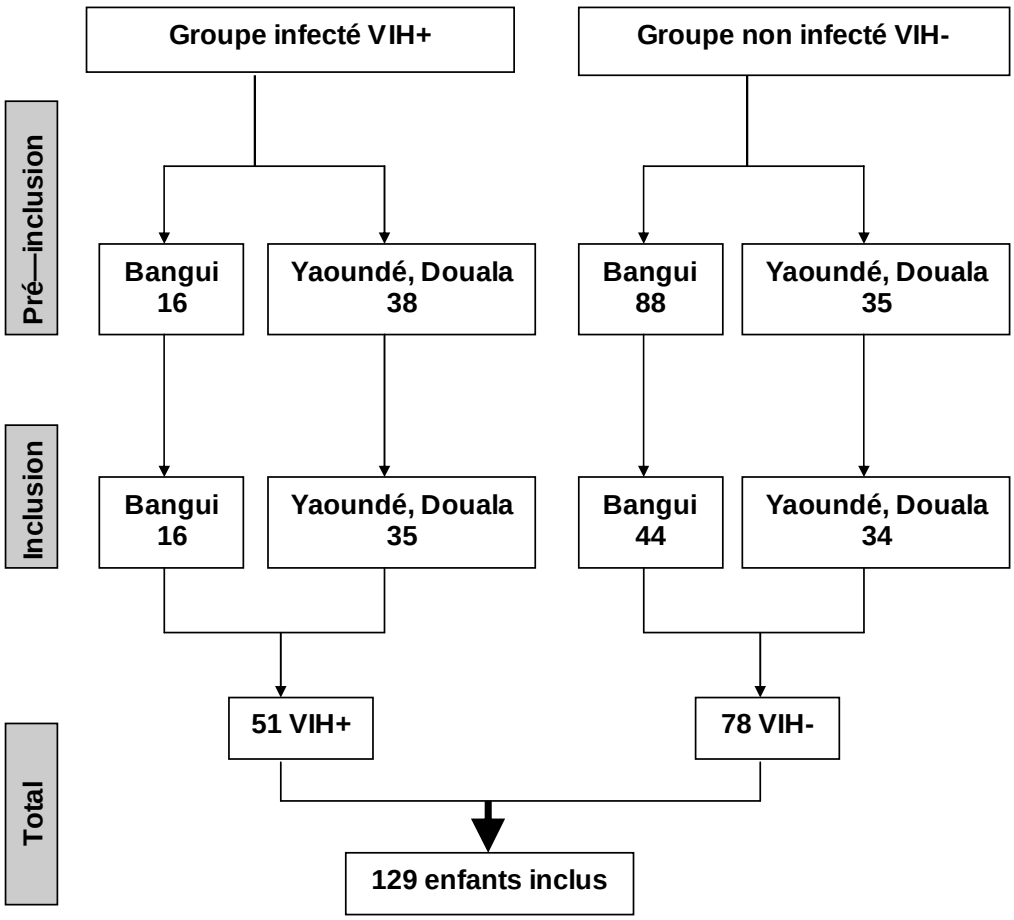


Figure II-2 : Diagramme décrivant l'inclusion d'enfants, EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA

II.3 Etude ANRS 12140-PEDIACAM : Impact des multithérapies antirétrovirales et du PEV sur l'évolution des nourrissons infectés par le VIH suivis au Cameroun

II.3.1 Objectifs

- Evaluer la faisabilité des multithérapies antirétrovirales précoces chez les nourrissons infectés par le VIH au Cameroun diagnostiqués avant l'âge de 7 mois
- Evaluer la réponse de ces nourrissons aux vaccins du Programme Elargi de Vaccination (PEV).

II.3.2 Schéma de l'étude

Il s'agit d'une étude de cohorte prospective interventionnelle d'enfants nés de mères séropositives et séronégatives pour le VIH suivis jusqu'à l'âge de 5 ans, constitués de deux groupes d'enfants infectés (suivis depuis la naissance ou suivis depuis un diagnostic de l'infection VIH effectué avant l'âge de 7 mois), et de deux groupes témoins d'enfants non infectés suivis depuis la naissance (nés de mères séropositives ou nés de mères séronégatives pour le VIH).

Cette étude associe plusieurs institutions hospitalières et de recherche (**Figure II-3**) :

- Au Cameroun : le Centre Pasteur du Cameroun (CPC), le Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya (CME-FCB), le Centre Hospitalier d'Essos (CHE) à Yaoundé et l'Hôpital Laquintinie de Douala (HLD). Ces structures reçoivent par le système de référence, les enfants infectés par le VIH ou très sévèrement malades identifiés dans les structures sanitaires satellites.
- En France, y participent les équipes de l'Institut Pasteur de Paris et quelques investigateurs de l'Enquête Pédiatrique Française (EPF) dont l'appui porte sur les volets virologique, immunologique, méthodologique et clinique.

L'organisation et les interactions entre les différentes équipes ont été mises en place dans le cadre d'autres projets de recherche (*Programme Pilote de Santé Publique (PPSP) de réduction de la TME du VIH (2000-2004)*, sur un financement de la Fondation Glaxo Smith Kline et projet sur la c*omparaison de la réponse aux vaccins utilisés dans le programme élargi de vaccination chez les enfants infectés et non infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (2004-2006),* sur un financement des Actions Concertées Inter Pasteuriennes*)* mais aussi de la collaboration inter-hospitalière (Programme ESTHER entre

l'Hôpital Robert Debré, Paris et l'Hôpital Laquintinie à Douala et l'Hôpital Armand Trousseau, Paris et le CME-FCB et le CHE à Yaoundé).

II.3.2.1 Inclusions et suivi des nourrissons

L'étude comporte deux phases (Figure II-4):

Phase I : de la première semaine de vie à l'âge de 14 semaines

- **Nourrissons exposés au VIH :** Tous les enfants nés de mères séropositives pour le VIH dans les maternités des sites participants ou reçus dans leurs services de pédiatrie avant l'âge de 7 jours étaient éligibles. Pour être inclus, les parents devaient signer le consentement de participation à la phase I de l'étude.
- **Nourrissons non exposés au VIH :** A chaque nourrisson nés de mères séropositives inclus, était apparié un nourrisson né de mère séronégative pour le VIH (en tenant compte du site de l'étude et du sexe de l'enfant) identifié parmi les accouchements suivant celui de la mère séropositive pour le VIH ou parmi les nouveau-nés reçus en consultation pédiatrique.

Ces paires de nourrissons étaient suivies jusqu'à l'âge de 14 semaines et recevaient les vaccins prévus selon le calendrier national du PEV de routine au Cameroun : une dose de vaccin BCG et de vaccin polio oral (VPO) à la naissance, trois doses de vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (germe entier) (DTCoq), de VPO, de vaccin contre hépatite B (HB) et contre *Haemophilus influenzae* sérotype b à 6, 10 et 14 semaines.

Les nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH bénéficiaient d'un test de dépistage du VIH précoce réalisé par PCR à 6 semaines et les résultats étaient disponibles au cours de la visite suivante. Les parents de nourrissons présentant un résultat positif ou douteux recevaient très rapidement un appel téléphonique afin de déclencher le processus de prise en charge et/ou de confirmation du précédent résultat. Les enfants allaités disposant d'un premier résultat négatif étaient également prélevés 6 semaines après le sevrage afin de confirmer ou non le résultat du premier test VIH.

Phase II : suivi prolongé jusqu'à l'âge de 5 ans

L'inclusion dans cette phase portait, d'une part, sur une partie des enfants infectés et non infectés inclus en phase I, et, d'autre part, sur un groupe d'enfants infectés non inclus en phase I, mais diagnostiqués pour le VIH avant l'âge de 7 mois

Parmi les enfants inclus en phase I, les enfants éligibles pour le suivi prolongé à partir de 14 semaines étaient :

- **Tous les enfants infectés par le VIH :** si leurs parents acceptaient de signer le consentement de participation pour le suivi prolongé dans cette étude.
- **un sous-échantillon d'enfants non infectés nés de mères séropositives**, sélectionnés par une procédure d'appariement de fréquence, basée sur les mêmes caractéristiques qu'à la phase I, de manière à obtenir un nombre à peu près équivalent au nombre d'enfants infectés
- **un sous-échantillon d'enfants nés de mères séronégatives**, sélectionnés par la même procédure d'appariement de fréquence pour le groupe précédent, de manière à obtenir un nombre à peu près équivalent au nombre d'enfants infectés

En outre, tout enfant diagnostiqué pour le VIH avant l'âge de 7 mois, dans les trois hôpitaux participant à Pediacam pendant la même période, quel que soit le motif de diagnostic, était éligible pour être inclus dans le suivi prolongé jusqu'à 5 ans, sous réserve du consentement parental.

Le Centre de Coordination de l'étude recherchait régulièrement les enfants non revenus aux différentes visites et procédait, avec les cliniciens, aux relances téléphoniques. Certains bénéfices étaient proposés aux familles de nourrissons pour leur participation à l'étude, comme la gratuité des consultations médicales et des analyses biologiques non directement liées à l'étude, la fourniture des vaccins recommandés mais non intégrés dans le PEV, le remboursement des frais de transport et l'appui en lait artificiel pour les familles ayant choisi ce type d'alimentation pour leur enfant.

II.3.2.2 Méthode de détermination du statut VIH des nourrissons en phase I

Sur les sites de Yaoundé, le sang total était recueilli dans un tube EDTA avant d'être transféré au laboratoire de virologie du CPC. Les échantillons étaient testés par PCR en temps réel (Biocentric HIV charge virale) utilisant la méthode de Taqman selon une technique maison validée par l'ANRS. Sur le site de Douala, les prélèvements de sang ont été recueillis sur des papiers filtres (Dried Blood Spot-DBS) selon la procédure standard décrite et transférée au laboratoire du Programme National de Lutte contre le VIH à Mutengene. Plus tard et pour réduire les délais entre les prélèvements et le rendus des résultats, un échantillon de DBS a été envoyé au CPC à Yaoundé où le test Biocentric a été utilisé pour la recherche de l'ADN proviral. Tous les échantillons étaient également passés en sérotypie afin de déterminer le groupe du VIH.

II.3.2.3 Description de l'intervention

Un traitement antirétroviral était proposé systématiquement à tous les nourrissons infectés. En première ligne, ce traitement comportait :

- **En cas de non exposition de l'enfant aux antirétroviraux pendant la grossesse, à l'accouchement ou en post partum ou exposition aux ARV n'est pas connue : d**eux inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase inverse (INTI) et un inhibiteur non nucléosidique de la reverse transcriptase inverse (INNTI) en accord avec les recommandations nationales camerounaises sur l'utilisation de la thérapie antirétrovirale : AZT (Zidovudine) ou D4T (Stavudine) si anémie avec un taux d'hémoglobine < 10g/dL pendant les premières semaines jusqu'à correction de l'anémie puis switch AZT) **+** 3TC (Lamivudine) **+** NVP (Névirapine)
- **En cas d'exposition de l'enfant à la névirapine ou à tout autre INNTI, pris par la mère ou le nourrisson dans le cadre d'un traitement pour la mère ou de la PTME :** un inhibiteur de la protéase (lopinavir/ritonavir) à la place de l'inhibiteur non nucléosidique de la reverse transcriptase.

Les vaccins du PEV ont été planifié pour tous les nourrissons inclus selon le calendrier vaccinal national du Cameroun complété par les vaccins DTCoq, VPO, conjugués contre l'*Haemophilus influenzae de type b* et hépatite B (rappels), des vaccins Rougeole-Oreillons-Rubéole, Meningo AC, Pneumo 23, typhim selon le calendrier joint en annexe (

Tableau I-1; Tableau VIII-5, annexe 1).

Ces interventions étaient gratuites pour les nourrissons inclus dans l'étude Pediacam. Les traitements antirétroviraux fournis gratuitement par le Gouvernement de la République du Cameroun avec l'aide des bailleurs de fonds et les vaccins financés par l'ANRS. A côté de cette intervention, a été également développé grâce au financement de la Fondation TOTAL, d'autres actions (appui en alimentation, en analyses biologiques, médicaments essentiels, vaccins et construction des structures d'accueil) pour les nourrissons infectés par le VIH suivis dans les sites de l'étude Pediacam mais non inclus dans l'activité de recherche. Ce qui a énormément facilité et redynamisé la routine de la prise en charge des enfants infectés dans ces sites.

II.3.3 Recueil des données

Les questionnaires standardisés ont été remplis par les médecins, avec l'aide de technicien d'études cliniques, et monitorés si besoin par l'équipe coordinatrice.

A l'inclusion du nourrisson dans la phase I de l'étude, les données portaient sur : la mère (âge, profession, statut marital, statut VIH de la mère et date de dépistage, antécédents médico-chirurgicaux et obstétricaux), les conditions de l'accouchement (date et heure d'accouchement, terme de la grossesse, mode d'accouchement, les traitements prophylactiques de TME déjà reçus, les traitements ARV en cours si applicables, les complications de la grossesse et de l'accouchement, les suites de couches), le père, si possible (séropositivité connue, âge, profession, niveau d'éducation, connaissance du statut de la mère), l'état clinique de l'enfant à la naissance (APGAR), le sexe, le poids de naissance et le mode d'allaitement.

Au cours des visites prévues à l'âge de 6, 10 et 14 semaines, tous les parents (ou tuteurs légaux) de nourrissons ont également répondu aux questions contenues dans une fiche simplifiée standardisée comportant les informations sur le statut vital, l'histoire des pathologies survenues depuis la dernière visite, les vaccins reçus depuis la dernière visite et le mode d'alimentation du nourrissons

A l'inclusion en phase II de l'étude, tous les nourrissons, infectés et non infectés, ont été examinés cliniquement et ont bénéficié d'un bilan biologique. A chaque visite les informations sur l'environnement de l'enfant (familial ou autre), le mode d'allaitement, le récapitulatif de toutes les pathologies, hospitalisations, traitements, et vaccinations survenues entre deux visites reçues depuis la dernière visite, la recherche des effets secondaires des traitements (attendus ou non), l'observance selon le questionnaire simplifié, l'évaluation de l'état clinique et des paramètres anthropométriques, le récapitulatif des analyses biologiques réalisées et les traitements antirétroviraux (ARV) et préventifs des infections opportunistes prescrits, les motifs d'arrêt, de changement ou d'adaptation de doses.

II.3.4 Bilans biologiques

Les prélèvements biologiques ont été effectués sur site, chez chaque enfant selon le calendrier des visites (Figure VIII-1, annexe 3). Les analyses ont été réalisées au CPC pour les sites de Yaoundé et pour le site de Douala, essentiellement à l'Hôpital Laquintinie. Les résultats étaient rendus aux cliniciens pour la prise en charge des enfants. D'autres analyses ont été regroupées afin de programmer des manipulations en différé comme les sérologies vaccinales. Les analyses biologiques prévues :

- Hématologie : Numération Formule Sanguine (NFS), diagnostic du paludisme par goutte épaisse (GE)
- Biochimie : ALAT (SGOT), ASAT (SGTP), Glycémie à jeun, amylasémie, bilan lipidique (cholestérol total, cholestérol HDL, triglycérides), créatininémie ;

- Immunologie : Numération lymphocytaire (CD3, CD4, CD8) ;
- Virologie : charge virale (CV), test de résistance HIV si nécessaire, Hépatites B, CMV ;
- Parasitologie : examen direct des selles ;
- Sérologie PEV: diphtérie, tétanos, coqueluche, rougeole, hépatite B (HB), *Haemophilus influenzae* de type b (ActHib)

D'autres analyses, non directement liées à l'étude et nécessaires pour la prise en charge de l'enfant étaient également pris en charge à la demande des investigateurs.

Un bilan biologique était prévu à l'inclusion pour tous les nourrissons inclus en phase II. Ensuite tous les 3 mois jusqu'à l'âge de 2 ans et enfin tous les 6 mois jusqu'à l'âge de 5 ans pour les enfants infectés par le VIH. Chez les enfants non infectés par le VIH, le bilan était réalisé tous les 6 mois jusqu'à l'âge de 5 ans. Au cours du premier mois suivant la mise en route du traitement antirétroviral, un bilan biologique (NFS, Transaminases, amylase) devait être réalisé tous les quinze jours afin d'évaluer la tolérance des traitements.

II.3.5 Effectif attendu dans l'étude ANRS-PEDIACAM

Au regard des données historiques des centres de recrutement, on s'attendait à inclure 2000 naissances d'enfants de mères séropositives sur une période de 2 ans (éligibles pour la phase I d'inclusion). Parmi ces enfants, on s'attendait à observer 100 enfants infectés par TME (tous éligibles pour la phase II), en se basant sur l'hypothèse d'un taux de transmission compris entre 5 et 10% (selon les estimations pré-étude dans une population de femmes traitées par bithérapie AZT + Névirapine pendant la grossesse). Il était donc prévu de sélectionner 100 enfants non infectés (avec un appariement de fréquence) pour la phase II (voir annexes 2). Enfin, nous avions prévu d'inclure 2000 nourrissons nés de mères séronégatives, dont 100 selon sélectionnés selon la même procédure que ci-dessus et suivis pour une période prolongée (en phase II).

Par ailleurs, nous avons estimé que 40 enfants infectés seraient recrutés directement en phase II (à l'occasion du diagnostic de VIH avant l'âge de 7 mois), pendant la même période, en se basant sur une revue des files actives de l'année précédant l'étude.

II.3.6 Nombre de sujets inclus et calendrier de l'étude

L'étude ANRS-PEDIACAM a démarré en novembre 2007. Les recrutements sont terminés mais le suivi se poursuit (Figure II-4). Au total, 2050 nourrissons nés de mères séropositives et 2050 nourrissons nés de mères séronégatives pour le VIH ont été inclus en phase I à la date du 30 juin 2012, fin des inclusions (Figure II-5 ; Figure II-6). Le suivi et les sélections (annexe 2) selon le protocole ont permis d'inclure 611 enfants en phase II, répartis comme suit :

- Enfants infectés par le VIH suivis depuis la naissance (n=69)
- Enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH (n=205)
- Enfants non infectés nés de mères séronégatives pour le VIH (n=196)
- Enfants infectés par le VIH non suivis depuis la naissance mais diagnostiqués avant l'âge de 7 mois (n=141)

Le pourcentage de nourrissons nés de mères séropositives éligibles et non inclus en phase I a été estimé à 18,4% sur la base des estimations effectuées entre novembre 2007 et juin 2010. Au cours de cette période, 23 622 accouchements ont été enregistrés dans les trois maternités des sites impliqués dans Pediacam dont 1743 accouchements de mères infectées par le VIH. Parmi elles, 1422 ont accepté de participer à l'étude (Figure II-5).

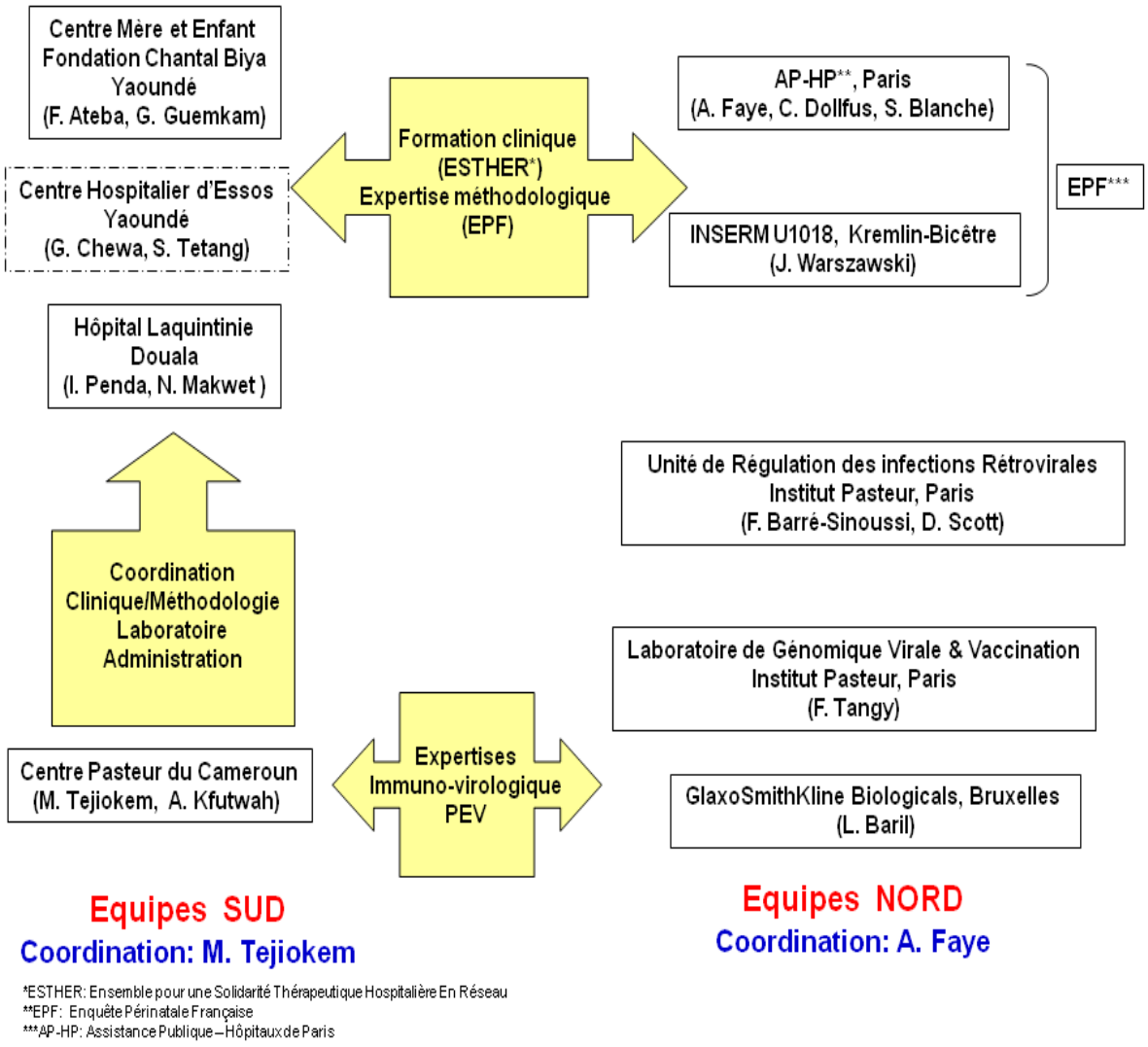


Figure II-3 : Interactions entre les différentes équipes impliquées dans l'étude ANRS-PEDIACAM

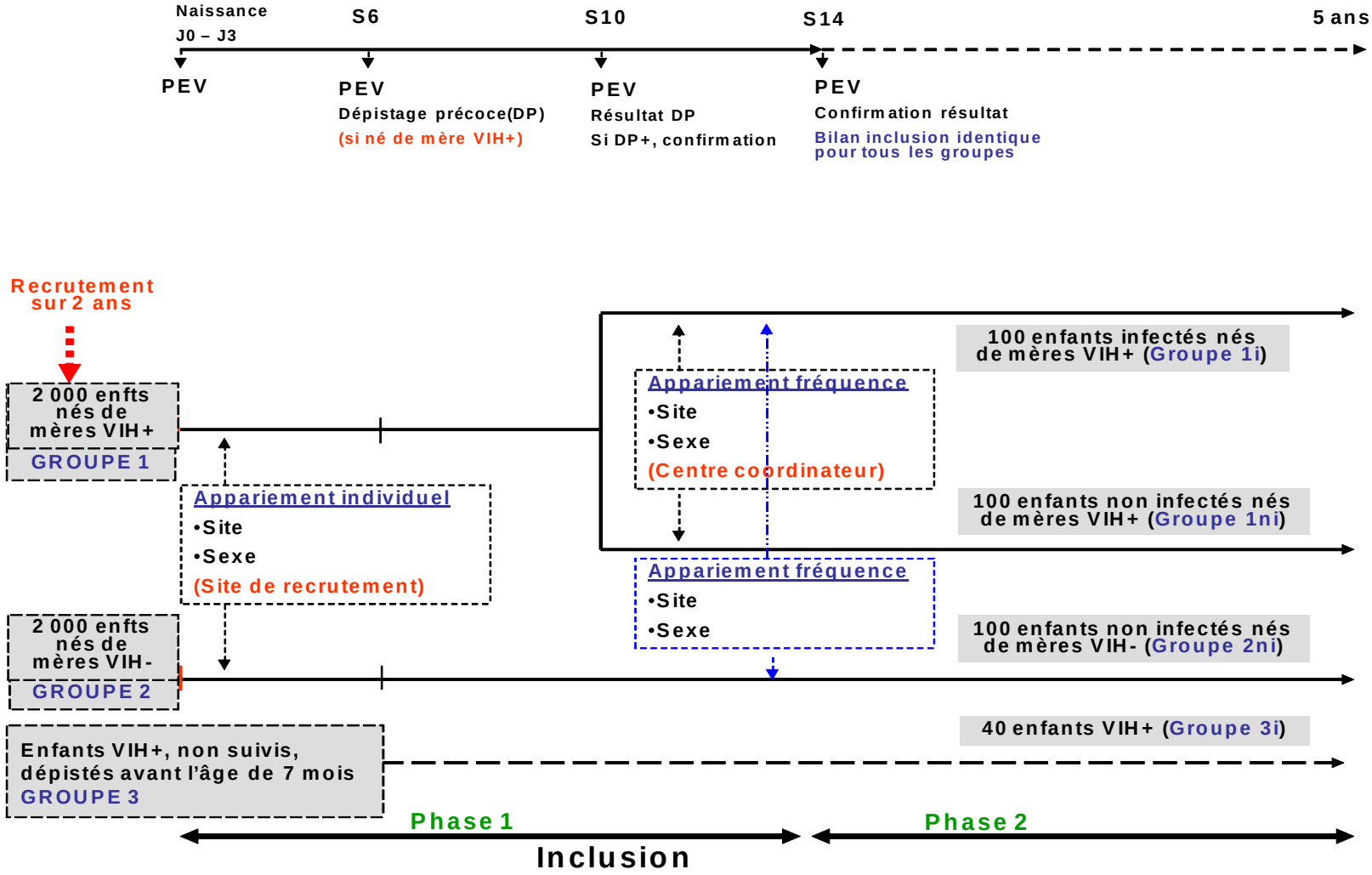


Figure II-4 : Inclusion des enfants dans l'étude ANRS-PEDIACAM (2007-2010), Cameroun

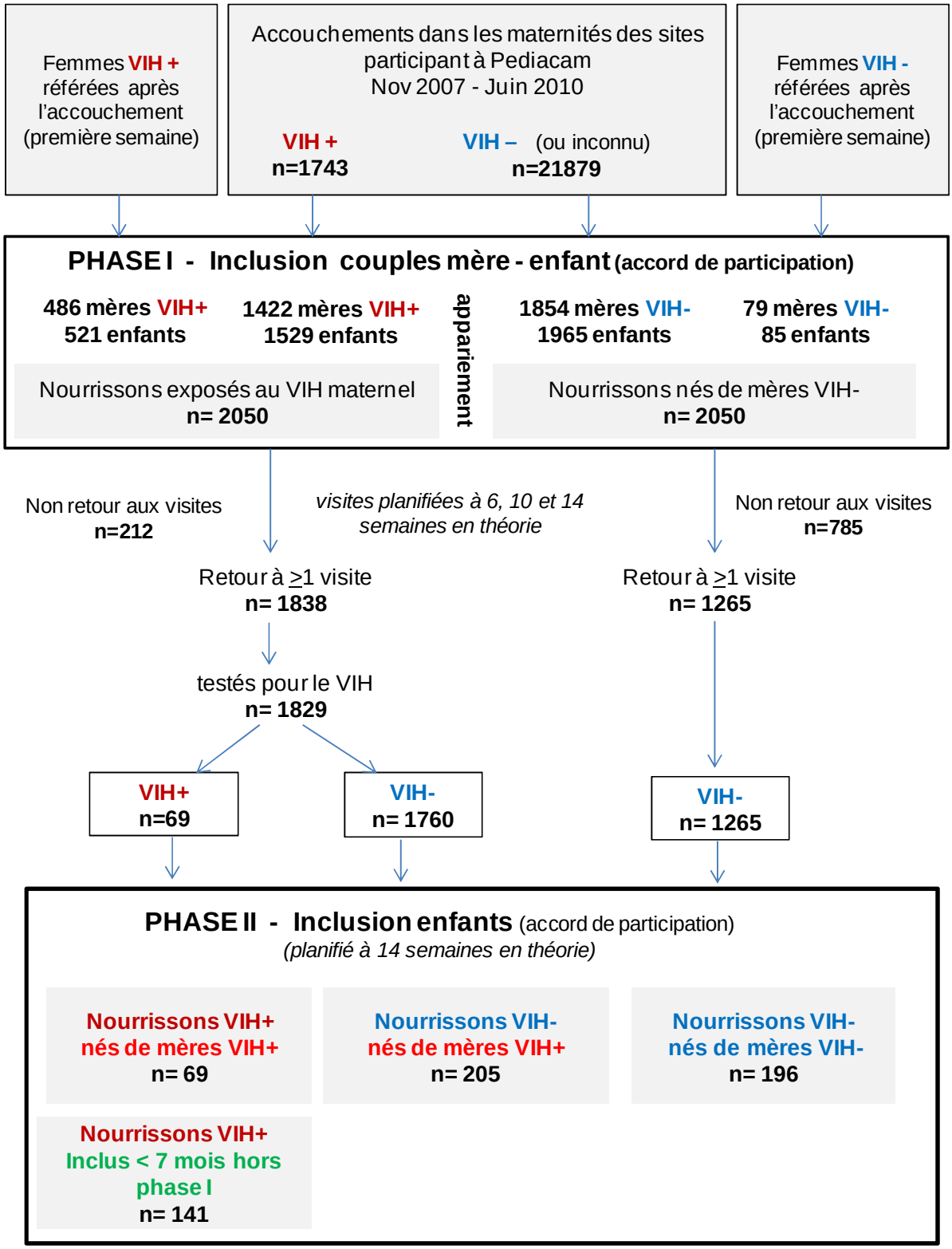
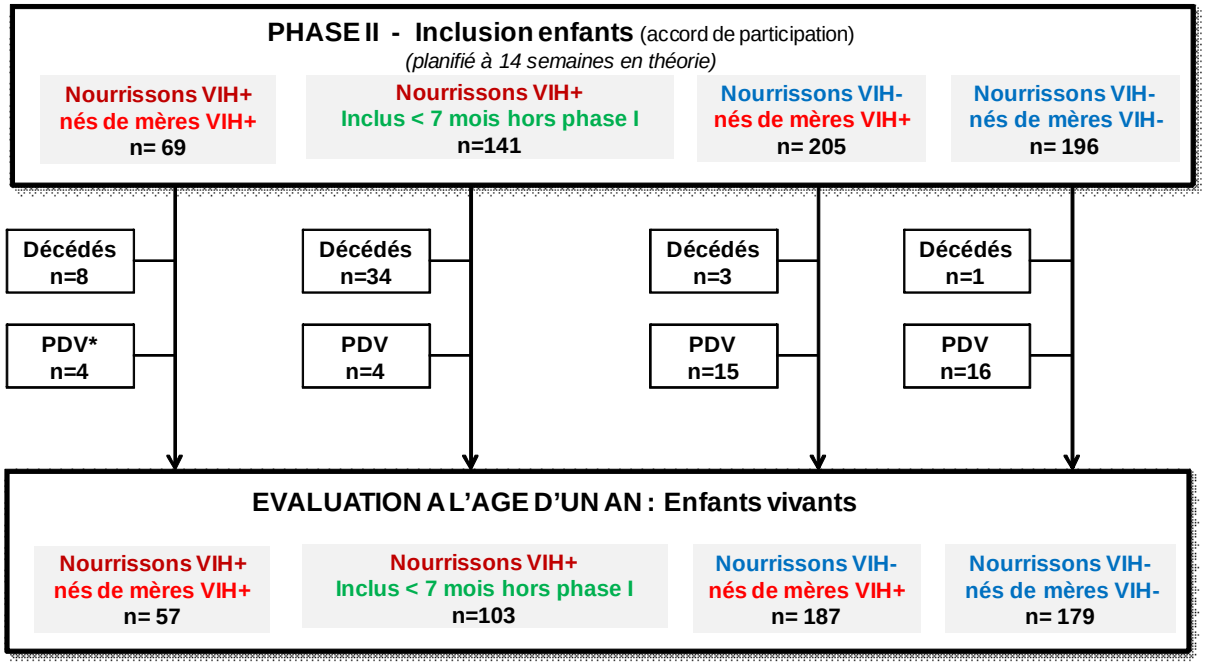


Figure II-5 : Inclusion dans les phases I et II de l'étude ANRS-PEDIACAM, 2007-2011, Cameroun



PDV*: Perdu de vue

Figure II-6: Statut vital des enfants à l'âge d'un an après inclusion dans la phase II de l'étude ANRS-PEDIACAM, 2007-2012, Cameroun

Chapitre III : Processus de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons exposés - faisabilité, facteurs associés à un processus incomplet

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique présentée en annexe (Tejiokem MC et al, 2011).

Tejiokem MC, Faye A, Penda IC, Guemkam G, Ateba Ndongo F, Chewa G, Rekacewicz C, Rousset D, Kfutwah A, Boisier P, Warszawski J; ANRS 12140-PEDIACAM study group. Feasibility of early infant diagnosis of HIV in resource-limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon. **PLoS One**. 2011;6(7):e21840.

III.1 Matériels et méthodes

III.1.1 Population de l'étude

Cette analyse a concerné tous les nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH, inclus dans la première phase de l'étude ANRS-Pediacam de novembre 2007 à décembre 2009. Parmi les 1381 mères séropositives pour le VIH (éligibles) qui ont accouché dans les maternités des sites participants de Pediacam dans la période de recrutement, 1176 ont accepté de faire partie de Pediacam, soit un taux de participation initiale excellent de 85,2% et un total de 1217 enfants inclus.

Par ailleurs, 428 enfants nés de mères séropositives, ayant accouché dans une autre structure de santé ou à domicile, ont été inclus dans leur première semaine de vie en Phase I de Pediacam. Leurs mères avaient été envoyées ou s'étaient présentées d'elles-mêmes après l'accouchement dans l'un des sites de Pediacam.

Soit un total de 1645 nourrissons inclus (Figure III-1).

Ces nourrissons étaient tous *nés au moins 6 mois avant le moment de notre analyse statistique*. Pour les naissances multiples, un seul enfant a été retenu, par tirage au sort. Au total, N=56 nourrissons.

III.1.2 Définition de la variable d'intérêt : processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH

Le processus de diagnostic précoce de l'infection VIH était considéré comme "complet" si le test virologique VIH était réalisé et le résultat rendu à la famille avant l'âge de 7 mois, limite classique pour considérer un traitement comme précoce (Faye A et al, 2002 ; Chiappini E et al, 2006). Toute autre situation était considérée comme un processus incomplet.

III.1.3 Description des autres variables utilisées

Les données collectées par des questionnaires standardisées ont été regroupées en :

- Facteurs liés à la prise en charge de la mère :
  - moment du diagnostic VIH par rapport à l'accouchement
  - nombre de consultations prénatales
  - stratégies de PTME chez la mère et l'enfant
- Facteurs liés au contexte obstétrical et à l'accouchement :
  - lieu d'accouchement (maternité Pediacam, autres structures de santé et domicile)
  - gémellité
  - existence ou non de complications maternelles

- primiparité
- mode d'accouchement
- prématurité
- poids de naissance de l'enfant
- hospitalisation du nouveau-né
- mode d'alimentation (allaitement maternel, artificiel ou mixte)

- Facteurs liés aux conditions de vie de la famille :
  - statut marital, niveau scolaire et profession de la mère
  - existence d'un réfrigérateur fonctionnel, de l'eau courante ou de l'électricité dans le domicile de l'enfant.
  - nombre d'enfants vivants au foyer
  - connaissance du statut VIH du père par la mère
  - partage du statut VIH de la mère avec le père de l'enfant ou son partenaire

III.1.4 Stratégie d'analyses statistiques

Les caractéristiques des couples mère-enfant ont été décrites en utilisant les médianes avec les écarts interquartiles pour les variables continues et les pourcentages pour les variables catégorielles.

Pour décrire le processus de diagnostic de l'infection VIH chez les nourrissons, les proportions ont été estimées aux différentes étapes successives, conditionnellement à l'étape précédente, avec leurs intervalles de confiance à 95%.

Les analyses bi et multivariées ont été réalisées par régression logistique pour identifier les facteurs associés au processus incomplet de diagnostic, en variable dépendante. Le modèle multivarié initial incluait toutes les variables non colinéaires associées au processus incomplet de diagnostic VIH avec un seuil de signification $p \leq 0,2$ en analyse bivariée.

Le modèle final a été obtenu par une stratégie pas à pas descendante, en vérifiant que le retrait d'une variable ne modifie pas trop les odds ratio, et en testant certaines interactions possibles. Le site d'inclusion et le niveau d'étude de la mère, associés classiquement au non retour des enfants, ont été systématiquement inclus dans tous les modèles.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel STATA version 10.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA). Une valeur de $p \leq 5\%$ était considérée comme statistiquement significative.

III.2 Résultats

III.2.1 Description de la population étudiée

Entre novembre 2007 et décembre 2009, 1645 nourrissons nés de 1587 mères infectées par le VIH ont été inclus dans l'étude ANRS-PEDIACAM, dont 1176 avaient accouché dans une maternité de Pediacam, et les autres avaient accouché ailleurs. Parmi ces enfants, 45,9% ont été inclus au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, 24,7% au Centre Hospitalier d'Essos à Yaoundé et 29,4% à l'Hôpital Laquintinie de Douala (

Figure III-1).

Les accouchements gémellaires représentaient 3,5% de l'ensemble (52 jumeaux et 4 triplets-deux décès observés à la naissance chez deux jumeaux). L'âge médian des mères à l'accouchement était de 29,2 ans (intervalle interquartile IQ : 25,7-32,8) et celui des nouveau-nés à l'inclusion était de 3 jours (IQ : 1-5). Au total, 42,0% mères connaissaient leur statut VIH avant le début de la grossesse. Aucune prophylaxie maternelle n'avait été administrée chez 9,9% des mères. Le nourrisson a été allaité dans 10,7% des cas.

Le poids médian des nouveau-nés à la naissance était de 3150 g, (IQ : 2800-3500), avec 51,8% de garçons.

III.2.2 Description du processus de diagnostic précoce

Parmi les 1587 nourrissons inclus, 89,7% (n=1423) ont été testés pour le VIH à un âge médian de 1,5 mois (IQ : 1,4-1,6).

Parmi les enfants testés, le résultat du test a été recherché avant l'âge de 7 mois par 94,9% (n=1331) des familles (âge médian : 2,5 mois, (IQ : 2,4-3,0). Le délai médian entre la réalisation du test et le retrait des résultats était de 1,1 mois (IQ : 1,0-1,2) avec une différence significative selon le site d'inclusion (1,0 mois au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya et au Centre Hospitalier d'Essos et 1,5 mois à l'Hôpital Laquintinie de Douala, p<10-3). Au total, un processus incomplet (pas de test, pas de retrait, ou retrait tardif) a concerné 16,1% (256/1587) des nourrissons exposés au VIH (

Figure III-1).

Outre les 20 enfants qui ont suivi l'ensemble du processus mais avec retard, et 8 enfants qui n'ont pas été testés bien qu'ils soient revenus en visite de suivi, le processus incomplet concerne 228 enfants qui ne sont pas revenus à l'ensemble des visites prévues : 156 enfants qui ne sont jamais revenus bien que la famille ait accepté initialement l'inclusion dans Pediacam et 72 qui ne sont pas revenus après avoir effectué le premier test à 6

semaines. Les relances téléphoniques (parfois multiples par enfant) ont été effectuées afin de déterminer le statut vital de ces nourrissons perdus de vue et collecter les motifs de non retour. Une information n'a été obtenue que pour 87 nourrissons, les autres enfants (n=149) ayant été considérés comme perdus de vue, soit 9,4%.

Parmi les 87 enfants pour lesquels des informations ont été obtenues, 25 nourrissons étaient décédés. Pour les 62 enfants vivants les familles ont invoqué des difficultés de déplacements (57,8%) ou la maladie de la mère (11,1%) comme motif de non retour. D'autres raisons incluaient le refus ou la peur des résultats du test, l'oubli du rendez vous et le décès d'un des parents.

III.2.3 Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce

A) L'analyse bivariée montre qu'un processus incomplet est associé significativement :

- à une moins bonne prise en charge du VIH : nombre de visite prénatale moins fréquente et la découverte tardive du VIH de la mère pendant la grossesse (Tableau III-1 ; Tableau III-2)
- à des facteurs liés aux conditions de vie familiale : au statut marital (moins fréquent chez les femmes mariées), l'absence de réfrigérateur à domicile, l'absence de partage du statut VIH de la mère au père (Tableau III-3)
- à une situation de complications obstétricales ou maternelles : gémellité, prématurité, mode d'accouchement en urgence, hospitalisation du nourrisson à la naissance

B) Après ajustement dans une analyse multivariée, seuls deux types de facteurs restent associés significativement que ce soit dans un modèle complet (Tableau III-4) ou plus parcimonieux (Tableau III-5):

- **Facteurs liés à la prise en charge du VIH** : un processus incomplet était plus fortement observé en cas de diagnostic du VIH dans le dernier trimestre de grossesse par rapport à la connaissance du statut préalable à la grossesse (ORa=1,8 IC95% 1,1-2,9), et en l'absence de prophylaxie maternelle par rapport à l'administration d'une trithérapie pendant la grossesse (ORa=2,4 IC95% 1,4-4,3).
- **Facteurs liés à de mauvaises conditions obstétricales** : un processus incomplet était associé à l'accouchement par césarienne en urgence par rapport à un accouchement par voie basse (ORa=2,5 IC95% 1,5-4,3).

Les facteurs liés aux conditions de vie, ainsi que certains facteurs obstétricaux (nombre limité de consultation prénatale, la gémellité, la prématurité, ou l'hospitalisation de l'enfant à la naissance) ne restent pas associés après ajustement sur l'ensemble des facteurs du modèle complet.

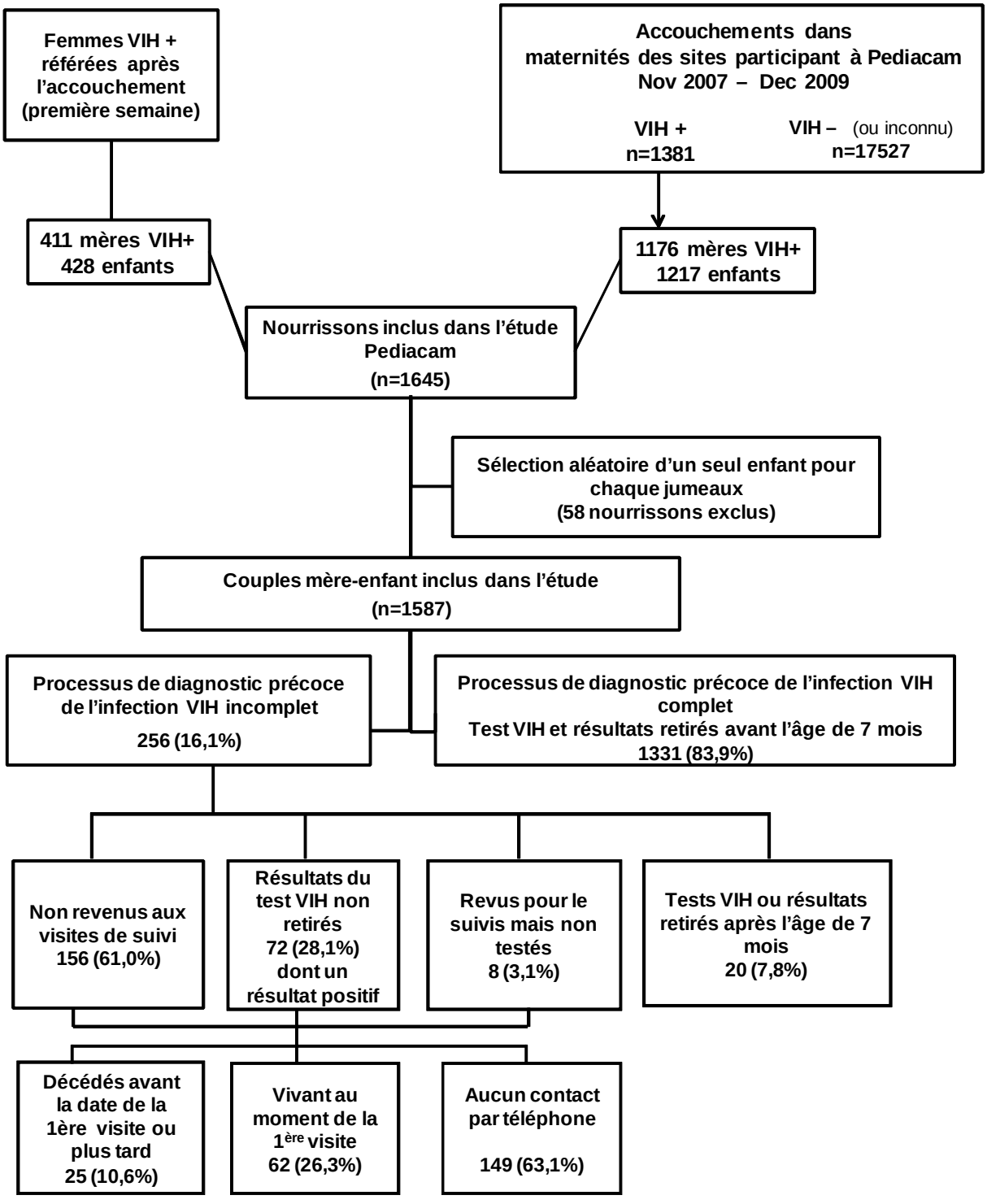


Figure III-1: Processus de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009)

Tableau III-1 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : prise en charge de la grossesse, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009

Facteurs **(nombre total des données renseignées, %)**	N = 1587	n = 256	% 16,1	Odds ratio (IC 95%)	p
Site clinique *(1587 ; 100)*					0,68
Centre Hospitalier d'Essos, Yaoundé	392	62	15,8	1,0 (0,7-1,4)	
Hôpital Laquintinie, Douala	466	81	17,4	1,1 (0,8-1,6)	
Centre Mère et Enfants FCB / Hôpital Central	729	113	15,5	Référence	
Âge de la mère à l'accouchement *(1563 ; 98,5)*					0,22
<25 ans	314	58	18,5	1,4 (1,0-2,0)	
25-30 ans	560	86	15,4	1,1 (0,8-1,5)	
>30 ans	689	98	14,2	Référence	
Moment du diagnostic du VIH *(1566 ; 98,7)*					$<10^{-3}$
Moins de 3 mois avant l'accouchement	351	79	22,5	2,1 (1,5-3,0)	
Plus de 3 mois avant l'accouchement	549	83	15,1	1,3 (0,9-1,8)	
Avant la grossesse	666	81	12,2	Référence	
Primiparité *(1560 ; 98,3)*					0,61
Oui	246	41	16,7	1,1 (0,8-1,6)	
Non	1314	202	15,4	Référence	
Nombre d'enfants vivants *(1558 ; 98,2)*					0,60
Plus d'un	1044	165	15,8	1,1 (0,8-1,4)	
un	514	76	14,8	Référence	
Grossesse gémellaire *(1587 ; 100)*					0,07
Oui	56	14	25,0	1,8 (0,9-3,3)	
Non	1531	242	15,8	Référence	
Nombre de visites anténatales *(1507 ; 95,0)*					0,02
≤3	220	46	20,9	1,6 (1,1-2,2)	
>3	1287	187	14,5	Référence	
Pathologie pendant la grossesse *(1527 ; 96,2)*					0,32
Non	925	151	16,3	1,2 (0,9-1,5)	
Oui	602	87	14,4	Référence	
Prise d'antirétroviraux pour la PTME *(1535 ; 96,7)*					$<10^{-4}$
Aucune prophylaxie	157	50	31,8	4,0 (2,6-6,3)	
Protocole simplifié d'ARV	790	124	15,7	1,6 (1,2-2,2)	
Trithérapie	588	61	10,4	Référence	
Prématurité *(1564 ; 98,6)*					0,09
<37 semaines de grossesse	228	44	19,3	1,4 (0,9-2,0)	
≥37 semaines de grossesse	1336	199	14,9	Référence	
Mode d'accouchement *(1564 ; 98,6)*					0,002
Césarienne d'urgence	96	27	28,1	2,2 (1,4-3,6)	
Césarienne élective	53	7	13,2	0,9 (0,4-2,0)	
Voie basse	1415	209	14,8	Référence	
Lieu d'accouchement *(1587 ; 100)*					0,37
À la maison ou autres formations sanitaires	411	72	17,5	1,1 (0,8-1,5)	
Sites de l'étude Pediacam	1176	184	15,6	Référence	

Tableau III-2 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : état du nourrisson à la naissance, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009

Facteurs **(nombre total des données renseignées, %)**	N = 1587	n = 256	% 16,1	Odds ratio (OR) (IC 95%)	p
Sexe de l'enfant *(1587; 100)*					0,69
Masculin	819	135	16,5	1,1 (0,8-1,4)	
Féminin	768	121	15,8	Référence	
Poids à la naissance *(1560; 98,3)*					0,14
<2500g	148	29	19,6	1,4 (0,9-2,1)	
≥2500g	1412	211	14,9	Référence	
Option d'alimentation *(1567; 98,7)*					0,55
Allaitement maternel exclusif	170	29	17,1	1,1 (0,7-1,7)	
Allaitement artificiel exclusif	1397	214	15,3	Référence	
Prise d'antirétroviraux pour la PTME *(1551; 97,7)*					0,54
Non	37	7	18,9	1,3 (0,6-3,0)	
Oui	1514	231	15,3	Référence	
Hospitalisé à la naissance *(1520; 95,8)*					0,07
Oui	176	35	19,9	1,4 (0,96-2,1)	
Non	1344	198	14,7	Référence	

Tableau III-3 : Analyse bivariée - Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons : facteurs sociodémographique et environnemental, ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009

Facteurs **(nombre total des données renseignées, %)**	N = 1587	n = 256	% 16,1	Odds ratio (IC 95%)	p
Statut marital *(1556; 98,0)*					0,47
Divorcée ou veuve	26	5	19,2	1,6 (0,6-4,3)	
Célibataire	461	70	15,2	1,2 (0,8-1,7)	
Concubinage	706	118	16,7	1,3 (0,9-1,9)	
Mariée	363	48	13,2	Référence	
Niveau d'éducation de la mère *(1550; 97,7)*					0,05
Aucun ou primaire	295	59	20,0	1,6 (1,0-2,6)	
Secondaire	1004	148	14,7	1,1 (0,8-1,7)	
Supérieur	251	33	13,2	Référence	
Activité professionnelle de la mère *(1543; 97,2)*					0,47
Ménagère ou sans emploi	675	113	16,7	1,2 (0,9-1,6)	
Etudiante ou en formation	184	31	16,8	1,2 (0,8-1,9)	
Activité rémunérée	684	99	14,5	Référence	
Niveau d'éducation du père *(1380; 87,0)*					0,29
Inconnu pour la mère	244	44	18,0	1,4 (0,9-2,1)	
Aucun ou primaire	126	15	11,9	0,8 (0,4-1,5)	
Secondaire	607	100	16,5	1,2 (0,8-1,7)	
Supérieur	403	56	13,9	Référence	
Âge du père à l'inclusion de l'enfant *(1401-88,3)*					0,30
<35 ans	565	87	15,4	1,2 (0,8-1,7)	
35-39 ans	424	73	17,2	1,4 (0,9-2,0)	
≥40 ans	412	54	13,1	Référence	
Partage du statut VIH maternel au partenaire *(1406; 88,6)*					0,03
Non	267	52	19,5	1,5 (1,0-2,1)	
Oui	1139	160	14,1	Référence	
Connaissance par la mère du statut VIH du père *(1465; 92,3)*					0,11
inconnu	587	101	17,2	1,5 (1,0-2,2)	
Séronégatif pour le VIH	516	81	15,7	1,3 (0,9-2,0)	
Séropositif pour le VIH	362	44	12,2	Référence	
Réfrigérateur fonctionnel à la maison *(1534-96,7)*					0,05
Non	725	128	17,7	1,3 (1,0-1,7)	
Oui	809	113	14,0	Référence	
Eau courante à la maison *(1539; 97,0)*					0,46
Non	688	113	16,4	0,9 (0,7-1,2)	
Oui	851	128	15,0	Référence	
Electricité à la maison *(1539; 97,0)*					0,53
Non	36	7	19,4	0,8 (0,3-1,8)	
Oui	1503	234	15,6	Référence	

Tableau III-4 : Régression logistique multivariée (modèle complet N=1285) : Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009)

	OR ajusté (IC 95%)	p-value
Site clinique		0,25
Centre Hospitalier d'Essos, Yaoundé	1,2 (0,8-1,8)	
Hôpital Laquintinie, Douala	0,8 (0,5-1,2)	
Centre Mère et Enfant / Hôpital Central, Yaoundé	Référence	
Niveau d'éducation de la mère		0,50
Aucun ou primaire	1,4 (0,8-2,5)	
Secondaire	1,2 (0,8-2,0)	
Supérieur	Référence	
Présence d'un réfrigérateur fonctionnel à la maison		0,33
Non	1,2 (0,8-1,6)	
Oui	Référence	
Moment du diagnostic du VIH chez la mère		0,10
Moins de 3 mois avant l'accouchement	1,7 (1,0-2,7)	
Plus de 3 mois avant l'accouchement	1,2 (0,8-1,7)	
Avant la grossesse	Référence	
Partage de son statut VIH avec son partenaire		0,27
Non	1,3 (0,8-1,9)	
Oui	Référence	
Connaissance du statut VIH du père		0,25
inconnu	1,2 (0,7-1,9)	
Séronégatif pour le VIH	1,4 (0,9-2,2)	
Séropositif pour le VIH	Référence	
Nombre de visites anténatales		0,72
≤3	1,1 (0,7-1,7)	
>3	Référence	
Mode d'accouchement		0,005
Césarienne d'urgence	2,5 (1,4-4,3)	
Césarienne élective	0,7 (0,2-2,2)	
Voie basse	Référence	
Prise d'antirétroviraux pour la PTME		0,02
Aucune prophylaxie	2,3 (1,2-4,1)	
Protocole simplifié d'ARV	1,4 (0,9-2,1)	
Trithérapie	Référence	
Poids à la naissance		0,38
<2500g	1,3 (0,7-2,2)	
≥2500g	Référence	
Prematurité		0,92
<37 semaines de grossesse	1,0 (0,6-1,6)	
≥37 semaines de grossesse	Référence	
Grossesse gémellaire		0,26
Oui	1,5 (0,7-3,4)	
Non	Référence	
Hospitalisé à la naissance		0,57
Oui	1,2 (0,7-1,9)	
Non	Référence	

Tableau III-5 : Régression logistique multivariée (modèle final N=1285) : Facteurs associés à un processus incomplet de diagnostic précoce de l'infection VIH (ANRS-Pediacam, Cameroun, 2007-2009)

	OR ajusté (IC 95%)	p-value
Site clinique		0,33
Centre Hospitalier d'Essos, Yaoundé	1,2 (0,8-1,8)	
Hôpital Laquintinie, Douala	0,8 (0,5-1,2)	
Centre Mère et Enfants de la FCB / Hôpital Central	Référence	
Moment du diagnostic du VIH chez la mère		0,04
Moins de 3 mois avant l'accouchement	1,8 (1,1-2,9)	
Plus de 3 mois avant l'accouchement	1,2 (0,8-1,8)	
Avant la grossesse	Référence	
Mode d'accouchement		0,003
Césarienne d'urgence	2,5 (1,5-4,3)	
Césarienne élective	0,8 (0,3-2,2)	
Voie basse	Référence	
Prise d'antirétroviraux pour la PTME		0,009
Aucune prophylaxie	2,4 (1,4-4,3)	
Protocole simplifié d'ARV	1,3 (0,9-2,0)	
Trithérapie	Référence	

III.3 Discussion

Le diagnostic précoce de l'infection VIH reste un défi à la fois technique et programmatique dans la prise en charge des nourrissons dans les pays en développement. Dans ce travail, nous avons décrit le processus de dépistage proposé systématiquement, dès leur première semaine de vie, à la cohorte de nourrissons nés de 1587 mères séropositives inclus entre novembre 2007 et décembre 2009 dans Pediacam, étude menée dans le contexte urbain du Cameroun

Ce processus était considéré comme complet lorsque le résultat du test était rendu à la famille avant l'âge de 7 mois. Cette limite d'âge a été choisie pour des raisons pragmatiques, tenant compte des difficultés inhérentes au contexte. Elle est un peu supérieure à l'âge de diagnostic idéal visé par l'intervention proposée dans Pediacam. Cette intervention avait pour objectif de proposer un traitement dès 3 mois aux enfants infectés.

Mais l'âge de 7 mois reste raisonnable car un traitement initiée dans les 6 premiers mois est susceptible d'améliorer fortement la survie (Faye A et al, 2004; Violari A et al, 2008; Chiappini E et al, 2009).

a) Une proportion élevée d'enfants ont bénéficié d'un processus complet

- Il est intéressant de souligner l'excellente acceptabilité initiale du test : 85,2% des mères dans la première semaine suivant l'accouchement à qui l'on a proposé de participer à Pediacam ont accepté. Parmi les mères ayant donné leur consentement de participation, 89,7% ont ramené les nourrissons en consultation pour la réalisation du test.

  Cette proportion est plus élevée que celle rapportée dans des études réalisées au Malawi et en Ouganda où 70% (1503/2156) et 52% (292/567) de nourrissons exposés au VIH ont été ramenés respectivement en consultation après l'inclusion (Ioannidis J et al, 1999; Ahoua L et al, 2010). Mais il convient de préciser qu'au moment de la conduite de ces études, l'accès des enfants infectés par le VIH aux antirétroviraux n'était pas facilité comme dans Pediacam.

- La proportion d'enfants ayant bénéficié d'un processus complet reste elle-même très élevée : 83,9% (IC95% : 82,0-85,6). L'âge médian au retrait des résultats du test était de 2,5 mois (IQ : 2,4-3,0).

  Un traitement antirétroviral aurait ainsi pu être initié avant 3 mois chez 75% des enfants concernés, correspondant à l'âge de l'intervention évaluée dans l'essai randomisé CHER. Hormis une étude au Botswana (Creek T et al, 2008) qui rapportait un taux de

retour de 81%, comparable au nôtre, des taux plus faibles ont été observés en Tanzanie et en Afrique du Sud avec respectivement 55% (242/441) et 65% (153/233) de familles revenues chercher les résultats (Rollins N et al, 2009; Nuwagaba-Biribonwoha H et al, 2010). En outre, dans ces études, l'âge au diagnostic variait entre 1 et 17 mois.

- Le délai entre le diagnostic de l'infection et le retrait des résultats variait selon les sites principalement en raison d'un accès différent au laboratoire de PCR : les deux sites de Yaoundé étaient situés à proximité du laboratoire, tandis que le site de Douala devait faire transporter jusqu'à Mutengene (situé à 50 km de Douala), ses échantillons de sang séché sur papier buvard (DBS).

b) Les principaux facteurs associés à un processus incomplet relèvent d'un diagnostic du VIH trop tardif pendant la grossesse et de complications générant un climat d'urgence obstétricale

- Un processus incomplet de dépistage concernait 16% des enfants (10% de nourrissons jamais revus après l'inclusion initiale, et 6% pour lesquelles la famille n'avait pas recherché le résultat avant l'âge de 7 mois).

- Seuls trois facteurs du risque indépendants de processus incomplet sont identifiés en analyse multivariée : diagnostic tardif de l'infection VIH maternelle et absence de prophylaxie antirétrovirale pendant la grossesse, dénotant une mauvaise prise en charge du VIH - accouchement par césarienne en urgence, correspondant à une situation de complication obstétricale, comme la prématurité, et l'hospitalisation du nourrisson, qui ne sont associées qu'en analyse bivariée. Ces résultats ne sont pas surprenants.
  1) D'une part, une découverte tardive du VIH en cours de grossesse ne laisse pas le temps aux femmes d'en assimiler toutes les conséquences, d'accepter et d'initier une PTME et de comprendre le bénéfice du suivi et l'intérêt du diagnostic précoce de leur nourrisson (Lanoy E et al, 2006; Kaplan R et al, 2008). Parmi les 157 femmes qui n'avaient pas reçu de prophylaxie antirétrovirale, 65% avaient découvert leur statut VIH en médiane 3 jours avant l'accouchement (IQ : 1 à 15 jours). Ceci peut expliquer la proportion très élevée de processus incomplet dans ce groupe (31,8%).
  2) D'autre part, dans les situations de complications et d'urgences obstétricales, l'objectif prioritaire est de sauver la vie de la mère et de l'enfant. La prévention de la TME peut passer au second plan car l'équipe médicale dispose de peu de temps et d'opportunités pour parler de prophylaxie, de diagnostic du VIH de leurs enfants et de l'intérêt du suivi. D'autre part, les complications de l'accouchement peuvent avoir été à l'origine d'un transfert en urgence vers les hôpitaux participant à Pediacam de femmes suivis dans des structures de soins primaires éloignées. Après

l'accouchement, ces femmes peuvent préférer retourner dans la structure sanitaire de proximité au lieu de faire suivre leur enfant dans les sites de l'étude. Malheureusement, le motif de transfert éventuel des femmes enceintes n'a pas été collecté, ce qui ne nous permet pas de vérifier cette hypothèse.

L'absence de prophylaxie antirétrovirale pendant la grossesse avait déjà été rapportée comme facteur de risque de perdus de vue en Ouganda (Ahoua L et al, 2010), mais pas les modalités d'accouchement au Malawi (Ioannidis J et al, 1999).

- Le processus incomplet de dépistage de l'enfant était associé, en analyse bivariée, à certains facteurs de conditions de vie de l'enfant : absence de partage des résultats du test VIH entre la mère et le père, faible niveau d'étude de la mère, absence de réfrigérateur fonctionnel au domicile. Ces facteurs sont liés à un diagnostic et une prise en charge plus tardive du VIH. Il est intéressant de souligner que l'ajustement sur le moment du diagnostic du VIH au cours de la grossesse et l'absence de PTME faisait disparaître les associations entre processus incomplet et les marqueurs de conditions de vie socio-économique.

  Ces ajustements n'ont pas toujours été réalisés dans les études qui ont rapporté une relation entre le risque d'être perdu de vue pour les couples mères et enfants après l'accouchement et l'absence de partage des informations sur le statut VIH de la mère (Jones SA et al, 2005), le faible niveau d'éducation, une activité de cultivateur, un domicile éloigné des formations sanitaires, ou la nécessité de payer le transport pour se rendre à une structure de soins (Ioannidis J et al, 1999; McCoy D et al, 2002).

c) Forces et Limites de l'étude

- L'une des forces de cette étude est d'avoir été réalisée dans trois centres hospitaliers de référence, situés dans les deux villes les plus importantes du Cameroun.

  Ces hôpitaux sont ouverts à l'ensemble des couches sociales, ont un recrutement hétérogène et leurs pratiques médicales permettant de refléter une certaine diversité des pratiques de diagnostic précoce de l'infection VIH offerte à une population vivant en milieu urbain.

- La proportion de mères ayant déclaré nourrir exclusivement les nourrissons au lait artificiel était plus élevée dans notre étude que sur le plan national, mais proche de ce qui a été rapportés dans d'autres études dans le même contexte (Tejiokem MC et al, 2004; Tchendjou P et al, 2010).

En 2009, seulement 32% des mères infectées par le VIH ont rapporté une alimentation exclusive au lait artificiel au Cameroun (Ministère de la Santé Publique du Cameroun et al, 2009), où les directives nationales recommandent l'allaitement maternel exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois sauf si l'alimentation de remplacement est acceptable, faisable, accessible, durable et sûre (AFADES). Cette forte proportion de mères utilisant l'alimentation de remplacement peut être expliquée par un conseil actif, par le statut socio-économique relativement élevé de la population des sites de l'étude et par la faible pression socioculturelle comparée aux zones rurales.

- Le statut vital n'a pas été établi chez 149 nourrissons perdus de vue. L'absence de retour à la consultation pourrait être la conséquence d'un décès méconnu.

Chez les 1438 nourrissons avec un statut vital connu, le taux de mortalité était de 17,4‰ IC95% (11,3-25,6), ce qui est plus faible que le taux de mortalité à un mois d'âge estimé à 29‰ sur le plan national (Institut National de la Statistique et al, 2004). De même, le taux de transmission de l'infection VIH de 3,6% (51/1423) (IC à 95% : 2,8-4,8) est lui-même relativement faible. Le faible taux de mortalité dans Pediacam est probablement lié à une meilleure prise en charge précoce associée à l'intervention. Mais on ne peut exclure une sous-estimation de la mortalité et du taux de transmission qui pourrait être dû à une plus grande fréquence d'infection VIH sévère méconnue et conduisant au décès chez les perdus de vue.

III.4 Conclusion

Les facteurs de risque du processus incomplet de diagnostic précoce du VIH reflètent plus un moins bon accès aux soins prénataux (diagnostic VIH tardif chez la mère, absence de prophylaxie pour la PTME) et un contexte obstétrical préoccupant (accouchement par césarienne d'urgence), plutôt que les conditions de vie familiale, socio-économique et de communication autour du test VIH.

Ceci pourrait découler en partie de l'accès au dépistage et au traitement facilité par Pediacam : traitement gratuit et systématique dès le diagnostic pour tous les enfants infectés, suivi calqué sur le calendrier du programme élargi de vaccination, bénéfices du projet pour les familles (consultations et bilan biologique gratuits même en dehors du suivi, appui en alimentation de remplacement, et en vaccins non inclus dans le PEV) et les relances effectuées par l'équipe médicale par le téléphone.

En outre, la moitié des mères connaissaient leur statut VIH avant la grossesse et avaient eu le temps d'intégrer l'intérêt du suivi et du diagnostic précoce du VIH.

Ces résultats suggèrent de focaliser l'attention de l'équipe soignante sur les femmes diagnostiquées peu de temps avant l'accouchement, particulièrement celles n'ayant pas reçu d'ARV ou transférées récemment dans une structure hospitalière pour des complications obstétricales. Il est important d'informer le personnel des maternités de ces résultats afin qu'ils apportent un renforcement du soutien juste après l'accouchement dans ces situations présentant un risque de suivi non optimal.

Chapitre IV : Prise en charge précoce des nourrissons infectés par le VIH : fréquence et facteurs de risque d'un processus suboptimal d'initiation du traitement antirétroviral

Ce travail a été soumis pour publication à JAIDS (Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes) en début juin 2012.

Tejiokem MC, Josiane Warszawski, Francis Ateba Ndongo, Gisèle Chewa, Nicaise Makwet, Jean Audrey Ndongo, Suzie Tetang, Georgette Guemkam, Félicité Owona, Paul Alain Ngoupo, Patrice Tchendjou, Anfumbom Kfutwah, Ida CalixtePenda, Albert Faye. Feasibility in routine practice of early combined antiretroviral therapy in HIV infected infants in resources limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon. Soumis à **JAIDS**

IV.1 Matériels et Méthodes

IV.1.1 Population de l'étude

Cette analyse a concerné tous les nourrissons inclus dans la phase II de l'étude ANRS-PEDIACAM entre novembre 2007 et juin 2010, *nés au moins 12 mois avant l'analyse*. Au total, 560 nourrissons parmi les 611 inclus à la fin des recrutements répondaient à cette sélection (Chapitre II, paragraphe II.3.5). Il s'agissait de nourrissons :

a) Infectés par le VIH, suivis ou non depuis la première semaine de vie

- Inclus en phase I, lors de leur première semaine de vie (n=66)
- Inclus directement en phase II, à l'occasion d'un diagnostic de VIH avant l'âge de 7 mois (n=110)

b) Non infectés par le VIH, suivis depuis la première semaine de vie

- nés de mères séropositives pour le VIH (n=205)
- nés de mères séronégatives pour le VIH (n=179)

IV.1.2 Variables d'intérêt : processus suboptimal d'initiation des ARV et mortalité infantile des nourrissons suivis depuis la naissance

a) Processus suboptimal d'initiation des ARV chez les nourrissons infectés (critères d'optimalité)

Cette variable a été définie pour prendre en compte l'ensemble du processus d'initiation des ARV chez les nourrissons infectés par le VIH. Ce processus était considérée comme optimal si les ARV étaient débutés :

- avant l'âge de 4 mois (quel que soit l'âge au diagnostic ou le délai entre le test VIH et la mise sous ARV)
- ou avant l'âge de 7 mois pour les nourrissons non inclus en phase I, à condition que le délai entre le test et la mise sous ARV n'excède pas 6 semaines.
- ou avant 12 mois pour les nourrissons contaminés pendant l'allaitement1, à condition que le délai entre le sevrage et la mise sous ARV n'excède pas 12 semaines

En outre, pour les nourrissons symptomatiques, le délai entre l'annonce des résultats du test VIH et la mise sous ARV ne devait pas excéder 3 semaines.

[1] C'est-à-dire ayant eu un premier résultat négatif lors du dépistage initial à 6 semaines, puis positif à la fin de l'allaitement

Toute autre situation était considérée comme non optimale ou suboptimale, à l'exclusion des décès survenus trop précocement pour avoir le temps d'initier le traitement.

Un décès était considéré comme précoce s'il survenait moins de 3 semaines après le rendu du test chez un nourrisson symptomatique. Un décès était également considéré comme trop précoce pour initier le traitement s'il survenait avant l'âge de 4 mois chez un nourrisson asymptomatique suivi depuis la naissance dans le cadre du processus proposé, ou encore moins de 6 semaines après le test de dépistage positif ayant justifié son inclusion avant l'âge de 7 mois.

Pour les enfants allaités initialement négatif, et asymptomatiques, tout décès survenant moins de 12 semaines après le sevrage (délai fixé pour réaliser le test et rendre le résultat) était considéré comme précoce.

Deux autres définitions moins contraignantes, autorisant des délais plus longs entre l'âge au test VIH, l'annonce des résultats et la mise sous traitement, ont été également proposées (Tableau IV-1).

Tableau IV-1 : Critères de définition d'un processus suboptimal d'initiation des ARV, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun

	Définition du processus optimal		
CRITERES	**Définition principale**	2e définition	3e définition
a) Inclus en phase I (1ère semaine de vie)			
Non allaités (N=54)			
âge à l'initiation des ARV, (quel que soit le délai entre test VIH et initiation des ARV)	**< 4 mois**	**< 4 mois**	**< 4 mois**
Allaités (N=12)			
âge à l'initiation des ARV	<**12 mois**	<12 mois	<12 mois
avec un délai max depuis le sevrage	**12 sem**	15 sem	15 sem
b) Non inclus en phase I, *inclus à l'occasion du diagnostic VIH < 7 mois* ***(N=110)***			
âge à l'initiation des ARV	**< 7 mois**	**< 7 mois**	**< 7 mois**
avec un délai max depuis le test VIH si ARV initié entre 4 et 6 mois	**6 sem**	8 sem	10 sem
De plus, si nourrissons symptomatiques *(stade OMS III et IV)* :			
Délai écoulé entre annonce et début ARV	**3 sem**	4 sem	5 sem

Sem : semaines

b) Mortalité infantile des nourrissons infectés ou non suivis depuis la naissance

La mortalité infantile est estimée en intention de traiter, par la probabilité de décès à un an des nourrissons infectés et non infectés par le VIH, nés vivants et suivis depuis la naissance (méthode de Kaplan-Meier).

IV.1.3 Autres variables utilisées

La plupart des variables ont été décrites dans le chapitre III (paragraphe III.1.3).

IV.1.4 Stratégie d'analyses statistiques

Les caractéristiques maternelles et infantiles sont décrites pour les quatre groupes d'enfants et comparées par des tests de Chi deux ou des tests exacts de Fisher pour les variables catégorielles, et une ANOVA ou un test de Kruskall Wallis pour les variables continues selon les conditions d'application.

La proportion du processus suboptimal d'initiation des ARV a été estimée (avec un intervalle de confiance à 95%) chez les enfants infectés par le VIH, en utilisant la principale définition, puis les deux autres définitions dans le cadre d'une analyse de sensibilité.

Les facteurs associés à un processus suboptimal (variable dépendante) ont été identifiés en analyse bivariée puis multivariée par un modèle de régression logistique. L'analyse a été menée chez les enfants qui n'étaient pas décédés trop précocement pour bénéficier du traitement. Le modèle multivarié initial a inclus systématiquement les variables non colinéaires associées en analyse bivariée à un processus suboptimal avec un $p<0,2$. Le modèle final a été obtenu par une stratégie pas à pas descendante, en vérifiant que le retrait d'une variable ne modifiait pas trop les odds ratios, en testant certaines interactions possibles, et en ajustant sur les variables d'échantillonnage (site de recrutement et modalité de recrutement dans l'étude).

La survie à un an a été estimée dans les 4 groupes de nourrissons par la méthode de Kaplan Meier et comparée entre les trois groupes suivis depuis la naissance par le test de logrank. Les données ont été censurées à l'âge d'un an ou à la dernière visite pour les enfants perdus de vue.

Le seuil de significativité choisi était de 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Stata/IC 10.0.

IV.2 Résultats

IV.2.1 Population étudiée

Entre novembre et juin 2010, 560 nourrissons ont été inclus en phase II de l'étude Pediacam. Parmi eux, 66 nourrissons suivis depuis la naissance infectés par le VIH (dont 12 allaités), 110 nourrissons infectés par le VIH non identifiés à la naissance mais dépistés avant l'âge de 7 mois directement inclus en phase II, 205 nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH et 179 nés de mères séronégatives pour le VIH.

A l'inclusion en phase II, les 4 groupes de nourrissons différaient significativement selon le lieu de naissance (les enfants infectés étant le plus souvent nés en dehors des sites PEDIACAM), l'âge à l'inclusion en phase II (plus jeune pour les nourrissons suivis depuis la naissance), et les paramètres anthropométriques (plus élevés chez les nourrissons non infectés et les plus faibles chez les nourrissons inclus à l'occasion du diagnostic de VIH).

Comparées aux mères séropositives, les mères séronégatives pour le VIH avaient allaités majoritairement leurs enfants, et avaient un niveau socioéconomique et un niveau d'études un peu plus élevé. Elles possédaient plus souvent un réfrigérateur fonctionnel au domicile de l'enfant (Tableau IV-2 et Tableau IV-3).

IV.2.2 Processus d'initiation précoce du traitement ARV chez les nourrissons infectés par le VIH

Parmi les 176 nourrissons infectés par le VIH éligibles pour l'initiation des antirétroviraux, 6,3% (n=11) sont décédés trop tôt pour en bénéficier, avant d'atteindre la fin de la période considérée comme optimale (Figure IV-1, Figure IV-2 et Figure IV-3).

Parmi les 165 nourrissons restants, 5 (2,8%) n'ont pas reçu d'ARV (un changement de résidence, 4 refus de traitement dont un nourrisson symptomatique décédé 3,5 semaines après le diagnostic).

Finalement 90,9% (160/176) des nourrissons ont initié un traitement ARV, dont 42,0% (74/176) avant l'âge de 4 mois et 83,5% (147/176) avant l'âge de 7 mois.

Parmi les 165 enfants non décédés trop tôt pour avoir le temps de recevoir un ARV, 62,4% ($IC_{95\%}$: 54,6 à 69,8) ont été mis sous traitement dans un délai optimal selon la définition principale. En utilisant la définition la moins restrictive, cette proportion passait à 72,0%. Les processus suboptimaux tenaient principalement à des délais trop élevés entre le test et l'annonce des résultats aux parents et entre l'annonce des résultats et l'initiation des ARV. Mais tout de même, dans 14,5 à 32,6% des cas, selon les différentes définitions, le retard à

l'initiation des ARV était le fait uniquement d'un retard à la réalisation du test VIH (Tableau IV-4).

- De manière non surprenante, l'âge médian à l'initiation des antirétroviraux, de 4,0 mois (10-90^{e} percentiles: 2,5 à 6,9), était significativement plus bas chez les nourrissons inclus en phase I (suivis depuis la première semaine de vie), que chez les nourrissons inclus au diagnostic (3,5 vs 4,7 mois-p<10-4).
- Le délai médian entre la réalisation du test et l'initiation des ARV était similaire dans les deux groupes (6,2 vs 5,1 semaines, p=0,5), mais le délai entre l'annonce du résultat et l'initiation était significativement plus élevé chez les nourrissons inclus en phase I (3,2 semaines, 10-90^{e} percentile: 0,0-6,5 versus 1,1 semaines, 10-90e percentile: 0,0-5,3 ; p=0,02). Les délais étaient significativement plus élevés chez les nourrissons inclus sur le site de l'Hôpital Laquintinie à Douala (Tableau IV-5)

IV.2.3 Facteurs associés à un processus suboptimal d'initiation des antirétroviraux

L'analyse bivariée montrait que le processus suboptimal d'initiation des ARV était significativement plus fréquent en cas d'inclusion dans le site de Douala plutôt que dans les deux sites de Yaoundé ($p<10^{-4}$), d'absence de PTME pendant la grossesse (p=0,05), et de réalisation tardive du bilan biologique pré-thérapeutique après l'annonce des résultats du test HIV à la famille (p=0,005) (Tableau IV-6). Le processus suboptimal tendait aussi à être plus fréquent chez les nourrissons non inclus en phase 1 (p=0,12) et chez les nourrissons testés en 2007-2008 par rapport à 2009-2010 (p=0,11). Aucun lien avec les facteurs maternel, sociodémographique et infantiles n'était significatif.

Après ajustement dans un modèle multivarié, les seuls facteurs restant significativement associés au processus suboptimal d'initiation des ARV étaient :

- **le site de recrutement** (plus fréquent dans le site de Douala : ORa=3,7 IC95% 1,4-9,5),
- **le mode de recrutement des nourrissons** (plus fréquent chez les nourrissons inclus à l'occasion d'un diagnostic de VIH avant 7 mois : ORa=2,2 IC95% 0,9-5,2),
- **le retard à la réalisation du bilan biologique pré-thérapeutique** (plus fréquent en cas de décalage entre l'annonce et la réalisation du bilan : ORa=3,3 $IC_{95\%}$ 1,9-9,9)

Les résultats similaires pour ces trois variables ont été obtenus en excluant les nourrissons recrutés sur le site de Douala.

En utilisant la définition la moins restrictive du processus suboptimal, celui-ci apparaissait significativement moins fréquent en cas d'hospitalisation dans la période précédent l'inclusion : ORa=0,4 -IC $_{95\%}$ [0,1-0,9]; p=0,03. Ce facteur s'ajoutant aux facteurs précédents.

IV.2.4 Survie des nourrissons au cours de la première année de vie

Au 30 juin 2011, 38 (6,8%) des 560 nourrissons inclus en phase II de Pediacam sont décédés avant l'âge de 1 an. Parmi ces enfants décédés, 34 étaient des nourrissons infectés par le VIH (8 suivis depuis la première semaine de vie et 28 suivis depuis le diagnostic de l'infection VIH avant l'âge de 7 mois), 3 étaient non infectés nés de mères séropositives pour le VIH et un seul était né de mère séronégative pour le VIH.

Par ailleurs, 6,6% (37) nourrissons ont été considérés perdus de vus avant la fin de l'année. Il s'agit majoritairement de nourrissons non infectés par le VIH. Seuls 6 nourrissons infectés par le VIH dont 4 suivis depuis la première semaine de vie ont été perdus de vue.

Au total, 86,6% (485) des nourrissons étaient vivants à un an :

- 54/66 infectés par le VIH inclus en phase I,
- 82/110 infectés par le VIH dépistés avant 7 mois
- 187/205 nourrissons non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH
- 162/179 nourrissons infectés par le VIH nés de mères séronégatives pour le VIH.

La probabilité cumulée de décès à l'âge d'un an estimée par la méthode de Kaplan Meier dans les trois groupes de nourrissons inclus en phase I (donc suivis depuis la première semaine de vie) était significativement plus élevée chez les nourrissons infectés (12,5%-$IC_{95\%}$: 6,5 à 23,5) que chez les nourrissons non infectés nés de mères séropositives (1,5%; $IC_{95\%}$: 0,5 à 4,7) et non infectés nés de mères séronégatives pour le VIH (0,6%; $IC_{95\%}$: 0,08 à 4,0) $p<10^{-4}$, test de logrank (Figure IV-4).

Soixante huit pourcent (IC à 95% : 52,0 à 82,4) des décès sont survenus au cours du premier mois après le diagnostic de l'infection VIH, avec ou sans ARV, et 79% ($IC_{95\%}$: 65,7 à 90,9) dans les 3 mois suivants.

Globalement, 21,1% (8/38) des décès sont survenus à domicile rendant le diagnostic de la cause de décès difficile. Trois de ces décès ont été déclarés subits et rapides (un décès dans chacun des groupes). Parmi ceux qui sont décédés à l'hôpital ou dans les centres de santé, 34,2% (13/38) présentaient une infection respiratoire aiguë, 18,4% (7/38) une gastroentérite, 10,5% (4/38) une malnutrition. Les autres causes de décès citées étaient le paludisme cérébral, la méningite, la rougeole et la prématurité.

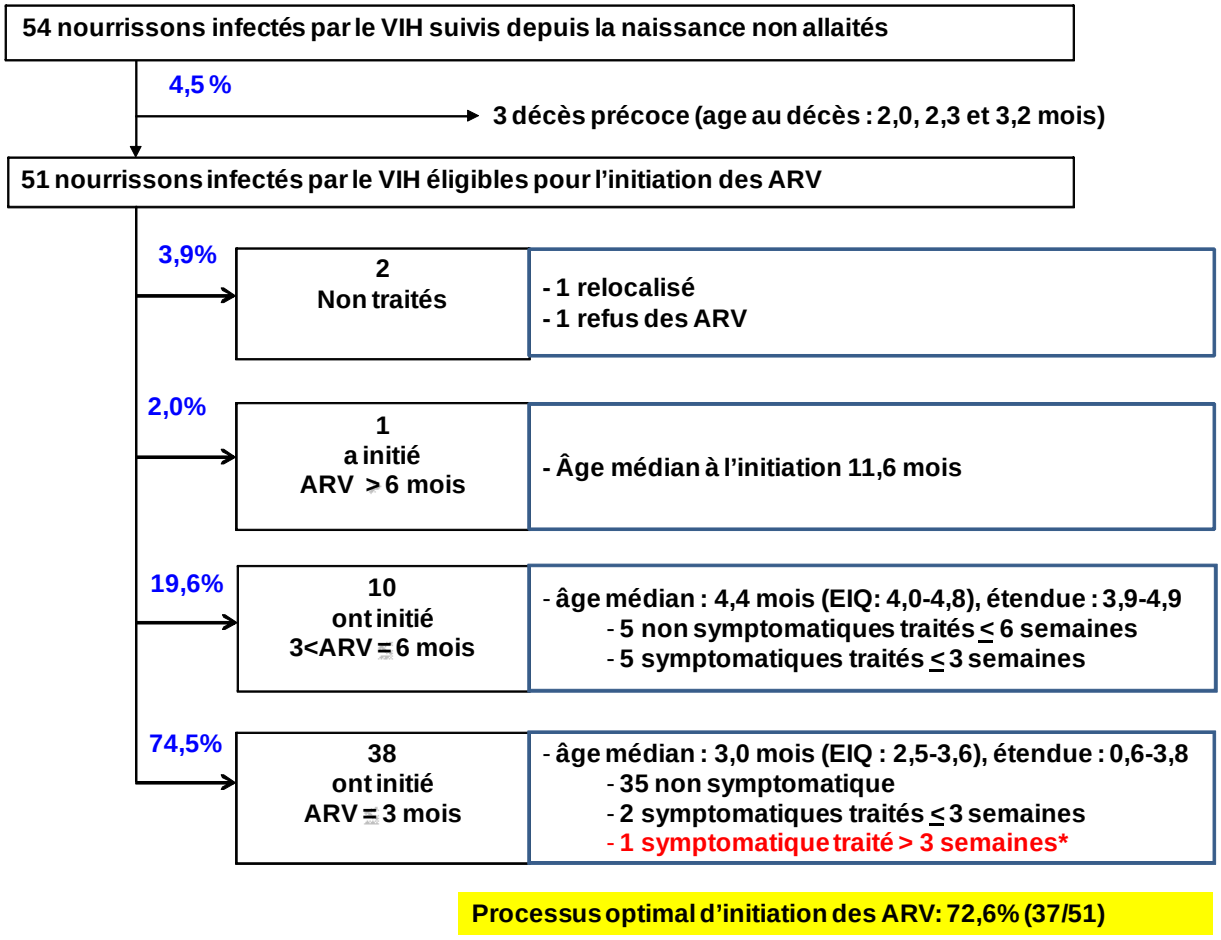


Figure IV-1 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis la naissance, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun

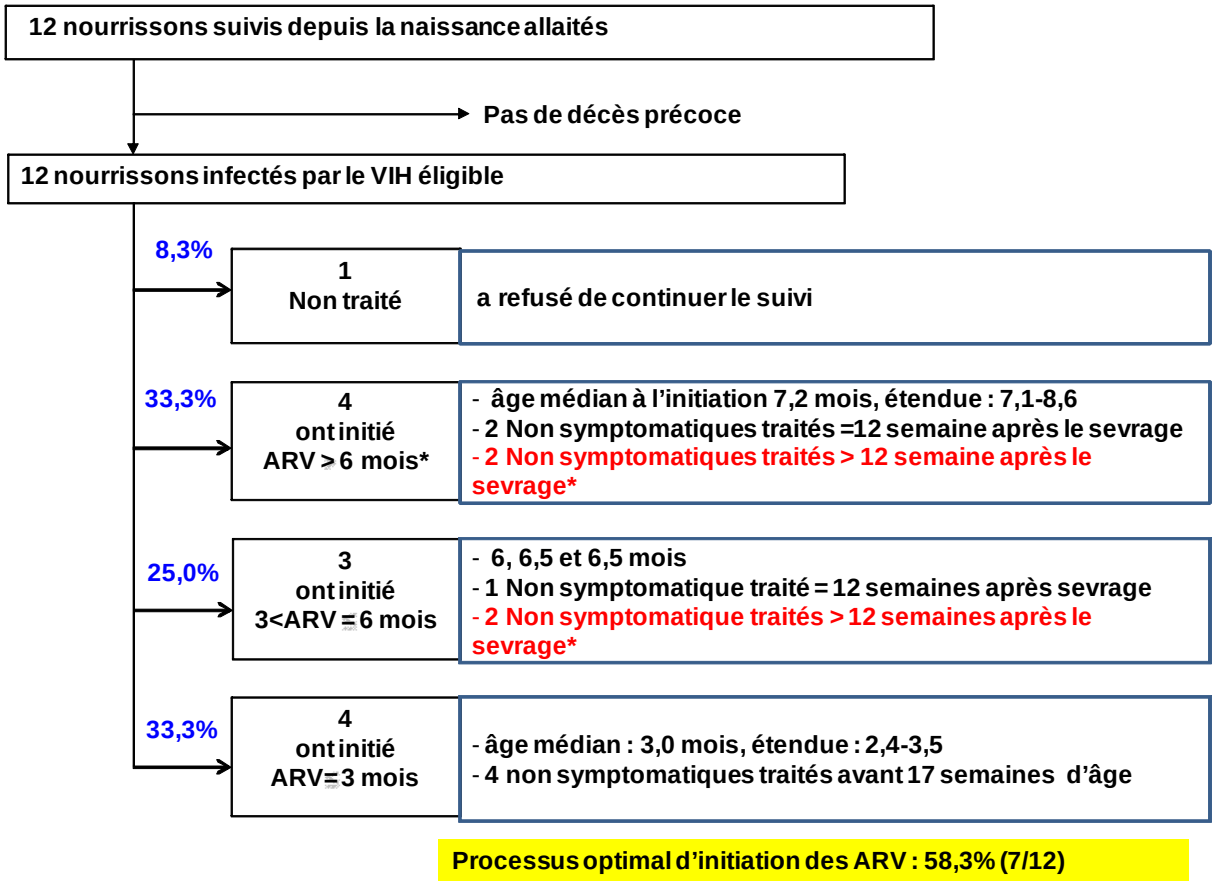


Figure IV-2 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis la naissance et allaités, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun

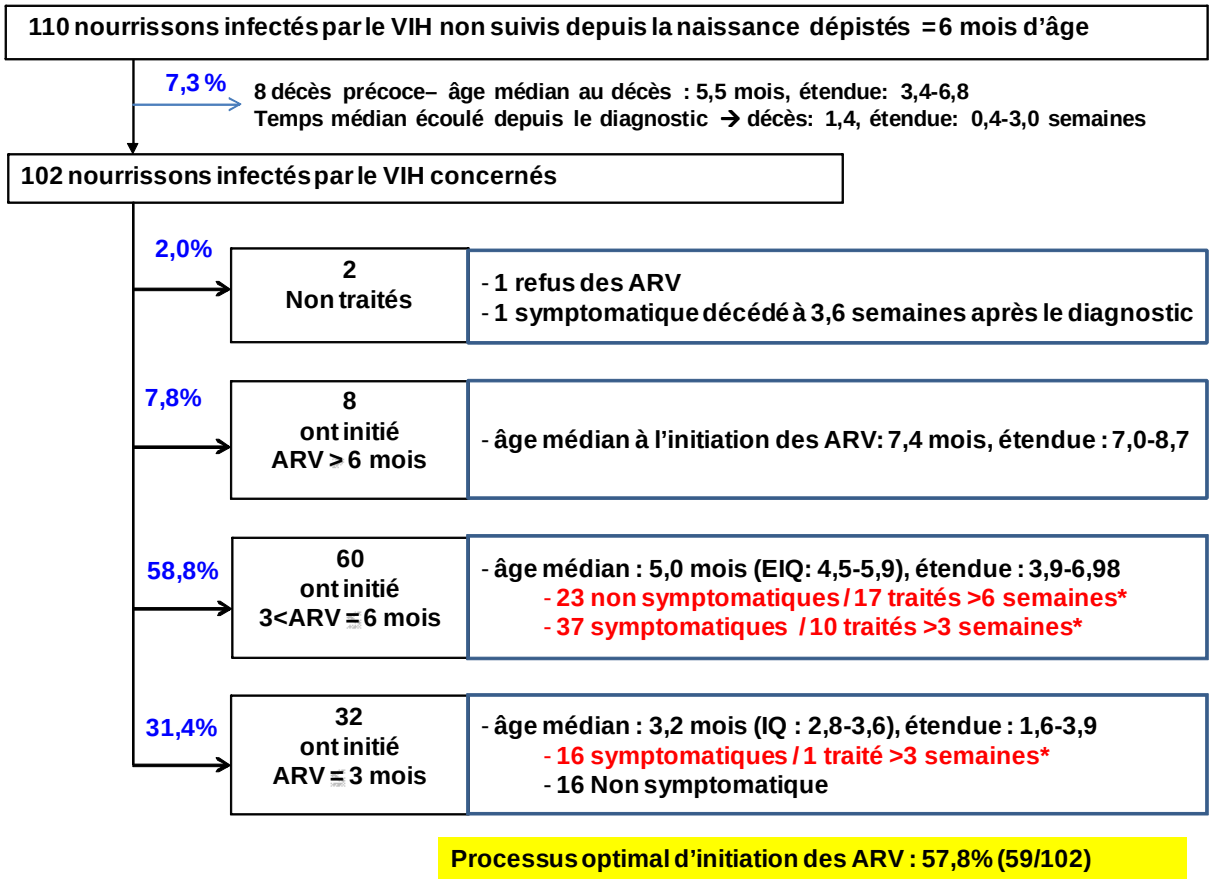


Figure IV-3 : Processus de mise en œuvre des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis le diagnostic avant l'âge de 7 mois, ANRS-PEDIACAM, Cameroun

Tableau IV-2: Caractéristiques maternelles, obstétricales et néonatales des 4 groupes de nourrissons inclus en phase II, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun

	Nourrissons infectés dépistés avant âge<7 mois				**Nourrissons non infectés depuis la 1ère semaine**				Comparaison des 4 groupes
	Suivis depuis la **1ère** sem N=66		Suivis depuis le diagnostic N=110		mères infectées N=205		mères non infectées N=179		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
Site de recrutement									
CME, Yaoundé	29	46,0	50	45,5	98	47,8	92	51,4	0,5
CHE, Yaoundé	20	30,3	36	32,7	52	25,4	53	29,6	
Hôpital Laquintinie, Douala	17	25,8	24	21,8	55	26,8	34	19,0	
Lieu de naissance									
Sites Pediacam	40	60,6	14	12,7	157	76,6	176	98,3	$<10^{-3}$
Statut marital de la mère									
Divorcée ou veuve	2	3,0	2	1,9	5	2,4	3	1,7	0,8
Célibataire	22	33,3	40	36,3	65	31,7	54	30,2	
Mariée/concubinage	42	63,6	66	61,4	135	65,9	122	68,2	
Niveau d'éducation de la mère									
Aucun ou primaire	12	18,5	43	39,8	37	18,2	6	3,4	$<10^{-3}$
secondaire	46	70,8	59	54,6	123	60,6	95	53,4	
Supérieur	7	10,8	6	5,6	43	21,2	77	43,3	
Activité professionnelle de la mère									
Activité rémunérée	31	48,4	36	33,3	90	44,5	75	42,1	0,2
Ménagère, sans emploi, étudiante	33	51,6	72	66,7	112	55,5	103	57,9	
Notion de PTME chez la mère									
Pas d'ARV grossesse/accouchement	19	28,8	72	66,7	8	3,9			$<10^{-3}$
Mode d'accouchement									
Césarienne	3	4,6	2	1,9	28	13,7	20	11,2	0,003
Prématurité									
Oui (<37 semaines gestationnelle)	11	16,7	20	21,7	27	13,2	22	12,3	0,2
Sexe									
Féminin	41	62,1	56	50,9	107	52,2	90	50,3	0,4
Notion d'allaitement									
Oui	12	18,2	58	53,2	20	9,8	178	99,4	$<10^{-3}$
Hospitalisation avant ou à l'inclusion									
Oui	12	19,0	62	56,4	10	4,9	4	2,2	$<10^{-3}$

Tableau IV-3 : Caractéristiques des enfants inclus en phase II dans les 4 groupes de nourrissons, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun

	Nourrissons infectés dépistés avant âge<7 mois				**Nourrissons non infectés depuis la 1ère semaine**				Comparaison des 4 groupes
	Suivis depuis la **1ère** sem N=66		Suivis depuis le diagnostic N=110		mères infectées N=205		mères non infectées N=179		
	n ou médiane	% ou 10–90e	n ou médiane	% ou 10–90e	n ou médiane	% ou 10–90e	n ou médiane	% ou 10–90e	p
Age en mois (médiane, 10–90e)[a]	3,3	1,7-5,3	4,4	2,6-6,5	4,3	3,4-5,8	3,9	3,4-5,3	$<10^{-4}$
Enfant vivant avec (n=557)									
Parents	63	100	93	84,6	203	99,0	179	100	$<10^{-3}$
Tuteur ou aidant ou institution	0	0	17	15,4	2	1,0	0	0	
Réfrigérateur fonctionnel au domicile									
Non	30	47,6	58	56,3	93	46,5	53	30,6	$<10^{-3}$
Oui	33	52,4	45	43,7	107	53,5	120	69,4	
Poids pour l'âge Z score[a]									
Médiane, 10e–90e percentile	-0,4	-2,3-1,6	-2,0	-5,1-0,3	0,4	-1,5-1,8	1,0	-0,6-2,5	$<10^{-4}$
Stade de la maladie (OMS)									
Stades 1 & 2	54	85,7	45	40,9					$<10^{-3}$
Stades 3 & 4	9	14,3	65	59,1					
Age en mois (médiane, 10–90e)[a]									
Au test VIH	1,5	(1,4-4,7)	2,9	(1,5-5,9)	1,4	(1,3-1,6)			$<10^{-4}$
À l'annonce des résultats[c]	2,5	(1,7-5,3)	4,2	(2,7-6,5)	2,5	(2,4-3,4)			$<10^{-4}$
À l'initiation des ARV*	3,5	(2,2-6,5)	4,7	(3,0-7,0)					$<10^{-3}$
Temps écoulé entre (semaines)[a]									
Test VIH et début ARV[b]	6,2	(2,4-12,2)	5,1	(1,1-14,4)					0,5
Test VIH et annonce résultat[c]	3,6	(1,1-5,3)	2,7	(1,0-10,6)	4,6	(4,0-8,3)			$<10^{-3}$
Annonce résultats et début ARV	3,2	(0,0-6,5)	1,1	(0,0-4,1)					0,002
Protocole ARV administré[b]									
contenant inhibiteur de protéase	58	96,7	50	50,0					$<10^{-3}$
contenant Névirapine	2	3,3	48	48,0					
Autres (3 INRT)	0	0,0	2	2,0					

[a] Médiane (10e–90e percentile), p-value pour le test Mann-Whitney ou le test de Kruskall-Wallis
[b] 16 nourrissons non traités par les ARV
[c] 1 nourrisson infecté n'a pas reçu les résultats de son test VIH

Tableau IV-4 : Détail du processus d'initiation des ARV chez les 176 enfants infectés inclus en phase II : analyse de sensibilité selon différentes définitions, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010, Cameroun.

		Critères de définition du processus optimal					
		Définition principale		2e définition		3e définition	
		%	n	%	n	%	n
Décès précoce survenus avant la fin de la période d'intervention							
Oui		6,3	11	6,8	12	6,8	12
Non		93,7	165	93,6	164	93,6	164
Qualité du processus d'initiation ARV chez enfants non décédés		**n=165**		**n=164**		**n=164**	
Optimal		62,4	103	69,5	114	72,0	118
Suboptimal		37,6	62	30,5	50	28,0	46
Détails du processus suboptimal		**n=62**		**n=50**		**n=46**	
Aucun traitement au cours de la première année de vie		8,1	5	8,0	4	8,7	4
Retard	Test VIH initial tardif	14,5	9	24,0	12	32,6	15
	Allongement délai entre test VIH et annonce	37,1	23	36,0	18	30,4	14
	Allongement délai entre annonce et début ARV	24,2	15	22,0	11	23,9	11
	Allongement des deux periodes ci-dessus	16,1	10	1,0	5	4,3	2

Tableau IV-5 : Age au test VIH et différents délais écoulés entre le test VIH, l'annonce des résultats et l'initiation des ARV selon le site de recrutement des nourrissons infectés par le VIH, ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun

	Suivis depuis la 1ère semaine de vie (inclus en phase I)				Inclus à l'occasion d'un diagnostic VIH avant l'âge de 7 mois				Tous les nourrissons infectés par le VIH inclus dans Pediacam			
	CME	CHE	HLD	p	CME	CHE	HLD	p	CME	CHE	HLD	p-value
Age au test VIH (mois)*	1,5 [1,3 ; 5,8] n=29	1,5 [0,8 ; 4,9] n=20	1,5 [1,4 ; 2,1] n=17	0,9	4,1 [1,8 ; 6,3] n=50	2,5 [1,5 ; 4,4] n=36	2,5 [1,5 ; 4,3] n=24	$<10^{-3}$	2,8 [1,4 ; 6,2] n=79	1,7 [1,4 ; 4,4] n=56	2,0 [1,4 ; 3,7] n=41	0,003
Délai (semaines) entre												
Test HIV et annonce des résultats	4,0 [1,4 ; 5,1] n=29	2,3 [0,9 ; 4,7] n=20	4,4 [2,7 ; 8,3] n=16	0,004	2,1 [1,1 ; 6,5] n=50	2,1 [0,4 ; 7,3] n=36	7,6 [1,0 ; 11,0] n=24	$<10^{-3}$	2,7 [1,1 ; 5,3] n=79	2,1 [0,6 ; 11,1] n=56	5,8 [1,6 ; 10,4] n=40	$<10^{-3}$
Annonce des résultats et initiation des ARV	4,7 [0,0 ; 7,7] n=27	2,8 [0,4 ; 4,6] n=18	2,7 [0,0 – 6,7] n=15	0,06	1,0 [0,0 ; 2,8] n=42	1,3 [0,1 ; 3,4] n=34	2,0 [0,0 ; 11,0] n=24	0,005	1,8 [0,0 ; 6,0] n=69	1,9 [0,1 ; 3,6] n=52	2,4 [0,1 ; 9,0] n=39	0,1
Test VIH et initiation des ARV	9,0 [3,1 ; 12,1] n=27	4,7 [1,4 ; 7,7] n=18	8,0 [3,0 ; 14,0] n=15	0,01	3,9 [1,1 ; 8,8] n=42	4,4 [0,6 ; 13,0] n=34	10,9 [5,3 ; 16,3] n=24	$<10^{-3}$	5,0 [1,4 ; 10,0] n=69	4,6 [1,1 ; 12,4] n=52	10,4 [3,0 ; 15,3] n=39	$<10^{-3}$

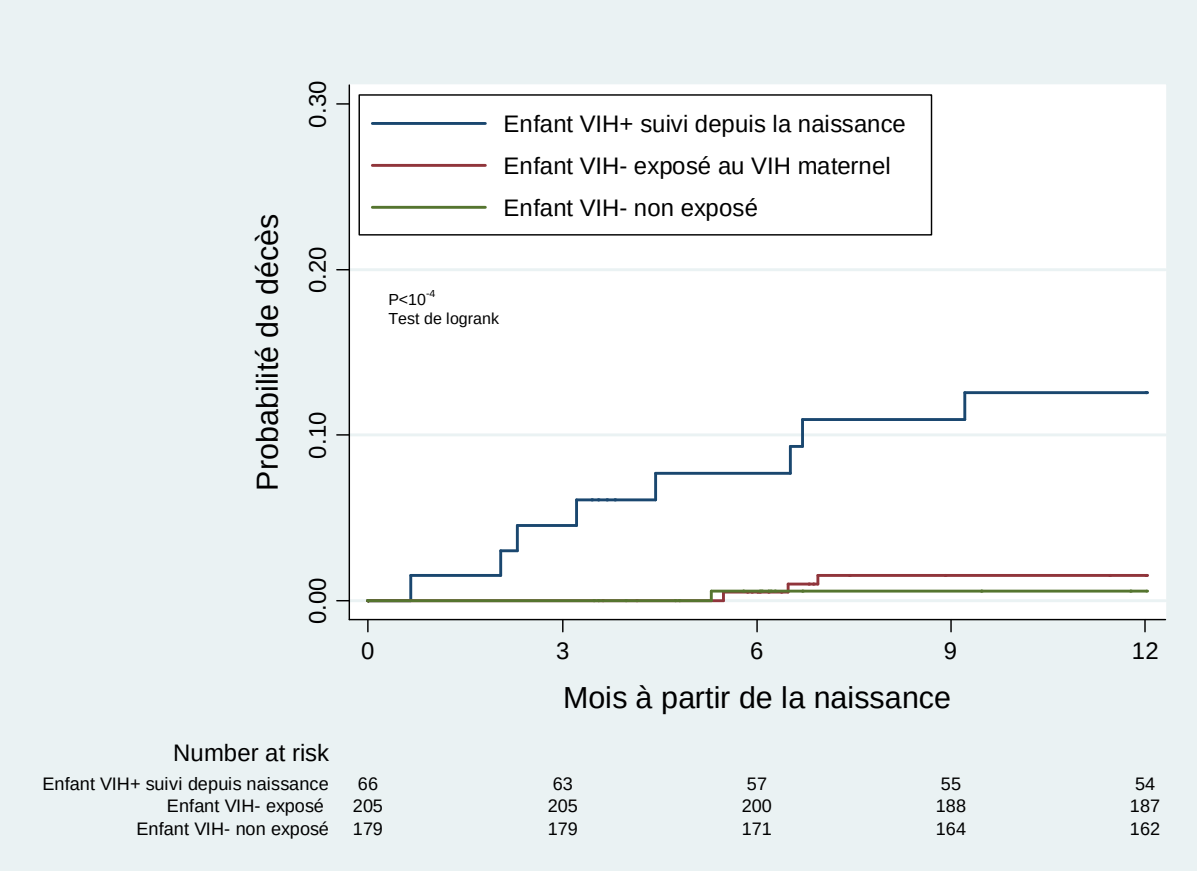
*Médiane (10-90e percentile)
CME: Centre Mère et Enfant, Yaounde
CHE : Centre Hospitalier d'Essos, Yaounde
HLD: Hôpital Laquintinie de Douala

Tableau IV-6 : Régression logistique bi et multivariée: facteurs associés au processus suboptimal d'initiation des ARV chez les nourrissons infectés par le VIH inclus en phase II, ANRS-PEDIACAM, 2007-2010

	Processus suboptimal d'initiation des ARV						
	Analyse bivariée					Analyse multivariée	
	N = 165	n= 62	%	OR brut [$IC_{95\%}$]	p-value	OR ajusté [$IC_{95\%}$]	p-value
Site de recrutement							
HLD - Douala	40	27	67,5	5,3 (2,3-12,3)	$<10^{-3}$	3,7 (1,4-9,5)	0,009
CHE - Yaoundé	54	15	27,8	0,98 (0,4-2,1)		0,9 (0,4-2,1)	
CME - Yaoundé	71	20	28,2	Référence		Référence	
Mode d'inclusion dans Pediacam							
Inclus au diagnostic <7 months	102	43	42,2	1,7 (0,9-3,3)	0,12	2,2 (0,9-5,2)	0,09
Inclus en phase 1 (1ère sem vie)	63	19	30,2	Référence		Référence	
Lieu de naissance							
Hors site Pediacam	112	41	36,6	0,9 (0,4-1,7)	0,9	-	
Maternités Pediacam	53	21	39,6	Référence			
Année de réalisation du test VIH							
2007-2008	62	28	45,2	1,7 (0,9-3,4)	0,12	2,1 (0,96-4,5)	0,06
2009-2010	103	34	33,0	Référence		Référence	
Statut marital de la mère							
Célibataire/divorcée/veuve	60	25	41,7	1,3 (0,7-2,6)	0,4	-	
Mariée/concubinage	103	36	35,0	Référence			
Niveau d'études de la mère							0,4
Aucun ou primaire	49	21	42,9	0,6 (0,2-2,2)	0,2	0,8 (0,2-3,4)	
Secondaire	100	33	33,0	0,4 (0,1-1,4)		0,5 (0,1-1,9)	
Supérieur	13	7	53,9	Référence		Référence	
Activité professionnelle de la mère							
Activité rémunérée	62	23	37,1	0,96 (0,5-1,8)	0,9	-	
Autres *	100	38	38,0	Référence			
Réfrigérateur fonctionnel au domicile							
Non	81	32	39,5	0,9 (0,5-1,7)	0,8	-	
Oui	75	28	37,3	Référence			
Notion d'ARV pour la PTME							
Non	84	38	45,2	1,9 (1,0-3,6)	0,05	1,5 (0,7-3,1)	0,3
Oui	79	24	30,4	Référence			
Sexe							
Masculin	75	29	38,7	1,1 (0,6-2,0)	0,8	-	
Féminin	90	33	36,7	Référence			
Notion d'allaitement							
Oui	65	27	41,5	1,3 (0,7-2,5)	0,4	-	
Non	99	35	35,4	Référence			
Hospitalisation avant phase 2							
Oui	67	22	32,8	0,7 (0,4-1,4)	0,8	-	
Non	96	38	39,6	Référence			
Prématurité							
Oui (<37 semaines)	31	13	41,9	1,3 (0,6-2,9)	0,5	-	
Non (≥37 semaines)	117	42	35,9	Référence			
Délai annonce-bilan pré-thérapeutique							
>7 jours	25	15	60,0	3,7 (1,5-8,9)	0,005	3,3 (1,1-9,9)	0,06
1-7 jours	21	11	52,4	2,7 (1,0-6,9)		2,1 (0,7-6,4)	
0 jour (le jour de l'annonce résultat)	117	34	29,1	Référence		Référence	

n=159: nombre d'enfants impliqués dans l'analyse multivariée *chômage/formation/ménagère/étude

Figure IV-4 : Courbes de survie brute à partir de la naissance et jusqu'à un an selon le mode d'inclusion et le statut VIH de l'enfant et de la mère (Méthode de Kaplan Meier), ANRS-Pediacam, 2007-2010, Cameroun



Number at risk

Enfant VIH+ suivi depuis naissance	66	63	57	55	54
Enfant VIH- exposé	205	205	200	188	187
Enfant VIH- non exposé	179	179	171	164	162

IV.3 Discussion

Les directives pour le traitement précoce de l'infection VIH chez les nourrissons infectés se diffusent progressivement dans la plupart des pays à ressources limitées, selon les recommandations de l'OMS (WHO, 2010b). L'étude ANRS-PEDIACAM a été mise en place pour évaluer la faisabilité d'une multithérapie antirétrovirale systématiquement offerte aux nourrissons infectés par le VIH suivis depuis leur première semaine de vie ou dépistés avant l'âge de 7 mois dans trois hôpitaux de référence localisés dans les deux plus grandes villes du Cameroun. La finalité de l'étude était d'identifier les points forts, les contraintes et les difficultés de cette intervention en vue de faciliter si possible, le passage à l'échelle de ces recommandations dans les pays comparables.

A notre connaissance, cette étude interventionnelle est la première conduite dans un contexte proche de la routine, et portant sur une population plus large et moins sélectionnée que les essais randomisés qui tendent à inclure les familles les plus observantes à priori (Violari A et al, 2008).

a) Acceptabilité élevée du traitement antirétroviral par les familles

Globalement, 83,5% des nourrissons ont initié les antirétroviraux avant l'âge de 7 mois, avec un délai médian entre le test VIH et le début des ARV de 5,4 semaines (IQ : 3,0 à 9,6). Ce délai était deux fois plus court que celui observé dans une étude observationnelle concernant les nourrissons âgés de 0 à 18 ans a Haïti (George E et al, 2007). Une très faible proportion (2,4%) de parents a refusé le traitement et/ou la poursuite du suivi.

Dans une récente publication ayant évalué plusieurs programmes nationaux en Afrique et en Asie, seulement 22 à 38% des nourrissons infectés par le VIH, dépistés par PCR, avaient initié les traitements ARV dans 3 des 4 pays étudiés. Dans le 4^{e} pays (la Namibie), 70% des nourrissons infectés avaient initié un traitement, probablement en raison de l'anticipation de la mise en place des recommandations de traitements ARV précoces (Chatterjee A et al, 2011). Ces résultats, moins bons que les nôtres peuvent s'expliquer par le fait que ces études ont été menées au moment où les recommandations internationales sur le moment de démarrer les antirétroviraux étaient en cours de modification. Ils contrastent avec les pays développés où une forte proportion des nouveaux nés de mères infectées par le VIH dépistés dans les programmes PTME est mise sous traitement ARV précoce depuis la fin des années 2000 (Dunn D, 2003; Aboulker JP et al, 2004; Faye A et al, 2004).

Néanmoins, chez un tiers des nourrissons, les délais entre le test VIH et le début des ARV d'une part, ou l'annonce des résultats à la famille, d'autre part, n'étaient pas optimaux selon

les différentes définitions que nous avons utilisées. Or un retard à l'initiation des traitements ARV peut conduire rapidement au décès (Abrams EJ et al, 2003; Dunn D, 2003; Newell ML et al, 2004b; Violari A et al, 2008).

Notre définition d'optimalité était basée sur les recommandations OMS de diagnostic précoce, calées sur le calendrier du PEV et sur les résultats de l'essai randomisé CHER qui a évalué l'efficacité sur la survie d'un traitement initié avant l'âge de 12 semaines. Dans l'idéal, le test VIH devrait être réalisé à 6 semaines de vie et les résultats rendus au plus tard 4 semaines après la date de prélèvement, comme le suggèrent les directives de l'OMS, donc autour de l'âge de 10 semaines (Violari A et al, 2008; WHO, 2010b). En cas de résultat positif ou douteux, le test de confirmation devait être réalisé en même temps qu'une évaluation de l'environnement social et familial et de la présentation du programme thérapeutique aux parents avec la perspective d'initier les ARV lors de la confirmation du diagnostic à 14 semaines de vie. Nous avons ajouté une marge de deux semaines supplémentaire pour tenir compte des difficultés pratiques du processus (collecte de l'échantillon, conditionnement et transport vers le laboratoire, retour des résultats au clinicien, annonce des résultats à la famille, confirmation des résultats et évaluation de l'environnement familial), de sorte qu'une initiation des ARV à 16 semaines au plus tard, pour un enfant entré dans ce processus à partir de sa première semaine de vie, correspondait à un processus raisonnablement optimal.

Cette définition était plus contraignante que celle que nous avions adoptée dans le chapitre III, dans lequel nous considérions que le processus était complet lorsque le résultat était rendu à la famille avant l'âge de 6 mois. Mais il s'agissait de résultat positif ou négatif. Ici, l'optimalité consistait à mettre sous traitement les enfants infectés sans retard par rapport à l'intervention planifiée.

Pour les enfants infectés contaminés par l'allaitement, le délai d'optimalité ne devait pas dépasser 12 semaines entre le sevrage et la mise sous traitement, intégrant la nécessité d'attendre au moins 6 semaines après ce sevrage pour réaliser un nouveau test de VIH.

Dans tous les cas, pour les enfants symptomatiques, un traitement débuté au-delà de 3 semaines après l'annonce des résultats à la famille n'était pas optimal en raison de l'urgence thérapeutique, même s'il faut stabiliser les affections opportunistes avant le démarrage des ARV.

b) Facteurs associés à un processus suboptimal d'initiation des antirétroviraux

Selon les définitions, un processus non optimal concernait, au pire, 37,6% des nourrissons et, au mieux, 28%. Les seuls facteurs indépendamment liés à un processus suboptimal

étaient le site de recrutement, le mode de recrutement dans PEDIACAM et le fait de différer la réalisation du bilan biologique après l'annonce des résultats, alors qu'en principe ce bilan aurait dû être réalisé le jour de l'annonce. Aucune caractéristique sociodémographique, ou en relation avec les conditions de vie n'était associée au processus suboptimal d'initiation des ARV. Ceci suggère que les raisons majeures de retard étaient beaucoup plus liées au système de soins, incluant le retard à la collecte de l'échantillon et le processus de traitement des échantillons et du rendu des résultats. Mais, on ne peut écarter complètement un défaut de puissance de notre étude. Avec les effectifs disponibles, Pediacam a une puissance de 80%, avec une erreur de 1ère espèce de 0,05, pour mettre en évidence des OR de 2,5 mesurant l'association entre processus suboptimal et l'absence de réfrigérateur fonctionnel dans le domicile de l'enfant, l'absence d'activité rémunérée de la mère ou un niveau d'étude bas. La puissance est insuffisante pour mettre en évidence des associations moins fortes.

L'effet site peut s'expliquer en partie par des mécanismes organisationnels allongeant le délai entre le test et l'annonce des résultats. A Douala, le diagnostic de VIH était réalisé sur sang séché sur papier buvard utilisé dans le Laboratoire National de Référence couvrant cette région localisé à 50 km de Douala. Le temps de conditionnement, de conservation, de transport, d'analyses, de retour des résultats sur le site est souvent long comme le rapportent certaines études (Khamadi S et al, 2008; Nuwagaba-Biribonwoha H et al, 2010), même si une étude réalisée en Tanzanie a rapporté un temps médian entre la collecte de l'échantillon et l'annonce des résultats de 23 jours en utilisant le papier buvard (Lofgren SM et al, 2009). À partir de l'année 2009, pour réduire ce délai sur le site de Douala, deux échantillons de DBS ont été collectés pour chaque enfant, dont un a été envoyé parallèlement au laboratoire de virologie du Centre Pasteur du Cameroun. Ce changement de modalités pourrait expliquer la diminution des processus sub-optimaux avec l'année de réalisation du test VIH.

Il est plus difficile de comprendre le sens du lien avec le mode d'inclusion dans Pediacam. La proportion de processus suboptimal est significativement moins élevée chez les enfants inclus en phase I, c'est-à-dire entrant dans le processus de dépistage depuis leur naissance que dans le groupe des enfants inclus à l'occasion du diagnostic. Cette observation est surprenante car on se serait attendu à ce que l'urgence liés aux modalités diagnostiques des des enfants du deuxième groupe, dont deux tiers étaient symptomatiques, génère une très grande rapidité dans la mise sous ARV. On ne peut étudier directement le lien avec l'existence de symptômes car cette information n'est collectée pour les enfants inclus en phase I qu'au moment de l'inclusion en phase II.

Théoriquement, le conseil aux familles doit commencer immédiatement après l'annonce des résultats du premier test VIH sans attendre les résultats du test de confirmation réalisé le jour même de l'annonce. Néanmoins, la priorité donnée à la stabilisation de l'état d'un nourrisson symptomatique avant de démarrer les ARV explique peut-être en partie un décalage dans l'initiation de ces traitements. Il est également possible que, pour les nourrissons asymptomatiques, les cliniciens se donnent le temps d'attendre les résultats du test de confirmation avant de démarrer les ARV comme le suggère l'association entre processus suboptimal et le décalage de réalisation du bilan biologique pré-thérapeutique. Enfin une troisième raison possible pourrait provenir de la durée nécessaire pour permettre aux parents ou personnes en charge du nourrisson infecté par le VIH de comprendre le nouveau statut de leur enfant, d'accepter ce résultat. La découverte du VIH de l'enfant peut aussi être l'occasion de révéler le statut VIH de la mère et éventuellement du père, entraînant une perturbation familiale susceptible d'interférer négativement avec la prise en charge rapide de l'enfant. Dans les situations où les parents n'ont pas d'autonomie financière, le personnel médical et les auxiliaires psychosociaux les encouragent à faire venir une personne de leur entourage (famille ou autre) qui s'engagera à les assister de temps à autre pendant le traitement.

c) Mortalité infantile

Une proportion relativement élevé des nourrissons (6,3%, dont 3,6% de nourrissons suivis depuis la première semaine de vie) sont décédés trop tôt après le diagnostic pour avoir le temps d'être traités. Ils sont décédés plus vite que le délai optimal prévu pour réaliser et rendre le résultat du test à la famille. Ce taux élevé de décès précoce est peu sensible aux critères de définition d'optimalité. On voit mal comment planifier une intervention plus rapide alors que l'intervention actuelle ne parvient pas à être réalisée dans les délais prévus pour un tiers des nourrissons.

Parmi les nourrissons infectés par le VIH suivis depuis la première semaine de vie dans PEDIACAM, la probabilité cumulée de décès au cours de la première année de vie était 12,5%, nettement plus faible que dans les cohortes conduites en Afrique subsaharienne sans ARV ou prophylaxie au cotrimoxazole (35%) (Newell ML et al, 2004b).

La mortalité à 1 an est nettement plus élevée chez les enfants inclus à l'occasion du diagnostic de VIH. Or ce groupe est majoritaire dans Pediacam. Ceci reflète l'accès insuffisant des femmes enceintes à la PTME qui conduit à un diagnostic tardif des nourrissons souvent à l'occasion d'une complication grave. Ce résultat souligne l'importance de renforcer et passer à l'échelle les services de prévention de la TME et d'établir des liens

structurels entre les différents services de l'hôpital pour identifier précocement les nourrissons exposés au VIH et traiter ceux qui sont infectés par le VIH.

La mortalité à un an des nourrissons non infectés étaient également beaucoup plus faible dans notre étude que dans certaines études qui ont rapporté des taux de mortalité de 4,9% chez les nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH (Newell ML et al, 2004b) et 10% (Obimbo EM et al, 2004) chez les nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH. La mortalité infantile dans la population générale du Cameroun a été estimée à 6,2% (INS et al, 2011). Il est possible que la faible mortalité dans PEDIACAM ait été en partie sous estimée par les perdus de vue à 1 an (7,3% chez les nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH). Mais elle découle probablement en grande partie d'un suivi actif et un accès facilité de ces enfants au système de soins et au programme de vaccination.

IV.4 Conclusion

Nos résultats suggèrent fortement que le traitement précoce de l'infection VIH chez les nourrissons est faisable en pratique de routine dans les services de pédiatrie urbains à condition d'assurer une coordination active, une prise en charge gratuite et la stratégie de relance par téléphone des familles non revues en consultation.

La mortalité relativement faible dans ce contexte de routine d'un pays à ressources limitées, en intention de traiter, pourrait résulter en partie de l'efficacité d'une prise en charge médicale précoce des nourrissons infectés par le VIH.

Il reste cependant une marge d'amélioration pour ce processus par une organisation fonctionnelle et structurelle plus efficiente des sites. Il est important de poursuivre la formation des praticiens et autres agents de santé sur l'importance d'une initiation précoce des ARV, et pour apporter un soutien actif aux familles au moment de l'annonce du diagnostic de l'enfant.

Chapitre V : La vaccination des enfants nés de mères séropositives pour le VIH dans le contexte du Programme Elargi de Vaccination. Comparaison de la réponse humorale à type de persistance des anticorps chez les enfants infectés et non infectés

Ce travail a fait l'objet de deux publications scientifiques présentées en annexe (Tejiokem MC et al, 2007; Tejiokem MC et al, 2009)

Tejiokem MC, Njamkepo E, Gouandjika I, Rousset D, Béniguel L, Bilong C, Tene G, Penda I, Ngongueu C, Gody JC, Guiso N, Baril L. Whole-cell pertussis vaccine induces low antibody levels in human immunodeficiency virus-infected children living in sub-Saharan Africa. **Clin Vaccine Immunol**. 2009 Apr;16(4):479-83.

Tejiokem MC, Gouandjika I, Béniguel L, Zanga MC, Tene G, Gody JC, Njamkepo E, Kfutwah A, Penda I, Bilong C, Rousset D, Pouillot R, Tangy F, Baril L. HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the Expanded Program on Immunization. **PLoS One**. 2007 Dec 5;2(12):e1260.

V.1 Méthodes utilisées

V.1.1 Population d'étude

Cette étude a porté sur les enfants inclus dans les sites participant à l'enquête transversale EPIPEV. Ils étaient âgés de 18 à 36 mois, nés de mères séropositives, infectés ou non infectés par le VIH, et ayant reçu les vaccins du PEV (voir chapitre II, paragraphe II.2.2.1).

V.1.2 Définition de la variable d'intérêt : persistance d'anticorps post-vaccinaux

Pour chaque antigène vaccinal (vaccin polio oral 1, 2 et 3, diphtérie, tétanos, coqueluche et rougeole), la réponse vaccinale à type de persistance d'anticorps mesurée à l'inclusion dans l'étude, a été définie par une variable en deux catégories, selon que le titre d'anticorps était supérieur au seuil de positivité (réponse adéquate) ou inférieur au seuil (réponse inadéquate). Ces variables ont été utilisées pour chacun des antigènes vaccinaux comme variable dépendante.

V.1.3 Description des autres variables utilisées

Les données sociodémographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques collectées par questionnaire portaient sur l'âge, le sexe, la notion d'allaitement maternel, les signes cliniques, le nombre de doses vaccins reçus, le délai depuis la dernière dose vaccinale et les traitements antirétroviraux reçus. Les données de charge virale et de CD4 mesurées au moment de l'inclusion ont permis de définir plusieurs variables combinées avec le statut VIH

- Une variable combinant le statut VIH et le pourcentage de lymphocytes TCD4 (non infecté, infecté avec un % CD4 $\geq$ 25%, infecté avec un % CD4 < 25%)
- Une variable combinant le statut VIH et la charge virale (non infecté, infecté avec une charge virale $\geq$ 10 000 cp/ml, infecté avec une charge virale < 10 000 cp/ml)
- Une variable combinant le statut VIH et la durée des ARV (« non infecté », « infecté avec ARV $\geq$ 6 mois », « infecté avec ARV < 6 mois »)

Concernant les paramètres anthropométriques, deux variables ont également été mesurées à l'inclusion :

- Le pli cutané : défini par la moyenne des plis cutanés tricipital et sous-scapulaire.
- Le périmètre brachial ajusté sur l'âge (MUAC for age - Mid Upper Arm circumference) : dont la valeur seuil indiquant un état de malnutrition se situe à une valeur de Z score inférieure à -2 (de Onis M et al, 2003; de Onis M et al, 2009).

V.1.4 Stratégie d'analyses statistiques

Les pourcentages de réponses inadéquates et les moyennes géométriques des titres d'anticorps chez les sujets détectables ont été comparés chez les enfants infectés et non infectés par des tests de Chi deux ou des tests exacts de Fisher pour les variables catégorielles ou les tests de Mann Whitney pour les variables continues.

L'étude des facteurs associés à la réponse vaccinale (variable dépendante), en termes de persistance d'anticorps pour chaque antigène vaccinal a été réalisé par un modèle de régression logistique multiple tenant compte des caractéristiques cliniques, sociodémographiques et biologiques, et ajustant systématiquement sur le statut VIH de l'enfant, le pays de recrutement, le statut nutritionnel et le sexe.

Les autres variables ont été incluses dans le modèle si le seuil de significativité en analyse univariée était inférieur à 0,25.

La stratégie pas à pas descendante manuelle a été utilisée pour simplifier notre modèle de régression. Le logiciel d'analyses statistiques utilisé était STATA®8 - College Station, TX, USA.

V.2 Résultats

V.2.1 Population étudiée

Au cours de la période allant de novembre 2004 à mai 2005, 177 enfants nés de mères séropositives (54 infectés et 123 non infectés par le VIH1) ont été pré-inclus dans l'ensemble des sites du Cameroun et de la République Centrafricaine (RCA). Parmi eux, 48 enfants (dont 44 de la RCA) n'ont finalement pas été inclus pour des raisons diverses : début de la primo-vaccination après l'âge d'un an, vaccination incomplète (Figure II-2).

Au total, 129 enfants ont été inclus dans l'étude : 51 infectés par voie périnatale (16 en RCA et 35 au Cameroun) et 78 enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH (44 en RCA et 34 au Cameroun). L'âge médian des enfants enrôlés était de 22,9 mois (IQ : 19,5 à 28,1) significativement plus élevé chez les enfants infectés par le VIH que chez les enfants non infectés par le VIH (24,9 vs 22,4 mois ; p=0,03). Le sexe, la notion d'allaitement maternel, le poids à l'inclusion, le nombre de doses de vaccins reçu (DTCoq et rougeole) et la fréquence des gouttes épaisses positives pour le paludisme n'étaient pas associés significativement au statut VIH de l'enfant (Tableau V-1 et Tableau V-2).

Le temps médian écoulé entre le prélèvement sanguin pour la détermination de la sérologie vaccinale et la dernière dose de vaccin reçue était de 17,3 mois (IQ : 14,2 à 21,6) pour le DTCoq et VPO et de 12,8 mois (IQ : 9,3 à 18,0) pour le vaccin contre la rougeole globalement comparable entre les deux groupes d'enfants. Peu d'enfants avaient reçu une dose de rappel de DTCoq VPO (15%) ou une seconde dose de vaccin rougeole (7%).

Selon la classification clinique OMS, 70,1% des enfants infectés par le VIH étaient classés au stade 1 et 29,9% au stade 2. Environ deux tiers de ces enfants étaient sous ARV (33/51) au moment de l'inclusion dans l'étude (6 en RCA et 27 au Cameroun). La durée du traitement était supérieure ou égale à 6 mois chez 61% (20/33). L'âge médian au démarrage des ARV était de 18,1 mois (IQ : 13,0 à 21,5) indiquant que la majorité des enfants avaient démarré les ARV longtemps après avoir reçu la première série de vaccination du Programme Elargi de Vaccination. Le type de traitement les plus fréquents étaient la combinaison AZT+3TC+NVP (n=22) et D4T+3TC+NVP (n=8). Parmi les enfants infectés par le VIH, 61% (31/51) avaient une charge virale plasmatique en dessous de 10 000 copies/ml (6 en RCA et 25 au Cameroun). La proportion d'enfants ayant un bon statut immunitaire (CD4 $\geq$ 25%) était de 39,2%.

V.2.2 Facteurs associés à une réponse vaccinale inadéquate contre les antigènes vaccinaux chez les enfants nés de mères séropositives

La proportion d'enfants présentant un niveau d'anticorps adéquat contre les différents antigènes vaccinaux testés était globalement plus faible chez les enfants infectés que non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH.

A l'exception des poliovirus types 1 et 2, cette différence était statistiquement significative pour la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, la rougeole et le poliovirus 3. La moyenne géométrique des titres d'anticorps était également plus faible chez les enfants infectés par le VIH que chez les enfants non infectés par le VIH sauf pour le vaccin rougeole, la diphtérie et la coqueluche (Tableau V-3).

Les analyses bivariées ont montré une association significative entre les covariables liées au statut VIH (ARV, %CD4, charge virale) et la réponse inadéquate contre les différents antigènes vaccinaux testés. L'allaitement maternel était associé à une réponse inadéquate contre la rougeole. Un long délai depuis la dernière vaccination était associé à une réponse inadéquate contre la coqueluche, la diphtérie et le tétanos. L'existence d'un signe clinique à l'inclusion était associée à une réponse inadéquate contre la coqueluche. Le sexe masculin et le fait d'être inclus dans les sites du Cameroun tendaient à être associés à une réponse inadéquate contre le tétanos (Tableau V-4 et Tableau V-5).

L'analyse de régression logistique multivariée réalisée pour chaque valence vaccinale a montré que la variable combinée statut VIH-CD4% était associée à une réponse inadéquate : pour tous les antigènes vaccinaux, excepté le tétanos, les enfants infectés par le VIH avec des niveaux d'immunodépression sévères (CD4 < 25%) avaient un risque plus élevé d'avoir une réponse inadéquate comparés aux enfants non infectés (Tableau V-6).

Le délai long depuis la dernière vaccination DTCoq (>18 mois) était significativement associé à une réponse inadéquate d'anticorps contre la diphtérie et le tétanos.

Il existait un lien significatif entre la réponse inadéquate contre la coqueluche et la présence des signes cliniques et un nombre de dose de vaccins reçus inférieur à 4. Aucune notion de coqueluche n'a été rapportée mais une toux persistante au delà d'une période de 21 jours a été notée chez 9 enfants infectés par le VIH (17,6%) et seulement 2 (2,6%) enfants non infectés par le VIH.

Parmi les 9 enfants infectés par le VIH avec une toux persistante, deux avaient un taux d'anticorps anti-TP (Toxine pertussique) très élevé (180 EU/ml) et étaient négatifs en AGG (Agglutinines). Ces enfants avaient reçu 3 doses de vaccins contre le DTCoq et la dernière

dose avait été faite environ 15 mois avant cette étude. Mais le taux élevé d'anti-TP serait en relation avec un contact avec *B. pertussis*.

Pour les deux enfants non infectés par le VIH mais ayant présenté une toux persistante, les faibles titres en anti-TP permettait de conclure à l'absence d'infection à *B. pertussis*.

Six autres enfants avaient des taux d'anti-TP assez élevés ($\geq$100EU/ml). Chez aucun de ces enfants n'avait été rapportée une notion de toux persistante au moment de l'inclusion. Parmi eux, 4 étaient négatifs aux AGG (un enfant infecté par le VIH et 3 non infectés par le VIH) et deux positifs aux AGG (tous non infectés par le VIH). L'infection aigue à *B pertussis* pouvait être évoquée chez ces enfants sur la base du taux élevé d'anti-TP et du délai entre la dernière vaccination et le prélèvement pour l'analyse sérologique. Mais en l'absence d'éléments sur la culture ou la PCR, il n'est pas possible de faire la différence entre des anticorps vaccinaux et les anticorps infectieux.

Tableau V-1 : Comparaison des caractéristiques sociodémographiques et cliniques des enfants inclus dans l'étude EPIPEV en fonction du statut VIH, 2004-2006, Cameroun et RCA

	Enfants infectés par le VIH N = 51		**Enfants non infectés nés de mères VIH+ N = 78**		*p*
	Médiane ou %	n ou IQ	Médiane ou %	n ou IQ	
Sites					
RCA, CNP, Bangui	31,4	**16**	56,4	**44**	0,005
CAMEROUN	68,6	**35**	43,6	**34**	
CME, Yaoundé		20		26	
CASS, Nkolndongo, Yaoundé		6		8	
CHE, Yaoundé		2		0	
HLD, Douala		7		0	
Sexe					0,45
Féminin	54,9	28	61,5	48	
Masculin	45,1	23	38,5	30	
Allaitement maternel					0,07
Oui	68,6	35	52,6	41	
Non	31,4	16	47,4	37	
Symptômes généraux					10^{-4}
Non	65,8	32	91,0	71	
Oui	37,2	19	9,0	7	
Classification clinique OMS					
Catégorie I	70,1	36			
Catégorie II	29,9	15			
Catégorie III	0	0			
Durée du traitement en classes					
< 6 mois	25,5	13			
≥ 6 mois	39,2	20			
Non traité	35,3	18			
Périmètre brachial ajusté sur l'âge					0,02
MUAC < -2 Z score: malnutrition	29,4	15	12,8	10	
MUAC ≥ -2 Z score : Normal	70,6	36	87,2	68	
Rougeole - Nombre doses reçus					0,8
1	92,2	47	93,6	73	
2	7,8	4	6,4	5	
DTC - Nombre de doses reçus					0,8
3	86,3	44	84,6	66	
4	13,7	7	15,4	12	
Poids en Kg			*n=76*		0,25
Médiane	10,8	9-12	10,7	10 - 12	
Plis cutanés moyen	*n=48*		*n=76*		0,20
Médiane (en mm)	7,0	6,0-8,3	7,3	6,5 - 8,5	
Age (en mois)					0,03
Médiane (en mois)	24,9	20,0-30,7	22,4	19,4 – 26,3	
Terme de grossesse	*n=33*		*n=39*		0,68
Médiane (en semaines)	40	38-40	39	38 – 40	

RCA : République Centrafricaine, CNP : Centre National Pédiatrique, CME : Centre Mère et Enfant, CHE : Centre Hospitalier d'Essos, CASS : Centre d'Animation et d'Action Sociale et Sanitaire, IQ : Interquartile

Tableau V-2 : Comparaison des caractéristiques biologiques des enfants inclus dans EPIPEV en fonction du statut VIH, 2004-2006, Cameroun et RCA

	Enfants infectés par le VIH N = 51		**Enfants non infectés nés de mères VIH+ N = 78**		*p*
	%	n	%	n	
Résultat goutte épaisse					0,70
Négatif	80,4	41	61,3	65	
Positif	19,6	10	16,7	13	
Anémie (Hb < 11 g/dL)				*n=75*	0,33
Non	39,2	20	48,0	36	
Oui	60,8	31	52,0	39	
Macrocytose (VGM ≥ 83 fl)				*n=75*	**$< 10^{-4}$**
Non	56,9	29	90,7	68	
Oui	43,1	22	9,3	7	
Leucocytes				*n=75*	0,23
3,0 – 10,0 *10^9/L	62,8	32	52,0	39	
> 10,0 *10^9/L	37,2	19	48,0	36	
Lymphocytes				*n=75*	0,87
1,0 – 5,0 *10^9/L	41,2	21	42,7	32	
> 5,0 *10^9/L	58,9	30	57,3	43	
Hyper protidémie (protéines > 85g/l)		*n=49*		*n=77*	**10^{-4}**
Non	65,3	32	93,5	72	
Oui	34,7	17	6,5	5	
Charge virale en classes (copies / ml)					
< 10 000	60,8	31			
≥ 10 000	39,2	20			
Pourcentage de lymphocytes TCD4+					
< 15%	29,4	15			
15-24 %	31,4	16			
≥ 25%	39,2	20			

Tableau V-3 : Proportion d'enfants avec une réponse vaccinale adéquate et moyenne géométrique des titres (MGT) pour les anticorps contre la rougeole, la diphtérie, le tétanos, la coqueluche et la poliomyélite selon le statut VIH de l'enfant, EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA

Antigène vaccinal		Enfants infectés par le VIH			Enfants non infectés par le VIH			*P*1*	*P*2†
	Nombre de doses	N	Réponse adéquate n (%)	MGT‡ [IC à 95%]	N	Réponse adéquate n (%)	MGT‡ [IC à 95%]		
Rougeole									
Enzygnost	Total	50	8 (16,0)	1091,5 [576,1-2067,8]	77	48 (62,3)	943,2 [782,7-1136,6]	$<10^{-4}$	0,56
	1 dose	46	7 (15,2)		72	45 (62,5)		$<10^{-4}$	
	2 doses	4	1 (25,0)		5	3 (60,0)		0,36	
Microimmune	Total	49	10 (20,4)		77	43 (55,8)		$<10^{-4}$	
	1 dose	45	9 (20,0)		72	39 (54,2)		$<10^{-4}$	
	2 doses	4	1 (25,0)		5	4 (80,0)		0,21	
Diphtérie	Total	51	27 (52,9)	245 [166-361]	78	62 (79,5)	312 [246-396]	0,001	0,13
	3 doses	44	22 (50,0)		66	51 (77,3)		0,003	
	4 doses	7	5 (71,4)		12	11 (91,7)		0,29	
Tétanos	Total	51	43 (84,3)	289 [228-367]	78	76 (97,4)	491 [396-609]	0,01	0,001
	3 doses	44	36 (81,8)		66	64 (97,0)		0,01	
	4 doses	7	7 (100,0)		12	12 (100,0)			
Coqueluche	Total	50	15 (30,0)	52,8 [41,4-67,3]	78	43 (55,1)	62,8 [52,2-75,6]	0,005	0,28
	3 doses	43	10 (23,3)		66	34 (51,5)		0,003	
	4 doses	7	5 (71,4)		12	9 (75,0)		0,63	
Polio virus	≥4 doses								
Sérotype 1		51	48 (94,1)	6,1 [4,5-8,3]	78	78 (100,0)	16,1 [12,1-21,5]	0,06	$<10^{-5}$
Sérotype 2		51	48 (94,1)	13,2 [8,9-19,3]	78	77 (98,7)	42,5 [32,5-58,0]	0,17	$<10^{-5}$
Sérotype 3		51	36 (70,6)	2,3 [1,3-3,9]	78	75 (96,2)	4,5 [3,3-6,1]	$<10^{-4}$	0,02

**P*1: pour la comparaison de la proportion de réponse adéquate d'anticorps entre enfants infectés par le VIH et non infectés par le VIH (test de chi deux or exact de Fisher, selon le cas)
†*P*2: pour la comparaison de la MGT entre enfants infectés par le VIH et non infectés par le VIH (test de Mann-Whitney)
‡MGT = Moyenne géométrique des titres (MGT) ou concentrations exprimée en mUI/ml, excepté pour la poliovirus (UI/ml) et la coqueluche ; IC = intervalle de confiance,

Tableau V-4 : Analyse bivariée : Réponse inadéquate contre le vaccin rougeole et caractéristiques des enfants inclus dans EPIPEV, 2004-2006

Caractéristiques	Réponse humorale inadéquate contre la rougeole				
	N	n	%(n/N)	OR* (IC† à 95%)	p
	126	73	57,9		
Site d'inclusion					0,67
Cameroun	67	40	59,7	1,2 (0,6-2,4)	
RCA	59	33	55,9	1	
Statut VIH de l'enfant					$<10^{-4}$
Infecté	49	39	79,6	4,9 (2,0-12,0)	
Non infecté par le VIH	77	34	44,2	1	
Statut VIH – traitement ARV en cours					$<10^{-4}$
Durée ARV < 6 mois	30	25	83,3	6,3 (2,0-19,7)	
Durée ARV ≥ 6 mois	19	14	73,7	3,5 (1,1-11,2)	
Non infectés par le VIH	77	34	44,2	1	
Statut VIH - % cellules T CD4+					$<10^{-4}$
< 25% cellules T $CD4^+$	29	26	89,7	11,0 (3,1-39,3)	
≥ 25% cellules T $CD4^+$	20	13	65,0	2,3 (0,8-6,5)	
Non infecté par le VIH	77	34	44,2	1	
Statut VIH – Charge virale					$<10^{-4}$
Charge virale ≥ 10,000 copies/ml	20	17	85,0	7,2 (1,8-28,8)	
Charge virale < 10,000 copies/ml	29	22	75,9	4,0 (1,4-10,9)	
Non infecté par le VIH	77	34	44,2	1	
Sexe					0,70
Féminin	76	43	56,6	0,9 (0,4-1,8)	
Masculin	50	30	60,0	1	
Age des enfants à l'inclusion					0,29
> 23 mois (âge médian)	64	40	62,5	1,5 (0,7-2,0)	
≤ 23 mois	62	33	53,2	1	
Age à la vaccination contre la rougeole					0,28
> 12 mois	14	10	71,4	1,9 (0,6-6,6)	
≤ 12 mois	112	63	56,3	1	
Notion d'allaitement					0,06
Oui	74	48	64,9	2,0 (1,0-4,2)	
Non	52	25	48,1	1	
Signes cliniques					
Oui	25	18	72,0	2,2 (0,8-5,7)	0,11
Non	101	55	54,5	1	
Périmètre brachial ajusté à l'âge|					0,11
< -2Z score (malnutrition)	25	18	72,0	2,2 (0,8-5,7)	
≥ -2Z score	101	55	54,5	1	
Délai écoulé depuis la dernière vaccination					0,13
≥ 12 mois	67	43	64,2	1,7 (0,8-3,5)	
< 12 mois	59	30	50,8	1	
Nombre de doses reçues					0,49
2 doses	9	4	44,4	0,6 (0,1-2,2)	
1 dose	117	69	59,0	1	
Macrocytose (volume globulaire moyen) (n=123)					0,01
MGV ¶ ≥ 83 fl	28	22	78,6	3,3 (1,2-9,1)	
MGV¶ < 83 fl	95	50	52,6	1	
Protidémie (n=123)					0,05
> 85 g/l	22	17	77,3	2,8 (1,0-8,5)	
≤ 85 g/l	111	55	54,5	1	

* Odds ratio pour la réponse inadéquate contre le vaccin rougeole ; † Intervalle de confiance

Tableau V-5 : Analyse bivariée : relation entre la réponse inadéquate contre les vaccins contre la coqueluche (AGG), la diphtérie, le tétanos et les caractéristiques des enfants (50 infectés par le VIH et 78 non infectés par le VIH), EPIPEV, 2004-2006

	Réponse anticorps inadéquate												
	Contre la coqueluche					***Contre la diphtérie***				***Contre le tétanos***			
	N 128	n_c 70	% (n_c/N) 54,7	OR* IC à 95%†	*p*‡	n_d 40	% (n_d/N) 31,3	OR* IC à 95%†	*p*‡	n_t 10	% (n_t/N) 7,8	OR* IC à 95%†	*p*‡
Site d'inclusion													
Cameroun	69	40	58,0	1,3 (0,7-2,7)	0,4	27	39,1	2,3 (1,0-5,2)	0,03	9	13,0	8,9 (1,0-76,3)	0,02
RCA	59	30	50,8	1		13	22,0	1		1	1,7	1	
Statut VIH de l'enfant													
Infectés	50	35	70,0	2,9 (1,4-6,1)	0,005	24	48,0	3,6 (1,6-8,1)	0,001	8	16,0	7,2 (1,4-37,7)	0,006
Non infectés par le VIH	78	35	44,9	1		16	20,5	1		2	2,6	1	
Statut VIH – traitement ARV					0,01				$<10^{-5}$				0,001
Durée ARV < 6 mois	31	20	64,5	2,2 (0,9-5,3)		11	35,5	0,7 (0,1-3,5)		4	12,9	3,2 (0,2-38,7)	
Durée ARV ≥ 6 mois	19	15	79,0	4,6 (1,4-15,1)		13	68,4	5,7 (2,2-14,4)		4	21,0	8,9 (1,6-48,8)	
Non infectés par le VIH	78	35	44,9	1		16	20,5	1		2	2,6	1	
Statut VIH - % cellules T CD4+					0,003				$<10^{-5}$				0,02
< 25% cellules T $CD4^+$	30	24	80,0	4,9 (1,8-13,4)		16	53,3	4,4 (1,7-11,6)		5	16,7	7,6 (1,3-44,5)	
≥ 25% cellules T $CD4^+$	20	11	55,0	1,5 (0,6-4,0)		8	40,0	2,6 (0,9-7,6)		3	15,0	6,7 (1-46,0)	
Non infectés par le VIH	78	35	44,9	1		16	20,5	1		2	2,6	1	
Statut VIH – Charge virale					0,02				$<10^{-5}$				0,02
Charge virale ≥ 10,000	20	15	75,0	3,7 (1,2-14,1)		11	55,0	4,7 (1,6-14,2)		3	15,0	6,7 (1,0-46,0)	
Charge virale < 10,000	30	20	66,7	2,4 (1,0-5,9)		13	43,3	3,0 (1,2-7,6)		5	16,7	7,6 (1,3-44,5)	
Non infectés par le VIH	78	35	44,9	1		16	20,5	1		2	2,6	1	
Sexe													
Masculin	52	31	59,6	1,4 (0,7- 2,8)	0,35	14	26,9	0,7 (0,3-1,5)	0,8	1	1,9	0,1 (0,02-1,2)	0,04
Féminin	76	39	51,3	1		26	34,2	1		9	11,8	1	
Age à l'inclusion													
> 23 mois (âge médian)	64	37	57,8	1,3 (0,6-2,6)	0,48	24	37,5	1,8 (0,8-3,9)	0,1	9	14,1	10,3 (1,2-89,8)	0,009
≤ 23 mois	64	33	51,6	1		16	25,0	1		1	1,6	1	
Notion d'allaitement maternel													
Oui	75	43	57,3	1,3 (0,6-2,6)	0,47	24	32,0	1,1 (0,5-2,3)	0,8	5	6,7	0,7 (0,2-2,5)	0,6
Non	53	27	50,9	1		16	30,2	1		5	9,4	1	
Signes cliniques													
Oui	25	20	80,0	4,2 (1,5-12,2)	0,005	8	32,0	1,0 (0,4-2,7)	0,9	0	0		0,1

Non	103	50	48,5	1		32	31,1	1		10	9,7		
Périmètre brachial ajusté à l'âge													
< -2Z score (malnutrition)	25	17	68,0	2,0 (0,8-5,0)	0,14	10	40,0	1,6 (0,6-4,0)	0,3	22	88,0	1,9 (0,4-7,8)	0,4
≥ -2Z score	103	53	51,5	1		30	29,1	1		96	93,2	1	
Délai depuis dernier vaccin													
> 18 mois	59	38	64,1	2,1 (1,0-4,3)	0,04	24	40,7	2,3 (1,1-4,9)	0,03	8	13,6	5,9 (1,1-25,8)	0,04
≤ 18 mois	69	32	46,4	1		16	23,2	1		2	2,9	1	
Nombre de doses reçues													
3 doses	109	65	59,6	4,1 (1,4-2,3)	0,01	37	33,9	2,7 (0,8-10,0)	0,13	10	9,2		0,2
4 doses	19	5	26,3	1		3	15,8	1		0	0		

Tableau V-6 : Régression logistique multivariée : facteurs associés à une réponse inadéquate contre les vaccins du PEV, ACIP-EPIPEV, 2004-2006, Cameroun et RCA

Vaccins du PEV / caractéristiques des enfants	Modèle initial			Modèle final		
	ORa[†]	IC[‡] **à** 95%	p	ORa	IC à 95%	p
Rougeole (N = 120)						
Infecté par le VIH et T CD4 <25% vs Non infecté	6,2	(1,5-29,2)	0,01	10,1	(2,8 –36,4)	0,0008
Infecté par le VIH et T CD4 ≥ 25%vs Non infecté	2,1	(0,6-7,1)	0,21	2,6	(0,9 – 7,7)	
Allaitement maternel	1,3	(0,6-3,4)	0,44			
Age à la vaccination (> 12 mois)	1,6	(0,4-6,9)	0,51			
Présence de signes cliniques	0,8	(0,3-2,8)	0,79			
Malnutrition (MUAC < -2Z scores)	1,2	(0,4-3,8)	0,76			
Délai depuis dernier vaccin (> 12 mois)	1,3	(0,6-3,2)	0,52			
Macrocytose (MGV > 85 fl)	2,2	(0,6-7,1)	0,60			
Hyperprotidémie	1,5	(0,4-5,0)	0,24			
Diphtérie (N = 126)						
Infecté par le VIH et T CD4 <25% vs Non infecté	3,4	(1,2-10,0)	0,03	3,8	(1,5-9,5)	0,01
Infecté par le VIH et T CD4 ≥ 25%vs Non infecté	1,6	(0,5-5,7)	0,44	2,4	(0,8-6,9)	
Site d'inclusion (Cameroun)	2,2	(0,8-5,6)	0,11			
Sexe (féminin)	1,7	(0,7-4,1)	0,21			
Malnutrition (MUAC < -2Z scores)	1,4	(0,5-4,4)	0,52			
Age à l'inclusion (> 23 months)	1,1	(0,3-4,2)	0,91			
Délai depuis dernier vaccin (≥ 18 mois)	1,7	(0,4-6,7)	0,44	2,3	(1,0-5,1)	0,04
Nombre de doses reçus (< 4 doses)	2,4	(0,5-11,2)	0,27			
Macrocytose (MGV > 85 fl)	1,0	(0,4-3,0)	0,94			
Coqueluche (N = 125)						
Infecté par le VIH et T CD4 <25% vs Non infecté	2,6	(0,8-9,2)	0,12	3,8	(1,3-11,6)	0,06
Infecté par le VIH et T CD4 ≥ 25%vs Non infecté	0,9	(0,2-3,0)	0,81	1,3	(0,4-3,7)	
Site d'inclusion (Cameroun)	1,5	(0,6-3,8)	0,35			
Sexe (féminin)	1,0	(0,4-2,3)	0,97			
Malnutrition (MUAC < -2Z scores)	1,1	(0,4-3,6)	0,83			
Présence des signes cliniques	6,1	(1,5-24,7)	0,01	4,8	(1,3-17,6)	0,02
Délai depuis dernier vaccin (≥ 18 mois)	6,0	(1,5-23,7)	0,01			
Nombre de doses reçus (< 4 doses)	1,4	(0,5-4,7)	0,40	6,8	(1,8-25,4)	0,004
Macrocytose (MGV > 85 fl)	1,5	(0,5-4,7)	0,44			
Tétanos (N = 126)						
Infecté par le VIH et T CD4 <25% vs Non infecté	6,6	(0,6-55,6)	0,12	6,9	(1,1-42,0)	0,10
Infecté par le VIH et T CD4 ≥ 25%vs Non infecté	2,5	(0,3-17,4)	0,46	4,3	(0,6-30,9)	
Site d'inclusion (Cameroun)	8,1	(0,6-106,1)	0,10			
Sexe (féminin)	8,6	(0,8-86,6)	0,07	8,5	(1,0-75,2)	0,05
Age à l'inclusion (> 23 months)	12,1	(0,6-257,9)	0,11	8,4	(1,0-72,3)	0,05
Malnutrition (MUAC < -2Z scores)	4,0	(0,4-34,7)	0,22			
Notion d'allaitement maternel (oui)	0,4	(0,05-2,7)	0,33			
Délai depuis dernier vaccin (≥ 18 mois)	0,6	(0,04-8,0)	0,69			
Macrocytose (MGV > 85 fl)	0,7	(0,1-4,3)	0,72			

[†] Odds Ratio ajusté; [‡] Intervalle de confiance

V.3 Discussion

L'accès aux antirétroviraux des enfants infectés par le VIH dans les pays à ressources limitées permet d'espérer l'augmentation de leur espérance de vie. Avec cette avancée, la question de la persistance des anticorps contre les antigènes vaccinaux du PEV chez ces enfants est cruciale dans ces pays où les maladies à prévention vaccinale restent endémiques.

Nous avons comparé ici la persistance des anticorps suite à la vaccination de routine (PEV) pratiquée pour la plupart avant l'âge d'un an chez les enfants infectés et non infectés par le VIH, âgés de 18 à 36 mois, nés de mères séropositives pour le VIH dans deux pays d'Afrique Centrale.

- **Réponse inadéquate contre les antigènes vaccinaux**

Nos résultats ont montré une proportion plus faible d'enfants présentant un titre d'anticorps détectable (réponse adéquate) contre certains antigènes vaccinaux du PEV (rougeole, diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite sérotypes 1 et 3) chez les enfants infectés que non infectés par le VIH.

a) Réponse à la vaccination rougeole

C'est pour le vaccin rougeole que cette différence entre enfants infectés et non infectés par le VIH était la plus marquée. Cependant, des titres d'anticorps étaient similaires dans les deux groupes présentant une réponse adéquate contre la rougeole. La faible réponse anticorps aux vaccins contre la rougeole chez les enfants infectés par le VIH a été rapportée précédemment dans plusieurs études (Rudy BJ et al, 1994; Lindgren-Alves CR et al, 2001).

Les tentatives d'utilisation du vaccin rougeoleux à titre élevé d'Edmonston-Zagreb a montré un taux de séroconversion élevé de l'ordre de 90% chez les enfants infectés par le VIH, trois mois après la vaccination effectuée à l'âge de 6 mois (Dabis F, 1992; Lepage P et al, 1992). Cependant, l'introduction de ce vaccin à titre élevé a été abandonnée en raison des problèmes de sécurité (Garenne M et al, 1991).

Les activités supplémentaires à type de campagnes nationales ou locales de vaccination contre la rougeole ont montré leur efficacité dans le contrôle de la rougeole en Afrique australe malgré la forte prévalence de l'infection VIH (Helfand RF et al, 2005; Wolfson LJ et al, 2007). Aucune activité supplémentaire de vaccination contre la rougeole n'a été réalisée dans les deux pays autour de la période concernée par cette étude, malgré la circulation du virus sauvage de la rougeole.

Même en l'absence de réponse anticorps post-vaccination rougeole, il est difficile de prédire si l'enfant reste susceptible ou non à la maladie rougeoleuse. Une étude récente a démontré une mortalité très élevée due aux épidémies de rougeole chez les enfants non vaccinés au Niger, Nigéria et Tchad avec un taux de létalité de 4 à 10% chez les enfants de moins de 5 ans (Grais RF et al, 2007), rappelant ainsi l'effet dévastateurs de la rougeole sur des populations non vaccinées (Moss WJ, 2007).

Chez les enfants non infectés par le VIH, la réponse cellulaire aux vaccins de la rougeole semble induite même au cours de l'immunisation précoce (à 6 mois d'âge) alors que la réponse anticorps reste assez faible ou non détectable à cet âge de la vie (Bautista-Lopez N et al, 2000; Gans H et al, 2001). Une fois produites, les cellules mémoires T contre la rougeole vont persister pendant longtemps chez l'enfant non infecté par le VIH (Naniche D et al, 2004). Cependant, le déficit en cellules T CD4 chez les enfants infectés par le VIH empêche certainement le montage d'une réponse mémoire effective contre la maladie et l'échec secondaire de la vaccination serait dû au déclin au cours du temps des anticorps (al-Attar I et al, 1995; Brunell PA et al, 1995). Il y a donc intérêt à étudier prospectivement ces questions d'immunités humorale et cellulaire chez les enfants traités précocement par les antirétroviraux.

b) Réponse à la vaccination contre la coqueluche

Concernant le vaccin contre la coqueluche, nous avons observé qu'après un délai médian de 18 mois après l'administration de la 3^{e} dose de vaccination DTCoq, seulement 19,2% des enfants infectés par le VIH et 48,2% des enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH possédaient des anticorps et cette différence était significative.

Le vaccin cellulaire entier contre la coqueluche est difficile à produire et son efficacité est liée au fabricant. En effet, l'efficacité du DTCoq avec un régime à trois doses (2, 4 et 6 mois) a été estimée à 48,3% ($IC_{95\%}$: 37,0 à 57,6%) dans une étude réalisée en Suède en utilisant les vaccins produit par les Laboratoires Connaught aux Etats-Unis (Gustafsson L et al, 1996) et environ 36% ($IC_{95\%}$: 14,2 à 52,1%) dans une étude réalisée en Italie avec le même vaccin (Greco D et al, 1996). Aucune donnée n'est disponible concernant le vaccin produit par le "Serum Institute of India" producteur de la plus grande quantité des vaccins utilisés dans les pays en développement.

La coqueluche semble être une infection peu courante chez les personnes vivants avec le VIH (Doebbeling BN et al, 1990; Cohn SE et al, 1993). L'infection par *B. pertussis* est rarement évoquée et le diagnostic biologique est difficile. Une forme pauci symptomatique ou atypique chez les enfants infectés par le VIH sera mal diagnostiquée. *B. pertussis* intracellulaire a été retrouvée dans les macrophages obtenus des produits de lavage

broncho-alvéolaire chez les enfants infectées par le VIH (Bromberg K et al, 1991). Ces patients étaient pauci symptomatiques et d'autres affections opportunistes contribuaient à la sévérité de leur pathologie respiratoire. Dans cette étude, les cas de toux persistante ont été rapportés chez environ 1/5 des enfants infectés par le VIH mais cela n'a pas été confirmé bactériologiquement. Pour conclure, ce n'est pas clair, et on ne sait pas si les enfants infectés par le VIH sont plus à risque de formes sévères de la coqueluche ou plus à risque de développer fréquemment la maladie coquelucheuse que les enfants non infectés par le VIH. Cependant, les enfants infectés par le VIH ont des titres d'anticorps contre la coqueluche plus faibles et peuvent constituer un réservoir pour la dissémination de la coqueluche dans la population, surtout que des porteurs asymptomatiques ont été rapportés (WHO, 2010c). L'administration d'une dose de rappel devra être une priorité, surtout pour les pays endémiques. Pour y arriver, il est important d'étendre la gratuité du PEV au delà de l'âge de un an.

c) Réponse à la vaccination contre la poliomyélite

La réponse anticorps aux VPO, particulièrement aux sérotypes 1 et 2 était peu différente chez les enfants infectés que non infectés par le VIH comme rapporté précédemment (Barbi M et al, 1992). L'influence du degré d'immunodépression n'a pas été démontrée pour la réponse au vaccin oral trivalent. Ceci serait dû à l'administration de multiples doses de ce vaccin au cours des campagnes nationales d'immunisation annuelles réalisées au Cameroun et en RCA chez les enfants âgés de moins de 5 ans. Au cours de ces campagnes, les enfants reçoivent deux gouttes du vaccin oral trivalent quelque soit leur statut vaccinal de routine. Bien que la proportion d'enfants avec un taux d'anticorps adéquat pour la polio 1 et 2 ait été élevée aussi bien chez les enfants infectés par le VIH et non infectés par le VIH, le titre d'anticorps était clairement plus faible chez les enfants infectés par le VIH, même à la suite de l'administration des doses supplémentaires de VPO trivalent.

En revanche, la proportion d'enfants infectés par le VIH avec une persistance adéquate d'anticorps contre la polio 3 était plus faible comparée à celle des types 1 et 2, comme l'avaient démontré certaines études dans d'autres contextes (Ryder RW et al, 1993; Sutter RW et al, 2000), mais, les titres d'anticorps étaient similaires entre les deux groupes d'enfants.

- **Difficultés de mise en place des recommandations du PEV**

Notre étude a également relevé les difficultés à mettre en place et à maintenir avec succès le Programme Elargi de Vaccination. En effet, la moitié des enfants éligibles (44/88) en RCA n'ont pas été inclus en raison du non respect des critères basés sur le suivi du calendrier de

vaccination (vaccination débutée après l'âge d'un an, non complétude de la primo-vaccination avant un an, etc.).

Ces difficultés d'application des recommandations du PEV sont sans doute multifactorielles. Elles peuvent se situer au niveau des familles ou du personnel médical. Elles peuvent être aussi la conséquence des problèmes logistiques d'approvisionnement, de stockage et d'administration des vaccins. Une étude réalisée en Zambie a montré une faible couverture vaccinale chez les enfants infectés par le VIH par rapport aux enfants non infectés. Selon ces auteurs, les mères infectées par le VIH ne seraient pas capables, en raison des maladies fréquentes aussi bien chez elles-mêmes que chez leur enfant infecté, d'honorer la plupart des rendez vous de vaccination (Setse RW et al, 2006).

De plus, très peu d'enfants inclus dans notre étude avaient reçu des rappels vaccinaux c'est-à-dire une 4^{e} dose des vaccins DTCoq-VPO et une 2^{e} dose du vaccin contre la rougeole pourtant recommandés. En pratique de routine, le PEV fournit gratuitement les vaccins jusqu'à l'âge de 12 mois et le coût de la suite des vaccinations est à la charge des familles.

- **Facteurs associés à la persistance inadéquate des anticorps contre les antigènes vaccinaux**

Nous avons montré dans notre étude que l'immunodépression sévère était associée à une réponse inadéquate contre les antigènes vaccinaux du PEV.

Chez l'adulte infecté par le VIH, il a été démontré dans la phase aïgue de l'infection VIH, une déplétion massive et irréversible des cellules mémoires T CD4 tandis que la capacité de régénérer la mémoire centrale et les cellules T naïves reste largement intacte (Brenchley JM et al, 2006; Grossman Z et al, 2006). Cette profonde déplétion des cellules CD4 mémoires de la muqueuse va entraïner un affaiblissement de l'activation immunitaire systémique affectant la réponse adaptative spécifique contre les pathogènes. Ce mécanisme n'a pas encore été démontré chez les enfants infectés nés de mères séropositives pour le VIH mais suggèrent indirectement l'intérêt des antirétroviraux précoces chez les enfants comme modèle de soins.

Waibale *et al* avaient trouvé dans leur étude, un lien entre la malnutrition protéino-énergétique et la faible réponse anticorps au vaccin rougeoleux (Waibale P et al, 1999). Une telle relation n'a pas été retrouvée dans notre étude en raison peut être de l'absence d'enfants présentant une altération importante de l'état général.

- **Forces et limites de l'étude**

La plupart des enfants inclus dans l'étude EPIPEV ont été prélevés à un moment où leur concentration en anticorps aurait dû être maximale sans qu'il y ait eu une décroissance significative. La réponse inadéquate contre les vaccins du PEV pourrait être le fait : soit du

manque d'induction immédiate de la réponse vaccinale ou soit de l'incapacité sur le plan immunitaire à maintenir une réponse vaccinale. Dans ce contexte, le fait que les enfants aient été examinés à des âges variables ne devrait avoir aucun impact sur l'interprétation des données.

Le groupe de référence utilisé dans cette étude était constitué d'enfants non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH. C'était pour nous une option pratique car, au moment de l'étude, ces enfants côtoyaient déjà les enfants infectés par le VIH dans le même service. De plus, leur statut VIH était déjà déterminé. Plusieurs études avaient rapporté que la morbidité, la mortalité et les paramètres anthropométriques de ces enfants étaient similaires à ceux des enfants nés de mères séronégatives (Lepage P et al, 1996; Taha TE et al, 2000). Nous avons pensé qu'il en serait de même pour les questions de réponses immunitaires. Cependant, peu de données concernant l'activation immunitaire et l'homéostasie des lymphocytes chez les enfants non infectés exposés au VIH pendant la grossesse existent. Il a été démontré une altération de la maturation des cellules T chez les enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH (McNally LM et al, 2007). De plus, l'activation immunitaire et la dénaturation de la différentiation post-thymique ont été mises en évidence chez les adolescents bien portants nés de mères séropositives pour le VIH (Clerici M et al, 2000). Ceci peut en partie expliquer la faible réponse anticorps au vaccin contre la rougeole (autour de 60%) observée chez les enfants non infectés exposés au VIH pendant la grossesse.

V.4 Conclusion

Nous avons observé sans équivoque que la réponse inadéquate aux vaccins du PEV, plus fréquente chez les enfants infectés que non infectés par le VIH, était associée à la sévérité de l'immunodépression induite par le VIH.

Ces premiers résultats sont en partie à l'origine de l'étude Pediacam, dont les premiers résultats ont été présentés dans les chapitre III et IV. L'objectif était d'évaluer prospectivement et conjointement la faisabilité d'un traitement antirétroviral précoce et l'efficacité de la réponse vaccinale aux vaccins du PEV complétés par des doses supplémentaires de rougeole et renforcé par les doses de rappel de DTCoq, hépatite B, *haemophilus influenzae* type b, pneumocoque et VPO trivalent ou vaccin polio injectable.

En outre, Pediacam a été conçue pour comparer les enfants infectés par le VIH à deux groupes témoins d'enfants non infectés : nés de mères séropositives et nés de mères séronégatives pour le VIH.

Chapitre VI : Discussion générale et perspectives

VI.1 Discussion générale

Nous avons tenté à travers ce travail de thèse de traiter des questions préoccupantes concernant la prise en charge des nourrissons nés de mères séropositives pour le VIH, dans le contexte d'un pays à ressources limitées caractérisé par une faible couverture de la prévention de la transmission mère-enfant (PTME) et un accès limité des enfants infectés aux multithérapies antirétrovirales (WHO et al, 2010).

Nous avons abordé trois aspects concernant la prise en charge précoce de ces nourrissons : le diagnostic du VIH, l'initiation des antirétroviraux (ARV) et la réponse humorale aux vaccins du Programme Elargi de Vaccination (PEV).

Les analyses sont issues de deux enquêtes originales financées par l'institut Pasteur de Paris, l'ANRS, en partenariat avec le Centre Pasteur du Cameroun : une enquête transversale portant sur des enfants infectés et non infectés par le VIH, inclus entre 18 et 36 mois dans cinq hôpitaux du Cameroun et de République Centrafricaine, mesurant la persistance des anticorps contre les vaccins du PEV, menée en 2004-2005 (ACIP-EPIPEV) - une cohorte initiée en 2007, d'enfants infectés et non infectés par le VIH, inclus à la naissance ou au plus tard à 6 mois dans trois hôpitaux des deux villes principales du Cameroun (ANRS-Pediacam).

- **Faisabilité du diagnostic précoce de l'infection VIH chez les nourrissons exposés dans le contexte urbain du Cameroun**

Nous avons évalué l'acceptabilité et le déroulement d'un processus de dépistage de l'infection VIH, planifié dès la première semaine de vie des enfants nés de mères séropositives, comportant dans l'idéal un premier test à 6 semaines, la communication des résultats à la famille à 10 semaines avec un éventuel test de confirmation en cas de résultat positif ou douteux. Nous avons néanmoins considéré que, compte tenu des difficultés logistiques multiples, un processus permettant de communiquer un résultat de test à la famille avant l'âge de 7 mois était une intervention correctement menée (Faye A et al, 2004; Chiappini E et al, 2006), permettant d'offrir un accès précoce aux ARV, même si, dans l'idéal, l'intervention prévoyait une initiation à 14 semaines. Au total, 83,9% ($IC_{95\%}$: 82,0-85,6) ont pu bénéficier de ce processus complet avec un âge médian de 2,5 mois (IQ : 2,4-3,0) au retrait du test. Ce résultat témoigne d'une excellente acceptabilité du dépistage précoce proposé dans ce contexte. Ces résultats sont plus élevés que ce qui a été rapporté dans d'autres études en Afrique sub-saharienne.

L'étude PEDIACAM est une étude interventionnelle, à mi-parcours entre un essai thérapeutique et un observatoire des pratiques de routine. En effet, la population était

beaucoup moins sélectionnée que dans un essai, et l'inclusion était proposée à toutes les mères accouchant ou se présentant dans les 7 jours suivant l'accouchement dans l'un des sites participant, sans critères d'exclusion en dehors du consentement a priori de participation. L'intervention proposée était censée s'insérer dans les pratiques de routine, selon les recommandations OMS. Mais la cohorte offrait un accompagnement du processus expliquant sans doute en partie son succès, comportant des relances téléphoniques par l'équipe médicale et la gratuité de la prise en charge clinique, biologique, thérapeutique et nutritionnelles).

Trois facteurs ont été trouvés associés à un processus incomplet: une découverte tardive de l'infection maternelle pendant la grossesse (dans les 3 derniers mois avant l'accouchement), l'absence de prophylaxie antirétrovirale chez la mère pendant la grossesse, et un accouchement par césarienne en urgence. En revanche, les facteurs reflétant le niveau socio-économique, les conditions de vie et le partage du statut VIH entre mère et père n'étaient pas liés au succès du processus.

Nos résultats soulignent ainsi l'importance du dépistage de l'infection VIH chez les femmes, sans attendre la survenue d'une grossesse, afin de laisser le temps à l'équipe médicale d'organiser la PTME et planifier le suivi des enfants, et aux femmes de s'y préparer.

L'accès à large échelle au dépistage reste un défi pour les pays les plus touchés par l'épidémie, aussi bien sur le plan technique que programmatique. En 2010, les enquêtes démographiques de santé (EDS) réalisées dans plusieurs pays à ressources limitées ont montré que seuls 34% des femmes et 17% des hommes avaient réalisé et reçu les résultats du test VIH. La plupart avait été testée une seule fois à un stade avancé de la maladie. Chez les femmes, le test survient le plus souvent pendant la grossesse, après le 5^{e} mois, au moment de la première consultation prénatale (UNAIDS, 2010). Ce qui pourrait être également un obstacle à l'application correcte des nouvelles recommandations de l'OMS sur la PTME (WHO, 2010a). Près de la moitié des mères séropositives dont les enfants ont été inclus dans Pediacam connaissaient leur statut avant la grossesse, avec une faible proportion ayant opté pour l'allaitement maternel, facilitant ainsi l'acceptabilité du processus de dépistage précoce.

Le dépistage de l'infection VIH pose des problèmes techniques aussi bien chez les nourrissons que chez les femmes. Il faut développer et évaluer des algorithmes de diagnostic, intégrant de nouveaux tests VIH et leur mise en œuvre sur le terrain. Au Cameroun, une évaluation des performances de cinq tests rapides de diagnostic du VIH recommandés en première ligne en 2009, a montré que seulement 2 d'entre eux avaient une sensibilité de 100%, les autres variant de 94 à 98%. Les différents algorithmes

recommandés présentaient des sensibilités de 94,7% à 100% et des spécificités de 91,5% à 98,5%, conduisant à l'existence problématique de faux négatifs et faux positifs. Cette situation se dégrade encore lorsqu'il y a des ruptures de stock et une réduction des tests rapides disponibles (Aghokeng AF et al, 2009).

Les techniques moléculaires de diagnostic de l'infection VIH chez les nourrissons ne sont, quant à elles, disponibles que dans quelques laboratoires de référence très souvent localisés dans les villes principales. Dans la plupart des cas, les échantillons sont collectés sur papier buvard pour être rapatriés vers le laboratoire de référence sans risque de dégradation importante pendant le transport. Mais la formation d'un personnel à la gestion des échantillons qui arrivent au niveau central et la réduction des délais entre prélèvement et rendu des résultats reste un défi majeur.

- **Faisabilité de l'initiation précoce des multithérapies antirétrovirales chez les nourrissons infectés par le VIH**

L'intérêt des multithérapies antirétrovirales initiée dans les six premiers mois de vie sur la réduction de la mortalité et de la morbidité a été largement montré dans des études observationnelles menées en Europe de l'Ouest et confirmé par un essai thérapeutique en Afrique du Sud (Faye A et al, 2004; Chiappini E et al, 2006; Violari A et al, 2008; Goetghebuer T et al, 2009). Ces résultats ont justifié les directives de l'OMS qui recommandent désormais le traitement systématique des enfants infectés par le VIH dès le diagnostic, initialement avant l'âge de 1 an, et plus récemment 2 ans.

L'évaluation de la faisabilité de cette stratégie en routine dans les pays à ressources limitées était l'un des objectifs de l'étude Pediacam. Dans cette thèse, nous avons étudié la phase initiale, portant sur le temps écoulé entre un test du VIH effectué avant l'âge de 7 mois et la mise sous ARV lorsque le résultat était positif. Nous avons montré que ce processus était globalement satisfaisant puisque 90,9% (IC 95% : 85,7 – 94,7) des enfants infectés ont initié un traitement ARV dont 83,5% avant l'âge de 7 mois, à 4 mois en médiane (90^{e} percentile = 6,9 mois). Ce résultat est nettement meilleur que ce qui avait été rapporté jusqu'ici dans les pays à ressources limitées.

Toutefois, 6,3% des enfants sont décédés trop tôt après le prélèvement diagnostic, sans que l'on ait eu le temps d'initier un traitement. Ceci s'explique par la gravité de la maladie qui a souvent constitué le motif de dépistage chez les nourrissons dont la mère avait échappé au dépistage ou à la PTME. Il paraît difficile d'accélérer encore la mise sous traitement en pratique de routine, alors qu'environ un tiers des enfants infectés initie le traitement au-delà du seuil limite optimal prévu par l'intervention, et ceci malgré l'accompagnement renforcé des familles dans le cadre de Pediacam. Le meilleur moyen pour limiter le dépistage de

l'infection en catastrophe, à un stade trop avancé, reste d'améliorer l'accès au dépistage VIH des femmes avant ou pendant la grossesse pour suivre leurs enfants dès leur naissance.

Les principaux facteurs liés à un processus non optimal relèvent de la présentation tardive des enfants en consultation pour le diagnostic de l'infection VIH, de l'organisation fonctionnelle des sites, et du décalage entre la communication du résultat aux familles et le bilan pré-thérapeutique, peut-être en rapport avec la difficulté pour l'équipe médicale de gérer l'annonce de ces résultats aux familles.

Une très faible proportion des familles de nourrissons (<3%) a refusé la mise sous traitements antirétroviraux. Ceci est un excellent résultat à mettre à l'actif de l'expérience et du niveau de formation de l'équipe médicale dans les sites de l'étude. Les motifs de refus n'ont pas été recueillis mais il faut souligner que dans l'ensemble, ces nourrissons étaient asymptomatiques. Certains de leurs parents ne voyaient sans doute pas l'utilité de traiter ces enfants, d'autres n'avaient pas véritablement réglé leur propre situation en matière d'infection par le VIH (déni, absence de bilan, dépistage tardif en fin de grossesse etc.).

- **Réponse humorale aux vaccins du PEV chez les enfants infectés par le VIH**

Plusieurs travaux ont suggéré une réponse vaccinale moins bonne chez les enfants infectés par le VIH. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à comparer entre enfants infectés et non infectés, tous exposés au VIH de leur mère, la réponse en termes de persistance des anticorps contre plusieurs antigènes vaccinaux du PEV appliqué en routine dans des pays à ressources limitées où les difficultés logistiques et les co-morbidités y sont plus importantes que dans les pays industrialisés.

Notre objectif était d'identifier, dans ce contexte, des sous-groupes d'enfants infectés mal vaccinés, du fait d'un non respect des recommandations ou de réponses vaccinales inadéquates. Ces enfants peuvent constituer un réservoir favorisant la résurgence de maladie à prévention vaccinale dans la population générale, compte tenu de l'amélioration prévisible de leur survie avec l'accès aux antirétroviraux.

L'étude EPIPEV a permis de confirmer que le niveau de persistance d'anticorps était plus faible chez les enfants infectés par le VIH par rapport aux enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH pour l'ensemble des antigènes vaccinaux testés.

Mais nous avons également observé, surtout dans le cas du vaccin contre la rougeole, que la proportion d'enfants ayant une réponse vaccinale adéquate était certes significativement plus élevée chez les enfants non infectés par le VIH nés de mères séropositives pour le VIH,

mais restait inférieure au niveau attendu chez les enfants de la population générale, c'est-à-dire nés de mères séronégatives.

Ce résultat original suggère que l'exposition au VIH pendant la grossesse pourrait entraîner un dysfonctionnement du système immunitaire chez les enfants, même lorsqu'ils échappent eux-mêmes à l'infection (Clerici M et al, 2000). Peu d'études ont exploré l'influence de l'exposition au VIH sur la réponse aux vaccins pour pouvoir dégager le mécanisme responsable de cette observation (Scott S et al, 2007; Madhi SA et al, 2010; Jones CE et al, 2011).

Mais il est important de souligner que certains auteurs pensent que la persistance insuffisante des anticorps chez ces enfants exposés au VIH s'expliquerait beaucoup plus par la perte progressive des anticorps au fil du temps que par un défaut de réponse primaire à la vaccination. Jones et al ont rapporté récemment, une réponse vaccinale adéquate plus élevée chez les nourrissons non infectés nés de mères séropositives que les nourrissons nés de mères séronégatives pour les valences coqueluche et pneumocoques testées à la suite de la primovaccination prévue par le PEV. L'explication proposée reposait sur la capacité inhibitrice de la réponse vaccinale par les anticorps maternels transmis aux nourrissons (Madhi SA et al, 2005; Scott S et al, 2007; Madhi SA et al, 2010; Jones CE et al, 2011). En effet, les enfants nés de mères séropositives ont un niveau faible d'anticorps maternels corrélé à la faible quantité d'anticorps chez la mère elle-même (Jones CE et al, 2011).

- **Taux de transmission et mortalité à 1 an**

Le taux de transmission mère-enfant chez les enfants inclus depuis la naissance est de 3,6% (IC à 95% : 2,8-4,8) d'autant plus faible que la mère avait reçu un traitement antirétroviral pendant la grossesse.

En intention de traiter, la mortalité infantile, même si elle reste évidemment plus élevée chez les enfants infectés que non infectés par le VIH, était plus faible que ce qui est rapporté au Cameroun et dans les pays du sud dans ces populations, probablement liée à l'intensification du suivi et de l'ensemble de la prise en charge médicale. On ne peut exclure que les perdus de vue à l'âge d'un an, qui représente 6,6% des enfants, pourraient être plus souvent infectés et/ou décédés, mais la proportion de perdus de vue est sensiblement la même chez les enfants nés de mères séropositives (7,3%) que séronégatives (8,9%) dont on peut penser qu'elles sont moins concernées par le suivi de leurs enfants, même gratuit.

- **Conditions de recrutement des enfants dans nos études**

Nos prévisions initiales de recrutement étaient basées sur des données antérieures à l'étude et des ajustements en cours d'étude ont été nécessaires, face aux réalités de terrain.

Au cours de la première année de recrutement dans Pediacam, nous avons observé un taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant (3,6%) plus faible que prévu (5 à 10%), peut-être liée à la diffusion des recommandations de PTME dans les maternités participantes, conduisant à un nombre d'enfants infectés suivis depuis la naissance plus faible qu'attendu.

A l'inverse, le recrutement des enfants infectés à l'occasion d'un diagnostic avant 7 mois a été plus important que prévu, témoignant de l'insuffisance de dépistage du VIH des femmes avant ou en cours de grossesse. Nous avons choisi de prolonger la durée d'inclusion de ces enfants, pour obtenir un nombre total d'enfants infectés suffisamment large, notamment pour répondre aux objectifs de la sous-étude ANRS-PRIVAR d'évaluation de la réponse cellulaire des enfants au vaccin rougeole (voir annexe). Ce groupe est important aussi du point de vue de santé publique, puisqu'il représente malheureusement, la fraction majoritaire des enfants diagnostiqués pour le VIH avant 7 mois au Cameroun.

Nous avons également du augmenter le nombre d'enfants non infectés inclus dans les groupes témoins, pour anticiper l'attrition au cours du temps plus importante que prévu. En particulier un tiers de nourrissons nés de mères séronégatives pour le VIH ne revenaient pas pour les visites de suivi planifiées en phase I (Figure II-4).

VI.2 Perspectives

Comme nous l'avons montré dans cette thèse, l'acceptabilité a été remarquable pour le dépistage de l'infection VIH chez les nourrissons et l'initiation des traitements antirétroviraux précoces chez les nourrissons infectés par le VIH, dans ce contexte de pays à ressources limitées.

Ces résultats sont en partie liés à d'importants efforts consentis pour organiser le circuit du patient et assurer la coordination active de ces études. Le défi principal reste l'organisation structurelle et fonctionnelle des différents sites. Nous envisageons, en collaboration avec les autorités de santé chargées de la lutte contre le VIH, de profiter des installations développées dans le cadre de Pediacam pour évaluer au fil du temps, les outils simples de repérage des nourrissons exposés au VIH dans les hôpitaux, par une collecte régulière de données concernant ce processus. Ces outils pourront être diffusés à l'échelle nationale pour faciliter l'accès au dépistage de l'infection VIH chez les nourrissons et faciliter la pérrenisation de cette activité. Le financement est obtenu et la mise en place en cours.

De plus, la cohorte PEDIACAM va permettre d'évaluer la prise en charge des nourrissons au-delà de la période d'initiation des traitements, et notamment l'observance et la manipulation des traitements par les parents, la tolérance, l'efficacité et les conditions de vie jusqu'à l'âge de 5 ans. En outre, une étude socio-anthropologique (ANRS 12 177-NOURRISSONS, Coordinateurs : Fred EBOKO et Sophie DJETCHA, annexe 4), associée à l'étude Pediacam, a été menée entre 2009 et 2011 pour décrire et analyser les déterminants du diagnostic précoce et de l'observance des traitements ARV chez les nourrissons infectés par le VIH-1 dans leurs contextes sociaux et culturels. Les analyses sont en cours.

La cohorte PEDIACAM a été également conçue pour comprendre le mécanisme de la réponse vaccinale des nourrissons dans le contexte particulier d'accès aux traitements antirétroviraux précoces en Afrique. Ces questions de recherche sont issues des résultats que nous avons présentés dans cette thèse, confirmant la moins bonne persistance des anticorps vaccinaux chez les enfants infectés par le VIH, mais également une réponse en dessous des limites attendues chez les enfants non infectés nés de mères séropositives pour le VIH (Tejiokem MC et al, 2007). PEDIACAM comporte ainsi deux groupes témoins d'enfants non infectés : nés de mères séropositives et nés de mère séronégatives pour le VIH. Cette étude permettra d'étudier prospectivement l'application des recommandations du PEV en routine, selon le statut VIH de l'enfant. Dans EPIPEV, environ 27% des enfants identifiés n'avaient pas été inclus pour des raisons de non respect du calendrier vaccinal. Et surtout, une étude de la cinétique des anticorps vaccinaux du PEV est prévue sur une période de 5 ans, ainsi que de la relation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire,

en particulier dans les situations où la réponse humorale n'est pas détectable, à partir d'une étude associée portant sur la réponse cellulaire des nourrissons au vaccin contre la rougeole (ANRS 12 207-PRIVAR, Responsables : Michèle Février, Institut Pasteur de Paris et Anfumbom Kfutwah, Centre Pasteur du Cameroun, annexe 4).

En cette période charnière d'accès précoce au diagnostic du VIH et aux traitements antirétroviraux, des enseignements peuvent être directement tirés de nos résultats pour faciliter sa diffusion. Une prise en charge dans les premiers mois de vie, selon les recommandations OMS actuelles, intégrée aux pratiques de routine, est faisable lorsqu'elle est soutenue par un personnel formé, motivé. Cette intervention a été évaluée dans trois structures hospitalières de référence, situées en zone urbaine et pionnières dans la lutte contre le VIH au Cameroun. Elle est certainement généralisable à d'autres pays dans des structures similaires. Mais le défi principal reste son application dans les structures de santé périphérique, ou de soins primaires, des zones rurales.

Le succès sera conditionné d'une part, par la formation du personnel à l'application des recommandations du PEV et des stratégies de prise en charge des nourrissons infectés par le VIH, et surtout l'organisation structurée d'un circuit actif entre sites cliniques et les laboratoires, l'implication de services médicaux de référence et une coordination centralisée pouvant apporter un soutien logistique et une expertise. D'autre part, il faudra penser à développer des stratégies de dépistage de l'infection VIH à large échelle. Cela pourrait passer par la vulgarisation du dépistage de manière systématique et gratuite en lieu et place du dépistage actuellement payant à la demande du patient. Cette stratégie a montré son intérêt en milieu hospitalier ougandais où le test VIH était proposé à tous les patients admis, ensuite étendu aux membres de familles des personnes infectées et enfin à la communauté (Wanyenze RK et al, 2008; Kankasa C et al, 2009). Le dépistage communautaire semble être une autre piste intéressante car il permet d'identifier à un stade précoce les enfants infectés et faciliter l'accès au traitement ou même de prévenir la transmission.

Chapitre VII : Références

Aboulker, J. P., A. Babiker, et al. (2004). "Highly active antiretroviral therapy started in infants under 3 months of age: 72-week follow-up for CD4 cell count, viral load and drug resistance outcome." Aids **18**(2): 237-45.

Abrams, E. J., J. Wiener, et al. (2003). "Maternal health factors and early pediatric antiretroviral therapy influence the rate of perinatal HIV-1 disease progression in children." Aids **17**(6): 867-77.

Aghokeng, A. F., E. Mpoudi-Ngole, et al. (2009). "Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon." PLoS One **4**(11): e7702.

Ahoua, L., H. Ayikoru, et al. (2010). "Evaluation of a 5-year programme to prevent mother-to-child transmission of HIV infection in Northern Uganda." J Trop Pediatr **56**(1): 43-52.

al-Attar, I., J. Reisman, et al. (1995). "Decline of measles antibody titers after immunization in human immunodeficiency virus-infected children." Pediatr Infect Dis J **14**(2): 149-51.

Angel, J. B., P. Walpita, et al. (1998). "Vaccine-associated measles pneumonitis in an adult with AIDS." Ann Intern Med **129**(2): 104-6.

Barbi, M., M. R. Biffi, et al. (1992). "Immunization in children with HIV seropositivity at birth: antibody response to polio vaccine and tetanus toxoid." Aids **6**(12): 1465-9.

Bautista-Lopez, N., B. J. Ward, et al. (2000). "Development and durability of measles antigen-specific lymphoproliferative response after MMR vaccination." Vaccine **18**(14): 1393-401.

Benjamin, D. K., Jr., W. C. Miller, et al. (2001). "Rational testing of the HIV-exposed infant." Pediatrics **108**(1): E3.

Beregszaszi, M., C. Dollfus, et al. (2005). "Longitudinal evaluation and risk factors of lipodystrophy and associated metabolic changes in HIV-infected children." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(2): 161-8.

Blanche, S., M. J. Mayaux, et al. (1994). "Relation of the course of HIV infection in children to the severity of the disease in their mothers at delivery." N Engl J Med **330**(5): 308-12.

Blanche, S., M. L. Newell, et al. (1997). "Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **14**(5): 442-50.

Bobat, R., D. Moodley, et al. (1997). "Breastfeeding by HIV-1-infected women and outcome in their infants: a cohort study from Durban, South Africa." Aids **11**(13): 1627-33.

Borrow, P., H. Lewicki, et al. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **68**(9): 6103-10.

Brambilla, D., C. Jennings, et al. (2003). "Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability." J Clin Microbiol **41**(5): 1888-93.

Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?" Nat Immunol **7**(3): 235-9.

Bromberg, K., G. Tannis, et al. (1991). "Detection of Bordetella pertussis associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection." Infect Immun **59**(12): 4715-9.

Brunell, P. A., V. Vimal, et al. (1995). "Abnormalities of measles antibody response in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **10**(5): 540-8.

Burns, D. N. and L. M. Mofenson (1999). "Paediatric HIV-1 infection." Lancet **354 Suppl 2**: SII1-6.

Chatterjee, A., S. Tripathi, et al. (2011). "Implementing services for Early Infant Diagnosis (EID) of HIV: A comparative descriptive analysis of national programs in four countries." BMC Public Health **11**(1): 553.

Chiappini, E., L. Galli, et al. (2006). "Virologic, immunologic, and clinical benefits from early combined antiretroviral therapy in infants with perinatal HIV-1 infection." Aids **20**(2): 207-15.

Chiappini, E., L. Galli, et al. (2009). "Five-year follow-up of children with perinatal HIV-1 infection receiving early highly active antiretroviral therapy." BMC Infect Dis **9**: 140.

Chintu, C., G. J. Bhat, et al. (2004). "Co-trimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): a double-blind randomised placebo-controlled trial." Lancet **364**(9448): 1865-71.

Chitsike, I. and R. van Furth (1999). "Paralytic poliomyelitis associated with live oral poliomyelitis vaccine in child with HIV infection in Zimbabwe: case report." Bmj **318**(7187): 841-3.

Chouquet, C., S. Richardson, et al. (1999). "Timing of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission from mother to child: bayesian estimation using a mixture." Stat Med **18**(7): 815-33.

Ciaranello, A. L., Y. Chang, et al. (2009). "Effectiveness of pediatric antiretroviral therapy in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis." Clin Infect Dis **49**(12): 1915-27.

Clerici, M., M. Saresella, et al. (2000). "T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV." Blood **96**(12): 3866-71.

Coffie, P. A., S. K. Kanhon, et al. "Nevirapine for the prevention of mother-to-child transmission of HIV: a nation-wide coverage survey in Cote d'Ivoire." J Acquir Immune Defic Syndr **57 Suppl 1**: S3-8.

Cohen, B. J., R. P. Parry, et al. (2006). "Measles immunity testing: comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay." J Virol Methods **131**(2): 209-12.

Cohen Stuart, J. W., W. A. Slieker, et al. (1998). "Early recovery of CD4+ T lymphocytes in children on highly active antiretroviral therapy. Dutch study group for children with HIV infections." Aids **12**(16): 2155-9.

Cohn, S. E., K. L. Knorr, et al. (1993). "Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease." Am Rev Respir Dis **147**(2): 411-3.

Cooper, E. R., C. Hanson, et al. (1998). "Encephalopathy and progression of human immunodeficiency virus disease in a cohort of children with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Women and Infants Transmission Study Group." J Pediatr **132**(5): 808-12.

Creek, T., A. Tanuri, et al. (2008). "Early diagnosis of human immunodeficiency virus in infants using polymerase chain reaction on dried blood spots in Botswana's national program for prevention of mother-to-child transmission." Pediatr Infect Dis J **27**(1): 22-6.

Cunningham, C. K., T. T. Charbonneau, et al. (1999). "Comparison of human immunodeficiency virus 1 DNA polymerase chain reaction and qualitative and quantitative RNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus 1-exposed infants." Pediatr Infect Dis J **18**(1): 30-5.

Cutts, F. (1993). "Les bases immunologiques de la vaccination. Module 7: la rougeole. Organisation modiale de la santé. ." Retrieved June, 02, 2012, from http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-f/mod7_f.pdf.

Dabis, F. (1992). Aspects épidémiologiques des maladies à prévention vaccinale de l'enfant en Afrique. UFR de santé Publique. Bordeaux, Université de Bordeaux II. **PhD**.

Dabis, F., P. Lepage, et al. (1994). "[Routine vaccinations in children and adults infected with HIV]." Sante **4**(3): 173-82.

de Martino, M., A. Podda, et al. (1997). "Acellular pertussis vaccine in children with perinatal human immunodeficiency virus-type 1 infection." Vaccine **15**(11): 1235-8.

de Onis, M., C. Garza, et al. (2009). "[WHO growth standards for infants and young children]." Arch Pediatr **16**(1): 47-53.

de Onis, M. and A. W. Onyango (2003). "The Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts and the growth of breastfed infants." Acta Paediatr **92**(4): 413-9.

Delamare, C., M. Burgard, et al. (1997). "HIV-1 RNA detection in plasma for the diagnosis of infection in neonates. The French Pediatric HIV Infection Study Group." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **15**(2): 121-5.

Doebbeling, B. N., M. L. Feilmeier, et al. (1990). "Pertussis in an adult man infected with the human immunodeficiency virus." J Infect Dis **161**(6): 1296-8.

Dunn, D. (2003). "Short-term risk of disease progression in HIV-1-infected children receiving no antiretroviral therapy or zidovudine monotherapy: a meta-analysis." Lancet **362**(9396): 1605-11.

Edwards, K. M. and N. B. Halasa (2004). "Commentary: is pertussis disease increasing?" Int J Epidemiol **33**(2): 365-6.

Eshleman, S. H., D. R. Hoover, et al. (2005). "Resistance after single-dose nevirapine prophylaxis emerges in a high proportion of Malawian newborns." Aids **19**(18): 2167-9.

Farquhar, C., D. Wamalwa, et al. (2009). "Immune responses to measles and tetanus vaccines among Kenyan human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children pre- and post-highly active antiretroviral therapy and revaccination." Pediatr Infect Dis J **28**(4): 295-9.

Fassinou, P., N. Elenga, et al. (2004). "Highly active antiretroviral therapies among HIV-1-infected children in Abidjan, Cote d'Ivoire." Aids **18**(14): 1905-13.

Faye, A., C. Bertone, et al. (2002). "Early multitherapy including a protease inhibitor for human immunodeficiency virus type 1-infected infants." Pediatr Infect Dis J **21**(6): 518-25.

Faye, A., J. Le Chenadec, et al. (2004). "Early versus deferred antiretroviral multidrug therapy in infants infected with HIV type 1." Clin Infect Dis **39**(11): 1692-8.

Fiscus, S. A., J. Wiener, et al. (2007). "Ultrasensitive p24 antigen assay for diagnosis of perinatal human immunodeficiency virus type 1 infection." J Clin Microbiol **45**(7): 2274-7.

Forsyth, K. D., C. H. Wirsing von Konig, et al. (2007). "Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting." Vaccine **25**(14): 2634-42.

Galazka, A. (1993a). "Les bases immunologiques de la vaccination. Module 1: Immunologie générale. Organisation Mondiale de la Santé." Retrieved June, 02, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/hq/1993/WHO_EPI_GEN_93.11_mod1_fre.pdf.

Galazka, A. (1993b). "Les bases immunologiques de la vaccination: la diphtérie." Retrieved June, 02, 2012, from http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-f/mod2_f.pdf.

Galazka, A. (1993c). "Les bases immunologiques de la vaccination: le tétanos." Retrieved June, 02, 2012, from http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-f/mod3_f.pdf.

Gans, H., L. Yasukawa, et al. (2001). "Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9, and 12 months." J Infect Dis **184**(7): 817-26.

Garenne, M., O. Leroy, et al. (1991). "Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal." Lancet **338**(8772): 903-7.

George, E., F. Noel, et al. (2007). "Antiretroviral therapy for HIV-1-infected children in Haiti." J Infect Dis **195**(10): 1411-8.

Gibb, D. M., R. L. Goodall, et al. (2003). "Adherence to prescribed antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected children in the PENTA 5 trial." Pediatr Infect Dis J **22**(1): 56-62.

Glesby, M. J., D. R. Hoover, et al. (1996). "The effect of influenza vaccination on human immunodeficiency virus type 1 load: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." J Infect Dis **174**(6): 1332-6.

Goetghebuer, T., E. Haelterman, et al. (2009). "Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants." Aids **23**(5): 597-604.

Gortmaker, S. L., M. Hughes, et al. (2001). "Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1." N Engl J Med **345**(21): 1522-8.

Grais, R. F., C. Dubray, et al. (2007). "Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad." PLoS Med **4**(1): e16.

Greco, D., S. Salmaso, et al. (1996). "A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group." N Engl J Med **334**(6): 341-8.

Grimprel, E., P. Begue, et al. (1996). "Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis vaccine in France." Clin Diagn Lab Immunol **3**(1): 93-7.

Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, et al. (2006). "Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys." Nat Med **12**(3): 289-95.

Gustafsson, L., H. O. Hallander, et al. (1996). "A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine." N Engl J Med **334**(6): 349-55.

Helfand, R. F., W. J. Moss, et al. (2005). "Evaluating the impact of the HIV pandemic on measles control and elimination." Bull World Health Organ **83**(5): 329-37.

INS and ORC-Macro. (2011). "Enquête démographique et de Santé, Cameroun." 2011, from http://www.statistics-cameroon.org/downloads/EDS-MICS11/EDS_MICS_2011_Rapport_preliminaire_27_oct_11.pdf.

Institut National de la Statistique and ORC-Macro. (2004). "Enquête démographique et de Santé, Cameroun." Retrieved January 18, 2011, from http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR163/FR163-CM04.pdf

Ioannidis, J., T. Taha, et al. (1999). "Predictors and impact of losses to follow-up in an HIV-1 perinatal transmission cohort in Malawi." Int. J. Epidemiol. **28**(4): 769-775.

Ioannidis, J. P., A. Tatsioni, et al. (2004). "Maternal viral load and rate of disease progression among vertically HIV-1-infected children: an international meta-analysis." Aids **18**(1): 99-108.

Ion-Nedelcu, N., A. Dobrescu, et al. (1994). "Vaccine-associated paralytic poliomyelitis and HIV infection." Lancet **343**(8888): 51-2.

Jaquet, D., M. Levine, et al. (2000). "Clinical and metabolic presentation of the lipodystrophic syndrome in HIV-infected children." Aids **14**(14): 2123-8.

Jeena, P. M., P. Pillay, et al. (2002). "Impact of HIV-1 co-infection on presentation and hospital-related mortality in children with culture proven pulmonary tuberculosis in Durban, South Africa." Int J Tuberc Lung Dis **6**(8): 672-8.

Jones, C. E., S. Naidoo, et al. (2011). "Maternal HIV infection and antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants." Jama **305**(6): 576-84.

Jones, S. A., G. G. Sherman, et al. (2005). "Exploring socio-economic conditions and poor follow-up rates of HIV-exposed infants in Johannesburg, South Africa." AIDS Care **17**(4): 466-70.

Kankasa, C., R. J. Carter, et al. (2009). "Routine offering of HIV testing to hospitalized pediatric patients at university teaching hospital, Lusaka, Zambia: acceptability and feasibility." J Acquir Immune Defic Syndr **51**(2): 202-8.

Kaplan, R., C. Orrell, et al. (2008). "Loss to follow-up and mortality among pregnant women referred to a community clinic for antiretroviral treatment." Aids **22**(13): 1679-81.

Katsoulidou, A., M. Petrodaskalaki, et al. (2006). "Evaluation of the clinical sensitivity for the quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Comparison of the new COBAS TaqMan HIV-1 with three current HIV-RNA assays--LCx HIV RNA quantitative, VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) and COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor v1.5." J Virol Methods **131**(2): 168-74.

Khamadi, S., V. Okoth, et al. (2008). "Rapid identification of infants for antiretroviral therapy in a resource poor setting: the Kenya experience." J Trop Pediatr **54**(6): 370-4.

Knuchel, M. C., B. Jullu, et al. (2007). "Adaptation of the ultrasensitive HIV-1 p24 antigen assay to dried blood spot testing." J Acquir Immune Defic Syndr **44**(3): 247-53.

Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." J Virol **68**(7): 4650-5.

Kretsinger, K., K. R. Broder, et al. (2006). "Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel." MMWR Recomm Rep **55**(RR-17): 1-37.

Lambert, J. S., D. R. Harris, et al. (2003). "Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **34**(5): 512-9.

Lanoy, E., M. Mary-Krause, et al. (2006). "Predictors identified for losses to follow up among HIV-seropositive patients." Journal of Clinical Epidemiology **59**: 829-835.

Laufer, M. K., J. J. van Oosterhout, et al. (2006). "Observational cohort study of HIV-infected African children." Pediatr Infect Dis J **25**(7): 623-7.

Lepage, P., F. Dabis, et al. (1992). "Safety and immunogenicity of high-dose Edmonston-Zagreb measles vaccine in children with HIV-1 infection. A cohort study in Kigali, Rwanda." Am J Dis Child **146**(5): 550-5.

Lepage, P., P. Msellati, et al. (1996). "Growth of human immunodeficiency type 1-infected and uninfected children: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda, 1988 to 1993." Pediatr Infect Dis J **15**(6): 479-85.

Levy, Y., C. Durier, et al. (2003). "Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial." Aids **17**(3): 343-51.

Lindgren-Alves, C. R., L. M. Freire, et al. (2001). "[Search of antimeasles antibodies in HIV-infected children after basic immunization]." J Pediatr (Rio J) **77**(6): 496-502.

Litalien, C., A. Faye, et al. (2003). "Pharmacokinetics of nelfinavir and its active metabolite, hydroxy-tert-butylamide, in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1." Pediatr Infect Dis J **22**(1): 48-55.

Lofgren, S. M., A. B. Morrissey, et al. (2009). "Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities." Aids **23**(18): 2459-66.

Luzuriaga, K., M. McManus, et al. (2000). "Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses." J Virol **74**(15): 6984-91.

Madhi, S. A., P. Adrian, et al. (2010). "Effect of HIV infection status and anti-retroviral treatment on quantitative and qualitative antibody responses to pneumococcal conjugate vaccine in infants." J Infect Dis **202**(3): 355-61.

Madhi, S. A., L. Kuwanda, et al. (2005). "Immunogenicity and effectiveness of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in HIV infected and uninfected African children." Vaccine **23**(48-49): 5517-25.

Mandelbrot, L. (1998). "Vertical transmission of viral infections." Curr Opin Obstet Gynecol **10**(2): 123-8.

Manzi, M., R. Zachariah, et al. (2005). "High acceptability of voluntary counselling and HIV-testing but unacceptable loss to follow up in a prevention of mother-to-child HIV transmission programme in rural Malawi: scaling-up requires a different way of acting." Trop Med Int Health **10**(12): 1242-50.

Mayaux, M. J., M. Burgard, et al. (1996). "Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group." Jama **275**(8): 606-10.

Mbori-Ngacha, D., R. Nduati, et al. (2001). "Morbidity and mortality in breastfed and formula-fed infants of HIV-1-infected women: A randomized clinical trial." Jama **286**(19): 2413-20.

McCoy, D., M. Besser, et al. (2002). "Interim findings on the National PMTCT pilot sites: Summary of lessons and recommendations. Durban: Health Systems Trust." Retrieved January 18, 2011, from ftp://ftp.hst.org.za/pubs/pmtct/pmtctsummary.pdf

McNally, L. M., P. M. Jeena, et al. (2007). "Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study." Lancet **369**(9571): 1440-51.

Melvin, A. J. and K. M. Mohan (2003). "Response to immunization with measles, tetanus, and Haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy." Pediatrics **111**(6 Pt 1): e641-4.

Ministère de la Santé Publique du Cameroun and Comité National de Lutte contre le SIDA. (2009). "Vers l'accès universel à la prévention en faveur des groupes cibles prioritaires: prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant. Rapport de progrès N°4." Retrieved January 18, 2011, from http://www.cnls.org/public/web/IMG/pdf/rapport_ptme_n_4.pdf.

Moodley, D., R. A. Bobat, et al. (1995). "Predicting perinatal human immunodeficiency virus infection by antibody patterns." Pediatr Infect Dis J **14**(10): 850-2.

Moss, W. J. (2007). "Measles still has a devastating impact in unvaccinated populations." PLoS Med **4**(1): e24.

Moss, W. J., C. J. Clements, et al. (2003). "Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus." Bull World Health Organ **81**(1): 61-70.

Moss, W. J., F. Cutts, et al. (1999). "Implications of the human immunodeficiency virus epidemic for control and eradication of measles." Clin Infect Dis **29**(1): 106-12.

Mphatswe, W., N. Blanckenberg, et al. (2007). "High frequency of rapid immunological progression in African infants infected in the era of perinatal HIV prophylaxis." Aids **21**(10): 1253-61.

Murphy, E. L., A. C. Collier, et al. (2001). "Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease." Ann Intern Med **135**(1): 17-26.

NACC-KENYA. (2010). "UNGASS 2010 - United Nations General Assembly Special Session on HIV and AIDS Country Report – Kenya." from http://www.unaids.org/en/dataanalysis/monitoringcountryprogress/progressreports/2010countries/kenya_2010_country_progress_report_en.pdf.

Naniche, D., M. Garenne, et al. (2004). "Decrease in measles virus-specific CD4 T cell memory in vaccinated subjects." J Infect Dis **190**(8): 1387-95.

Nesheim, S., P. Palumbo, et al. (2003). "Quantitative RNA testing for diagnosis of HIV-infected infants." J Acquir Immune Defic Syndr **32**(2): 192-5.

Newell, M. L., H. Brahmbhatt, et al. (2004a). "Child mortality and HIV infection in Africa: a review." Aids **18 Suppl 2**: S27-34.

Newell, M. L., H. Coovadia, et al. (2004b). "Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis." Lancet **364**(9441): 1236-43.

Newell, M. L., F. Parazzini, et al. (1998). "A randomised trial of mode of delivery in women infected with the human immunodeficiency virus." Br J Obstet Gynaecol **105**(3): 281-5.

Ngo-Giang-Huong, N., W. Khamduang, et al. (2008). "Early HIV-1 diagnosis using in-house real-time PCR amplification on dried blood spots for infants in remote and resource-limited settings." J Acquir Immune Defic Syndr **49**(5): 465-71.

Nuwagaba-Biribonwoha, H., B. Werq-Semo, et al. (2010). "Introducing a multi-site program for early diagnosis of HIV infection among HIV-exposed infants in Tanzania." BMC Pediatr **10**: 44.

Nyandiko, W. M., B. Otieno-Nyunya, et al. (2010). "Outcomes of HIV-exposed children in western Kenya: efficacy of prevention of mother to child transmission in a resource-constrained setting." J Acquir Immune Defic Syndr **54**(1): 42-50.

Obimbo, E. M., D. A. Mbori-Ngacha, et al. (2004). "Predictors of early mortality in a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected african children." Pediatr Infect Dis J **23**(6): 536-43.

Otieno, R. O., C. Ouma, et al. (2006). "Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria." Aids **20**(2): 275-80.

Palasanthiran, P., P. Robertson, et al. (1994). "Decay of transplacental human immunodeficiency virus type 1 antibodies in neonates and infants." J Infect Dis **170**(6): 1593-6.

Pancharoen, C., J. Ananworanich, et al. (2004). "Immunization for persons infected with human immunodeficiency virus." Curr HIV Res **2**(4): 293-9.

Papiernik, M., Y. Brossard, et al. (1992). "Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women." Pediatrics **89**(2): 297-301.

Peltzer, K. and G. Mlambo (2010). "Factors determining HIV viral testing of infants in the context of mother-to-child transmission." Acta Paediatr **99**(4): 590-6.

Permar, S. R., W. J. Moss, et al. (2001). "Prolonged measles virus shedding in human immunodeficiency virus-infected children, detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction." J Infect Dis **183**(4): 532-8.

Prendergast, A., G. Tudor-Williams, et al. (2007). "International perspectives, progress, and future challenges of paediatric HIV infection." Lancet **370**(9581): 68-80.

Ramsay, M. E., C. P. Farrington, et al. (1993). "Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods." Epidemiol Infect **111**(1): 41-8.

Relyveld, E., N. H. Oato, et al. (1991). "Determination of circulating antibodies directed to pertussis toxin and of agglutinogens in children vaccinated with either the whole cell or component pertussis vaccine in France, Japan and Senegal." Vaccine **9**(11): 843-50.

Robertson, S. (1993). "les bases immunologiques de la vaccination : la poliomyélite." Retrieved June, 02, 2012, from http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF-IBI-f/mod6_f.pdf.

Rogerson, S. R., M. Gladstone, et al. (2004). "HIV infection among paediatric in-patients in Blantyre, Malawi." Trans R Soc Trop Med Hyg **98**(9): 544-52.

Rollins, N., S. Mzolo, et al. (2009). "Universal HIV testing of infants at immunization clinics: an acceptable and feasible approach for early infant diagnosis in high HIV prevalence settings." Aids **23**(14): 1851-7.

Rosenberg, E. S., M. Altfeld, et al. (2000). "Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection." Nature **407**(6803): 523-6.

Rouet, F., D. K. Ekouevi, et al. (2005). "Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting." J Clin Microbiol **43**(6): 2709-17.

Rouet, F., V. Foulongne, et al. (2010). "Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study." J Virol Methods **163**(2): 253-7.

Rousseau, M. C., J. Moreau, et al. (1999). "Vaccination and HIV: a review of the literature." Vaccine **18**(9-10): 825-31.

Rouzioux, C., D. Costagliola, et al. (1995). "Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group." Am J Epidemiol **142**(12): 1330-7.

Rudy, B. J., R. M. Rutstein, et al. (1994). "Responses to measles immunization in children infected with human immunodeficiency virus." J Pediatr **125**(1): 72-4.

Ryder, R. W., M. J. Oxtoby, et al. (1993). "Safety and immunogenicity of bacille Calmette-Guerin, diphtheria-tetanus-pertussis, and oral polio vaccines in newborn children in Zaire infected with human immunodeficiency virus type 1." J Pediatr **122**(5 Pt 1): 697-702.

Scott, S., P. Cumberland, et al. (2005). "Neonatal measles immunity in rural Kenya: the influence of HIV and placental malaria infections on placental transfer of antibodies and levels of antibody in maternal and cord serum samples." J Infect Dis **191**(11): 1854-60.

Scott, S., W. J. Moss, et al. (2007). "The influence of HIV-1 exposure and infection on levels of passively acquired antibodies to measles virus in Zambian infants." Clin Infect Dis **45**(11): 1417-24.

Semprini, A. E., C. Castagna, et al. (1995). "The incidence of complications after caesarean section in 156 HIV-positive women." Aids **9**(8): 913-7.

Setse, R. W., F. Cutts, et al. (2006). "HIV-1 infection as a risk factor for incomplete childhood immunization in Zambia." J Trop Pediatr **52**(5): 324-8.

Shearer, W. T., T. C. Quinn, et al. (1997). "Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group." N Engl J Med **336**(19): 1337-42.

Sherman, G. G., P. A. Cooper, et al. (2005). "Polymerase chain reaction for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infancy in low resource settings." Pediatr Infect Dis J **24**(11): 993-7.

Simondon, F., I. Iteman, et al. (1998). "Evaluation of an immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay for pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in diagnosis of pertussis in Senegal." Clin Diagn Lab Immunol **5**(2): 130-4.

Spira, R., P. Lepage, et al. (1999). "Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group." Pediatrics **104**(5): e56.

Sprauer, M. A., L. E. Markowitz, et al. (1993). "Response of human immunodeficiency virus-infected adults to measles-rubella vaccination." J Acquir Immune Defic Syndr **6**(9): 1013-6.

Stringer, J. S., M. Sinkala, et al. (2004). "Universal nevirapine upon presentation in labor to prevent mother-to-child HIV transmission in high prevalence settings." Aids **18**(6): 939-43.

Sutcliffe, C. G., J. H. van Dijk, et al. (2008). "Effectiveness of antiretroviral therapy among HIV-infected children in sub-Saharan Africa." Lancet Infect Dis **8**(8): 477-89.

Sutter, R. W., A. J. Suleiman, et al. (2000). "Trial of a supplemental dose of four poliovirus vaccines." N Engl J Med **343**(11): 767-73.

Taha, T. E., S. M. Graham, et al. (2000). "Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and -uninfected African children." Pediatrics **106**(6): E77.

Tchendjou, P., C. Same-Ekobo, et al. (2010). "Effectiveness of multidrug antiretroviral regimens to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in routine public health services in Cameroon." PLoS One **5**(4): e10411.

Teglas, J. P., M. J. Mayaux, et al. (2000). "Antiretroviral therapy and mortality among children with perinatal HIV infection." Jama **284**(22): 2871-2.

Tejiokem, M. C., A. Faye, et al. (2011). "Feasibility of early infant diagnosis of HIV in resource-limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon." PLoS One **6**(7): e21840.

Tejiokem, M. C., I. Gouandjika, et al. (2007). "HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the Expanded Program on Immunization." PLoS ONE **2**(12): e1260.

Tejiokem, M. C., E. Nerrienet, et al. (2004). "[Prevention of mother to child HIV-1 transmission (MTC) in Cameroon]." Med Mal Infect **34 Suppl 1**: S57-60.

Tejiokem, M. C., E. Njamkepo, et al. (2009). "Whole-cell pertussis vaccine induces low antibody levels in human immunodeficiency virus-infected children living in sub-Saharan Africa." Clin Vaccine Immunol **16**(4): 479-83.

Tejiokem, M. C., J. Warsawski, et al. (2010). "The impact of different antiretroviral regimens on prevention of mother to child transmission in routine practice in Cameroon (ANRS 12140-PEDIACAM)." IAS 2010, july, Vienna (Austria).

Tovo, P. A., M. de Martino, et al. (1992). "Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children." Lancet **339**(8804): 1249-53.

Townsend, C. L., M. Cortina-Borja, et al. (2008). "Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006." Aids **22**(8): 973-81.

UN. (2001). "Declaration of Commitment on HIV/AIDS. United Nations General Assembly: Special session on HIV/AIDS; June 27, 2001 ", from http://www.un.org/ga/aids/coverage/FinalDeclarationHIVAIDS.html.

UNAIDS. (2010). "UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010." Retrieved April 24, 2012, from http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/paediatric020907.pdf.

Varga, C. A., G. G. Sherman, et al. (2005). "Psychosocial consequences of early diagnosis of HIV status in vertically exposed infants in Johannesburg, South Africa." Health Care Women Int **26**(5): 387-97.

Vigano, A., M. Saresella, et al. (2007). "Immune activation and normal levels of endogenous antivirals are seen in healthy adolescents born of HIV-infected mothers." Aids **21**(2): 245-8.

Violari, A., M. F. Cotton, et al. (2008). "Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants." N Engl J Med **359**(21): 2233-44.

Vougmo Meguejio Njua, C., F. Nguefack, et al. (2011). "[Booster doses outside of the Expanded Program on Immunization in two schools in basic education in Yaounde, Cameroon]." Pan Afr Med J **10**: 20.

Vreeman, R. C., S. E. Wiehe, et al. (2008). "A systematic review of pediatric adherence to antiretroviral therapy in low- and middle-income countries." Pediatr Infect Dis J **27**(8): 686-91.

Waibale, P., S. J. Bowlin, et al. (1999). "The effect of human immunodeficiency virus-1 infection and stunting on measles immunoglobulin-G levels in children vaccinated against measles in Uganda." Int J Epidemiol **28**(2): 341-6.

Wamalwa, D. C., C. Farquhar, et al. (2007). "Early response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected Kenyan children." J Acquir Immune Defic Syndr **45**(3): 311-7.

Wanyenze, R. K., C. Nawavvu, et al. (2008). "Acceptability of routine HIV counselling and testing, and HIV seroprevalence in Ugandan hospitals." Bull World Health Organ **86**(4): 302-9.

Warszawski, J., R. Tubiana, et al. (2008). "Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort." Aids **22**(2): 289-99.

Watson, D. C. and J. J. Farley (1999). "Efficacy of and adherence to highly active antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus type 1." Pediatr Infect Dis J **18**(8): 682-9.

WER. (2007). "Révision des lignes directrices relatives à la vaccination par le BCG des nourrissons exposés au risque d'infection par le VIH." 82: 193-196 Retrieved June,19, 2012, from http://www.who.int/immunization/wer8221bcg_May07_position_paper.pdf.

WHO. (2003). "Améliorer l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays à ressources limitées : recommandations pour une approche de santé publique." Retrieved June, 12, 2012, from http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5514f/s5514f.pdf.

WHO. (2006). "Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children in resource limited setting: towards universal access. Recommendations for public health approach 2006." Retrieved April 24, 2012, from http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/paediatric020907.pdf.

WHO. (2008a). "Report of the WHO Technical Reference Group, Paediatric HIV/Antiretroviral Therapy and Care Guideline Group Meeting, WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 10–11 April 2008." Retrieved April 24, 2012, from http://www.who.int/hiv/pub/paediatric/WHO_Paediatric_ART_guideline_rev_mreport_2008.pdf

WHO. (2008b). "WHO Expert Consultation on New and emerging evidence on the use of antiretroviral drugs for the prevention of mother-to-child transmission of HIV Geneva, 17-19 November 2008." Retrieved April 24, 2012, from http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/media/pmtct_consultation_2008.pdf.

WHO. (2010a). "Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: recommendations for a public health approach. 2010 version. Geneva, World Health Organization." Retrieved April 24, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818_eng.pdf.

WHO. (2010b). "Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children: towards universal access. Recommendations for a public health approach. 2010 revision. Geneva, World Health Organization." Retrieved April 24, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf. WHO (2010c) Pertussis vaccines: WHO position paper. weekly epidemiological record **Volume**, 385-400 DOI:

WHO, UNICEF, et al. (2010). "Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector, progress report 2009, Geneva, World Health Organization " Retrieved April 24 2012, from http://www.who.int/hiv/pub/tuapr_2009_en.pdf.

WHO, UNICEF, et al. (2011). "Global HIV/AIDS Response. Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. 2011 Progress Report " Retrieved April 24, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf.

WHO/EPI. (1997). "Manual for the virological investigation of polio. Expanded Program on Immunization." Retrieved June, 12, 2012, from http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_EPI_GEN_97.01.pdf.

Williams, A. J., T. Duong, et al. (2001). "Pneumocystis carinii pneumonia and cytomegalovirus infection in children with vertically acquired HIV infection." Aids **15**(3): 335-9.

Wolfson, L. J., P. M. Strebel, et al. (2007). "Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study." Lancet **369**(9557): 191-200.

Young, N. L., N. Shaffer, et al. (2000). "Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtypes." J Acquir Immune Defic Syndr **24**(5): 401-7.

Zhao, Y., M. Yu, et al. (2002). "Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by using TaqMan technology." J Clin Microbiol **40**(2): 675-8.

Chapitre VIII : Annexes

VIII.1 Annexe 1 : Tableaux complémentaires de la revue de littérature

Tableau VIII-1 : Classification clinique en 3 stades de l'infection et de la maladie VIH chez l'enfant

Stade clinique I : - Asymptomatique - Lymphadénopathie généralisée
Stade clinique II : - Diarrhée chronique d'une durée de plus de 30 jours en l'absence d'étiologie connue - Episodes de candidose récurrents ou persistants en dehors de la période néonatale - Perte de poids ou incapacité à guérir en l'absence d'étiologie connue - Fièvre persistante d'une durée de plus de 30 jours en l'absence d'étiologie connue - Infections bactériennes graves récurrentes autres que la septicémie ou la méningite (ex. ostéomyélite, pneumonie bactérienne (non tuberculeuse), abcès)
Stade clinique III : - Infections opportunistes définissant le SIDA - Grave incapacité à se développer (« émaciation ») en l'absence d'une étiologie connue (*) - Encéphalopathie progressive - Malignité - Septicémie ou méningite récurrente

(*) perte de poids persistante supérieure à 10% du poids de base ou inférieure au 5^{e} percentile du poids en fonction du tableau des tailles constatée à la suite de 2 séries de mesures consécutives, avec plus d'un mois d'écart, en l'absence d'une autre étiologie ou d'une maladie concurrente.
Source: WHO. (2003). from Retrieved June, 12, 2012, http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5514f/s5514f.pdf:

Tableau VIII-2 : Classification clinique en 4 stades de l'infection et de la maladie VIH chez le nourrisson et l'enfant

Stade clinique 1 : asymptomatique
- Asymptomatique - Lymphadénopathie persistante généralisée
Stade clinique 2[(i)] : modéré
- Hépatomégalie persistante inexpliquée - Eruptions papuleuses prurigineuses - Lésions condylomateuses extensives - Molluscum contagiosum extensif - Ulcérations orales récurrentes - Hypertrophie parotidienne persistante et inexpliquée - Erythème gingival linéaire - Herpès zoster - Infection haute récurrente ou chronique des voies respiratoires supérieures (otite moyenne aigue, otorrhée, sinusite, tonsilite) - Mycoses unguéales
Stade clinique 3[(i)] : avancé
- Malnutrition modérée inexpliquée ne répondant pas aux traitements standards - Diarrhée persistante inexpliquée (14 jours ou plus) - Fièvre persistante inexpliquée (>37.5℃, intermitt ent ou constant, pendant plus d'un mois) - Candidose orale persistante (au-delà des 6-8 premières semaines de vie) - Leucoplasie orale chevelue - Gingivite aigue ulcéronécrotique/parodontite - Adénite tuberculeuse - Tuberculose pulmonaire - Pneumonie bactérienne sévère et récurrente - Pneumonie lymphoïde interstitielle symptomatique - Maladie pulmonaire chronique associée au VIH y compris dilatation des bronches - Anémie inexpliquée (<8g/dl), neutropénie (<500/mm3) ou thrombopénie chronique (<50000/mm3)
Stade clinique 4 : sévère
- Cachexie sévère ou malnutrition sévère ne répondant au traitement standard - Pneumonie à Pneumocystis carinii - Infections bactériennes sévères récurrentes présumées (empyème, pyomyosite, arthrite ou ostéite, méningite à l'exclusion de la pneumonie) - Infection chronique à Herpes virus simplex (orolabiale ou cutanée durant plus d'un mois ou viscérale quelque soit la localisation) - Tuberculose extrapulmonaire - Sarcome de kaposi - Candidose oesophagienne (ou de la trachée, bronchique ou pulmonaire) - Toxoplasmose cérébrale (en dehors de la période néonatale) - Encéphalopathie à VIH - Rétinite à cytomégalovirus ou infection à CMV affectant tout autre organe et ayant débuté à plus d'un mois d'âge - Cryptococcose extrapulmonaire (y compris méningite) - Mycose endémique profonde disséminée (histoplasmose extrapulmonaire, coccidiomycose, penicilliose) - Cryptosporidiose chronique (avec diarrhée) - Isosporose chronique - Mycobactérie atypique disséminée - Lymphome cérébral ou lymphome B non Hodgkinien - Leucoencéphalite multifocale progressive - Cardiomyopathie due au VIH ou néphropathie du VIH

Tableau VIII-3 : Critères biologiques (lymphocytes CD4 et totaux) permettant de définir un déficit immunitaire sévère en prélude à la mise sous ARV

Marqueurs immunologiques	Recommandations âge-dépendant de mise sous ARV			
	≤11 mois	**12-35 mois**	**36-59 mois**	**≥ 5ans**
%CD4+	<25%	<20%	<15%	<15%
Nombre absolu de CD4[c]	<1500 cellules /mm^3	<750 cellules /mm^3	<350 cellules /mm^3	<200 cellules /mm^3

Source: WHO. (2003). from Retrieved June, 12, 2012, http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5514f/s5514f.pdf:

Tableau VIII-4 : Système de classement en pédiatrie du déficit immunitaire associé au VIH basé sur la numération et le taux de lymphocytes CD4 en fonction de l'âge

	<12 mois		**1 à 5 ans**		**6 à 12 ans**	
Catégorie immunitaire	**Nombre /mm^3**	**(%)**	**Nombre /mm^3**	**(%)**	**Nombre /mm^3**	**(%)**
Catégorie 1 : aucune suppression	≥ 1500	(≥ 25)	≥ 1000	(≥ 25)	≥ 500	(≥ 25)
Catégorie 2 : suppression modérée	750-1499	(15-24)	500-999	(15-24)	200-499	(15-24)
Catégorie 3 : suppression importante	< 750	(< 15)	< 500	(< 15)	< 200	(< 15)

(*) Tableau modifié tiré de "Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age". MMWR, 1994; 43(n°RR-12): pp. 1-10

Tableau VIII-5: Calendrier vaccinal chez l'enfant: vaccins recommandés mais non pris en charge par le PEV, administrés dans le cadre de l'étude ANRS-PEDIACAM, Cameroun

Age	**Enfants nés de mères séronégatives pour le VIH ou de statut inconnu**	**Enfants nés de mères séropositives pour le VIH**	
		Non infectés	**Infectés**
15 mois	ROR	ROR	
18 mois	DTCoq Polio, Hépatite B, Haemophilus B	DTCoq Polio, Hépatite B, Haemophilus B	DTCoq Polio, Hépatite B, Haemophilus B
24 mois	Pneumo 23 Meningo A+C Typhim Vi	Pneumo 23 Meningo A+C Typhim Vi	Pneumo 23 Meningo A+C Typhim Vi
5 ans	DTCoq Polio	DTCoq Polio	DTCoq Polio

VIII.2 Annexe 2 : Description de la procédure de sélection des témoins en phase II de Pediacam

La procédure de sélection des témoins était basée sur un appariement de fréquence et non sur un appariement 1 :1 comme en phase 1. Plusieurs pas de sondage ont été définis selon le sexe et le statut VIH des nourrissons sur la base des données de la littérature et en faisant plusieurs hypothèses sur : la proportion de garçons parmi nourrissons exposés au VIH (M=0,5), la proportion de garçons parmi les nourrissons infectés par le VIH (TM=0,4) et le taux de transmission du VIH de la mère à l'enfant (Tr = 0,075).

- un pas de sondage (PSM1) pour les garçons exposés au VIH mais non infectés par le VIH (M-+)
- un pas de sondage (PSF1) pour les filles exposées au VIH mais non infectées par le VIH (F-+)
- un pas de sondage (PSM2) pour les garçons nés de mères séronégatives pour le VIH (M--)
- un pas de sondage (PSF2) pour les filles nées de mères séronégatives pour le VIH (F--)

Les pas de sélection étaient alors :

$$PSM1_0 = \frac{M}{TM \times Tr} - 1$$

$$PSF1_0 = \frac{(1-M)}{(1-TM) \times Tr} - 1$$

$$PSM2_0 = \frac{M}{TM \times Tr}$$

$$PSF2_0 = \frac{(1-M)}{(1-TM) \times Tr}$$

Les valeurs obtenues pour les différents pas étaient : $PSM1_0$ = 15,66 soit 16, $PSF1_0$ = 10,11 soit 10, $PSM2_0$ = 16,66 soit 17, $PSF2_0$ = 11,11 soit 11

A l'aide de ces pas de sondage, la sélection des témoins a été faite sur les listes constituées suite au rendu des résultats VIH selon le statut VIH de l'enfant, par site et par sexe (voir liste stratifiée page suivante). Cette procédure de sélection était réalisée par le Centre Coordinateur de l'étude basé au Centre Pasteur du Cameroun et les listes transmises dans les différents sites pour les inclusions.

PEDIACAM ***Centre Pasteur du Cameroun***

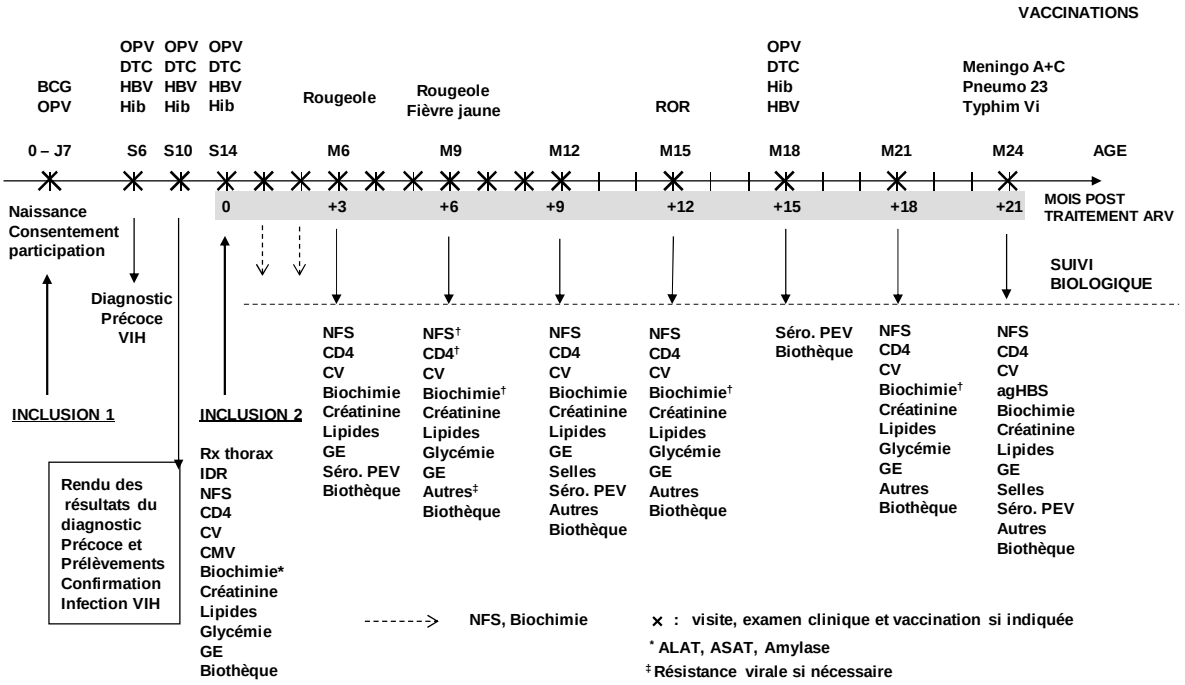
Projet ARNS 12140

Liste stratifiée

Enfants infectés par le VIH						*Enfants non infectés nés de mères VIH+*						*enfants non infectés nés de mères VIH-*					
HLD		***CME***		***CHE***		***HLD***		***CME***		***CHE***		***HLD***		***CME***		***CHE***	
F	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***	***F***	***M***
200251	201151	100121	102651	300441	300631	200011	200071	100041	100011	300011	300161	200241	200101	100051	100071	300581	344441
201591	203071	100361	102131	300171	300851	200051	200291	100081	100061	300031	300412	200321	200081	100181	100151	300461	300131
203671	203731	100341	105921	300861	301251	200111	200091	100301	100101	300151	300081	200661	200281	100351	100111	300491	300121
204791	206811	101681	107551	301491	302661	200131	200431	100211	100141	300321	300072	200021	200361	100311	100031	300941	300181
205511	210911	102011	108991	302281	303731	200171	200351	100381	100191	300281	300141	200161	200441	100561	100201	300641	300511
205791	211631	102791	110161	303371	305021	200191	200591	100161	100251	300561	300211	200621	200481	100601	100281	300952	300231
207051		104271	110221	303191	305401	200211	200471	100431	100271	377771	300201	200461	200601	100791	100421	300611	300291
206911		105501	115621	306371	306291	200231	200391	100451	100491	300601	300241	200501	200821	100541	100261	300711	300431
208351		108671		307821		200311	200731	100551	100511	300591	300221	200981	200841	100881	100501	301141	388881
211771		109311		308691		200331	200691	100531	100611	300751	300051	200721	200901	100921	100481	300721	300571
		109581				200651	200791	100591	100801	300661	300261	200561	201081	101021	100701	300731	300701
		110763				200611	200631	100771	100671	300691	300301	200381	200741	100981	100721	300741	301231

VIII.3 Annexe 3 : Calendrier de suivi des enfants inclus dans Pediacam

Suivi des enfants infectés par le VIH inclus depuis la naissance



Suivi des enfants non infectés par le VIH depuis la naissance

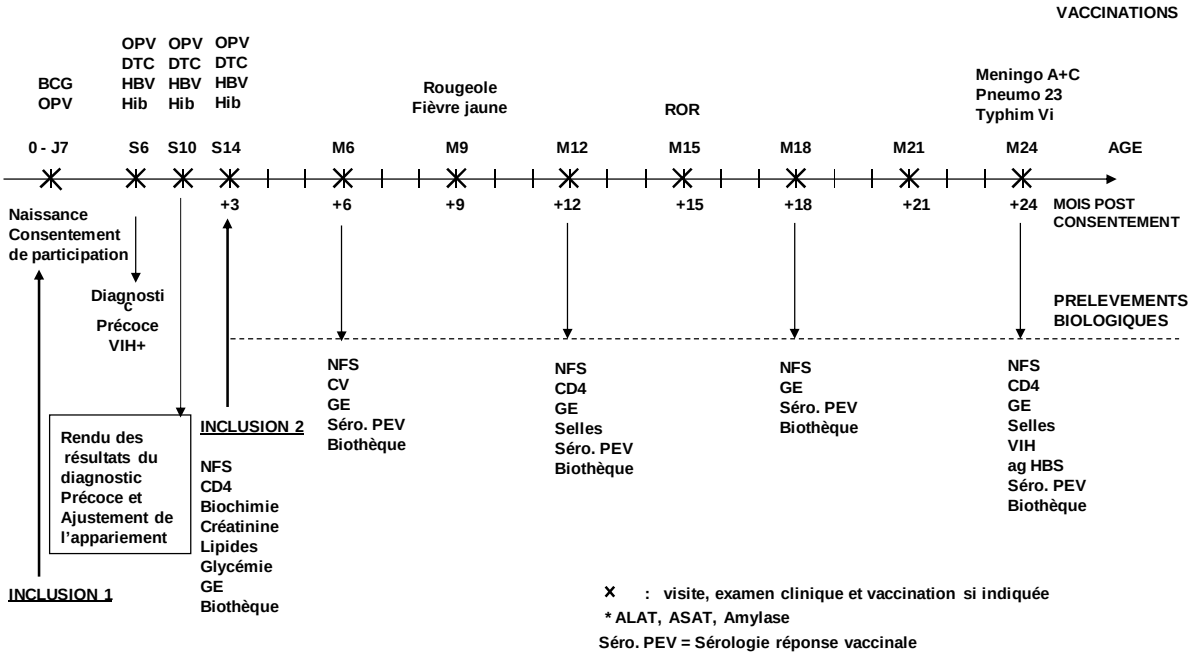


Figure VIII-1: Bilans biologiques détaillés des enfants inclus dans la cohorte Pediacam

VIII.4 Annexes 4 : Projets associés à Pediacam

NOURRISSONS – ANRS 12 177

Objectif: Décrire et analyser les déterminants anthropologiques de l'observance chez les nourrissons infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral dans leurs contextes sociaux et culturels

Coordinateurs: F. Eboko, S. Djetcha et C. Abé

VEDIAG – ANRS 12 217

Objectif: Évaluer la faisabilité du co-diagnostic VIH CMV sur papier buvard à partir d'une extraction commune d'ADN chez les nourrissons infectés par le VIH âgés de moins de 18 mois dans 4 pays du Sud

Coordinateurs: E. Nerrienet, M. Leruez

PEDIACAM
ANRS 12140

PRIVAR – ANRS 12 207

Objectif: Evaluer la capacité des nourrissons à générer des réponses immunes cellulaires spécifiques après vaccination contre la rougeole

Coordinateurs: M. Février, A Kfutwah

CHRONOVAC - ACIP

Objectif: Comparer la réponse humorale fièvre jaune et rougeole, chez les enfants âgés de 9 à 15 mois, vaccinés, soit simultanément (Groupe de référence) soit dans un délai de 1 à 28 jours (Groupe testé)

Coordinateurs: L. Baril, R. Michel

Collaborations: Instituts Pasteur de Dakar (IPD) et Cayenne, Centre Pasteur du Cameroun (CPC)

VIII.5 Annexe 5 : Publications scientifiques issues de cette thèse et distinctions

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Feasibility of Early Infant Diagnosis of HIV in Resource-Limited Settings: The ANRS 12140-PEDIACAM Study in Cameroon

Mathurin C. Tejiokem[1,2]*, Albert Faye[3,4], Ida C. Penda[5,6], Georgette Guemkam[7], Francis Ateba Ndongo[7], Gisèle Chewa[8], Claire Rekacewicz[9], Dominique Rousset[1,10], Anfumbom Kfutwah[1], Pascal Boisier[1], Josiane Warszawski[2,11,12], the ARNS 12140-PEDIACAM study group

1 Centre Pasteur du Cameroun, Membre du Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroun, **2** Université de Paris Sud 11, Paris, France, **3** Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Robert Debré, Paris, France, **4** Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UFR de Médecine, Paris, France, **5** Hôpital Laquintinie, Douala, Cameroun, **6** Université de Douala, Douala, Cameroun, **7** Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, Yaoundé, Cameroun, **8** Centre Hospitalier d'Essos, Yaoundé, Cameroun, **9** Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales, Paris, France, **10** Institut Pasteur de Paris, Paris, France, **11** Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Hôpital de Bicêtre, Paris, France, **12** Equipe 4 (VIH et IST) - INSERM U1018 (CESP), Paris, France

Abstract

Background: Early infant diagnosis (EID) of HIV is a key-point for the implementation of early HAART, associated with lower mortality in HIV-infected infants. We evaluated the EID process of HIV according to national recommendations, in urban areas of Cameroon.

Methods/Findings: The ANRS12140-Pediacam study is a multisite cohort in which infants born to HIV-infected mothers were included before the 8th day of life and followed. Collection of samples for HIV DNA/RNA-PCR was planned at 6 weeks together with routine vaccination. The HIV test result was expected to be available at 10 weeks. A positive or indeterminate test result was confirmed by a second test on a different sample. Systematic HAART was offered to HIV-infected infants identified. The EID process was considered complete if infants were tested and HIV results provided to mothers/family before 7 months of age. During 2007–2009, 1587 mother-infant pairs were included in three referral hospitals; most infants (n = 1423, 89.7%) were tested for HIV, at a median age of 1.5 months (IQR, 1.4–1.6). Among them, 51 (3.6%) were HIV-infected. Overall, 1331 (83.9%) completed the process by returning for the result before 7 months (median age: 2.5 months (IQR, 2.4–3.0)). Incomplete process, that is test not performed, or result of test not provided or provided late to the family, was independently associated with late HIV diagnosis during pregnancy (adjusted odds ratio (aOR) = 1.8, 95%CI: 1.1 to 2.9, p = 0.01), absence of PMTCT prophylaxis (aOR = 2.4, 95%CI: 1.4 to 4.3, p = 0.002), and emergency caesarean section (aOR = 2.5, 95%CI: 1.5 to 4.3, p = 0.001).

Conclusions: In urban areas of Cameroon, HIV-infected women diagnosed sufficiently early during pregnancy opt to benefit from EID whatever their socio-economic, marital or disclosure status. Reduction of non optimal diagnosis process should focus on women with late HIV diagnosis during pregnancy especially if they did not receive any PMTCT, or if complications occurred at delivery.

Citation: Tejiokem MC, Faye A, Penda IC, Guemkam G, Ateba Ndongo F, et al. (2011) Feasibility of Early Infant Diagnosis of HIV in Resource-Limited Settings: The ANRS 12140-PEDIACAM Study in Cameroon. PLoS ONE 6(7): e21840. doi:10.1371/journal.pone.0021840

Editor: Landon Myer, University of Cape Town, South Africa

Received January 24, 2011; **Accepted** June 11, 2011; **Published** July 19, 2011

Copyright: © 2011 Tejiokem et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This prospective study is sponsored by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tejiokem@pasteur-yaounde.org

Introduction

By the end of 2009, an estimated 2.5 million children worldwide were living with HIV, mostly a consequence of vertical transmission, and more than 90% of these children are in sub-Saharan Africa [1]. In resource limited countries, about 35% of HIV infected infants without any therapeutic intervention die before the age of one year [2]. Observational studies in industrialized countries and a randomized clinical trial in South Africa demonstrated that early initiation of HAART in infants dramatically reduces morbidity and mortality [3–6]. These results led the World Health Organization (WHO), in 2008, to recommend systematic early initiation of HAART to all HIV-infected infants diagnosed within the first year of life, and since 2010, within the first two years of life, irrespective of CD4 count or WHO clinical stage [7,8]. Thus, early diagnosis of HIV infection in infants is essential. In 2008, only 15% of HIV-exposed infants benefited from recommended virological tests within the first two months of life [9].

Many sub-Saharan African countries are increasingly developing and scaling up access to early infant HIV virological testing, particularly using dried blood spots (DBS) [9,10,11] generally

collected in clinical sites and sent to reference laboratories. In Cameroon a pilot program of HIV early infant diagnosis, was launched in 2007 using DBS with clinical sites collecting and sending samples to two referral laboratories for testing. The main difficulties encountered were the long delay between blood collection and the result, the large proportion of parents who failed to return for their infants' results and HIV-infected infants being lost to follow-up [12]. Several studies on PMTCT programs and clinical cohorts throughout sub-Saharan Africa similarly experienced high rates of loss to follow up [13–15] and some identified poor socioeconomic conditions as being a cause [14,16,17]. Despite the investment of financial and human resources, it remains of primary importance to improve the acceptability of early HIV testing in infants.

The ANRS 12140-PEDIACAM study started in Cameroon in November 2007 with two main objectives: to study the feasibility and effectiveness, in routine practice, of early antiretroviral multitherapy offered systematically to HIV-infected infants before 7 months of age; and to evaluate the humoral response of these children to vaccines of the Expanded Program of Immunization (EPI). All infants born to HIV-infected mothers included in the Pediacam study were offered early infant diagnosis (EID). Here, we describe the complete EID process (HIV test performed and results provided to mothers/family before 7 months of age) in urban areas of Cameroon and identify maternal and infant characteristics associated with the EID process being incomplete.

Methods

The ANRS 12140-Pediacam survey

Pediacam is an ongoing prospective observational cohort coordinated at the Centre Pasteur of Cameroon, and conducted in three referral hospitals in the two largest cities of Cameroon: the Central Hospital Maternity (CHM)/Mother and Child Center of the Chantal Biya Foundation (MCC-CBF), the Hospital Center Essos (HCE) both in Yaounde and Laquintinie Hospital (LH) in Douala. These referral hospitals are among the pioneers in the fight against HIV infection in Cameroon and offer a full range of services for infant and adult health needs in their areas. The Pediacam study comprises two consecutive phases. All infants born live to HIV-infected mothers with documented serostatus were included before the 8th day of life in the first phase of the study, and were followed, tested for HIV and given routine vaccinations by nurses according to the Cameroonian Expanded Program on Immunization schedule: BCG and oral polio vaccine at birth, combination diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B vaccine and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine, oral polio vaccine at 6, 10 and 14 weeks. Prior to inclusion, mothers were provided, by the physicians involved in the study, with information about the study, the benefits of follow up and infant testing at 6 weeks, and were invited to give written informed consent for the participation of their infant in the study. During the first visit planned at 6 weeks, early HIV diagnosis was proposed after counselling in addition to the routine clinical, nutritional and immunization follow up. In the second phase, systematic HAART and follow up was offered to all HIV-infected children included in the first phase, and also to HIV-infected children not followed since birth but aged less than 7 months at diagnosis of HIV infection. Infants born to HIV-uninfected mothers were also included in a control group. The ANRS-Pediacam study was granted ethical approval in Cameroon by the National Ethics Committee and in France by the Biomedical Research Committee of the Pasteur Institute of Paris. The Cameroon Ministry of Public Health gave administrative authorization to start the study.

Study population

This analysis included all infants born live to HIV-infected mothers enrolled into the first phase of Pediacam from November 2007 to December 2009. They were all aged at least six months at the time of this analysis.

Process of early infant diagnosis of HIV

Infant follow-up was scheduled to coincide with the Cameroon National EPI timetable at 6, 10 and 14 weeks thereby limiting the number of hospital visits. Samples for HIV virological testing were collected from HIV-exposed infants at the first follow-up visit planned at 6 weeks of age and the results were expected to be available at the next visit planned at 10 weeks. The study physicians and psychosocial workers contributed to post-test counselling. A positive or indeterminate test result was confirmed by a second test on a different sample collected as soon as possible after a phone call to the parents. A second test was also planned for breastfed infants, six weeks after weaning. In the Pediacam study, information concerning infant feeding was reported orally by mothers at inclusion i.e. before the 8th day of life and during the first phase follow up visits at 6, 10 and 14 weeks. The central coordinating team regularly identified infants who did not return for a follow-up visit within one week of the planned date and organised with the clinical site to make reminder phone calls. Incentives, including free medical support for consultation, HIV diagnosis, additional vaccine (*Haemophilus influenzae* type b which was not included in the Expanded Program on Immunization at the time this project was launched), and reimbursement of taxi fares were provided to participants by the Pediacam study during follow-up visits. The project provided free milk as required to women who choose formula feeding. For infants who tested HIV negative but were not included in the second phase of the Pediacam study, clinical follow up was encouraged until at least the HIV serological test at 15–18 months, in line with the national recommendations. The EID process from birth to the announcement of the result to the family was considered to be "complete" if the HIV virological test was performed and the result provided to mothers/family before 7 months of age.

Virological determination of HIV status

At the first follow-up visit for HIV-exposed infants attending the Yaoundé sites, whole blood was collected into EDTA-containing anticoagulant tubes and transferred to the Virology Laboratory of Centre Pasteur of Cameroon. The samples were tested for HIV RNA by a real-time polymerase chain reaction (RT PCR) (Biocentric HIV Charge Virale) using the TaqMan technology in an in-house protocol validated by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis [18]. Samples from infants attending the Douala site were collected onto filter papers (DBS), processed according to standard procedures [19] and transported to the National Program Reference laboratory, managed by the US Center for Disease Control at Mutengene. To reduce the delay between blood collection and availability of the test result at the collection site, one of the DBS collected from each infant at the Douala site was also sent to the Virology Laboratory of Centre Pasteur of Cameroon. Biocentric HIV DNA cell kit was used to test for HIV proviral DNA. All samples were also subjected to an in-house serotyping assay to distinguish between HIV groups and indirectly confirmed maternal HIV serological status.

Data collection

Data concerning socio-demographic and obstetrical characteristics, strategies for prevention of mother-to-child transmission,

neonatal anthropometric and clinical characteristics, postnatal treatment, feeding option, and routine immunization were collected in standardized questionnaires for each mother-child pair included. Clinical, vaccination and nutrition status was evaluated at each visit.

Statistical analysis

Characteristics of mother-infant pairs were described using medians with interquartile ranges (IQR) for continuous variables and percentages with frequencies for categorical variables. Each step of the EID process was described, and proportions were estimated with 95% confidence intervals (95%CI). For multiple births, only one infant, randomly selected was included in the statistical analysis. Univariate and multivariate logistic regressions were performed to identify factors associated with "incomplete EID process".

A first multivariate logistic regression model included non collinear variables associated with "incomplete EID process" (as dependant variable) if the p-value was ≤ 0.2 in the univariate analysis. The final model was obtained using a backward-stepwise strategy with consideration for confounding effects and interactions. We systematically included the study site and the mother's education level. Statistical analyses were performed using STATA version 10.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA). A p-value of 5% was considered for statistical significance of association.

Results

Baseline characteristics of the study population

Between November 2007 and December 2009, 1645 infants born to 1587 HIV infected mothers at three referral hospitals were included in the ANRS 12140-Pediacam study: 756 (45.9%) at the CH/MCC-CBF; 406 (24.7%) at the HCE in Yaoundé and 483 (29.4%) at the LH in Douala. Before pregnancy, 666 (42.0%) of the 1587 mothers were aware of their HIV infection. The median age of mothers at delivery was 29.2 years (IQR, 25.8–32.8). Among the mothers, 89.2% delivered vaginally, 3.5% had multiple births (52 twins and four triplets; one infant each died at delivery in the case of two twins), 9.9% did not take any prophylaxis for PMTCT, and 10.7% declared breastfeeding exclusively. Of the mother-infant pairs enrolled, 1176 (74.1%) mothers delivered in maternities participating in the study, 392 (24.7%) in other maternities, most of which were located in the same cities as the referral hospitals, and 19 (1.2%) at home or on their way to health facilities to deliver. The median age at enrolment of the HIV-exposed infants was 3 days (IQR, 1–5) and 51.8% were male. The median birth weight was 3150 g (IQR, 2800–3500).

Early infant diagnosis process

Of the 1587 mother-infant pairs, 90.2% (1431) attended at least one scheduled follow-up visit. Only 0.6% (8) of the infants were not tested, although the mothers agreed to HIV testing during the consultation. The mothers of 94.9% (1351) of 1423 infants tested returned to collect the result: 75.3% (1018) received the result at or before the infant was 3 months old; 23.2% (313) between ages 4 and 6 months; and only 1.5% (20) were tested and learned about their HIV result after 6 months of age. The median age at HIV testing was 1.5 months (IQR, 1.4–1.6), with no significant differences observed between the sites, and at delivery of the result was 2.5 months (IQR, 2.4–3.0). The median time between HIV testing and receipt of the test result was 1.1 month (IQR, 1.0–1.2) with statistically significant difference according to site of inclusion (1.0 month for CH/MCC-CBF, 1.0 month for HCE and 1.5 month for LH ; $p<10^{-3}$). HIV infection was diagnosed in 3.7% (95%CI: 2.8–4.8, n = 50) of infants whose family returned to collect result. Of the 5.1% (n = 72) of infants whose parents did not return to learn about their HIV result, only one had a positive HIV PCR result, and had died before the test result could be returned.

Overall, the EID process was incomplete for 16.1% (95%CI: 14.4–18.0; n = 256) of the 1587 HIV-exposed infants: these infants were either not tested or their families did not return to collect the HIV results before 7 months of age (Fig. 1). The vital status of infants who did not return for a follow-up visit was determined by phone calls in 87 cases: 25 died before HIV testing or collection of results, including 14 deaths before the first visit scheduled before 7 weeks of age. Of the parents of the 62 remaining infants, 45 gave various reasons to justify their failure to attend the follow up or to collect the HIV result. Over half (57.8%) reported moving and in 11.1%, the mothers were sick. Other reasons included refusal of HIV testing, fear of the HIV test results, forgetting about the follow up visit, the time required for the consultation, attending follow up in another health structure, and death of a parent. For 149 infants, no information could be obtained concerning the vital status because they could not be traced mostly due to missing or incorrect contact information (Fig. 1). These infants were considered to be lost to follow up.

Factors associated with incomplete early infant diagnosis process

In univariate analysis, "incomplete EID process" was significantly associated with late HIV diagnosis during pregnancy (less than 3 months before delivery), few antenatal visits (less than 4 visits), absence of MTCT prophylaxis, emergency caesarean section for delivery, low mother educational level, the lack of a functional refrigerator, and non disclosure of maternal HIV status to the partner (**Table S1**). "Incomplete EID process" also tended to be more frequent among cases of premature delivery (less than 37 weeks of pregnancy, p = 0.09), multiple birth (p = 0.07) and infant hospitalisation at birth (p = 0.07).

In multivariate analysis (**Table 1**), "incomplete EID process" remained independently associated with late HIV diagnosis during pregnancy (adjusted odds ratio (aOR): 1.8; 95%CI: 1.1 to 2.9; p = 0.01), absence of MTCT prophylaxis (aOR: 2.4; 95%CI: 1.4 to 4.3; p = 0.002), and emergency caesarean section (aOR: 2.5, 95%CI: 1.5 to 4.3; p = 0.001). Multiple birth tended to be associated (aOR = 1.8, 95%CI: 0.9 to 3.7, p = 0.10). None of low mother's education level, the lack of a functional fridge, non disclosure of HIV status to partner, or few antenatal visits were associated with "incomplete EID process".

Discussion

Early infant diagnosis of HIV is one of the most important challenges in the management of paediatric HIV infection in resource limited settings. Here, we describe each step and obstacles to EID in infants included in the ANRS 12140-PEDIACAM study. This study involves a large prospective cohort mainly designed to evaluate the feasibility of early HAART for HIV-infected infants at three reference hospitals in the two main cities in Cameroon. As far as we are aware, this is one of the first large prospective studies to identify factors associated with the process of infant HIV diagnosis being incomplete in African settings where early virological testing and antiretroviral drugs are now available for infants outside of the research context.

In this study, the EID process from birth to the announcement of the result to the family was considered as complete if the HIV

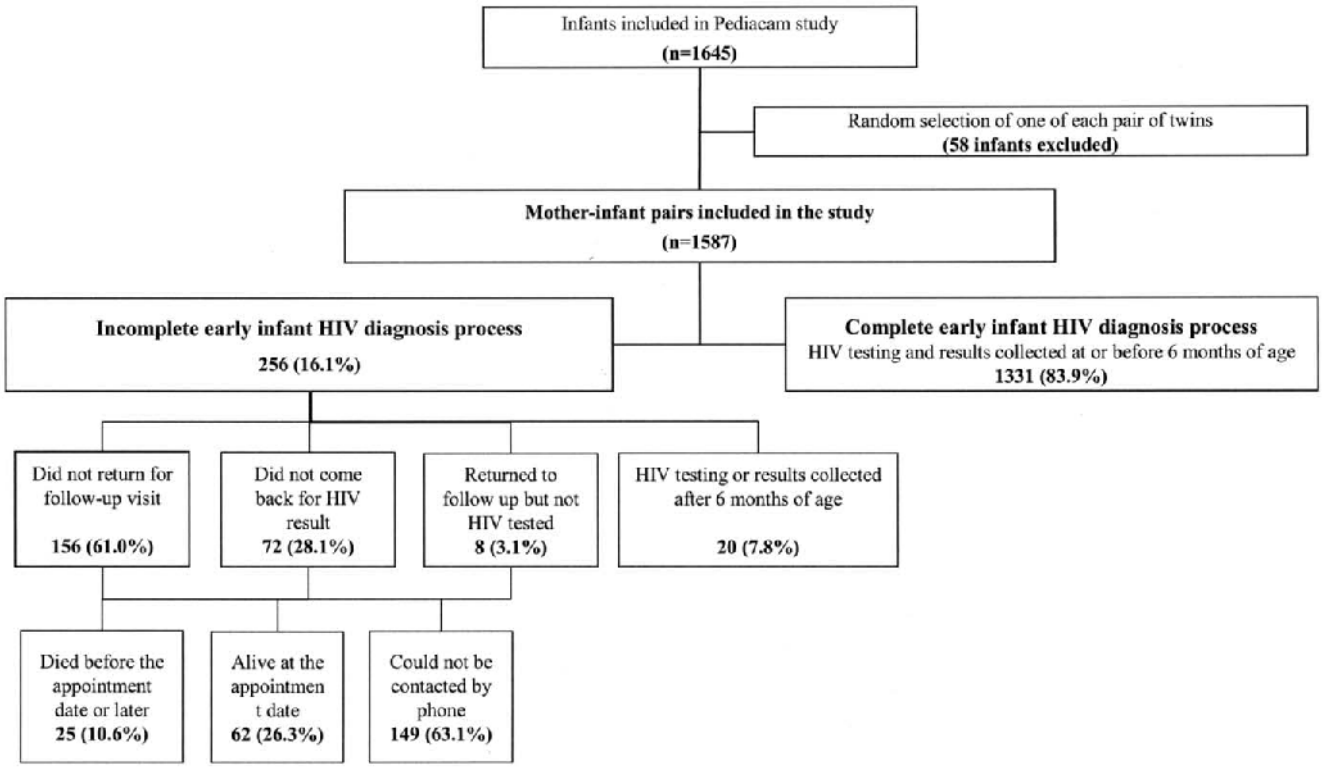


Figure 1. Take-up and key points of early infant HIV diagnosis process (ANRS12140-Pediacam study, Cameroon, 2007–2009).
doi:10.1371/journal.pone.0021840.g001

result was provided to the family before the infant was 7 months old. Learning the HIV status of the child after age 6 months is too late to allow early initiation of HAART, in accordance with several studies [3,5]. This would therefore result in a missed opportunity for HIV infected infants. Thus, the Pediacam study recommends starting treatment before age 7 months for all infants diagnosed as HIV-infected in the first phase of the study.

In the Pediacam study, 90.2% of infants returned at least once for follow up and almost all were tested for HIV. The return rate was higher than those previously reported in Malawi [14] and Uganda [20] where 70% (1503/2156) and 52% (292/567) of HIV exposed infants, respectively, were brought back for follow up. However, antiretroviral drugs were not easily accessible to children at the time of these previous surveys. Our active tracing method with multiple reminder calls may also explain the higher rate of return in our study.

Overall, the EID process was complete for 83.9% (95%CI: 82.0–85.6) of infants before the age of 7 months. This rate is similar to that reported in one clinical setting in Botswana (81%; 753/930) [11], but higher than those in surveys conducted in Tanzania and in South Africa where 55% (242/441) [21] and 65% (153/233) [22], respectively, of parents/guardians returned to learn about the results. However, age at diagnosis in these studies was more diverse: between 1 and 17 months. In the Pediacam study, the median age at collection of the HIV result was 2.5 months (IQR, 2.4–3.0). This is satisfactory in relation to promoting very wide access to HAART before 6 months of age. Initiating HAART at 3 months, as planned in the CHER randomized trial [4], would be feasible in routine practice for 75% of the infants in such settings.

Of every 100 infants offered early testing, 10 did not return for the test and six were tested but the family did not return to collect the result before the age of 7 months (both situations being incomplete EID). We investigated factors associated with incomplete EID. Late HIV diagnosis during pregnancy and absence of prophylaxis for PMTCT were significantly and independently associated with a higher risk of "incomplete EID process". Loss to follow up was previously reported to be associated with no PMTCT prophylaxis in a study in Uganda [20], and with short time between HIV infection and inclusion in a study for adults in France [23]. Of the 157 women who did not receive any PMTCT prophylaxis in Pediacam, 65.0% were diagnosed at a median time of 3 days (IQR, 1 to 15 days) before delivery (result not showed). Such a short period does not allow the women time to cope with the result, to deal with issues around disclosure to partner and to family, and to appreciate fully the benefits of medical follow up for both her and her child [24].

Incomplete EID was also significantly and independently associated with emergency caesarean section. Incomplete EID also tended to be more frequent in cases of multiple birth, low birth weight and infant hospitalisation at birth. Multiple birth and caesarean section were not reported to be associated with loss to follow up in a study conducted in Malawi [14]. Although our finding of an association with emergency caesarean section was unexpected, there are at least two possible explanations. First, saving the life of the mother and infant is the primary concern in cases of obstetrical emergency or neonatal complications. In such situations, prevention of HIV transmission may be a lower immediate priority for the mother and the medical team, and there may be little opportunity to discuss the benefits of follow up and infant HIV testing. Second, complications of labour or delivery are likely to be one of the reasons to refer women followed in primary antenatal care setting to the hospitals participating in the Pediacam survey. These women may prefer to return after

Table 1. Multivariate analysis: factors associated with incomplete early infant HIV diagnosis process (ANRS12140-Pediacam study, Cameroon, 2007–2009).

	Initial logistic regression model		Final logistic regression model	
Total (n = 1285)	**adjusted OR (CI 95%)**	**p-value**	**adjusted OR (CI 95%)**	**p-value**
Clinical sites		0.25		0.33
EHC*	1.2 (0.8–1.8)	0.44	1.2 (0.8–1.8)	0.44
LH†	0.8 (0.5–1.2)	0.28	0.8 (0.5–1.2)	0.32
CHM/MCC-CBF‡	ref		ref	
Mothers' level of education		0.50		0.36
None or primary education	1.4 (0.8–2.5)	0.24	1.5 (0.8–2.6)	0.15
Secondary	1.2 (0.8–2.0)	0.40	1.3 (0.8–2.1)	0.29
Higher education	ref		ref	
Presence of a functional fridge at home				
No	1.2 (0.8–1.6)	0.33		
Yes	ref			
Time at maternal HIV diagnosis		0.10		0.04
Less than 3 months before delivery	1.7 (1.0–2.7)	0.04	1.8 (1.1–2.9)	0.01
More than 3 months before delivery	1.2 (0.8–1.7)	0.50	1.2 (0.8–1.8)	0.36
Before pregnancy	ref		ref	
Disclosure of maternal HIV serostatus to partner				
No	1.3 (0.8–1.9)	0.27		
Yes	ref			
Maternal knowledge of the fathers' HIV status		0.25		
Did not know	1.2 (0.7–1.9)	0.47		
Negative	1.4 (0.9–2.2)	0.11		
Positive	ref			
Number of antenatal visits				
≤3	1.1 (0.7–1.7)	0.72		
>3	ref			
Mode of delivery		0.005		0.003
Emergency C-section	2.5 (1.4–4.3)	0.001	2.5 (1.5–4.3)	0.001
Elective C-section	0.7 (0.2–2.2)	0.59	0.8 (0.3–2.2)	0.62
Vaginal	ref		ref	
Receipt of any ART for PMTCT		0.02		0.009
No prophylaxis	2.3 (1.2–4.1)	0.005	2.4 (1.4–4.3)	0.002
Short-course combined ARV	1.4 (0.9–2.1)	0.14	1.3 (0.9–2.0)	0.16
Tritherapy	ref		ref	
Birth weight				
<2500 g	1.3 (0.7–2.2)	0.38		
≥2500 g	ref			
Prematurity				
<37 weeks	1.0 (0.6–1.6)	0.92		
≥37 weeks	ref			
Multiple birth				
Yes	1.5 (0.7–3.4)	0.26	1.8 (0.9–3.7)	0.10
No	ref		ref	
Infant hospitalised at birth				
Yes	1.2 (0.7–1.9)	0.57		
No	ref			

*EHC : Essos Hospital Center, Yaoundé.
†LH : Laquintinie Hospital, Douala.
‡CHM / MCC-CBF: Central Hospital Maternity / Mother and Child Center of the Chantal Biya Foundation, Yaoundé.
doi:10.1371/journal.pone.0021840.t001

delivery to their local hospital for infant follow up. Unfortunately, the referral status of pregnant women was not collected in Pediacam study so it is not possible to test whether or not this was indeed the case.

Incomplete EID process was also associated, in univariate analysis, with factors related to living conditions and socio-economic status: low level of mother education, absence of a functional fridge at home, and failure to disclose their HIV status to partner. However, odds ratios were lower for these factors than for factors related to late HIV diagnosis and obstetrical context of delivery (**Table S1**). Moreover, these associations did not remain significant in multivariate analysis (**Table 1**). Our results thus contrast with those of other studies which report a higher rate of loss to follow up in poor socioeconomic conditions (low education level, farming, long distances and cost of transport) [14,25] and in cases of non disclosure of HIV status [16].

The median time between HIV testing and receipt of test result differed between Pediacam sites, mainly due to the DBS being used in one of the sites. More time is needed for preparation, conditioning and transport of DBS to the laboratory. This did not affect the completeness of the process within 6 months, but could do so if the aim was to complete the process in 3 months. This underlines the importance of carefully evaluating local obstacles to implementation of an EID programme.

The proportion of mothers initiating formula feeding was higher than is generally the case nationwide, but was consistent with what has been described previously in these settings [26,27]. In 2009, only 32% of HIV-infected mothers reported formula feeding [12]. The infant feeding policy in Cameroon promotes exclusive breastfeeding for the first six months, unless replacement feeding is acceptable, feasible, affordable, sustainable and safe. The high proportion of formula feeding in the Pediacam study may be explained by the active counselling, by the higher economic status and lower socio-cultural pressure on feeding practices in urban areas than in others areas in the country.

This study has some limitations. The inclusion of infants born to HIV-infected mothers at Pediacam study maternities was not exhaustive. The failure to return may in some cases have been the consequence of mortality. However, the vital status could not be established for 149 of the 256 children with incomplete process (**Fig. 1**). The mortality rate during the process, estimated among the 1438 infants with known vital status, was 17.4 per 1000 live births (95%CI: 11.3–25.6, n = 25), which is lower than the estimated national rate in Cameroon: 29‰ in the first month [28]. This lower rate may have been due to better early clinical management. The value, however, may also reflect a high rate of early mortality among the infants who never returned, possibly due to severe HIV infection. Indeed, continuing this argument would suggest that the transmission rate for HIV of 3.6% (2.8 – 4.8) may be an underestimation.

Despite these limitations, one of the strengths of Pediacam study was that it was conducted in three centres in two large cities of Cameroon. These centres have very different working practices and recruitments so the study reflects the diversity of practical management of EID in a heterogeneous population mostly living in urban areas.

In summary, our study shows good take-up of EID services and high proportion of mothers returning to collect their infant's result within the first six months of life in an operational setting. As nearly half of the mothers knew their HIV status before pregnancy, most of them were likely to have knowledge of the benefits of PMTCT, and infant HIV diagnosis and follow up. In the Pediacam study, the risk factors for "incomplete EID process" reflected the quality of prenatal care and the obstetrical context (late HIV diagnosis, lack of any prophylaxis for PMTCT, emergency caesarean section), rather than environmental conditions such as socio-economic, marital and disclosure status. This may be partly due to the follow-up schedule being tied to the national vaccination programme, and partly to incentives and active reminders by telephone calls.

It seems to be very important to focus on women diagnosed at, or only a few days before, delivery, especially if they did not receive any PMTCT, or if they were transferred from their usual care setting for emergency delivery. All maternity team members should be aware of these issues, so as to offer reinforced support just after delivery in these situations at risk of non optimal follow up of the infant.

Supporting Information

Table S1 Univariate analysis: factors associated with incomplete HIV early infant diagnosis process: (ANRS 12140-Pediacam study, Cameroon, 2007–2009).
(DOC)

Appendix S1 The ANRS 12140-Pediacam Study Team.
(DOC)

Acknowledgments

We dedicate this publication to the memories of the late Dr Chantal Same Ekobo and Prof Félix Tietche, who coordinated two of our clinical sites.

We are particularly grateful to parents who accepted their children to be included in this study. We thank the entire ARNS 12140 study team (**Appendix S1**) at each site for their commitment and excellent collaboration. Our appreciation are also extended to institutions that contributed to the conduct of this study, including the Cameroon Ministry of Public Health, the National Ethics Committee, the Association of people living with HIV/AIDS, the Centre Pasteur of Cameroun, the Central Hospital Maternity, the Mother and Child Center of the Chantal Biya Foundation, and the Essos Hospital Center in Yaoundé, Laquintinie Hospital in Douala, and the National HIV Program reference laboratory-US Center for Disease Control at Mutengene, the Fondation Merieux and the Fondation Total.

Special thanks to Prof Françoise Barré-Sinoussi for her mentorship in the preparation and setting up of the ANRS 12140 programme.

We acknowledge the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis for funding this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MCT AF ICP CR AK DR PB JW. Analyzed the data: MCT PB JW. Wrote the paper: MCT AF ICP GG FAN GC CR AK DR PB JW. Coordination of the study: MCT AF ICP CR DR AK PB JW. Recruitment and infants follow up: ICP GG FAN GC.

References

1. UNAIDS (2010) UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. Available: http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2009/default.asp. Accessed 2010 December 14.
2. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, et al. (2004) Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. Lancet 364: 1236–1243.
3. Faye A, Le Chenadec J, Dollfus C, Thuret I, Douard D, et al. (2004) Early versus deferred antiretroviral multidrug therapy in infants infected with HIV type 1. Clin Infect Dis 39: 1692–1698.
4. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, Babiker AG, Steyn J, et al. (2008) Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. N Engl J Med 359: 2233–2244.

5. Chiappini E, Galli L, Tovo PA, Gabiano C, Lisi C, et al. (2009) Five year follow-up of children with perinatal HIV-1 infection receiving early highly active antiretroviral therapy. BMC Infect Dis 9: 140.
6. Goetghebuer T, Haelterman E, Le Chenadec J, Dollfus C, Gibb D, et al. (2009) Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants. Aids 23: 597–604.
7. World Health Organization (WHO) (2008) Report of the WHO Technical Reference Group, Paediatric HIV/Antiretroviral Therapy and Care Guideline Group Meeting, WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 10-11April2008. Available: http://www.who.int/hiv/pub/paediatric/WHO_Paediatric_ART_guideline_rev_mreport_2008.pdf. Accessed 2010 December 14.
8. World Health Organization (WHO) (2010) Antiretroviral therapy for HIV infection in infants and children. Towards Universal Access. Recommendations for public health approach. 2010 revision. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599801_eng.pdf. Accessed 2010 December 2.
9. World Health Organization (WHO), UNICEF, UNAIDS (2010) Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. Progress report 2009. Available: http://www.who.int/hiv/pub/tuapr_2009_en.pdf. Accessed 2011 January 18.
10. Creek TL, Sherman GG, Nkengasong J, Lu L, Finkbeiner T, et al. (2007) Infant human immunodeficiency virus diagnosis in resource-limited settings: issues, technologies, and country experiences. Am J Obstet Gynecol 197: S64–71.
11. Creek T, Tanuri A, Smith M, Seipone K, Smit M, et al. (2008) Early diagnosis of human immunodeficiency virus in infants using polymerase chain reaction on dried blood spots in Botswana's national program for prevention of mother-to-child transmission. Pediatr Infect Dis J 27: 22–26.
12. Ministère de la Santé Publique du Cameroun, Comité National de Lutte contre le SIDA (2009) Vers l'accès universel à la prévention en faveur des groupes cibles prioritaires: prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant. Rapport de progrès N°4. Available: http://www.cnls.org/public/web/IMG/pdf/rapport_ptme_n_4.pdf. Accessed 2011 January 18.
13. Nyandiko WM, Otieno-Nyunya B, Musick B, Bucher-Yiannoutsos S, Akhaabi P, et al. (2010) Outcomes of HIV-exposed children in western Kenya: efficacy of prevention of mother to child transmission in a resource-constrained setting. J Acquir Immune Defic Syndr 54: 42–50.
14. Ioannidis J, Taha T, Kumwenda N, Broadhead R, Mtimavalye L, et al. (1999) Predictors and impact of losses to follow-up in an HIV-1 perinatal transmission cohort in Malawi. Int J Epidemiol 28: 769–775.
15. Manzi M, Zachariah R, Teck R, Buhendwa L, Kazima J, et al. (2005) High acceptability of voluntary counselling and HIV-testing but unacceptable loss to follow up in a prevention of mother-to-child HIV transmission programme in rural Malawi: scaling-up requires a different way of acting. Trop Med Int Health 10: 1242–1250.
16. Jones SA, Sherman GG, Varga CA (2005) Exploring socio-economic conditions and poor follow-up rates of HIV-exposed infants in Johannesburg, South Africa. AIDS Care 17: 466–470.
17. Bwirire LD, Fitzgerald M, Zachariah R, Chikafa V, Massaquoi M, et al. (2008) Reasons for loss to follow-up among mothers registered in a prevention-of-mother-to-child transmission program in rural Malawi. Trans R Soc Trop Med Hyg 102: 1195–1200.
18. Rouet F, Ekouevi DK, Chaix ML, Burgard M, Inwoley A, et al. (2005) Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. J Clin Microbiol 43: 2709–2717.
19. Sherman GG, Cooper PA, Coovadia AH, Puren AJ, Jones SA, et al. (2005) Polymerase chain reaction for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infancy in low resource settings. Pediatr Infect Dis J 24: 993–997.
20. Ahoua L, Ayikoru H, Gnauck K, Odaru G, Odar E, et al. (2010) Evaluation of a 5-year programme to prevent mother-to-child transmission of HIV infection in Northern Uganda. J Trop Pediatr 56: 43–52.
21. Nuwagaba-Biribonwoha H, Werq-Semo B, Abdallah A, Cunningham A, Gamaliel JG, et al. (2010) Introducing a multi-site program for early diagnosis of HIV infection among HIV-exposed infants in Tanzania. BMC Pediatr 10: 44.
22. Rollins N, Mzolo S, Moodley T, Esterhuizen T, van Rooyen H (2009) Universal HIV testing of infants at immunization clinics: an acceptable and feasible approach for early infant diagnosis in high HIV prevalence settings. Aids 23: 1851–1857.
23. Lanoy E, Mary-Krause M, Tattevin P, Dray-Spira R, Duvivier C, et al. (2006) Predictors identified for losses to follow up among HIV-seropositive patients. Journal of Clinical Epidemiology 59: 829–835.
24. Kaplan R, Orrell C, Zwane E, Bekker LG, Wood R (2008) Loss to follow-up and mortality among pregnant women referred to a community clinic for antiretroviral treatment. Aids 22: 1679–1681.
25. McCoy D, Besser M, Visser R, Doherty T (2002) Interim findings on the National PMTCT pilot sites: Summary of lessons and recommendations. Durban: Health Systems Trust. Available: ftp://ftp.hst.org.za/pubs/pmtct/pmtctsummary.pdf. Accessed 2011 January 18.
26. Tejiokem MC, Nerrienet E, Tene G, Menu E, Barre-Sinoussi F, et al. (2004) [Prevention of mother to child HIV-1 transmission (MTC) in Cameroon]. Med Mal Infect 34(Suppl 1): S57–60.
27. Tchendjou P, Same-Ekobo C, Nga A, Tejiokem M, Kfutwah A, et al. (2010) Effectiveness of multidrug antiretroviral regimens to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in routine public health services in Cameroon. PLoS One 5: e10411.
28. Institut National de la Statistique, ORC-Macro (2004) Enquête démographique et de Santé, Cameroun. Available: http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR163/FR163-CM04.pdf. Accessed 2011 January 18.

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Apr. 2009, p. 479–483 Vol. 16, No. 4
1556-6811/09/$08.00+0 doi:10.1128/CVI.00312-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Whole-Cell Pertussis Vaccine Induces Low Antibody Levels in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children Living in Sub-Saharan Africa▽

Mathurin C. Tejiokem,[1] Elisabeth Njamkepo,[2] Ionela Gouandjika,[3] Dominique Rousset,[4] Lydie Béniguel,[5] Catherine Bilong,[6] Gilbert Tene,[7] Ida Penda,[8] Carine Ngongueu,[9] Jean C. Gody,[9] Nicole Guiso,[2] and Laurence Baril[10]*

Laboratoire d'Épidémiologie et de Santé Publique,[1] Laboratoire de Virologie,[4] and Laboratoire d'Analyses Médicales,[6] Centre Pasteur du Cameroun, and Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya,[7] Yaoundé, and Service de Pédiatrie, Hôpital Laquintinie, Douala,[8] Cameroon; Unité de Recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines, Institut Pasteur, Paris, France[2]; Laboratoire des Entérovirus[3] and Laboratoire des Rétrovirus,[5] Institut Pasteur de Bangui, and Complexe Pédiatrique National,[9] Bangui, Central African Republic; and Unité d'Épidémiologie des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal[10]

Received 27 August 2008/Returned for modification 29 October 2008/Accepted 26 January 2009

The WHO recommendations for the immunization of children infected with human immunodeficiency virus (HIV) differ slightly from the guidelines for uninfected children. The introduction of antiretroviral therapy for HIV-infected infants should considerably prolong their life expectancy. The question of the response to the whole-cell pertussis (wP) vaccine should now be addressed, particularly in countries in which pertussis remains endemic. To evaluate the persistence of antibodies to the wP vaccine in HIV-infected and uninfected children who had previously received this vaccine in routine clinical practice, we conducted a cross-sectional study of children aged 18 to 36 months, born to HIV-infected mothers and living in Cameroon or the Central African Republic. We tested blood samples for antibodies to the wP vaccine and for antibodies to diphtheria and tetanus toxoids (D and T, respectively) in the context of the use of a combined DTwP vaccine. We enrolled 50 HIV-infected children and 78 uninfected, HIV-exposed children in the study. A lower proportion of HIV-infected children than uninfected children had antibodies against the antigens tested for all valences of the DTwP vaccine. Agglutinin levels were substantially lower in HIV-infected than in HIV-exposed but uninfected children (30.0% versus 55.1%, respectively; $P = 0.005$). We also observed a high risk of low antibody levels in response to the DTwP vaccine in HIV-infected children with severe immunodeficiency (CD4 T-cell level, <25%). The concentrations of antibodies induced by the DTwP vaccine were lower in HIV-infected children than in uninfected children. This study supports the need for a booster dose of the DTwP vaccine in order to maintain high antibody levels in HIV-infected children.

Downloaded from cvi.asm.org by on November 24, 2009

There are almost 2 million children under the age of 15 years living with human immunodeficiency virus (HIV) in sub-Saharan Africa, according to the UNAIDS (http://www.unaids.org). Without appropriate antiretroviral therapy (ART), these children experience progressive immune depression. They are hypersusceptible to infectious diseases, although infection by some pathogens may be prevented by immunization. The World Health Organization (WHO) recommendations for the immunization of HIV-infected children differ slightly from the general guidelines for non-HIV-infected children (13). The use of vaccines for HIV-infected children raises questions about the capacity of these children to display a response to the vaccine. The most frequent combination of vaccines used by the Expanded Program on Immunization (EPI) comprises diphtheria and tetanus toxoids and inactivated whole-cell *Bordetella pertussis* adsorbed onto an aluminum salt (DTwP vaccine). This combined vaccine is scheduled for immunization at the ages of 6, 10, and 14 weeks, and a first booster dose between the ages of 15 and 18 months is recommended. Pertussis (whooping cough) is a highly communicable respiratory tract infection caused by the bacterium *Bordetella pertussis*. The disease remains a serious health concern, especially for infants and young children. According to the WHO, in 2003 an estimated 17.6 million cases, leading to 279,000 deaths, occurred worldwide, and 90% of cases affected young children living in developing countries (2). Pertussis spreads easily from adolescents and adults to children, through droplets produced during coughing and sneezing, and many children who contract pertussis have coughing spells that last from 4 to 8 weeks. Complications are most likely for young infants, the most common and generally fatal complication being bacterial pneumonia with severe respiratory distress. Early treatment with antibiotics (macrolides), if available, may slightly reduce the severity of the illness, but above all, it is important to stop transmission. Prevention involves immunization, and different vaccines, based on whole-cell pertussis (wP) and acellular pertussis (aP) vaccines, are currently available. The vaccines are effective at preventing severe clinical disease in infancy and have a significant impact on the circulation of *B. pertussis*. In resource-constrained settings, the combined DTwP vaccine is used due

* Corresponding author. Mailing address: Unit of Infectious Disease Epidemiology, Institut Pasteur de Dakar, 36, avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. Phone: 221 33 839 92 46. Fax: 221 33 839 92 10. E-mail: baril@pasteur.sn.

▽ Published ahead of print on 4 February 2009.

to its low price. Without booster doses, older children and adults may experience waning immunity and may serve as reservoirs for the transmission of bacteria (22, 23). Therefore, in industrialized countries, additional booster doses in the form of an aP vaccine are now recommended (8, 12).

In this study, we evaluated the persistence of antibodies induced by the wP vaccine in HIV-infected and HIV-exposed but uninfected children born to HIV-infected mothers and living in Central Africa. These children had previously received a three-dose regimen of the combined DTwP vaccine as part of a routine clinical practice. In addition, we assessed the levels of antibodies to the diphtheria and tetanus toxoid valences of the combined DTwP vaccine in these children.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a cross-sectional study with HIV-infected children and HIV-exposed, uninfected children, born to HIV-infected mothers, living in Cameroon or the Central African Republic. All parents or legal guardians gave their written informed consent. The study was approved by the National Ethics Committees in Cameroon and the Central African Republic. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The detailed study design has been reported previously (21). Briefly, children were included in the study if they had received at least a primary vaccine series of three doses of the DTwP vaccine, as certified by their immunization card. Two different combined DTwP vaccines were used in routine clinical practices in the two countries during the study period: one (SII Triple Antigen) produced by the Serum Institute of India (Pune, India) and the other (DTCoq) by Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France).

Blood samples were collected and processed at the Centre Pasteur in Yaoundé, Cameroon, and at the Institut Pasteur in Bangui, Central African Republic. One serum sample was collected from each child between the ages of 18 and 36 months and was frozen at −20°C for antibody testing. Antibodies to diphtheria and tetanus toxoids were measured on site. Some serum samples were sent to the French National Reference Center for Pertussis at the Institut Pasteur in Paris, France, for the measurement of agglutinins (AGG) and antibodies to pertussis toxin (PT). Antibodies to diphtheria and tetanus toxoids were measured using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Diphtheria ELISA IgG test kit and Tetanus ELISA IgG test kit; Genzyme Virotech, Rüsselsheim, Germany). Sera with antibody concentrations greater than or equal to 100 mIU/ml were considered to be positive. For the wP valence, sera were analyzed by a standardized ELISA to quantify antibodies to PT, which is specific to *B. pertussis* infection (19). Assay cutoffs were set at four times the minimum level of detection, corresponding to 8 ELISA units (EU)/ml for antibodies to PT. Sera were considered positive if they had levels above 25 EU/ml. Antibodies to PT did not last for more than 2 years after vaccination with a wP vaccine, and we considered titers of antibodies to PT of ≥100 EU/ml in the absence of a booster dose within the 2 years before sampling as indicative of a recent infection with *B. pertussis* (10). AGG, i.e., antibodies that agglutinate bacteria, directed mostly against fimbrial antigens, were detected using the microagglutination test (17). Positive results were defined as values equal to or greater than the value of the first dilution tested (1/20 dilution).

Moreover, complete blood counts, tests for proteinemia, and tests for HIV type 1 (HIV-1) infection of children, including assessment of the HIV-1 load and lymphocyte subpopulation counts, were carried out. In Cameroon, the plasma HIV-1 RNA load (viral load [VL]) was quantified by a commercial assay (Versant bDNA HIV kit, version 3.0; Bayer Diagnostics, Emeryville, CA) according to the manufacturer's instructions. The threshold for quantification was 50 HIV-1 RNA copies/ml. In Bangui, the plasma HIV-1 RNA levels were determined by real-time TaqMan reverse transcription-PCR with the protocol established by the ANRS Working Group for Viral Quantification (18). The limit for quantification was 400 HIV-1 RNA copies/ml. CD4 T cells were counted using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan) flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA).

The chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate, was used to compare categorical variables between HIV-infected and HIV-exposed but uninfected children. The proportions of HIV-infected and HIV-exposed, uninfected children with antibodies to PT and with AGG above the defined threshold of detection were reported. Univariate logistic regression analyses were used to assess the effects of covariates on the odds ratios (OR) of low levels of antibody to each valence of the DTwP vaccine (using AGG for the wP valence). Composite categorical variables were created to evaluate the effects of HIV infection: (i) HIV status combined with the percentage of CD4 T cells (HIV-exposed but uninfected or HIV-infected children and ≥25% CD4 T cells; HIV-infected children and <25% CD4 T cells); (ii) HIV status combined with VL (HIV-exposed but uninfected or HIV-infected children and a VL of <10,000 copies/ml; HIV-infected children and a VL of ≥10,000 copies/ml); (iii) HIV status combined with the duration of ART (HIV-exposed but uninfected children or HIV-infected children and ≥6 months of ART; HIV-infected children and <6 months of ART or no ART). Uninfected children who had been exposed to HIV perinatally were considered the reference group in this study. All statistical analyses were performed using STATA, version 8.0 (Stata Corp., College Station, TX), with a significance level of 5%.

TABLE 1. Proportions of children who tested positive for AGG and of those with antibodies to PT after three or four doses of whole-cell pertussis vaccine in relation to HIV status

Antibody	No. of doses	HIV-infected children		HIV-exposed, uninfected children		P^a
		No. tested	No. (%) with positive responses	No. tested	No. (%) with positive responses	
AGG	Total	50	15 (30.0)	78	43 (55.1)	0.005
	3	43	10 (23.3)	66	34 (51.5)	0.003
	4[b]	7	5 (71.4)	12	9 (75.0)	1.0
Anti-PT	Total	50	13 (26.0)	78	23 (29.5)	0.7
	3	43	10 (23.3)	66	20 (30.3)	0.42
	4[b]	7	3 (42.9)	12	3 (25.0)	0.6

[a] By the chi square test or Fisher's exact test as appropriate.
[b] In a study by Grimprel et al. (10) in which four doses of the vaccine were given, 70 to 90% of HIV-exposed, uninfected children had AGG, while 30 to 40% had anti-PT antibodies.

RESULTS

We analyzed 128 children, 50 of whom were HIV infected while 78 were HIV exposed but uninfected. Very few children (7 infected and 12 not infected with HIV) received a booster dose of the DTwP vaccine in a routine clinical practice. The two groups of children were last immunized at similar times (mean ages, 19.7 months for the HIV-infected group and 17.4 months for the HIV-exposed but uninfected group). The proportion of HIV-infected children that tested positive for AGG was lower than that of HIV-exposed, uninfected children (Table 1). However, the proportion of HIV-infected children positive for antibodies to PT was similar to that of HIV-exposed, uninfected children. Between the two countries, the proportion of children with detectable AGG did not differ, but there was a significant difference in the proportions with antibodies to PT (13.6% in the Central African Republic versus 40.6% in Cameroon; $P = 0.001$).

Univariate logistic regression was used to analyze the levels of antibody to each valence of the DTwP vaccine (Table 2). There was a significant association between a short duration of ART or no ART and low levels of antibodies to the DTwP vaccine. Severe immunodeficiency (<25% CD4 T cells; VL, ≥10,000 copies) was also associated with low levels of antibodies to the DTwP vaccine. Only covariates linked to HIV status were statistically significant for the diphtheria and tetanus toxoid valences. The covariates linked to HIV status (ART, percentage of CD4 T cells, and VL) and to the time elapsed after the last immunization were statistically significant for the wP valence.

Downloaded from cvi.asm.org by on November 24, 2009

TABLE 2. Relationships between the levels of antibodies to the DTwP vaccine[a] and the characteristics of 128 children (50 HIV-infected and 78 HIV-exposed, uninfected children)

Characteristic	AGG					Antibody to diphtheria toxoid					Antibody to tetanus toxoid				
	No. (%) negative (n = 70)	No. (%) positive (n = 58)	OR	95% CI	P^b	No. (%) negative (n = 40)	No. (%) positive (n = 88)	OR	95% CI	P	No. (%) negative (n = 10)	No. (%) positive (n = 118)	OR	95% CI	P
Site of inclusion															
Cameroon	40 (58.0)	29 (42.0)	1.3	0.7–2.7	0.4	27 (39.1)	42 (60.9)	2.3	1.0–5.2	0.03	9 (13.0)	60 (87.0)	8.9	1.0–76.3	0.02
Central African Republic	30 (50.8)	29 (49.2)	1			13 (22.0)	46 (78.0)	1			1 (1.7)	58 (98.3)	1		
HIV status															
Infected	35 (70.0)	15 (30.0)	2.9	1.4–6.1	0.005	24 (48.0)	26 (52.0)	3.6	1.6–8.1	0.001	8 (16.0)	42 (84.0)	7.2	1.4–37.7	0.006
HIV exposed, uninfected	35 (44.9)	43 (55.1)	1			16 (20.5)	62 (79.5)	1			2 (2.6)	76 (97.4)	1		
ART duration															
<6 mo	20 (64.5)	11 (35.5)	2.2	0.9–5.3	0.01	11 (35.5)	20 (64.5)	0.7	0.1–3.5	0.7	4 (12.9)	27 (87.1)	3.2	0.2–38.7	0.03
≥6 mo	15 (79.0)	4 (21.0)	4.6	1.4–15.1	0.07	13 (68.4)	6 (31.6)	5.7	2.2–14.4	$<10^{-5}$	4 (21.0)	15 (79.0)	8.9	1.6–48.8	0.002
% of $CD4^+$ T cells															
<25%	24 (80.0)	6 (20.0)	4.9	1.8–13.4	0.002	16 (53.3)	14 (46.7)	4.4	1.7–11.6	0.0009	5 (16.7)	25 (83.3)	7.6	1.3–44.5	0.008
≥25%	11 (55.0)	9 (45.0)	1.5	0.6–4.0	0.4	8 (40.0)	12 (60.0)	2.6	0.9–7.6	0.07	3 (15.0)	17 (85.0)	6.7	1–46.0	0.02
HIV load															
≥10,000 copies	15 (75.0)	5 (25.0)	3.7	1.2–14.1	0.02	11 (55.0)	9 (45.0)	4.7	1.6–14.2	0.002	3 (15.0)	17 (85.0)	6.7	1.0–46.0	0.02
<10,000 copies	20 (66.7)	10 (33.3)	2.4	1.0–5.9	0.04	13 (43.3)	17 (56.7)	3.0	1.2–7.6	0.01	5 (16.7)	25 (83.3)	7.6	1.3–44.5	0.008
Sex															
Male	31 (59.6)	21 (40.4)	1.4	0.7–2.8	0.35	14 (26.9)	38 (73.1)	0.7	0.3–1.5	0.8	1 (1.9)	51 (98.1)	0.1	0.02–1.2	0.04
Female	39 (51.3)	37 (48.7)	1			26 (34.2)	50 (65.8)	1			9 (11.8)	67 (88.2)	1		
Age at inclusion															
>23 mo[c]	37 (57.8)	27 (42.2)	1.3	0.6–2.6	0.48	24 (37.5)	40 (62.5)	1.8	0.8–3.9	0.1	9 (14.1)	55 (85.9)	10.3	1.2–89.8	0.009
≤23 mo	33 (51.6)	31 (48.4)	1			16 (25.0)	48 (75.0)	1			1 (1.6)	63 (98.4)	1		
Breastfeeding															
Yes	43 (57.3)	32 (42.7)	1.3	0.6–2.6	0.47	24 (32.0)	51 (68.0)	1.1	0.5–2.3	0.8	5 (6.7)	70 (93.3)	0.7	0.2–2.5	0.6
No	27 (50.9)	26 (49.1)	1			16 (30.2)	37 (69.8)	1			5 (9.4)	48 (90.6)	1		
Clinical signs															
Yes	20 (80.0)	5 (20.0)	4.2	1.5–12.2		8 (32.0)	17 (68.0)	1.0	0.4–2.7	0.9	0	25 (100)			0.1
No	50 (48.5)	53 (51.5)	1			32 (31.1)	71 (68.9)	1			10 (9.7)	93 (90.3)			
MUAC[d] for age															
Z score, <−2 (malnutrition)	17 (68.0)	8 (32.0)	2.0	0.8–5.0	0.14	10 (40.0)	15 (60.0)	1.6	0.6–4.0	0.3	22 (88.0)	3 (12.0)	1.9	0.4–7.8	0.4
Z score, ≥−2	53 (51.5)	50 (48.5)	1			30 (29.1)	73 (70.9)	1			96 (93.2)	7 (6.8)	1		
Time since last vaccination															
>18 mo	38 (64.1)	21 (35.6)	2.1	1.0–4.3	0.04	24 (40.7)	35 (59.3)	2.3	1.1–4.9	0.03	8 (13.6)	51 (86.4)	5.9	1.1–25.8	0.04
≤18 mo	32 (46.4)	37 (53.6)	1			16 (23.2)	53 (76.8)	1			2 (2.9)	67 (97.1)	1		
No. of doses received															
3	65 (59.6)	44 (40.4)	4.1	1.4–12.3	0.01	37 (33.9)	72 (66.1)	2.7	0.8–10.0	0.13	10 (9.2)	99 (90.3)			0.2
4	5 (26.3)	14 (73.7)	1			3 (15.8)	16 (84.2)	1			0	19 (100)			

[a] AGG were used as the antibodies for the wP valence.
[b] By the chi-square test or Fisher exact test as appropriate.
[c] Median age.
[d] MUAC, mid-upper-arm circumference.

No history of whooping cough was reported in the questionnaires. Persistent coughs for periods of 21 days or more were noticed for nine (18.0%) HIV-infected and two (2.6%) HIV-negative children (OR, 8.3; 95% confidence interval [95% CI], 1.7 to 40.4; P = 0.003) (Table 3). Of the nine HIV-infected children with a persistent cough, two had elevated antibodies to PT (180 EU/ml) and tested negative for AGG. These children had received three doses of the DTwP vaccine and had last been immunized 15 months prior to the study; i.e., the study took place less than 2 years after vaccination. However, their high anti-PT titers may correlate with exposure to *B. pertussis*. The two HIV-exposed, uninfected children with persistent coughs had low titers of antibodies to PT, and their coughs were not likely to be linked to pertussis. Six other children had elevated antibodies to PT (>100 EU/ml); of these, four tested negative for AGG (one HIV-infected child and three HIV-exposed but uninfected children) and two tested positive for AGG (both HIV exposed but uninfected). No children were reported to have had a persistent cough at the time of blood collection. Acute pertussis infection was

Downloaded from cvi.asm.org by on November 24, 2009

TABLE 3. Relationships between AGG levels, antibodies to PT, and persistent cough cases according to HIV status

Characteristic (no. of children)	No. of children[a] (no. with a persistent cough) who were:	
	HIV infected	HIV exposed, uninfected
Positive for AGG (58)		
Positive for anti-PT antibodies (16)	4 (0)	12 (0)
Negative for anti-PT antibodies (42)	11 (1[b])	31 (0)
Negative for AGG (70)		
Positive for anti-PT antibodies (20)	9 (2[c])	11 (0)
Negative for anti-PT antibodies (50)	26 (6[c])	24 (2[d])

[a] All children received three or four doses of the DTwP vaccine.
[b] Four doses of the DTwP vaccine.
[c] Three doses of the DTwP vaccine.
[d] One of these children received three doses, and the other received four doses, of the DTwP vaccine.

probable for the six children discussed above, based on their levels of antibodies to PT and the time after the last immunization. It is difficult to differentiate between antibodies following infection and antibodies resulting from vaccination, since no culture or PCR was performed to document the microorganism responsible for the persistent cough.

DISCUSSION

Combination DTwP vaccines have been used successfully for several years. The first priority of the EPI is to achieve at least 90% coverage with three doses of DTwP vaccine for infants. However, according to the WHO, in 2004 only 44 countries (27%) had reached the threshold of 80% coverage with three doses; moreover, only one sub-Saharan African country achieved >80% coverage (2). As reported in our study, the booster dose is not performed in routine clinical practices in most developing countries.

It is well known that wP vaccines are difficult to produce reproducibly and that their efficacies may differ according to the manufacturer (7). For instance, the efficacy of a DTwP vaccine with a three-dose regimen (at 2, 4, and 6 months) was estimated to be around 50% (95% CI, 37.0 to 57.6%) in a study performed in Sweden using a DTwP vaccine produced by Connaught Laboratories in the United States (11) and around 36% (95% CI, 14.2 to 52.1%) in a study performed in Italy with the same vaccine (9). However, in Senegal, the efficacy with the same schedule was calculated to be 91% (95% CI, 81 to 96%) with a DTwP vaccine produced by Sanofi Pasteur, France (20). No data relating to the SII vaccine are available, whereas several studies report that the DTCoq vaccine from Sanofi Pasteur induces a strong humoral response (3, 15, 20). We were not able to analyze the data in relation to the vaccine manufacturers in our study, but differences in vaccines attributed to the vaccine manufacturer certainly need further investigation, using a three-dose-regimen at 6, 10, and 14 weeks.

We showed that at around 18 months after the last vaccination, only 19.2% of HIV-positive children and 48.2% of HIV-exposed, uninfected children possessed detectable antibodies after three doses of wP vaccine. The antibody response was lower in HIV-infected children than in HIV-exposed, uninfected children. However, neither the type nor the level of antibodies against the wP vaccine correlated clearly with efficacy, and these results may therefore not reflect a risk of severe clinical disease (7). Historical comparisons indicate that the practice of primary vaccination before the age of 6 months without a booster immunization is not optimal (16). Therefore, a fourth dose at the age of 18 months is recommended by the WHO and is given in most industrialized countries as a booster in the form of an aP vaccine. A four-dose regimen (with one booster dose) and a five-dose regimen (with two booster doses), even with a less effective vaccine, have satisfactorily controlled whooping cough in the United States (7).

B. pertussis infection seems to be uncommon among HIV-infected children and adults (1, 5, 6, 14), but infection by *B. pertussis* is rarely considered and is difficult to diagnose biologically. A paucisymptomatic or an atypical form of pertussis in HIV-infected children may be misdiagnosed. Intracellular *B. pertussis* has been demonstrated in macrophages by using bronchoalveolar lavage specimens from HIV-infected patients (4). The patients were paucisymptomatic, and other opportunistic infections were associated with the severity of their respiratory symptoms. In this study, cases of prolonged coughing were reported for almost one-fifth of HIV-infected children; however, these instances were not confirmed microbiologically.

To conclude, it is not clear whether HIV-infected children may be at greater risk of severe pertussis, or at risk of more frequent pertussis disease, than HIV-exposed, uninfected children. However, the former have lower titers of antibody to wP vaccine antigens and may serve as reservoirs for pertussis transmission in the population, since asymptomatic carriers have been reported. Therefore, the introduction of a fourth dose of pertussis vaccine should be considered a priority for all children living in countries in which pertussis is still a major health problem. To make this measure effective, these countries should extend the free delivery of the EPI vaccine to children above the age of 1 year. In the mid-term, monitoring the antibody response after a four-dose regimen will aid in the introduction of adequate recommendations for supplementary vaccine doses during the teenage years in the sub-Saharan population.

ACKNOWLEDGMENTS

The Department of International Affairs (DIA) of the Institut Pasteur provided the financial support for this study. The DIA played no role in the design of the study, data collection and analysis, or the preparation of the manuscript.

We thank Valérie Marquegnies for technical support in data management; Yoann Madec for discussions about statistical analyses; Valérie Maréchal, who measured the HIV loads at the Institut Pasteur de Bangui, Bangui, Central African Republic; and Katherine Kean for revising the English of the manuscript. We also express our profound gratitude to the hospital staff members and to the parents and their children who participated in the study at the Chantal Biya Foundation and the Nkolndongo Catholic Health Center in Yaoundé, Cameroon; the Laquintinie Hospital in Douala, Cameroon; and the Bangui Pediatric Center in Bangui, Central African Republic.

REFERENCES

1. **Adamson, P. C., T. C. Wu, B. D. Meade, M. Rubin, C. R. Manclark, and P. A. Pizzo.** 1989. Pertussis in a previously immunized child with human immunodeficiency virus infection. J. Pediatr. **115:**589–592.
2. **Anonymous.** 2005. Pertussis vaccines—WHO position paper. Wkly. Epidemiol. Rec. **80:**31–39.
3. **Baron, S., E. Njamkepo, E. Grimprel, P. Begue, J. C. Desenclos, J. Drucker,**

Downloaded from cvi.asm.org by on November 24, 2009

and N. Guiso. 1998. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. Pediatr. Infect. Dis. J. **17:**412–418.
4. **Bromberg, K., G. Tannis, and P. Steiner.** 1991. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection. Infect. Immun. **59:**4715–4719.
5. **Cohn, S. E., K. L. Knorr, P. H. Gilligan, M. L. Smiley, and D. J. Weber.** 1993. Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease. Am. Rev. Respir. Dis. **147:**411–413.
6. **Doebbeling, B. N., M. L. Feilmeier, and L. A. Herwaldt.** 1990. Pertussis in an adult man infected with the human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. **161:**1296–1298.
7. **Edwards, K. M., and M. D. Decker.** 2004. Pertussis vaccine, p. 471–528. *In* S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (ed.), Vaccines, 4th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
8. **Forsyth, K. D., C. H. Wirsing von Konig, T. Tan, J. Caro, and S. Plotkin.** 2007. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. Vaccine **25:**2634–2642.
9. **Greco, D., S. Salmaso, P. Mastrantonio, M. Giuliano, A. E. Tozzi, A. Anemona, M. L. Ciofi degli Atti, A. Giammanco, P. Panei, W. C. Blackwelder, D. L. Klein, S. G. Wassilak, et al.** 1996. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. N. Engl. J. Med. **334:**341–348.
10. **Grimprel, E., P. Begue, I. Anjak, E. Njamkepo, P. Francois, and N. Guiso.** 1996. Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis vaccine in France. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **3:**93–97.
11. **Gustafsson, L., H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter.** 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. N. Engl. J. Med. **334:**349–355.
12. **Kretsinger, K., K. R. Broder, M. M. Cortese, M. P. Joyce, I. Ortega-Sanchez, G. M. Lee, T. Tiwari, A. C. Cohn, B. A. Slade, J. K. Iskander, C. M. Mijalski, K. H. Brown, and T. V. Murphy.** 2006. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel. MMWR Recommend. Rep. **55:**1–37.
13. **Moss, W. J., C. J. Clements, and N. A. Halsey.** 2003. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. Bull. W. H. O. **81:**61–70.
14. **Ng, V., L. Weir, M. K. York, and W. K. Hadley.** 1992. *Bordetella pertussis* versus non-*L. pneumophila Legionella* spp.: a continuing diagnostic challenge. J. Clin. Microbiol. **30:**3300–3301.
15. **Njamkepo, E., F. Rimlinger, S. Thiberge, and N. Guiso.** 2002. Thirty-five years' experience with the whole-cell pertussis vaccine in France: vaccine strains analysis and immunogenicity. Vaccine **20:**1290–1294.
16. **Ramsay, M. E., C. P. Farrington, and E. Miller.** 1993. Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods. Epidemiol. Infect. **111:**41–48.
17. **Relyveld, E., N. H. Oato, N. Guerin, P. Coursaget, M. Huet, and R. K. Gupta.** 1991. Determination of circulating antibodies directed to pertussis toxin and of agglutinogens in children vaccinated with either the whole cell or component pertussis vaccine in France, Japan and Senegal. Vaccine **9:**843–850.
18. **Rouet, F., D. K. Ekouevi, M. L. Chaix, M. Burgard, A. Inwoley, T. D. Tony, C. Danel, X. Anglaret, V. Leroy, P. Msellati, F. Dabis, and C. Rouzioux.** 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. J. Clin. Microbiol. **43:**2709–2717.
19. **Simondon, F., I. Iteman, M. P. Preziosi, A. Yam, and N. Guiso.** 1998. Evaluation of an immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay for pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in diagnosis of pertussis in Senegal. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **5:**130–134.
20. **Simondon, F., M. P. Preziosi, A. Yam, C. T. Kane, L. Chabirand, I. Iteman, G. Sanden, S. Mboup, A. Hoffenbach, K. Knudsen, N. Guiso, S. Wassilak, and M. Cadoz.** 1997. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. Vaccine **15:**1606–1612.
21. **Tejiokem, M. C., I. Gouandjika, L. Beniguel, M. C. Zanga, G. Tene, J. C. Gody, E. Njamkepo, A. Kfutwah, I. Penda, C. Bilong, D. Rousset, R. Pouillot, F. Tangy, and L. Baril.** 2007. HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the Expanded Program on Immunization. PLoS ONE **2:**e1260.
22. **von König, C. H., S. Halperin, M. Riffelmann, and N. Guiso.** 2002. Pertussis of adults and infants. Lancet Infect. Dis. **2:**744–750.
23. **Wendelboe, A. M., E. Njamkepo, A. Bourillon, D. D. Floret, J. Gaudelus, M. Gerber, E. Grimprel, D. Greenberg, S. Halperin, J. Liese, F. Munoz-Rivas, R. Teyssou, N. Guiso, and A. Van Rie.** 2007. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. Pediatr. Infect. Dis. J. **26:**293–299.

Downloaded from cvi.asm.org by on November 24, 2009

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

HIV-Infected Children Living in Central Africa Have Low Persistence of Antibodies to Vaccines Used in the Expanded Program on Immunization

Mathurin C. Tejiokem[1], Ionela Gouandjika[4], Lydie Béniguel[5], Marie-Claire Endegue Zanga[2], Gilbert Tene[6], Jean C. Gody[7], Elisabeth Njamkepo[8], Anfumbom Kfutwah[2], Ida Penda[11], Catherine Bilong[3], Dominique Rousset[2], Régis Pouillot[1], Frédéric Tangy[9], Laurence Baril[10]*

1 Centre Pasteur du Cameroun, Laboratoire d'Epidémiologie et de Santé Publique, Yaoundé, Cameroun, **2** Centre Pasteur du Cameroun, Laboratoire de Virologie, Yaoundé, Cameroun, **3** Centre Pasteur du Cameroun, Laboratoire d'Analyses Médicales, Yaoundé, Cameroun, **4** Institut Pasteur de Bangui, Laboratoire des Entérovirus, Bangui, Central African Republic, **5** Institut Pasteur de Bangui, Laboratoire des Rétrovirus, Bangui, Central African Republic, **6** Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, Yaoundé, Cameroun, **7** Complexe Pédiatrique de Bangui, Central African Republic, **8** Centre National de Référence des *Bordetella*, Institut Pasteur, Paris, France, **9** Laboratoire de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France, **10** Unité d'Epidémiologie des Maladies Emergentes, Institut Pasteur, Paris, France, **11** Hôpital Laquintinie, Service de Pédiatrie, Douala, Cameroun

Background. **The Expanded Program on Immunization (EPI) is the most cost-effective measures to control vaccine-preventable diseases. Currently, the EPI schedule is similar for HIV-infected children; the introduction of antiretroviral therapy (ART) should considerably prolong their life expectancy.** ***Methods and Principal Findings.*** **To evaluate the persistence of antibodies to the EPI vaccines in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children who previously received these vaccines in routine clinical practice, we conducted a cross-sectional study of children, aged 18 to 36 months, born to HIV-infected mothers and living in Central Africa. We tested blood samples for antibodies to the combined diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP), the measles and the oral polio (OPV) vaccines. We enrolled 51 HIV-infected children of whom 33 were receiving ART, and 78 HIV-uninfected children born to HIV-infected women. A lower proportion of HIV-infected children than uninfected children had antibodies to the tested antigens with the exception of the OPV types 1 and 2. This difference was substantial for the measles vaccine (20% of the HIV-infected children and 56% of the HIV-exposed uninfected children, $p<0.0001$). We observed a high risk of low antibody levels for all EPI vaccines, except OPV types 1 and 2, in HIV-infected children with severe immunodeficiency ($CD4^+$ T cells $<25\%$).** ***Conclusions and Significance.*** **Children were examined at a time when their antibody concentrations to EPI vaccines would have still not undergone significant decay. However, we showed that the antibody concentrations were lowered in HIV-infected children. Moreover, antibody concentration after a single dose of the measles vaccine was substantially lower than expected, particularly low in HIV-infected children with low $CD4^+$ T cell counts. This study supports the need for a second dose of the measles vaccine and for a booster dose of the DTwP and OPV vaccines to maintain the antibody concentrations in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children.**

Citation: Tejiokem MC, Gouandjika I, Béniguel L, Zanga Marie-Claire E, Tene G, et al (2007) HIV-Infected Children Living in Central Africa Have Low Persistence of Antibodies to Vaccines Used in the Expanded Program on Immunization. PLoS ONE 2(12): e1260. doi:10.1371/journal.pone.0001260

INTRODUCTION

Pediatric HIV infection is a major public health threat. Two thirds of the 700,000 [630,000 to 820,000] children less than 15 years old newly infected with HIV in 2005 were living in sub-Saharan Africa [1]. Mother to child transmission of HIV is still a major route of infection for children. This is related mainly to insufficient access to prevention methods, HIV screening and antiretroviral treatment (ART) in developing countries. Without appropriate ART, HIV-infected children experience progressive immune depression and become susceptible to infectious diseases, some of which could be prevented by immunization.

The World Health Organization (WHO) recommendations for immunization of HIV-infected children differ slightly from the general guidelines for HIV-uninfected children [2]. The use of vaccines in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children raises questions about the capacity of those children to mount and maintain efficacious antibody levels. Several clinical trials in HIV-infected children report low antibody levels to various vaccines [reviewed in 3, 4].

In this study, we evaluated the persistence of antibody levels in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children born to HIV-infected mothers, living in Central Africa and who previously received EPI vaccines in routine clinical practice. In addition, we assessed the influence of host and viral related factors (nutritional, clinical and biological) on the association between HIV infection and the absence of antibody to EPI vaccines.

METHODS

Participants

We conducted a cross-sectional study in 4 pediatric care centers (3 in Cameroon and 1 in the Central African Republic (CAR)).

Academic Editor: Landon Myer, University of Cape Town, South Africa

Received June 13, 2007; **Accepted** October 27, 2007; **Published** December 5, 2007

Copyright: © 2007 TEJIOKEM et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by the Department of International Affairs (DIA) at the Institut Pasteur (Paris, France). The DIA was informed at regular intervals about the progress of the study. The DIA had no role in study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* **To whom correspondence should be addressed.** E-mail: laurence_baril@yahoo.com

Children were recruited from November 2004 to June 2005. Children were eligible if: (i) they were between 18 and 36 months of age; (ii) they were born (not prematurely, *i.e.* $\geq$ 37 weeks) to an HIV-infected mother who was diagnosed in the context of the mother to child transmission prevention program; and (iii) they had received at least a primary vaccine series of three doses of the combined diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP) vaccine, the total oral polio (TOPV) before one year of age, and one dose of the measles vaccine (documented on an immunization card). The HIV-1 status has been already confirmed by serology in all included children between 15 and 18 months of age. Children were not included in the study if (i) their clinical status was severely impaired (including advanced or severe HIV-associated symptoms) or (ii) they were breastfed six months before the enrolment period to avoid recent HIV infection through breastfeeding.

The EPI schedule in both countries included BCG vaccination and one dose of TOPV (dose 0) given at birth; a primary vaccination with three doses of the DTwP combined vaccine and TOPV given at 6, 10, and 14 weeks; and recommended booster doses of the DTwP combined vaccine and TOPV given at 18 months of age. The measles vaccine was scheduled to be given at nine months of age and a second dose was recommended at 12 to 15 months of age.

Ethics

All parents or legal guardians gave written informed consent. The study was approved by National Ethics Committees in Cameroon and in CAR. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Laboratory techniques

Blood samples were collected and processed at the Centre Pasteur in Yaoundé (Cameroon) and at the Institut Pasteur in Bangui (CAR). Complete blood count, proteinemia and tests for HIV-1-infected children including assessment of HIV-1 viral load and lymphocyte subpopulation counts were done. Thick blood smears were also performed for malaria diagnostics. In Cameroon, the plasma HIV-1 RNA viral load (VL) was quantified by a commercial assay (Versant® bDNA HIV kit version 3.0, Bayer Diagnostics, Emeryville, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The threshold for quantification was 50 HIV-1 RNA copies/ml. In Bangui, values for the plasma HIV-1 RNA were determined by real-time TaqMan RT-PCR with the protocol established by the Working Group for Viral Quantification of the ANRS [5]. The limit for quantification was 400 HIV-1 RNA copies/ml. The $CD4^+$ T cells were counted with a fluorescence activated cell sorter (FacScan) flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

The antibody concentrations or titers to measles, diphtheria, tetanus, and polio types 1, 2 and 3 were analyzed at the laboratory sites. Serological testing for pertussis was performed by the French National Reference Center for *Bordetella*. All the samples were tested in duplicates, and results were expressed as the mean values for the two determinations. The antibody level was considered adequate if the antibody concentration or titer was above the cut-off value defined by the manufacturers or by WHO recommendations.

Antibodies to measles were initially measured with a commercial ELISA kit (Enzygnost Anti-measles virus/IgG, Dade Behring, Germany) in which plates were coated with inactivated measles virus [6]. The assay was calibrated using an international reference reagent for the measles vaccine (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) #92/648, Hertfordshire, UK). The results were classified as negative (ΔOD $<$100 mUI/ml) or equivocal (100 $\leq \Delta$OD $\leq$ 335 mUI/ml). Quantitative values were calculated for positive samples (ΔOD$>$335 mUI/ml). Because the percentage of positive samples was low in both groups (16% and 62.3% of in HIV-infected and uninfected children, respectively) with this initial technique, all samples were re-tested for antibodies to measles using an IgG capture enzyme immunoassay (Measles IgG capture EIA, Microimmune Ldt, Brentford, UK) [7]. This qualitative assay was done by the Laboratory of Virology at the University Hospital of Caen (France), the French Associated Reference Center for Measles. Briefly, plates were coated with anti-human IgG and a recombinant measles nucleoprotein antigen was used to detect specific IgG against measles. Sera were identified as IgG positive if the OD was at least 1.25 times higher than the mean OD of three negative control wells.

Antibodies to diphtheria and tetanus toxoids were measured using commercial ELISA kits (Diphteria ELISA IgG Testkit and Tetanus ELISA IgG Testkit, Genzyme Virotech, Russelsheim, Germany). Sera with antibody concentrations of, at least, 100 mIU/ml were considered positive. For the wP vaccine, agglutinins (AGG), i.e. antibodies that agglutinate bacteria mostly directed against fimbrial antigens, were measured. These AGG were detected by the classical micro-agglutination test [8]. Adequate results were defined as values equal to or superior to the value for the first dilution tested (1/20 dilution).

Neutralizing antibody titers against each of the three poliovirus types were measured using a micro-neutralizing assay, based on the WHO recommended procedure [9]. The potency of the in-house reference serum (identical for both sites) was assayed in parallel with the second International Reference Reagent for live attenuated poliovirus (NIBSC #66/202) so that the results could be converted to International Units (IU). Two-fold dilutions of sera ranging from 1/8 to 1/1024 were incubated for three hours at 36°C in triplicate with 100 median $TCID_{50}$ doses of the corresponding Sabin-type poliovirus. HEp-2 cells were added and plates were scored after five days. The neutralizing antibody titer was the end point dilution of sera that protected 50% of the cell culture. Detectable antibody at a dilution of 1:8 was considered positive for that poliovirus serotype (equivalent to 0.6 IU for poliovirus 1, 1.1 IU for poliovirus 2 and 0.3 IU for poliovirus 3). The geometric mean concentration (GMC) for each poliovirus serotype was calculated as IU for all samples.

Statistical methods

The chi-square or Fisher's exact test was used as appropriate to compare categorical variables of HIV-infected and uninfected children. The student's t-test was used to compare continuous variables if the data adhered to normality assumptions; otherwise the Mann-Whitney test was used. The results for antibodies to the DTwP vaccine, the measles vaccine and the TOPV were reported as the GMC or GM titers (GMT) with the 95% confidence intervals (CI) for each group.

Univariate and multivariate logistic regression models were used to assess the effect of covariates on the odds ratios (OR) of a low antibody concentration to vaccine (only the serotype 3 for the OPV). Composite categorical variables were created to evaluate the effect of HIV infection: i) HIV status combined with the percentage of $CD4^+$ T cells (HIV-exposed uninfected, HIV infected and $\geq$25% $CD4^+$ T cells, HIV infected and $<$25% $CD4^+$ T cells) [10]; ii) HIV status combined with HIV VL (HIV-exposed uninfected, HIV infected and VL $<$10,000 copies/ml, HIV infected and VL $\geq$10,000 copies/ml) [11]; and iii) HIV status combined with duration of ART (HIV-exposed uninfected, HIV infected and $\geq$6 months ART, HIV infected and $<$6 months of ART or no ART). Six months was chosen as a

reasonable ART period to declare failure and to, eventually, start a second line of ART in resource–constrained countries. The perinatally HIV-exposed uninfected children constituted the reference group in this study. STATA version 8.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA) was used for all statistical analyses, with a significance level of 5%.

RESULTS

Study population

The first two criteria for eligibility were met by 177 children (54 HIV-infected and 123 HIV-exposed uninfected), but the third criteria (EPI schedule) was not fulfilled in three HIV-infected and 45 HIV-exposed uninfected children (44 from CAR). Thus, 129 children were included in the study: 51 perinatally HIV-infected (16 in the CAR and 35 in Cameroon) and 78 HIV-exposed uninfected (44 in the CAR and 34 in Cameroon). The mean age of children enrolled was 24.6 months (90% range; 18.1 to 35.6). Sex ratio, duration of breastfeeding, weight, MUAC [9], number of vaccine doses, and the frequency of positive blood smears for malaria did not statistically differ between the two groups. The median time interval between the collection of blood for antibody determination and the last vaccination was 17.3 months (90% range; 3.9 to 31.3 months) for the DTwP vaccine and 12.8 months (90% range; 3.3 to 26.1 months) for the measles vaccine.

According to the WHO pediatric clinical staging system [12], 36 (70%) of the HIV-infected children were classified as stage 1 and 15 (29.9%) at stage 2. Almost two thirds of them (33/51) were receiving ART at the time of inclusion in the study (six in CAR and 27 in Cameroon); the duration of treatment was at least six months for 61% (20/33) of the children receiving ART. The mean age of children starting ART was 18.1 months (90% range: 7.3–34.2 months), indicating that the majority of the children began ART several months after they received the first series of the EPI vaccines. The most frequent ART combinations were AZT+3TC+NVP (n = 22) and D4T+3TC+NVP (n = 8). In HIV-infected children, 61% (31/51) had a plasma VL below 10,000 copies per ml (6 in the CAR and 25 in Cameroon). For 51 HIV-infected children, the distribution according to the percentages of $CD4^+$ T cells was as follows: $<15\%$ (n = 15), 15–24% (n = 16) and $\geq 25\%$ (n = 20).

HIV-infected children have low levels of antibodies to EPI vaccines

We observed that the proportion of HIV-infected children with adequate antibody levels to all the tested vaccine antigens was lower than that of HIV-exposed uninfected children (Table 1). The difference was statistically significant for all tested antigens with the exception of poliovirus types 1 and 2. The GMCs were lower in the HIV-infected group than in the HIV-exposed uninfected group for all tested vaccines with the exception of the measles vaccine. These differences were statistically significant for tetanus and poliovirus types 1 to 3. Few children received a

Table 1. Proportions of adequate antibody concentrations or titers to the EPI vaccines and geometric mean concentrations or titers for antibodies against measles, DTwP and TOPV antigens, according to the HIV status of the children.

Vaccine antigens		HIV-infected children			HIV-exposed uninfected children			*P1**	*P2*†
	Number of doses	N	Adequate responses n (%)	GMC ‡ [95% CI]	N	Adequate responses n (%)	GMC‡ [95% CI]		
Measles									
Enzygnost	Total	50	8 (16.0)	1091.5 [576.1–2067.8]	77	48 (62.3)	943.2 [782.7–1136.6]	$<10^{-4}$	0.56
	1 dose	46	7 (15.2)		72	45 (62.5)		$<10^{-4}$	
	2 doses	4	1 (25.0)		5	3 (60.0)		0.36	
Microimmune	Total	49	10 (20.4)		77	43 (55.8)		$<10^{-4}$	
	1 dose	45	9 (20.0)		72	39 (54.2)		$<10^{-4}$	
	2 doses	4	1 (25.0)		5	4 (80.0)		0.21	
Diphtheria	Total	51	27 (52.9)	245 [166–361]	78	62 (79.5)	312 [246–396]	0.001	0.13
	3 doses	44	22 (50.0)		66	51 (77.3)		0.003	
	4 doses	7	5 (71.4)		12	11 (91.7)		0.29	
Tetanus	Total	51	43 (84.3)	289 [228–367]	78	76 (97.4)	491 [396–609]	0.01	0.001
	3 doses	44	36 (81.8)		66	64 (97.0)		0.01	
	4 doses	7	7 (100.0)		12	12 (100.0)			
Pertussis	Total	50	15 (30.0)	52.8 [41.4–67.3]	78	43 (55.1)	62.8 [52.2–75.6]	0.005	0.28
	3 doses	43	10 (23.3)		66	34 (51.5)		0.003	
	4 doses	7	5 (71.4)		12	9 (75.0)		0.63	
TOPV	≥4 doses								
Serotype 1		51	48 (94.1)	6.1 [4.5–8.3]	78	78 (100.0)	16.1 [12.1–21.5]	0.06	$<10^{-5}$
Serotype 2		51	48 (94.1)	13.2 [8.9–19.3]	78	77 (98.7)	42.5 [32.5–58]	0.17	$<10^{-5}$
Serotype 3		51	36 (70.6)	2.3 [1.3–3.9]	78	75 (96.2)	4.5 [3.3–6.1]	$<10^{-4}$	0.02

*P1: P value for the comparison of the proportion of adequate antibody concentrations or titers between HIV-infected and HIV-exposed uninfected children (Chi square test or Fisher exact test, as appropriate)

†P2: P value for the comparison of the GMC between HIV-infected and HIV-exposed uninfected children (Mann-Whitney test)

‡GMC = geometric mean concentration and CI = confidence interval, expressed in mUI/ml, except for poliovirus (UI/ml) and pertussis (GMT).

doi:10.1371/journal.pone.0001260.t001

booster of the DTwP vaccine (15%) or a second dose of the measles vaccine (7%). Only 20% (three HIV-infected and 21 HIV-exposed uninfected) of these children had the expected antibody levels against all the tested vaccines, 71% (37 HIV-infected and 55 HIV-exposed uninfected) had low antibody levels to one or more vaccine antigens, and 9% (9 HIV-infected and 1 HIV-exposed uninfected) did not develop or maintain the expected antibody level to the vaccine antigens. Moreover, the proportion of children with low antibody levels to EPI vaccines differed according to the degree of immunodeficiency, except for the tetanus and the poliovirus type 3 vaccines (Table 2). Children with $CD4^+$ T-cell counts lower than 25% had significantly low levels of antibodies, particularly to the live attenuated measles vaccine. A short duration of ART or no ART was significantly associated with a low measles antibody concentration (tested by EIA) as shown in the Table 3. Severe immunodeficiency ($<25\%$ $CD4^+$ T cells, HIV VL $\geq$10,000 copies) was also associated with a low antibody concentration. Only the covariates linked to HIV status (ART, % $CD4^+$ T cells, HIV VL, macrocytosis, protidemia) were statistically significant. More children with low measles antibody concentration than those with adequate antibody concentrations were breastfed; however, the difference was weakly significant.

Multivariate logistic regression models were performed for each EPI vaccine. Only the HIV status-$CD4^+$ T-cell percentage was considered in these analysis, due to the high agreement between the composite categorical variables (HIV status-$CD4^+$ T-cell percentage and HIV status-VL, $k = 0.71$; HIV status-$CD4^+$ T-cell percentage and HIV status-ART, $k = 0.75$; HIV status-VL and HIV status-ART, $k = 0.71$). For each EPI vaccine, HIV-infected children with severe immunodeficiency ($CD4^+$ T-cell percentage $<25\%$) had a significantly higher risk than HIV-exposed uninfected children of having low antibody levels (Table 4). For the poliovirus type 3 vaccine, HIV-infection, whatever the degree of immunodeficiency, was significantly associated with a low antibody titers.

DISCUSSION

Soon, the introduction of ART for infants and children living in resource-constrained settings should considerably prolong their life expectancy and reduce HIV disease progression. The question of the long-lasting antibody persistence to EPI vaccines in this population should now be addressed. In this study, we evaluated the persistence of antibody levels following routine EPI vaccine administration in perinatally HIV-infected and HIV-exposed uninfected children in Central Africa. We found that HIV-infected children had significantly lower levels of antibodies to the EPI vaccines than HIV-exposed uninfected children. On one hand, the proportion of HIV-infected children with expected antibody concentrations to measles was substantially low; although HIV-infected responders had GMC similar to the HIV-exposed uninfected children. On the other hand, although similar proportions of HIV-infected and HIV-exposed uninfected children were found adequate to the poliovirus types 1 and 2 vaccines, the antibody GMT were lower in HIV-infected children.

In this study, half of the children (44/88) in CAR could not be included because they did not meet the criteria about the EPI vaccine schedule showing how much a successful EPI could be difficult to implement and to maintain at a national level. Logistics related to supply, storage and administration of vaccines can lead to difficulty in applying the EPI recommended schedule. A recent study in Zambia showed a lower rate of EPI vaccine coverage in HIV-infected children [13]. Moreover, EPI vaccines are provided free-of-charge only until 12 months of age and we showed that, consequently, booster doses were almost never administrated in routine practice as they must be paid for by the families. Nevertheless, we observed that the few HIV-infected children who received four doses of the DTwP vaccine had a better antibody concentration than those who received only the primary series of three doses. For the measles vaccine, in sub-Saharan African countries, the first dose of the measles vaccine is recommended at 9 months of age to increase the protection of younger children and a second dose, known to improve the level of immunization, should be administered. Supplemental immunization activities (SIA) have been successful in controlling measles in southern Africa despite a high HIV prevalence [14,15]; but there were no SIA and the wild-type measles virus still circulating in the two countries at the time of our study.

Low responsiveness to the measles vaccine in HIV-infected children has been reported previously [6,16–18]. Attempts to use a high-dose Edmonston-Zagreb measles vaccine showed a higher conversion rate [19]; however, the introduction of high-dose vaccines was abandoned because of safety risks [20]. Waibale *et al.* linked low antibody response to the measles vaccine to nutritional status (stunting) rather than to HIV infection [21]. We did not include children with very poor general health status in our study to avoid collecting blood of children with short life-time expectancy or with on-going infectious disease, which may explain why we did not observe this link with the nutritional status. In routine vaccination practice, we observed a low persistence of antibody to the measles vaccine in all children; this was particularly marked in HIV-infected children. However, in terms of clinical protection, one cannot predict if HIV-infected children with no antibodies to measles despite immunization remain susceptible or not to measles infection. A recent study demonstrated a very high mortality level due to measles epidemics in unvaccinated children from Niger, Nigeria and Chad with case fatality rates of 4–10% in children under 5 years old [22], thus reminding the devastating impact of measles in unvaccinated populations [23]. In HIV-uninfected children born to HIV-uninfected mothers, the cellular response to the measles vaccine appears to be induced even after early immunization (at six

Table 2. Low antibody concentrations or titers to the EPI antigens in relation to the percentage of $CD4^+$ T cells.

HIV status % of $CD4^+$ T cells	Measles			Diphtheria			Tetanus			Pertussis			Poliovirus serotype 3		
	OR*	95% CI†	P	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*
HIV-exposed uninfected (Reference)	1			1			1			1			1		
HIV infected $\geq$ 25% $CD4^+$ T-cells	2.3	0.8–6.5	0.10	2.6	0.9–7.6	0.07	6.7	1.0–43.3	0.045	1.5	0.6–4.0	0.42	13,5	3.1–58.8	0.001
HIV infected $<$25% $CD4^+$ T-cells	11.0	3.1–39.3	$<10^{-5}$	4.1	1.7–10.1	0.002	7.3	1.3–39.9	0.02	4.9	1.8–13.4	0.002	8.7	2.1–35.5	0.003

*Odds ratio
†Confidence interval
doi:10.1371/journal.pone.0001260.t002

Table 3. Association between measles antibody concentration and children's characteristics.

Characteristics	Measles antibody		OR*	95% CI†	P‡
	Low (N = 73) n (%)	Adequate (N = 53) n (%)			
Site of inclusion					
Yaoundé	40 (59.7)	27 (40.3)	1.2	0.6–2.4	0.67
Bangui	33 (55.9)	26 (44.1)	1		
HIV status					
Infected	39 (79.6)	10 (20.4)	4.9	2.0–12.0	0.0001
HIV-exposed uninfected	34 (44.2)	43 (55.8)	1		
HIV status–Antiviral therapy (ART)					0.0001
Duration ART <6 months	25 (83.3)	5 (16.7)	6.3	2.0–19.7	0.0003
Duration ART ≥ 6 months	14 (73.7)	5 (26.3)	3.5	1.1–11.2	0.02
HIV-exposed uninfected	34 (44.2)	43 (55.8)	1		
HIV status–$CD4^+$ T cells					0.0001
<25% $CD4^+$ T-cells	26 (89.7)	3 (10.3)	11.0	3.1–39.3	$<10^{-5}$
≥ 25% $CD4^+$ T-cells	13 (65.0)	7 (35.0)	2.3	0.8–6.5	0.10
HIV-exposed uninfected	34 (44.2)	43 (55.8)	1		
HIV status–HIV Viral load					0.0001
Viral load ≥10,000 copies	17 (85.0)	3 (15.0)	7.2	1.8–28.8	0.001
Viral load <10,000 copies	22 (75.9)	7 (24.1)	4.0	1.4–10.9	0.004
HIV-exposed uninfected	34 (44.2)	43 (55.8)	1		
Sex					
Female	43 (56.6)	33 (43.4)	0.9	0.4–1.8	0.70
Male	30 (60.0)	20 (40.0)	1		
Age of children at time of inclusion					
>23 months§	40 (62.5)	24 (37.5)	1.5	0.7–2.0	0.29
≤23 months	33 (53.2)	29 (46.8)	1		
Age at vaccination against measles					
>12 months	10 (71.4)	4 (28.6)	1.9	0.6–6.6	0.28
≤12 months	63 (56.3)	49 (43.7)	1		
Breastfeeding					
Yes	48 (64.9)	26 (35.1)	2.0	1.0–4.2	0.06
No	25 (48.1)	27 (51.9)	1		
Clinical signs					
Yes	18 (72.0)	7 (28.0)	2.2	0.8–5.7	0.11
No	55 (54.5)	46 (45.5)	1		
MUAC‖ for age					
<-2Z score (malnutrition)	18 (72.0)	7 (28.0)	2.2	0.8–5.7	0.11
≥-2Z score	55 (54.5)	46 (45.5)	1		
Time since last vaccination					
≥12 months	43 (64.2)	24 (35.8)	1.7	0.8–3.5	0.13
<12 months	30 (50.8)	29 (49.2)	1		
Number of doses received					
2 doses	4 (44.4)	5 (55.6)	0.6	0.1–2.2	0.49
1 dose	69 (59.0)	48 (41.0)	1		
Macrocytosis					
MGV ¶ ≥83 fl	22 (78.6)	6 (21.4)	3.3	1.2–9.1	0.01
MGV¶ <83 fl	50 (52.6)	45 (47.4)	1		
Protidemia					
>85 g/l	17 (77.3)	5 (22.7)	2.8	1.0–8.5	0.05
≤85 g/l	55 (54.5)	46 (45.5)	1		

*Odds ratio of low measles antibody response
†Confidence interval
‡Chi square test, Fisher exact test or chi square test for trend as appropriate
§Median age
‖Mid upper arm circumference
¶Mean globular volume
doi:10.1371/journal.pone.0001260.t003

Table 4. Logistic regression analysis of various characteristics of children in relation to low antibody concentrations or titers to EPI vaccines (HIV-exposed uninfected children as reference group).

Vaccines/Characteristics of children	*Initial model*			*Final model*		
	OR[†]	CI[‡] 95%	p	OR	CI 95%	p
Measles (N = 120)						
HIV status–<25% $CD4^+$ T-cells	6.2	(1.5–29.2)	0.01	10.1	(2.8–36.4)	0.0001
HIV status–≥25% $CD4^+$ T-cells	2.1	(0.6–7.1)	0.21	2.6	(0.9–7.7)	0.08
Breastfeeding	1.3	(0.6–3.4)	0.44			
Age at vaccination against measles (>12 months)	1.6	(0.4–6.9)	0.51			
Presence of clinical signs	0.8	(0.3–2.8)	0.79			
Malnutrition (MUAC <-2Z scores)	1.2	(0.4–3.8)	0.76			
Time since last vaccination (>12 months)	1.3	(0.6–3.2)	0.52			
Macrocytosis (MGV >85 fl)	2.2	(0.6–7.1)	0.60			
Hyperprotinaemia	1.5	(0.4–5.0)	0.24			
Diphtheria (N = 126)						
HIV status–<25% $CD4^+$ T-cells	3.4	(1.2–10.0)	0.03	3.8	(1.5–9.5)	0.004
HIV status–≥25% $CD4^+$ T-cells	1.6	(0.5–5.7)	0.44	2.4	(0.8–6.9)	0.12
Inclusion site (Yaoundé)	2.2	(0.8–5.6)	0.11			
Sex (female)	1.7	(0.7–4.1)	0.21			
Malnutrition (MUAC <-2Z scores)	1.4	(0.5–4.4)	0.52			
Age (>23 months)	1.1	(0.3–4.2)	0.91			
Time since last vaccination (≥18 months)	1.7	(0.4–6.7)	0.44	2.3	(1.0–5.1)	0.04
Number of doses received (<4 doses)	2.4	(0.5–11.2)	0.27			
Macrocytosis (MGV >85 fl)	1.0	(0.4–3.0)	0.94			
Pertussis (N = 125)						
HIV status–<25% $CD4^+$ T-cells	2.6	(0.8–9.2)	0.12	3.8	(1.3–11.6)	0.02
HIV status–≥25% $CD4^+$ T-cells	0.9	(0.2–3.0)	0.81	1.3	(0.4–3.7)	0.63
Inclusion site (Yaoundé)	1.5	(0.6–3.8)	0.35			
Sex (female)	1.0	(0.4–2.3)	0.97			
Malnutrition (MUAC <-2Z scores)	1.1	(0.4–3.6)	0.83			
Presence of clinical signs	6.1	(1.5–24.7)	0.01	4.8	(1.3–17.6)	0.02
Number of doses received (<4 doses)	6.0	(1.5–23.7)	0.01	6.8	(1.8–25.4)	0.004
Time since last vaccination (≥18 months)	1.4	(0.5–4.7)	0.40			
Macrocytosis (MGV >85 fl)	1.5	(0.5–4.7)	0.44			
Tetanus (N = 126)						
HIV status–<25% $CD4^+$ T-cells	6.6	(0.6–55.6)	0.12	6.9	(1.1–42.0)	0.04
HIV status–≥25% $CD4^+$ T-cells	2.5	(0.3–17.4)	0.46	4.3	(0.6–30.9)	0.14
Inclusion site (Yaoundé)	8.1	(0.6–106.1)	0.10			
Sex (female)	8.6	(0.8–86.6)	0.07	8.5	(1.0–75.2)	0.05
Age (>23 months)	12.1	(0.6–257.9)	0.11	8.4	(1.0–72.3)	0.05
Malnutrition (MUAC <-2Z scores)	4.0	(0.4–34.7)	0.22			
Breastfeeding (yes)	0.4	(0.05–2.7)	0.33			
Time since last vaccination (≥18 months)	0.6	(0.04–8.0)	0.69			
Macrocytosis (MGV >85 fl)	0.7	(0.1–4.3)	0.72			
Polio serotype 3 (N = 123)						
HIV status–<25% $CD4^+$ T-cells	3.8	(0.7–22.6)	0.14	7.2	(1.7–30.2)	0.007
HIV status–≥25% $CD4^+$ T-cells	9.4	(1.6–54.0)	0.01	13.8	(3.1–60.9)	0.001
Inclusion site (Yaoundé)	0.9	(0.2–3.7)	0.86			
Sex (female)	1.1	(0.3–3.7)	0.91			
Malnutrition (MUAC <-2Z scores)	1.3	(0.3–5.2)	0.74			
Presence of clinical signs	1.6	(0.4–7.5)	0.52			
Time since last vaccination (≥18 months)	0.7	(0.2–2.7)	0.64			
Macrocytosis (MGV >85 fl)	1.7	(0.5–6.3)	0.41			
Hyperprotinaemia	1.4	(0.4–5.3)	0.62			

[†]Adjusted Odds Ratio
[‡]Confidence interval
doi:10.1371/journal.pone.0001260.t004

months of age), whereas the antibody response remains low or not detectable at this age [24,25]. Once established, T-cell memory against measles is long lasting in HIV-uninfected individuals [26]. However, the $CD4^+$ T-cell deficiency in HIV-infected children likely impairs mounting an effective memory against vaccines, and secondary vaccine failure due to a decline in vaccine-induced antibody over time has been described [27–29].

The poor antibody levels to EPI vaccines observed in perinatally HIV-infected children is probably related to major immunological dysfunction involving both cellular and humoral responses. The peripartum transmission of HIV correlates with rapid disease progression and a high mortality rate in HIV-infected infants [30]. In adults, it has been recently shown that acute HIV infection results in a massive and irreversible depletion of mucosal $CD4^+$ memory T cells, whereas the regenerative capacity of resting central memory and naïve T cells remains largely intact [reviewed in 31, 32]. Systemic immune activation is impaired after such a profound depletion of $CD4^+$ memory T cells in the mucosa, affecting pathogen-specific adaptive responsiveness. These mechanisms have not been studied in HIV-infected children born to HIV-infected mothers. Children were examined at a time when their antibody concentrations would have peaked and still not undergone significant decay, suggesting either a lack of inducing immediate vaccine response or, at least, a lack of immune capacity to maintain an adequate antibody level.

We included, as a reference group, perinatally HIV-exposed uninfected children; this was initially for practical reason because the HIV status of the mothers and the children were already determined at the time of the cross-sectional study. We expected similar antibody concentrations in this reference group and in the HIV unexposed and uninfected children [33,34]. However, a recent study demonstrates the influence of the maternal HIV status on the occurrence of severe pneumonia in young South African children [35]. Little is known about immune activation and lymphocyte homeostasis in HIV-uninfected children exposed to HIV during pregnancy. It was previously shown that cell-mediated immunity and T-cell maturation are altered in HIV-uninfected infants born to HIV-infected women [36]. More recently, immune activation and skewing of post-thymic differentiation were evidenced in healthy adolescents born to HIV-infected mothers [37]. This might explain, in part, the low antibody concentrations to the measles vaccine (around 60% of adequate response) observed in HIV-exposed uninfected children.

We also observed that the persistence of antibody to the TOPV, particularly to types 1 and 2 was less affected in HIV-infected children than to the other EPI vaccines, as reported previously [38,39]. The influence of the degree of immunodeficiency has not been demonstrated for the TOPV. This may be due to the administration of multiple TOPV doses during yearly national poliomyelitis immunization campaigns performed in Cameroon and in CAR for children under 5 years of age. During these campaigns, children received two drops of the TOPV whatever their routine vaccination status. However, although the proportion of children with antibodies to polioviruses types 1 and 2 were high in both HIV-infected and HIV-exposed uninfected children, the antibody titers were clearly lower in HIV-infected children even after supplemental doses of the TOPV. On the contrary, the proportion of HIV-infected children with antibodies to poliovirus type 3 was lower as compared to serotypes 1 and 2, but the titers were similar in both children groups. Lower antibody titers to poliovirus type 3 as compared to types 1 and 2 have been reported previously in HIV-uninfected children [40,41].

We unambiguously observed that the proportion of children with low antibodies levels to the EPI vaccines was associated with the severity of HIV-induced immunosuppression. The benefits of using ART for HIV-infected children [42] and of introducing ART to infants at an early stage [43,44], in terms of morbidity and mortality, have been now documented. In young children receiving ART, we also anticipate the improvement of the immune response to the EPI vaccines. A prospective study combining early ART therapy and the administration of an EPI vaccine schedule completed by a supplemental measles vaccine dose and reinforcing the schedule by booster doses of DTwP and TOPV vaccines is needed. Aside the EPI vaccines, responses to *H. influenzae* type b conjugate, hepatitis B, pneumococcus and yellow fever vaccines also deserve further investigation in this population. Our findings also highlight the urgent need to delineate the mechanisms of cellular and humoral responses to EPI vaccines in HIV-infected children.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nicole Guiso and Sophie Guillot at the Institut Pasteur (Paris, France) for valuable suggestions concerning the DTwP vaccine and the TOPV. We also thank Prof. François Freymuth and his staff (Laboratory of Virology, University Hospital of Caen, France) for their support with measles serology, Valérie Marquegnies for data management technical support, Dr Albert Faye for his contribution on HIV treatment in infants, Yoann Madec and Dr Arnaud Fontanet for the discussion about statistical analysis, Valérie Maréchal who measured the HIV viral loads at the Institut Pasteur in Bangui and Dr Carine Ngongueu who helped in the children follow-up in CAR. We would also like to express our profound gratitude to the hospital staff members and the parents and their children who participated in the study at the Chantal Biya Foundation and the Nkolndongo Catholic Health Center in Yaoundé, the Laquintinie Hospital in Douala (Cameroon), and the Bangui Paediatric Center (CAR).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LB MT IG. Performed the experiments: AK ME IG LB EN. Analyzed the data: RP LB MT. Contributed reagents/materials/analysis tools: FT DR CB. Wrote the paper: FT LB MT. Other: Wrote the first draft of the paper: LB. Recruitment and follow-up of the children: GT JC IP.

REFERENCES

1. WHO/UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic (2006) Available: http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport via the Internet. Accessed 15 Sept 2007.
2. WHO. Immunization service delivery and accelerated disease control. Vaccine Preventable Diseases. World Health Organization (Last update April 2006). Available: http://www.who.int/immunization_delivery/vaccines via the Internet. Accessed 15 Sept 2007.
3. Moss WJ, Clements CJ, Halsey NA (2003) Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. Bull World Health Organ 81: 61–70.
4. Pancharoen C, Ananworanich J, Thisyakorn U (2004) Immunization for persons infected with human immunodeficiency virus. Curr HIV Res 2: 293–299.
5. Rouet F, Ekouevi DK, Chaix ML, Burgard M, Inwoley A, et al. (2005) Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. J Clin Microbiol 43: 2709–2717.
6. Scott S, Cumberland P, Shulman CE, Cousens S, Cohen BJ, et al. (2005) Neonatal measles immunity in rural Kenya: the influence of HIV and placental malaria infections on placental transfer of antibodies and levels of antibody in maternal and cord serum samples. J Infect Dis 191: 1854–1860.
7. Cohen BJ, Parry RP, Doblas D, Samuel D, Warrener L, et al. (2006) Measles immunity testing: comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay. J Virol Methods 131: 209–212.

8. Relyveld E, Oato NH, Guerin N, Coursaget P, Huet M, et al. (1991) Determination of circulating antibodies directed to pertussis toxin and of agglutinogens in children vaccinated with either the whole cell or component pertussis vaccine in France, Japan and Senegal. Vaccine 9: 843–850.
9. WHO (1997) Neutralisation test for polio antibodies In: Manual for the virological investigation of poliovirus (Chapter 6). pp 44–49.
10. WHO. Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children in resource-limited settings: recommendations for a public health approach. Availabl:e http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/WHOpaediatric.pdf via the Internat. Accessed 15 Sept 2007.
11. Dunn D, HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Group (2003) Short-term risk of disease progression in HIV-1-infected children receiving no antiretroviral therapy or zidovudine monotherapy: a meta-analysis. Lancet 362: 1605–1611.
12. de Onis M, Yip R, Mei Z (1997) The development of MUAC-for-age reference data recommended by a WHO Expert Committee. Bull World Health Organ 75: 11–18.
13. Setse RW, Cutts F, Monze M, Ryon JJ, Quinn TC, et al. (2006) HIV-1 Infection as a risk factor for incomplete childhood immunization in Zambia. J Trop Pediatr 52: 324–328.
14. Helfand RF, Moss WJ, Harpaz R, Scott S, Cutts F (2005) Evaluating the impact of the HIV pandemic on measles control and elimination. Bull World Health Organ 83: 329–337.
15. Wolfson LJ, Strebel PM, Gacic-Dobo M, Hoekstra EJ, McFarland JW, et al. (2007) Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study. Lancet 369: 191–200.
16. Rudy BJ, Rutstein RM, Pinto-Martin J (1994) Responses to measles immunization in children infected with human immunodeficiency virus. J Pediatr 125: 72–74.
17. Arpadi SM, Markowitz LE, Baughman AL, Shah K, Adam H, et al. (1996) Measles antibody in vaccinated human immunodeficiency virus type 1-infected children. Pediatrics 97: 653–657.
18. Lindgren-Alves CR, Freire LM, Oliveira RC, Guerra HL, Da-Silva EE, et al. (2001) Search of antimeasles antibodies in HIV-infected children after basic immunization. J Pediatr (Rio J) 77: 496–502.
19. Lepage P, Dabis F, Msellati P, Hitimana DG, Stevens AM, et al. (1992) Safety and immunogenicity of high-dose Edmonston-Zagreb measles vaccine in children with HIV-1 infection. A cohort study in Kigali, Rwanda. Am J Dis Child 146: 550–555.
20. Garenne M, Leroy O, Beau JP, Sene I (1991) Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal. Lancet 338: 903–907.
21. Waibale P, Bowlin SJ, Mortimer EA Jr, Whalen C (1999) The effect of human immunodeficiency virus-1 infection and stunting on measles immunoglobulin-G levels in children vaccinated against measles in Uganda. Int J Epidemiol 28: 341–346.
22. Grais RF, Dubray C, Gerstl S, Guthmann JP, Djibo A, et al. (2007) Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. PLoS Med 4: e16. Available: http://medicine.plosjournals.org via the Internet. Accessed 17 Sept 2007.
23. Moss WJ (2007) Measles still has a devastating impact in unvaccinated populations. PLoS Med 2007 4: e24. Available: http://medicine.plosjournals.org via the Internet. Accessed 17 Sept 2007.
24. Bautista-Lopez N, Ward BJ, Mills E, McCormick D, Martel N, et al. (2000) Development and durability of measles antigen-specific lymphoproliferative response after MMR vaccination. Vaccine 18: 1393–1401.
25. Gans H, Yasukawa L, Rinki M, DeHovitz R, Forghani B, et al. (2001) Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9, and 12 months. J Infect Dis 184: 817–826.
26. Naniche D, Garenne M, Rae C, Manchester M, Buchta R, et al. (2004) Decrease in measles virus-specific CD4 T cell memory in vaccinated subjects. J Infect Dis 190: 1387–1395.
27. Al-Attar I, Reisman J, Muehlmann M, McIntosh K (1995) Decline of measles antibody titers after immunization in human immunodeficiency virus-infected children. Pediatr Infect Dis J 14: 149–151.
28. Brunell PA, Vimal V, Sandu M, Courville TM, Daar E, et al. (1995) Abnormalities of measles antibody response in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 10: 540–548.
29. Bekker V, Scherpbier H, Pajkrt D, Jurriaans S, Zaaijer H, et al. (2006) Persistent humoral immune defect in highly active antiretroviral therapy-treated children with HIV-1 infection: loss of specific antibodies against attenuated vaccine strains and natural viral infection. Pediatrics 118: 315–322.
30. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, et al. (2004) Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. Lancet 364: 1236–1243.
31. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. Nat Med 212: 289–295.
32. Brenchley JM, Price DA, Douek DC (2006) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? Nat Immunol 7: 235–239.
33. Lepage P, Msellati P, Hitimana DG, Bazubagira A, Van Goethem C, et al. (1996) Growth of human immunodeficiency type 1-infected and uninfected children: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda, 1988 to 1993. Pediatr Infect Dis J 15: 479–485.
34. Taha TE, Graham SM, Kumwenda NI, Broadhead RL, Hoover DR, et al. (2000) Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and -uninfected African children. Pediatrics 106: E77.
35. McNally LM, Jeena PM, Gajee K, Thula SA, Sturm AW, et al. (2007) Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. Lancet 369: 1440–1451.
36. Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, et al. (2000) T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. Blood 96: 3866–3871.
37. Vigano A, Saresella M, Schenal M, Erba P, Piacentini L, et al. (2007) Immune activation and normal levels of endogenous antivirals are seen in healthy adolescents born of HIV-infected mothers. AIDS 21: 245–248.
38. Barbi M, Biffi MR, Binda S, Clerici-Schoeller M, Ferraris G, et al. (1992) Immunization in children with HIV seropositivity at birth: antibody response to polio vaccine and tetanus toxoid. AIDS 6: 1465–1469.
39. Ryder RW, Oxtoby MJ, Mvula M, Batter V, Baende E, et al. (1993) Safety and immunogenicity of bacille Calmette-Guerin, diphtheria-tetanus-pertussis, and oral polio vaccines in newborn children in Zaire infected with human immunodeficiency virus type 1. J Pediatr 122: 697–702.
40. Sutter RW, Suleiman AJ, Malankar P, Al-Khusaiby S, Mehta F, et al. (2000) Trial of a supplemental dose of four poliovirus vaccines. N Engl J Med 343: 767–773.
41. Triki H, Abdallah MV, Ben Aissa R, Bouratbine A, Ben Ali Kacem M, et al. (1997) Influence of host related factors on the antibody response to trivalent oral polio vaccine in Tunisian infants. Vaccine 15: 1123–1129.
42. Fassinou P, Elenga N, Rouet F, Laguide R, Kouakoussui KA, et al. (2004) Highly active antiretroviral therapies among HIV-1-infected children in Abidjan, Cote d'Ivoire. AIDS 18: 1905–1913.
43. Faye A, Le Chenadec J, Dollfus C, Thuret I, Douard D, et al. (2004) Early versus deferred antiretroviral multidrug therapy in infants infected with HIV type 1. Clin Infect Dis 39: 1692–1698.
44. Chiappini E, Galli L, Tovo PA, Gabiano C, Gattinara GC, et al. (2006) Virologic, immunologic, and clinical benefits from early combined antiretroviral therapy in infants with perinatal HIV-1 infection. AIDS 20: 207–215.

Institut Pasteur

Division International

Paris, 11 mai 2012

M. Mathurin Tejiokem
Centre Pasteur du Cameroun

Yaoundé
République du Cameroun

N/Réf : *JS/MJ/AP/N°130/12*

Cher Monsieur, Cher Mathurin,

Nous avons le plaisir de vous confirmer l'attribution du prix Prix annuel "Dedonder Clayton".

Ce prix, attribué par un jury, le Professeur Françoise Barré-Sinoussi et la Directrice générale de l'Institut Pasteur, le Professeur Alice Dautry, récompense la qualité des travaux scientifiques de chercheurs en Afrique et en Asie dans le domaine de la recherche sur le VIH et des pathologies associées.

D'un montant de 46.000 $, il est attribué aux chercheurs dont la contribution scientifique s'avère déterminante. Il permet de soutenir les travaux scientifiques que vous souhaitez mener avec l'ensemble de votre unité.

Nous vous invitons à venir présenter vos travaux au colloque scientifique qui se tiendra à l'Institut Pasteur de Corée le 24 septembre 2012 en marge du Conseil des Directeurs.

En vous renouvellant nos félicitations,

Jérôme SALOMON
Responsable de la Division International

Marc JOUAN
Secrétaire Général auprès du Réseau International des Instituts Pasteur

Cc : Dominique Baudon, Directeur

25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

téléphone : +33 (0) 1 40 61 36 92
télécopie : + 33 (0) 1 45 68 89 52

Fondation reconnue d'utilité publique habilitée à recevoir dons et legs