



HAL
open science

**Stratégie alternative de prévention de la transmission
mère-enfant de l'hépatite B au Cambodge : l'étude
ANRS 12345 TA PROHM**

Olivier Segéral

► **To cite this version:**

Olivier Segéral. Stratégie alternative de prévention de la transmission mère-enfant de l'hépatite B au Cambodge : l'étude ANRS 12345 TA PROHM. Santé publique et épidémiologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASR034 . tel-03562542

HAL Id: tel-03562542

<https://theses.hal.science/tel-03562542>

Submitted on 9 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Stratégie alternative de prévention de la
transmission mère-enfant de l'hépatite B au
Cambodge : l'étude ANRS 12345 TA PROHM
*Alternative strategy to prevent HBV mother-to-child
transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA
PROHM study*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°570 : Santé Publique (EDSP)
Spécialité de doctorat: Santé Publique - Épidémiologie
Unité de recherche : CESP U 1018, Épidémiologie clinique, Université Paris-Saclay, Inserm,
94807, Villejuif, France
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 17/12/2021, par
Olivier SEGERAL

Composition du Jury

Olivier LAMBOTTE PUPH, Université Paris Saclay	Président
Maud LEMOINE MD, PhD, FRCP, Imperial College London	Rapporteur & Examinatrice
Nicolas NAGOT PUPH, Université de Montpellier	Rapporteur & Examineur
Pierre Marie GIRARD PUPH, Institut Pasteur	Examineur
Yuzuke SHIMAKAWA MD, PhD, Institut Pasteur	Examineur

Direction de la thèse

Laurence MEYER PUPH, Université Paris Saclay	Directrice de thèse
--	---------------------

Invités d'honneur

Jean-François Delfraissy
Saphonn Vonthanak

RÉSUMÉ

La transmission mère-enfant (TME) de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est à l'origine de la plupart des hépatites B chroniques dans les pays à forte endémie pour le VHB. La prévention repose sur la vaccination précoce des nouveau-nés à la naissance et, pour les femmes positives pour l'AgHBs, sur l'administration d'un traitement antiviral au troisième trimestre si la charge virale VHB est $> 5.3 \log_{10}$ UI/mL et d'immunoglobulines (HBIg) au nouveau-né. Au Cambodge, les prévalences du VHB chez les femmes enceintes, les enfants âgés de 5 à 7 ans et chez ceux nés de mères positives pour l'AgHBs ont été estimées à 4%, 0.6% et 10%, respectivement.

L'objectif de cette thèse était de concevoir et évaluer un programme de réduction de la TME du VHB au Cambodge en utilisant une stratégie basée sur les outils disponibles dans le pays. Ce travail s'est construit autour de l'étude ANRS 12345 TA PROHM dont l'objectif était d'évaluer l'efficacité d'une stratégie alternative sans HBIg de prévention de la TME du VHB au Cambodge basée sur 1/l'utilisation de tests de diagnostic rapides (TDR) AgHBs et AgHBe pour le dépistage et la prise en charge de l'infection VHB en peripartum 2/un traitement par Tenofovir (TDF) à partir de 24 semaines d'aménorrhée des femmes éligibles 3/une vaccination précoce pour tous les enfants à la naissance (< 2 heures de vie).

La première étape du travail de thèse a été de valider l'utilisation des 2 TDRs, l'AgHBs pour le dépistage de l'infection VHB et l'AgHBe pour décider de l'éligibilité au TDF. Une première évaluation a mis en évidence l'excellente performance du TDR AgHBs comparé à une technique immunoenzymatique mais une sensibilité insatisfaisante du TDR AgHBe pour identifier les femmes avec un niveau d'ADN VHB $> 5,3 \log_{10}$ UI/mL. Un nouvel algorithme sélectionnant les femmes AgHBe positives et celles AgHBe négatives avec un taux d'ALAT > 40 U/L a permis d'augmenter la sensibilité de 17% pour ce seuil de charge virale et a été utilisé dans l'étude à partir de Janvier 2019.

De 2017 à 2020, 21 251 femmes ont été dépistées en consultation anténatale dans 5 hopitaux cambodgiens. Parmi elles, 1194 ont pu être incluses dans l'étude dont 338 (28%) étaient éligibles au TDF. En l'absence d'HBIg, le taux de TME du VHB était de 1.48% [IC95%, 0.40-3.74] pour les femmes éligibles au TDF et de 0% [IC95%, 0-1.41] pour celles traitées plus d'un mois avant l'accouchement. Ce taux était de 8.33% [IC95%, 1.75–22.5] pour celles traitées moins d'un mois, soulignant l'importance du dépistage précoce pendant la grossesse. Pour les femmes non éligibles au TDF, le taux de transmission était de 1.06% [IC95%, 0.39-2.30], la transmission survenant chez des femmes hautement virémiques non dépistées par l'algorithme.

Ce travail montre qu'une stratégie alternative sans HBIg utilisant un traitement antiviral prophylactique maternel par TDF pendant au moins un mois avant l'accouchement associé à une vaccination précoce du nourrisson à la naissance permet de prévenir la TME du VHB. Cette stratégie est applicable en zones décentralisées, ce qui est essentiel pour des pays comme le Cambodge où l'accès au plateau technique est limité aux capitales ou aux grandes villes. Une telle stratégie doit maintenant être implantée en zones rurales en intégrant une analyse des coûts et des circuits d'approvisionnement en médicaments et réactifs afin d'amorcer l'engagement politique nécessaire pour un passage à l'échelle sur l'ensemble du pays.

SUMMARY

Mother-to-child transmission (MTCT) of hepatitis B virus (HBV) infection is the cause of most chronic hepatitis B in countries with high HBV endemicity. Prevention is based on early vaccination of newborns at birth and, for HBsAg-positive women, on the administration of antiviral treatment in the third trimester of pregnancy if the HBV DNA viral load is $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL and immunoglobulin (HBIg) to the newborn. In Cambodia, the prevalence of HBV infection among pregnant women, children aged 5 to 7 years, and those born to HBsAg-positive mothers was estimated at 4%, 0.6%, and 10%, respectively.

The objective of this thesis was to design and evaluate a strategy to reduce HBV MTCT in Cambodia using tools available in the country.

This work was structured around the ANRS 12345 TA PROHM study which objective was to evaluate the effectiveness of an HBIg-free alternative strategy to prevent HBV MTCT in Cambodia based on 1/ the use of HBsAg and HBeAg rapid diagnostic tests (RDT) for the screening and management of HBV infection in peripartum 2/a treatment with tenofovir from 24 weeks of amenorrhea of eligible women 3/an early vaccination for all infants at birth (< 2 hours of life).

The first step was to validate the use of the two RDTs, HBsAg for screening HBV infection and HBeAg for deciding eligibility for TDF. A first evaluation reported the excellent performance of the HBsAg RDT as compared to an enzyme immunoassay technique but an unsatisfactory sensitivity of the HBeAg RDT to identify women with an HBV DNA viral load level $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL. A new algorithm selecting HBeAg-positive women and HBeAg-negative women with ALT > 40 U/L increased sensitivity by 17% for this viral load threshold and was used in the study from January 2019.

From 2017 to 2020, 21,251 women were screened in antenatal care. Of these, 1194 could be included in the study, of whom 338 (28%) were eligible for TDF. In the absence of HBIg, the rate of HBV MTCT was 1.48% [CI95%, 0.40-3.74] for women eligible for TDF and 0% [CI95%, 0-1.41] for those treated more than one month before delivery. In contrast, the rate of HBV MTCT was 8.33% [CI95%, 1.75-22.5] for those treated less than one month, highlighting the importance of HBV early detection during pregnancy. For women not eligible for TDF, the transmission rate was 1.06% [CI95%, 0.39-2.30], with transmission occurring in highly viremic women not identified by the algorithm. This work shows that an HBIg-free alternative strategy using maternal antiviral prophylaxis with TDF for at least one month before delivery combined with an early infant vaccination at birth can prevent HBV MTCT. This strategy is applicable in decentralized areas, which is essential for countries such as Cambodia where access to technical facilities is limited to the capital or major provincial cities. Such a strategy needs to be implemented in rural settings, including an analysis of the costs and supply chains of drugs and reagents, to initiate the political commitment necessary for a nationwide scaling-up.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a débuté en 2015 avec pour seul objectif de prévenir la transmission de la mère à l'enfant d'un virus non curable avec les moyens disponibles à un temps T et à un lieu L. De 2015 à 2021, ce projet a évolué, s'est modelé en fonction des discussions, des rencontres, des réunions avec de multiples personnes, de professions différentes, de pays différents, d'opinions différentes et il m'est donc impossible de pouvoir toutes les remercier individuellement. Alors, je souhaiterais remercier tout d'abord la collectivité, la pluridisciplinarité, la contradiction et l'échange qui font de la recherche médicale un métier si passionnant et si enrichissant.

Ensuite, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de Thèse, le Pr Laurence Meyer, pour avoir accepté de me suivre dans cette aventure, pour ces précieux conseils et sa rigueur dans l'encadrement de cette thèse, pour sa disponibilité permanente malgré la distance, son soutien et sa gentillesse. C'était précieux.

Je voudrais remercier les membres du Jury et les invités d'honneur :

- Le Professeur Olivier Lambotte, président du jury. Nous nous sommes connus sur les bancs de la Faculté de Bicêtre en tant qu'étudiants, et nous revoilà au même endroit 30 ans plus tard avec un peu plus de rides... Merci pour ta disponibilité.
- Les Professeurs Maud Lemoine et Nicolas Nagot, rapporteurs de ma thèse. Je suis conscient de l'investissement que cela implique et je vous remercie pour le temps consacré.
- Le Professeur Pierre Marie Girard et le Docteur Yuzuke Shimakawa, examinateurs de ma thèse. Merci pour votre disponibilité.
- Le Professeur Saphonn Vonthanak, invité d'honneur, pour m'avoir accueilli dans son Université à Phnom Penh depuis 6 ans et m'avoir permis de m'épanouir professionnellement dans ce deuxième pays, qu'est pour moi, le Cambodge

Enfin, un remerciement tout particulier au Professeur Jean-François Delfraissy pour m'avoir accueilli dans son service il y a maintenant 20 ans en dépit de mon parcours atypique et de mon apparence « baba-cool ». Merci pour tous vos conseils et votre amical soutien à chaque étape de ma vie professionnelle. Je vous dois également ma découverte du Cambodge, merci de m'avoir fait une place dans cette riche aventure. Et merci, pour votre énergie positive.

Je voudrais remercier le groupe de recherche clinique de l'Institut Pasteur du Cambodge sans qui l'étude TA PROHM n'aurait jamais pu voir le jour :

- Le Dr Laurence Borand, pour son amitié, et pour tous ces instants partagés depuis le tout début de l'étude TA PROHM, les succès comme les obstacles. Nous avons d'autres projets en commun mais celui-ci restera le plus emblématique.
- Le Dr Dim Bunnet, pour cette collaboration clinique amicale dans le suivi de l'étude
- Toute l'équipe de recherche clinique pour avoir travaillé si durement pour assurer la validité des données malgré la multiplicité des hôpitaux et des services
- Et un remerciement au Dr Arnaud Tarantola pour la pertinence de ses conseils méthodologiques lors de l'implémentation de l'étude

Je voudrais remercier l'ANRS qui finance, sponsorise et accompagne, depuis plus de 20 ans, des projets de recherche répondant à des problématiques nationales au Cambodge et plus particulièrement, Isabelle Fournier, pour son amitié, sa rigueur dans la gestion des données et tous ces instants cambodgiens partagés, Claire Rekacewicz, pour son soutien continu au projet, et Nicolas Rouveau, Maria-Camila Calvo Cortes, et Laura Fernandez, chefs de projet de l'étude .

Je voudrais remercier Christine Durier et Layana Caroupaye-Caroupin de l'unité INSERM SC10/US019 pour l'analyse des données. Merci pour votre aide précieuse et pour nos riches discussions.

Je voudrais remercier toutes les participantes et leurs familles ainsi que tous les personnels de santé impliqués dans les centres de suivi de l'étude.

Et enfin, je voudrais remercier plusieurs personnes extérieures à l'étude

- Le professeur Cécile Goujard pour son amitié et son soutien constant et toute l'équipe du service de médecine interne du CHU Bicêtre. Ce service est pour moi une deuxième maison
- Mes parents pour supporter un fils nomade qui ne tient jamais en place
- Mes amis de toujours (le groupe ParisGwadaNyonsCambToul), d'être là tout simplement
- Et enfin, la femme de ma vie et nos filles, Delphine, Romane et Coline, pour leur amour, leur soutien et leur présence à mes côtés à chaque instant. « We are together ! »

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	2
SUMMARY	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
ABBREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES PUBLICATIONS	11
1. Objectifs generaux de la thèse	12
2. La transmission mère-enfant de l'hépatite B dans le contexte international	12
2.1. Histoire naturelle de la TME du VHB	12
2.2. Vaccination anti-VHB	13
2.3. Immunoglobulines anti-VHB (HBIG)	15
2.4. Traitement antiviral prophylactique	16
3. La TME du VHB dans le contexte du Cambodge	18
3.1. Le système de soins au Cambodge	18
3.2. Suivi materno-infantile d'après le rapport DHS 2014	21
3.3. Epidémiologie de l'infection VHB au Cambodge dans le contexte de la PTME et politique vaccinale	22
4. Problématiques et hypothèses de recherche en 2016	23
4.1. Problématiques	23
4.2. Hypotheses de recherche	24
5. Article 1 de la These. « Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study »	26
5.1. Introduction	26
5.2. Conclusion	33
6. Développement de l'étude TA PROHM	33
6.1. Contexte	33
6.2. Les objectifs de l'étude	34
6.3. Méthodologie	35

6.4.	Les acteurs de la recherche	35
6.4.1.	Les centres investigateurs.....	35
6.4.2.	Le centre de méthodologie et de gestion de l'étude.....	36
6.4.3.	La formation des investigateurs	36
6.4.4.	L'information aux participantes.....	36
6.5.	La population d'étude.....	37
6.5.1.	Critères d'inclusion	37
6.5.2.	Critères de non-inclusion	37
6.6.	Les critères de jugement	37
6.6.1.	Critère de jugement principal.....	37
6.6.2.	Critères de jugement secondaires	38
6.7.	Les stratégies d'intervention.....	38
6.7.1.	Validation d'un nouvel algorithme d'identification des femmes éligibles au TDF et amendement au protocole.....	39
6.7.2.	Le traitement antiviral prophylactique	40
6.7.3.	En salle de naissance.....	41
6.7.4.	Seroprophylaxie de l'enfant	41
6.8.	Nombre de sujets nécessaires.....	42
6.9.	Les méthodes statistiques.....	42
6.10.	Considérations éthiques	43
7.	<i>Article 2 de la Thèse. « HBeAg rapid test and ALT level-based algorithm to identify pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission: the ANRS 12345 TA PROHM study »</i>	44
7.1.	Introduction.....	44
7.2.	L'article 2	44
7.3.	Conclusion	52
8.	<i>Article 3 de la thèse. « Immunoglobulin-free alternative strategy to prevent HBV mother-to-child transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA-PROHM study »</i>	53
8.1.	Introduction.....	53
8.2.	L'article 3	54
8.3.	Conclusion	69
9.	<i>Discussion générale.....</i>	70
9.1.	L'utilisation des deux tests rapides	70
9.1.1.	L'AgHBs	70
9.1.2.	L'AgHBe.....	71
9.2.	La faisabilité d'une vaccination très précoce des enfants en salle de naissance	72
9.3.	Une stratégie sans immunoglobulines	74
9.4.	Une stratégie antivirale prophylactique de rattrapage pour les femmes vues tardivement en consultation anténatale	76
9.5.	Implémentation de la stratégie pour un passage à l'échelle : nécessité d'un engagement politique.....	77
10.	<i>Perspectives.....</i>	81

10.1.	Implementation de la stratégie en zones rurales	81
10.2.	Évaluation de la maladie hépatique en postpartum	82
11.	<i>Conclusion</i>	83
12.	<i>References</i>	84
13.	<i>Annexes</i>	89

ABBREVIATIONS

ALAT	Alanine amino-transferase
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMS	Central Medical Store
DBS	Dried Blood Spot
DHS	Demographic Health Survey
DO	District Opérationnel
EIG	Evènement indésirable grave
FDA	Food and drugs administration
HBIg	Immunoglobulines anti-VHB
IC95%	Intervalle de confiance a 95%
IPC	Institut Pasteur du Cambodge
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
POC	Point of Care
PTME	Prévention de la transmission mère-enfant
TA PROHM	Tenofovir As PRévention Of Hepatitis B Mother-to-child transmission
TDF	Tenofovir disoproxil fumarate
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TME	Transmission mère-enfant
UNICEF	Fonds des Nations unies pour l'enfance
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Couverture mondiale et régionale par une dose à la naissance de vaccin contre l'hépatite B administrée en temps utile, 2000-2016 (document principal)..... Page 14
- Figure 2 : les différentes provinces du Cambodge (document principal).....Page 19
- Figure 3 : Performance du TDR AgHBe en fonction de différents niveaux de charges virales ADN VHB (figure 1, article 1).....Page 30
- Figure 4 : Distribution des niveaux de charges virales ADN VHB pour les 128 femmes positives pour l'AgHBs (figure 2, article 1).....Page 30
- Figure 5 : charge virale ADN VHB en fonction du TDR AgHBe (graphique en nuage de points)(figure 3, article 1).....Page 30
- Figure 6 : schéma d'organisation de l'étude avant l'amendement (document principal).....Page 39
- Figure 7 : schéma d'organisation de l'étude après l'amendement (document principal et figure 1 de l'article 2).....Page 40
- Figure 8 : Niveaux d'ADN VHB en fonction du taux d'ALAT chez les femmes AgHBe positives et AgHBe négatives (graphique en nuage de points) (figure 2, article 2).....Page 46
- Figure 9 : Courbes ROC pour le test AgHBe seul et le nouvel algorithme et pour les deux niveaux de charges virales ADN VHB (5.3 et 7.3 Log₁₀ IU/mL) (figure 3, article 2).....Page 48
- Figure 10 : dépistage, inclusions et suivis des participants, diagramme de flux de l'étude (Figure 1, article 3).....Page 59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Performance du TDR AgHBs en comparaison a la technique ELISA (Tableau 1, article 1).....	Page 29
Tableau 2 : Performance du test rapide AgHBe pour predire différents seuils de quantification de charges virales ADN VHB (Tableau 2, article 1).....	Page 30
Tableau 3 : Mutations précoces et du promoteur basal du core pour les 8 femmes presentant un TDR AgHBe negatif et une charge virale ADN VHB > 5.3 Log ₁₀ IU/mL (Tableau 3, article 1).....	Page 31
Tableau 4 : Caractéristiques des participantes a l'inclusion (Tableau 1, article 2).....	Page 47
Tableau 5 : Performance du TDR AgHBe seul pour identifier une charge virale ADN VHB > 5.3 et a 7.3 Log ₁₀ IU/mL (Tableau 2, article 2).....	Page 48
Tableau 6 : Performance du nouvel algorithme pour identifier une charge virale ADN VHB > 5.3 et a 7.3 Log ₁₀ IU/mL (Tableau 3, article 2).....	Page 49
Tableau 7 : Analyse de la courbe ROC – seuils de reference et seuils optimaux (Tableau 4, article 2).....	Page 50
Tableau 8 : Caractéristiques des participantes a l'inclusion en fonction des résultats du nouvel algorithme (Tableau 5, article 2).....	Page 50
Tableau 9 : Dépistage et inclusions dans l'étude TA PROHM (Document principal).....	Page 53
Tableau 10 : Caractéristiques des participantes a l'inclusion dans l'étude TA PROHM (Tableau 1, article 3).....	Page 59
Tableau 11 : Caractéristiques des femmes a l'accouchement dans l'étude TA PROHM (Tableau 2, article 3).....	Page 60
Tableau 12 : Caractéristiques des enfants a la naissance dans l'étude TA PROHM (Tableau 3, article 3).....	Page 61
Tableau 13 : Critères de jugement principal de l'étude TA PROHM (Tableau 4, article 3).....	Page 62
Tableau 14 : Critères de jugement secondaires de l'étude TA PROHM (Tableau 5, article 3).....	Page 63

LISTE DES PUBLICATIONS

Les publications suivantes sont rattachées à ce travail de thèse. Les 3 premières publications sont insérées dans le document et les 2 dernières présentées en annexes.

1- **Ségéral O**, N'Diaye DS, Prak S, Nouhin J, Chhun S, Khamduang W, Chim K, Roque-Afonso AM, Piola P, Borand L, Ngo-Giang-Huong N, Rouet F; ANRS 12328 12345 Study Group. **Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study.** J Clin Virol. 2018 Dec; 109:29-34.

2- **Segeral O**, Dim B, Durier C, Prak S, Chhim K, Vong C, Pech S, Tiv S, Nem B, Hout K, Nouhin J, Chhun S, Borand L. **Hepatitis B e Antigen (HBeAg). Rapid Test and Alanine Aminotransferase Level-Based Algorithm to Identify Pregnant Women at Risk of HBV Mother-to-Child Transmission: The ANRS 12345 TA PROHM Study.** Clin Infect Dis. 2020 Dec 17;71(10):e587-e593.

3- **Segeral Olivier**, Dim Bunnet, Durier Christine, Nhoueng Sovann, Sovann Saren, Yin Song, Chhim Kearena, Tiv Say, Sar Polinn, Pech Sothy, Nem Bunthoeun, Hout Kay, Vong Chanlina, Guillebaud Julia, Nang Boraneath, Caroupaye-Caroupin Layana, Laurent Denis, Yay Chantana, Meyer Laurence, Chhun Samsorphea, Borand Laurence for the ANRS 12345 Study Group. **Immunoglobulin-free alternative strategy to prevent HBV mother-to-child transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA-PROHM study.** To be submitted to Lancet Infectious Diseases

4- **Olivier Segeral**, Wathanakpiseychoupoan Phirum, Ousa Khan, Hyna Chea, Saren Sovann, Sovann Nhoeung, Kearena Chhim, Song Yin, Bunnet Dim, Chantana Yay, Denis Laurent, Samsorphea Chhun, Laurence Borand. **In-field Evaluation of SD Bioline HBsAg Whole Blood Rapid Test in Pregnant Women in Cambodia: the ANRS 12345 TA PROHM Study.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2021 Oct;101(2):115452.

5- Moeung Sotheara, Goyet Sophie, Chassagne François, Nheuon Sovann, Sun Lynecta, Yang Dorina, Vilhem Steve, Dim Bunnet, Chhun Samsorphea, Borand Laurence, Kim Sothea, **Segeral Olivier**. **Traditional medicine consumption as a possible risk factor of liver cytolysis in postpartum for HBV-infected women: the ANRS 12345 TA PROHM study.** To be submitted to Phytomedicine

Par ailleurs, les résultats de l'étude TA PROHM ont été présentés oralement dans deux congrès internationaux :

1- Le Congrès de l'Asian Pacific for The Study of Liver (APASL), le 06 février 2021

2- Le Congrès de l'European Society for the Study of Liver (EASL), le 26 juin 2021

1. Objectifs généraux de la thèse

Principal : Concevoir et évaluer un programme de réduction de la transmission mère-enfant (TME) du virus de l'hépatite B (VHB) au Cambodge en utilisant une stratégie alternative basée sur les outils disponibles dans le pays

Spécifiques

- Adapter et évaluer au fur et à mesure ces outils
- Évaluer l'efficacité du programme en termes de réduction de la transmission
- Discuter l'implémentation du programme à l'échelle nationale

2. La transmission mère-enfant de l'hépatite B dans le contexte international

2.1. Histoire naturelle de la TME du VHB

L'OMS estime qu'en 2015, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) a causé 900 000 décès, principalement liés au développement de cirrhoses et de carcinomes hépatocellulaires (CHC)(1). Environ 70% des 257 millions de personnes vivant avec l'infection par le VHB vivent dans des régions où l'infection par le VHB est fortement endémique, notamment dans certaines parties de l'Asie et de l'Afrique. Toujours selon l'OMS, les régions Pacifique-Ouest et Asie du Sud Est hébergent 60% des infections chroniques par le VHB, soit 115 et 39 millions de personnes infectées respectivement (1).

La transmission mère-enfant (TME) de l'infection à VHB est à l'origine de la plupart des hépatites B chroniques dans les pays à forte endémie pour le VHB et on estime que plus de 50% des porteurs d'hépatites B chroniques ont acquis l'infection en période périnatale (2). Les femmes en âge de procréer présentant une hépatite B chronique représentent donc le réservoir le plus important de transmission du VHB, en particulier dans les régions Pacifique-Ouest et Asie du Sud Est. Ceci est dû essentiellement à deux facteurs :

1/ Le risque de progression vers une infection chronique par le VHB est inversement proportionnel à l'âge au moment de l'acquisition de l'infection : il est de 85 à 95% chez les enfants infectés en périnatal, mais seulement de l'ordre de 5% chez ceux qui acquièrent l'infection durant leur vie adulte (3)

2/ La transmission du VHB de la mère à l'enfant est plus fréquente chez les enfants nés de femmes qui ont une charge virale VHB élevée et/ou qui sont positives pour l'AgHBe (4)(5)(6)(7), le risque de transmission augmentant avec le niveau de charge virale (6)(7). Dans les régions Pacifique-Ouest et Asie du Sud-Est, une forte proportion de femmes jeunes sont encore en phase de tolérance immune et présentent une charge virale VHB élevée, le plus souvent associée à une positivité de l'AgHBe. Ceci semble s'expliquer par une forte proportion de sous-types viraux C dans ces régions. Le sous-type C est associé à un retard ou une absence de séroconversion HBe et à des niveaux de charge virale VHB plus élevés. Pour ces femmes, le risque de transmission est donc majeur (70 à 90% en l'absence d'immunisation et 10 à 20% malgré immunisation) (5)(8)(9).

La transmission durant l'accouchement est le mode le plus fréquent de TME du VHB (>90% des cas de transmission). Celle-ci a lieu soit par des micro-échanges au cours du travail, soit par le contact de l'enfant avec des fluides corporels infectés (10). La transmission in utero pourrait survenir chez des femmes présentant une CV VHB très élevée, souvent supérieure à 8 Log UI/mL (7). Néanmoins, il n'existe aucun moyen pratique de définir la transmission in utero du VHB, la présence de l'AgHBs et/ou de l'ADN du VHB dans le sang du cordon ombilical ou chez les nourrissons peu après la naissance indiquant une exposition au virus mais ne pouvant être utilisée pour définir la transmission in utero(11).

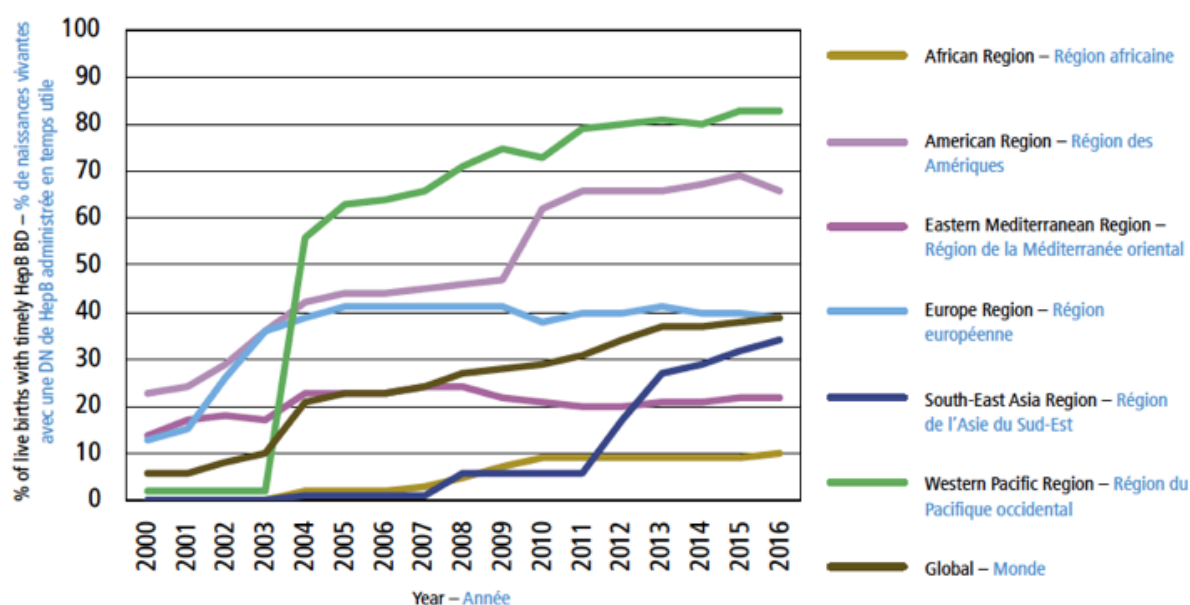
En mai 2016, l'OMS (« Global Health Sector Strategy on viral hepatitis 2016-2021 ») a défini comme objectif d'éliminer les hépatites virales en tant que menace pour la santé publique d'ici 2030(12). L'élimination est définie comme une réduction de 90 % de l'incidence et de 65 % de la mortalité, par rapport au niveau de référence de 2015. Concernant la transmission mère-enfant du VHB, la prévalence de l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) chez les enfants de 5 ans est considérée comme un bon indicateur de l'incidence cumulée des infections chroniques par le VHB (13) et l'objectif est d'atteindre une prévalence de l'AgHBs inférieure à 1 % chez les enfants de 5 ans en 2020 et inférieure à 0,1 % d'ici 2030.

2.2. Vaccination anti-VHB

Le pivot de la prévention repose sur l'immunoprophylaxie du bébé à la naissance. L'OMS

recommande que la première dose vaccinale soit injectée au moins durant la première semaine de vie et idéalement dans les premières 24 heures de vie (dose à la naissance en temps utile) suivie par deux ou trois doses supplémentaires avec pour objectif d'avoir une couverture vaccinale globale, incluant la première dose à la naissance, de plus de 90% en 2030 (14). La première dose de vaccin administrée à la naissance constitue une prophylaxie post-exposition pour prévenir la transmission aux nourrissons exposés au VHB en période périnatale et initie une série d'immunisations qui conféreront une protection à long terme contre l'infection par le VHB. Cette stratégie est donc capitale et doit être inscrite dans les recommandations nationales, ce qui est le cas pour 93% des pays de la région Pacifique-Ouest et 73% des pays de la région Asie du Sud-Est (15). Néanmoins, comme reporté sur la figure 1, la couverture vaccinale reste très hétérogène d'une région à l'autre dans le monde.

Figure 1 : Couverture mondiale et régionale par une dose à la naissance de vaccin contre l'hépatite B administrée en temps utile, 2000-2016



Chiffres déterminés pour les 84 pays disposant d'estimations OMS/UNICEF de la couverture vaccinale nationale (WUENIC); il a été supposé une couverture de 0% pour les 17 pays restants qui délivraient une DN de HepB universelle, mais sans disposer de données sur la vaccination en temps utile par cette dose. Tous les pays sont inclus dans le dénominateur.

La région Pacifique-Ouest, grâce à une progression rapide de la couverture vaccinale à la naissance à partir des années 2003-2004, a enregistré une réduction de la prévalence de l'AgHBs chez les enfants de 5 ans de 8.27% en période pré-vaccinale à 0.93% en période post-vaccinale (16). Des données similaires ont été reportées dans plusieurs pays de la région Asie du Sud-Est (17). Par ailleurs, la transmission maternelle augmentant non seulement le risque

d'infections chroniques, mais aussi le risque de réplication virale persistante et de maladie hépatique grave (18)(19), l'application de cette stratégie vaccinale est capitale. Le modèle mis en place à Taiwan en est le meilleur exemple. Un programme de vaccination universelle a été mis en place en 1986 avec une première dose administrée durant la première semaine de vie. Ce programme a permis de réduire l'incidence du CHC de 0,92 pour 100 000 personnes-années dans la cohorte non vaccinée à 0,23 dans les cohortes de naissance vaccinées (20). Par ailleurs, les cohortes de naissance vaccinées plus précocement ont eu un meilleur effet préventif sur le CHC que les cohortes de naissance vaccinées plus tardivement, en raison de l'amélioration des stratégies de vaccination. Enfin, la transmission du VHB par des mères hautement infectieuses (AgHBe positifs) et une vaccination incomplète contre le VHB étaient les deux principaux facteurs de risque d'échec de la prévention du CHC dans les cohortes de naissance vaccinées.

2.3. Immunoglobulines anti-VHB (HBIg)

Pour les enfants nés de mères positives pour l'AgHBs, les recommandations internationales conseillent l'administration d'HBIg dans les 12 premières heures de vie en plus de la première dose vaccinale (21)(22)(23). Néanmoins, la difficulté d'accès aux HBIg en raison d'un coût élevé et d'une chaîne du froid contraignante abouti de façon significative à des échecs de la sérovaccination dans le monde entier (24). Ce fait a été reconnu par l'OMS dans un rapport de 2009 (25) et dans les recommandations de mars 2015 (26).

Dans une méta-analyse réalisée en 2006 à partir de 26 essais contrôlés et randomisés, il a été conclu sur 10 études que la sérovaccination était plus efficace que la vaccination seule pour prévenir la survenue d'une infection VHB chez l'enfant (Risque relatif 0.54, 0.41 - 0.73) (27). Néanmoins, une seule étude parmi les 10 incluait des enfants nés de mères négatives pour l'AgHBe. Dans cette étude, le bénéfice de l'apport des HBIg par rapport à la vaccination seule n'était pas démontré dans cette population et les auteurs concluaient à la nécessité de poursuivre les études pour prouver le bénéfice des HBIg chez les mères AgHBe négatives. En 2014, une méta-analyse évaluant l'efficacité d'une vaccination seule en comparaison avec vaccination + HBIg chez des femmes AgHBe négatives et regroupant 9 études ne retrouvait pas de différence sur le risque de survenue d'une infection VHB chez l'enfant(28). Une étude en Thaïlande a montré que, en l'absence d'administration d'HBIg et avec une première

injection vaccinale le jour de la naissance, le taux de transmission globale du VHB était de 3% et les deux facteurs significativement associés à une TME du VHB étaient la présence d'une antigénémie HBe positive chez la mère et un délai de plus de 10 semaines pour la seconde injection vaccinale (29). Une autre étude au Vietnam évaluant une stratégie vaccinale sans HBIg (injections vaccinales à 0, 1 et 2 mois) retrouvait un taux de transmission de 14% chez les mères AgHBe positives mais de 0% chez les mères AgHBe négatives (30). L'OMS écrit à ce propos que la PTME atteinte par la vaccination précoce pourrait ne pas être significativement améliorée par l'ajout d'HBIg chez des femmes AgHBe négatives(26).

Enfin, la valeur ajoutée des HBIg chez des femmes sous traitement antiviral prophylactique n'est pas connue. En 2016, date de la rédaction du protocole de l'étude ANRS TA PROHM (objet de cette thèse) et jusqu'à ce jour, aucune étude n'a évalué une stratégie sans HBIg chez des femmes hautement virémiques sous traitement antiviral prophylactique. La nécessité de combler cette lacune est mise en avant dans plusieurs rapports OMS dont les dernières recommandations de juillet 2020 (31).

2.4. Traitement antiviral prophylactique

L'insuffisance de la sérovaccination pour les mères hautement infectieuses représente un autre enjeu majeur. Comme dit précédemment, la transmission du VHB de la mère à l'enfant est plus fréquente chez les enfants nés de femmes qui ont une charge virale élevée et/ou qui sont positives pour l'AgHBe (4)(5)(6)(7). En conséquence, pour les mères positives pour l'AgHBs, les recommandations internationales conseillent, en plus de la sérovaccination à la naissance, un traitement antiviral au troisième trimestre pour celles présentant une charge virale VHB élevée à savoir $> 5.3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ (21)(23)(22).

Dès 2003(32), plusieurs études basées sur l'administration d'analogues nucléos(t)idiques ont montré une bonne efficacité d'une telle stratégie pour prévenir la TME du VHB en faisant baisser la charge virale ADN VHB en dessous du seuil de $5.3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ pour l'accouchement (33). Ces agents antiviraux sont administrés à partir du début du 3ème trimestre car le 3ème trimestre est une période relativement sûre pour l'emploi des médicaments chez la femme enceinte, puisque l'organogénèse fœtale est à ce stade quasiment terminée.

La lamivudine a été la plus utilisée initialement (34) mais la molécule appartient à la catégorie C selon la classification de la Food and Drug Administration (FDA) signifiant que des études

chez les animaux ont rapporté des effets secondaires. De plus, la résistance du VHB à cette molécule est importante, avec une incidence de 24% après une année de traitement, et de 70% après 4 ans de traitement (35), ce qui constitue un frein à son emploi en PTME.

Le tenofovir disoproxil fumarate (TDF) appartient à la catégorie B selon la classification FDA et apparaît donc comme une bonne alternative compte tenu des données rassurantes chez les femmes enceintes VIH positives. Il ne présente, par ailleurs, pas de problème en termes de résistances (36). En 2016, date de la rédaction du protocole TA PROHM, un essai clinique randomisé contre placebo mené en Chine auprès de 200 mères présentant une charge virale ADN VHB supérieure à 5.3 Log₁₀ UI/mL démontrait que l'administration de TDF initiée entre 30 et 32 semaines d'aménorrhée en plus de l'immunoprophylaxie des nouveau-nés à la naissance entraînait une diminution significative de la TME du VHB par rapport au placebo (5% vs 18% en intention de traiter et 0% vs 5% en analyse per-protocole)(36). Au même moment, un essai clinique en double aveugle contre placebo mené en Thaïlande montrait que l'utilisation du TDF, initié à la 28^{ème} SA chez des femmes positives pour l'AgHBe, ne réduisait pas de manière significative le taux de transmission en conjonction avec une administration très précoce de l'immunoprophylaxie (HBIg + vaccin) (37). Plus récemment, une méta-analyse reposant sur 9 études soulignait l'efficacité et la bonne tolérance du TDF pour prévenir la TME du VHB (38). Les résultats contradictoires de l'étude Thaïlandaise peuvent s'expliquer de deux manières complémentaires : 1/ l'administration très précoce des HBIg et du vaccin (< 2 heures) a pu suffire à réduire fortement la transmission dans le groupe placebo (2%) 2/ ce taux de transmission de 2 % dans le groupe placebo était beaucoup plus faible que les 12 % initialement prévus, diminuant de fait la puissance nécessaire pour détecter une différence statistiquement significative (39).

En juillet 2020, l'OMS a recommandé que les femmes enceintes avec une charge virale ADN VHB $\geq 5,3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ reçoivent une prophylaxie par TDF à partir de la 28^e semaine de grossesse et ce, au moins jusqu'à la naissance (31).

3. La TME du VHB dans le contexte du Cambodge

3.1. Le système de soins au Cambodge

Le Cambodge est un pays agricole de 16 millions d'habitants situé en Asie du Sud-Est. Il est bordé par la Thaïlande à l'ouest, le Laos et la Thaïlande au nord, le golfe de Thaïlande au sud-ouest, et le Vietnam à l'est et au sud. Sa superficie totale est de 181 035 kilomètres carrés.

Le Cambodge a un climat tropical avec deux saisons distinctes qui rythment la vie rurale. De novembre à février, la mousson du nord-est, fraîche et sèche, apporte peu de pluie, tandis que de mai à octobre, la mousson du sud-ouest apporte des vents forts, une forte humidité et des pluies abondantes.

La proportion de la population vivant en zones rurales est de 80 %. La taille moyenne d'un ménage cambodgien est de 4,7 personnes. Le rapport hommes/femmes est de 0.95. Le taux d'alphabétisation des hommes adultes est de 84 % et celui des femmes de 76 %. La structure par âge de la population des ménages est typique d'une société dont la population est jeune et dont la fécondité a récemment baissé ce qui devrait soutenir la croissance économique au cours des prochaines décennies. Cependant, ces tendances ont également entraîné un déclin de la population jeune (0-14 ans), qui est passée de 43 % en 1998 à 28 % en 2018, ce qui signifie que le Cambodge se dirige lentement vers une société vieillissante.

Le Cambodge a connu une croissance économique rapide au cours des deux dernières décennies. La pauvreté reste cependant un problème - en 2014, le taux de pauvreté était de 13,5%, avec 2 millions de personnes pauvres. Malgré la croissance rapide de la capitale Phnom Penh due aux migrations internes, environ 90% des pauvres vivent toujours à la campagne. Grâce à des ressources gouvernementales dédiées (budget de la santé doublé sur les 5 dernières années), ainsi qu'aux fonds de bailleurs internationaux, l'accès aux soins de santé de bonne qualité s'est amélioré avec la mise en œuvre d'un fond d'équité en matière de santé, des systèmes de coupons et de régimes d'assurance maladie communautaires. Cependant, des difficultés persistent en matière d'accès et de qualité des services de soins, avec des dépenses personnelles élevées et un secteur privé en pleine expansion et mal réglementé.

Les résultats en matière de santé se sont améliorés récemment. L'espérance de vie était de

70.7 ans pour les femmes et de 66.6 ans pour les hommes en 2015. Le taux de mortalité infantile a diminué, passant de 45 pour 1 000 naissances vivantes en 2010 à 15 pour 1 000 naissances vivantes en 2016. Le taux de mortalité des moins de 5 ans a diminué, passant de 54 pour 1 000 naissances vivantes à 29 pour 1 000 naissances vivantes au cours de la même période. Le taux de mortalité maternelle était de 161 pour 100,000 naissances vivantes en 2015.

Le Cambodge est confronté à de nouveaux défis. Le vieillissement, l'urbanisation et l'augmentation de modes de vie peu sains ont entraîné une forte hausse de la prévalence des maladies non transmissibles, qui représentent aujourd'hui 61 % du total des décès, les cardiopathies ischémiques et les maladies cérébrovasculaires étant les principales causes de mortalité prématurée.

Figure 2 : les différentes provinces du Cambodge



Le système de soins au Cambodge repose sur un secteur public très hiérarchisé sous l'égide du Ministère de la Santé et une offre de soins privés très hétérogènes et sans réelle coordination et réglementation.

Concernant le service public, chaque province (représentée sur la figure 2) comporte un département provincial de santé. Les départements provinciaux de santé gèrent un hôpital provincial et couvrent d'un à dix districts opérationnels (DO). Chaque DO couvre une population de 100 000-200 000 habitants avec au moins un hôpital de référence de district et un certain nombre de centres de santé qui couvrent chacun 10 000-20 000 personnes. Les services de soins primaires dispensés par les centres de santé sont théoriquement disponibles à moins de deux heures de marche du domicile pour l'ensemble de la population.

- Les centres de santé fournissent des services de santé maternelle, néonatale et infantile, incluant vaccination, éducation nutritionnelle, avortement ; prévention des maladies transmissibles et non transmissibles, traitement des blessures

- Les hôpitaux de référence de district fournissent des soins ambulatoires ainsi que des traitements hospitaliers pour les cas référés, les cas compliqués de tuberculose, les urgences médicales, chirurgicales et obstétricales et certaines interventions chirurgicales. Ils incluent des services de radiographie, d'échographie et de laboratoire. En fonction de l'offres de soins, ils sont classés par niveaux de 1 à 3, 1 étant le niveau inférieur.

En pratique, les praticiens et cliniques privés sont particulièrement fréquentés pour les soins curatifs, tandis que les activités de promotion de la santé et de prévention sont du ressort du secteur public. La faible utilisation des établissements de santé publics pour les soins médicaux curatifs reste problématique. Seuls 22% des patients consultant pour un accident ou une maladie ont d'abord cherché à se faire soigner dans le secteur public, tandis que 67% ont cherché à se faire soigner pour leur dernier épisode chez des prestataires privés (rapport DHS 2014). Dans le secteur public, les centres de santé sont le plus souvent visités dans les zones rurales, tandis que les hôpitaux nationaux sont la source la plus courante de soins dans les zones urbaines. Dans le secteur privé, ce sont les cliniques privées dans les zones rurales, et les pharmacies privées dans les zones urbaines qui sont la source la plus courante de traitement. Par ailleurs, les médecins traditionnels occupent une place importante dans l'offre de soins en complément de la médecine conventionnelle.

Le système de santé s'appuie également sur un fort réseau communautaire. La mise en œuvre du programme communautaire est financée et soutenue par les départements de santé provinciaux et le district opérationnel administratif en termes de structure et de gestion. Chaque travailleur de santé communautaire est associé à un centre de santé où il peut recevoir une formation et une supervision et, dans certains cas, des ressources financières. La politique stipule que les travailleurs de santé communautaire doivent être alphabétisés, vivre dans les communautés qu'ils servent et être élus par les membres de la communauté. Chaque travailleur de santé communautaire s'occupe de 10 à 50 ménages en fonction des besoins de la communauté. Ils constituent un groupe hétérogène et varient considérablement en termes d'âge, de sexe, d'expérience, de statut social et d'affiliation politique. Leurs rôles incluent la responsabilité d'analyser et d'identifier les problèmes de santé survenant dans la communauté, de les communiquer aux centres de santé et de partager les informations des centres de santé avec la communauté. Cependant, ils sont confrontés à de nombreux défis tels que le manque de soutien financier, le manque de formation et le manque d'intérêt et de participation de la communauté (40).

3.2. Suivi materno-infantile d'après le rapport DHS 2014

Le suivi anténatal s'effectue majoritairement dans les centres de santé périphériques. Selon le rapport DHS 2014, 95% des femmes de 15 à 49 ans reçoivent au moins une visite de soin anténatal et 75% plus de 3 visites, la première visite ayant lieu en médiane à 2.5 mois de grossesse. Pour 90% des femmes, ces visites s'effectuent dans le secteur public et impliquent une sage-femme dans 88% des cas. Parmi les femmes ayant bénéficié d'une consultation anténatale, 82% ont été informées des complications obstétricales potentielles, 96% ont eu une mesure de la tension artérielle, 49% ont eu une analyse d'urine et 77% une analyse de sang.

Selon le rapport DHS 2014, dans 83% des cas, l'accouchement a lieu dans une structure de santé (69% public et 14% privé) et encore à domicile pour 17% des femmes. Près de 9 naissances sur 10 sont assistées par un prestataire qualifié (médecin, infirmière, sage-femme ou infirmière/sage-femme auxiliaire). En province, l'accouchement dans les hôpitaux provinciaux est généralement réservé aux grossesses compliquées.

Concernant les soins postnataux, 90% des femmes âgées de 15 à 49 ans ayant eu une

naissance vivante et 79% des bébés bénéficient d'un examen postnatal dans les deux jours suivant l'accouchement.

La couverture vaccinale est également satisfaisante. En 2014, 73% des enfants âgés de 12 à 23 mois avaient reçu tous les vaccins de base - une dose de BCG et de rougeole et trois doses de DPT/ pentavalent et de polio. En 2019, ce chiffre dépasse 95% selon un rapport OMS-UNICEF.

3.3. Epidémiologie de l'infection VHB au Cambodge dans le contexte de la PTME et politique vaccinale

Au Cambodge, la prévalence du VHB dans la population générale est incertaine en l'absence d'étude nationale de séroprévalence. Une étude réalisée dans la province de Siem Reap en 2012 retrouve une prévalence de l'AgHBs de 4.5% (IC95% : 2.7%-6.4%) dans la population adulte avec un pic se situant dans la tranche d'âge 30 – 49 ans (41).

La prévalence de l'hépatite B chez les femmes enceintes a été estimée à 4.39% (IC 95%: 3.53%–5.45%) lors d'une étude nationale de séroprévalence réalisée en 2017 et utilisant un échantillonnage en grappes stratifié à plusieurs degrés (42). Dans cette même étude, la prévalence de l'hépatite B chez les enfants âgés de 5 à 7 ans était estimée globalement à 0.56% (IC 95% : 0.32%–0.98%), à 4.62% (IC95% : 1.31%–14.97%) chez les enfants n'ayant pas reçu la vaccination et à 10.11% (IC95% : 5.41%–18.11%) chez ceux nés de mères positives pour l'AgHBs.

Depuis 2005, la vaccination contre l'hépatite B a été incluse dans le calendrier vaccinal national pour tous les enfants avec une première dose administrée à la naissance et 3 doses successives à 6, 10 et 14 semaines de vie. D'après les données de l'OMS-UNICEF, la couverture vaccinale en 2019 était de 92% globalement et de 88% pour la première dose à la naissance. Cependant, lors de la précédente étude en 2017, la couverture vaccinale était de 78.4% (IC95%, 74.2–82.1) pour la première dose à la naissance mais de seulement 45.4% (IC95%, 42.1–48.9) pour l'administration dans les 24 premières heures de vie (42). Ce décalage s'explique probablement par une confusion entre la définition de dose à la naissance (première semaine) et de dose à la naissance en temps utile (premier jour). La vaccination n'étant pas réalisée par l'équipe obstétricale mais par le service d'immunisation, il peut exister un délai > 24 heures pour adresser les bébés. Toujours dans la même étude, le fait d'accoucher à la maison ou en dehors

des structures de sante publiques (soit 30% des femmes environ) était retrouvé comme facteur de risque indépendant du fait de ne pas recevoir la première dose dans les 24 premières heures (42).

Si la couverture vaccinale est globalement satisfaisante, le dépistage et la prise en charge du VHB en consultation anténatale étaient inexistantes en 2016 et le restent actuellement dans la grande majorité des centres de soins, en dehors de quelques hôpitaux nationaux dans la capitale. Le ministère de la santé s'est engagé à éliminer la TME du VIH et de la syphilis d'ici 2025 avec des résultats probants puisque 90% et 80% des femmes, respectivement pour chaque infection, sont dépistées en consultation anténatale. En 2019, Il s'est engagé à étendre cet objectif à une triple élimination en incluant l'élimination de la TME de l'hépatite B d'ici 2030. Pour atteindre cet objectif, de nombreux défis persistent que ce soit en termes de dépistage ou de prise en charge des femmes VHB positives.

4.Problématiques et hypothèses de recherche en 2016

4.1.Problématiques

Concernant le dépistage de l'infection VHB en consultation anténatale, la réalisation d'un test AgHBs par une technique immunoenzymatique n'était possible en 2016 que dans les laboratoires des hôpitaux nationaux ou dans certains laboratoires privés en zones urbaines mais pas dans les hôpitaux provinciaux ou de districts et encore moins dans les centres de santé périphériques où sont réalisées la majorité des consultations anténatales. Un test de diagnostic rapide (TDR) AgHBs plasmatique était disponible dans les hôpitaux nationaux et provinciaux mais l'évaluation de ses performances n'était pas connue.

Concernant la prise en charge des femmes positives pour l'AgHBs :

1- L'accessibilité de la charge virale ADN VHB était également restreinte à quelques endroits de la capitale (Institut Pasteur du Cambodge, Hôpital National Calmette, laboratoires privés) et son coût restait inaccessible pour une grande majorité de la population avec une moyenne de 80 \$ par examen pour des techniques de type Roche ou Abbott. De la même manière que pour l'AgHBs, la réalisation d'un test AgHBe par une technique immunoenzymatique n'était possible que dans les laboratoires des hôpitaux nationaux ou dans certains laboratoires privés

en zones urbaines. Un TDR AgHBe plasmatique, commercialisé par la même compagnie que le test AgHBs, était disponible dans les hôpitaux nationaux et provinciaux mais son utilisation possible comme marqueur substitutif de la quantification virale n'avait jamais été évaluée.

2- Les HBlg n'étaient disponibles que dans un seul hôpital national de la capitale (l'hôpital Calmette) et à l'Institut Pasteur du Cambodge. Le coût d'une injection était de 80\$. Il n'existait pas de recommandations nationales sur le sujet et aucune directive nationale n'allait dans le sens d'une prise en charge des HBlg par le Ministère de la Santé dans un futur proche.

3- Des analogues nucléo(s)tidiques, dont le TDF, étaient disponibles via le programme national VIH et distribués dans l'ensemble du pays. Cependant, le fond d'équité en matière de santé qui subventionne les coûts des soins médicaux pour les indigents ne remboursait pas le traitement contre le VHB. Les frais à la charge des patients étaient exceptionnellement élevés (30 dollars par mois), en grande partie parce que les hôpitaux ou les praticiens privés achetaient le médicament individuellement à un prix non compétitif.

4- Enfin, en 2016, il n'existait pas de plan national stratégique et de recommandations nationales pour la prise en charge du VHB et, en conséquence, le personnel de soins (médecins, infirmier.e.s, sages-femmes) dans les centres de santé, hôpitaux de districts et hôpitaux provinciaux n'était pas formés pour la prise en charge du VHB que ce soit globalement ou dans le contexte de la PTME.

4.2. Hypotheses de recherche

Au regard des difficultés précédemment décrites, il semblait nécessaire d'évaluer un ensemble cohérent d'interventions qui puissent être utilisés immédiatement à la fin de l'étude en cas de résultats positifs. Nous avons donc formulé les hypothèses de recherche suivantes :

1- L'administration de la première dose vaccinale en salle de naissance dans les premières heures de vie permettrait d'augmenter la couverture vaccinale à la naissance et d'éviter une opportunité manquée (risque de perte de vue entre le service de maternité et le service d'immunisation).

2- En l'absence de techniques immunoenzymatiques et de méthodes de quantification de la charge virale VHB disponibles, en dehors de la capitale, un algorithme utilisant deux TDRs – l'AgHBs pour dépister l'infection VHB en consultation anténatale et l'AgHBe comme marqueur prédictif de forte répllication virale – pourrait constituer une stratégie alternative permettant

d'identifier les femmes à risque de transmission et éligible à un traitement antiviral prophylactique

3- En l'absence d'HBIg disponibles, un traitement antiviral prophylactique débuté au début du troisième trimestre pour les femmes éligibles serait suffisant pour limiter la transmission chez les femmes à risque en association avec une première dose vaccinale précoce

4- La décroissance de la charge virale sous TDF semblant être particulièrement rapide pendant les premières semaines de traitement (moins 2-3 Log₁₀ UI/mL durant le premier mois de traitement) (43), une administration tardive du traitement antiviral prophylactique pour les femmes arrivant tard dans les soins (après 32 semaines d'aménorrhée) pourrait représenter une stratégie de rattrapage.

En partant de ces 4 hypothèses de recherche, ce travail de thèse s'est mis en place en 2016 et est présenté ici selon le plan suivant :

- Validation des deux TDRs AgHBs et AgHBe grâce à un contrat d'initiation ANRS (article 1)
- Design de l'étude TA PROHM : définition des objectifs et de la méthodologie de l'étude (population d'étude, centres investigateurs, critères de jugement, considérations éthiques, méthodes statistiques)
- Évaluation d'un nouvel algorithme d'identification des femmes à risque de transmission (article 2)
- Évaluation de la stratégie TA PROHM en termes de réduction de la TME du VHB (article 3)
- Discussion générale et perspectives pour l'implémentation de la stratégie à l'échelle nationale

5. Article 1 de la These. « Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study »

5.1. Introduction

Avant l'implémentation de l'étude TA PROHM, un contrat d'initiation avait été financé par l'ANRS (étude ANRS 12328) avec pour objectifs de constituer un groupe de travail sur cette thématique et de valider l'utilisation de TDRs AgHBs et AgHBe pour le dépistage et la prise en charge des femmes enceintes à risque de TME du VHB. En 2016, une publication avait évalué la performance d'un TDR AgHBs chez les femmes enceintes avec des résultats globalement satisfaisants (sensibilité atteignant et dépassant les 90%)(44). En revanche, aucune étude n'avait évalué un TDR AgHBe chez la femme enceinte et notamment son utilisation comme marqueur substitutif de la quantification virale.

L'intérêt des TDR est de permettre un dépistage en consultation avec rendu immédiat du résultat (15 à 20 minutes). La couverture du dépistage peut donc être largement améliorée puisque le test peut être réalisé en consultation anténatale dans les centres de santé périphériques en évitant le risque de perdu de vue entre l'envoi de la patiente au laboratoire, la réalisation du test et l'annonce du résultat. Ils pourraient donc être adaptés pour les zones décentralisées où ont lieu la plupart des consultations anténatales.

En 2015, deux TDR plasmatiques AgHBs et AgHBe commercialisés par la compagnie SD Bioline étaient disponibles au Cambodge et en cours de validation en Thaïlande en population générale. L'objectif de cette étude était de compléter cette validation par une évaluation prospective de la performance de ces deux tests chez des femmes enceintes avec pour but de valider leur utilisation dans l'étude TA PROHM à venir.

La performance du TDR AgHBs a été évaluée en comparant les résultats avec les résultats de l'AgHBs par la technique ELISA sur 250 échantillons. Puis, les 128 échantillons positifs pour l'AgHBs en ELISA ont été testés à nouveau avec le TDR AgHBe afin d'évaluer sa performance en tant que marqueur de substitution de la répllication virale ADN VHB utilisé pour identifier les femmes à haut risque de TME du VHB.



Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study

Olivier Ségéral^{a,*}, Dieynaba S. N'Diaye^b, Sophearot Prak^c, Janin Nouhin^c, Samsorphea Chhun^e, Wootichai Khamduang^d, Kenrena Chim^e, Anne-Marie Roque-Afonso^f, Patrice Piola^b, Laurence Borand^b, Nicole Ngo-Giang-Huong^d, François Rouet^{c,1}, for the ANRS 12328 12345 Study Group

^a University of Health Sciences/ANRS, Phnom Penh, Cambodia

^b Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia

^c Virology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia

^d Faculty of Associated Medical Sciences, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMI 174/Programs for HIV Prevention and Treatment (PHPT), Chiang Mai, Thailand

^e Maternity Department, Hôpital Calmette, Phnom Penh, Cambodia

^f Virologie Hôpitaux Universitaires Paris Sud - INSERM U1193, Villejuif, France

ARTICLE INFO

Key words:

Cambodia
Hepatitis B virus
Rapid diagnostic tests
Pregnant women
Mother-to-child transmission

ABSTRACT

Background: In Cambodia, access to hepatitis B surface antigen (HBsAg) screening is low for pregnant women and Hepatitis B Virus (HBV) DNA quantification is poorly accessible.

Objectives: To evaluate the performance of a serial algorithm using two HBV rapid diagnostic tests (RDTs), in which samples positive for HBsAg were further tested for HBeAg as a surrogate marker for HBV DNA quantification.

Study design: In 2015, we prospectively collected plasma samples from 250 pregnant women consulting for antenatal care in one hospital in Phnom Penh including 128 with a known positive HBsAg status. All specimens were tested with the SD BIOLINE HBsAg RDT and HBsAg ELISA assay. In ELISA-positive samples, HBeAg status was determined using the SD BIOLINE HBeAg RDT and HBV DNA quantification was assessed.

Results: Sensitivity and specificity of HBsAg RDT were 99.2% (97.7–99.9) and 100% (97.0–100), respectively. Among the 128 ELISA-positive samples, 29 (23%) tested HBeAg positive and 34 (26.5%) had HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL. Sensitivity and specificity of HBeAg RDT in identifying viremic samples were 76.5% (62.2–90.7) and 96.8% (93.3–100) for HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL and 89.3% (77.8–100) and 96.0% (92.2–99.8) for HBV DNA > 7.3 Log₁₀ IU/mL. Among the 99 negative HBeAg RDT women, 8 had HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL and 7 of them harbored BCP/PC HBV mutants.

Conclusions: A combination of HBsAg and HBeAg RDTs could be a low-cost strategy to identify HBV-infected pregnant women at risk of perinatal transmission in a country where HBV DNA quantification is not routinely available.

1. Background

Among the estimated 257 millions of people living with Hepatitis B virus (HBV) infection, 60% are in Asia and 45% in the Western Pacific Region which includes Cambodia [1,2]. In this part of the world, mortality related to viral hepatitis is higher than any of the major

infectious agents: human immunodeficiency virus (HIV), tuberculosis and malaria. The World Health Organization (WHO) developed an ambitious strategy to eliminate viral hepatitis as a public health threat by 2030, aiming to reduce the incidence of chronic HBV infection by 90%, and its mortality by 65% [3]. To achieve this objective, universal immunization is the first line of defense against perinatal infection for

* Corresponding author at: ANRS, University of Health Sciences, 73 Preah Monivong Boulevard, Phnom-Penh, Cambodia.

E-mail address: olivier.segeral@uhs.edu.kh (O. Ségéral).

¹ This paper is dedicated to the memory of our colleague and friend, Dr François Rouet, who passed away on June 13, 2018.

all infants as the epidemic is mostly driven by the transmission from mother-to-child during the third trimester of pregnancy *in utero* or at delivery [4]. WHO recommends at least 3 doses of hepatitis B vaccination for all children worldwide, with the first dose to be administered at birth. This strategy could prevent approximately 90% of perinatal infection and could be effective in preventing horizontal transmission from household contacts. However, mother-to-child transmission still occurs in infants born to women with a high HBV viral load ($> 5.3 \text{ Log IU per milliliter}$) or with positive HBeAg [5–7] and the predictive rate of infection increases when the maternal VL increases [6]. International guidelines (AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases, APASL: Asian Pacific Association for the Study of the Liver, EASL: European Association for the Study of the Liver) suggest or recommend the use of antiviral drugs (such as tenofovir [TDF]) during the third trimester of pregnancy if maternal HBV DNA VL is $> 5.3 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ [8–10] in addition to immunoprophylaxis at birth, HBV vaccine +/- anti-HBs immune-globuline (HBIG), to prevent HBV MTCT. In Cambodia, where HBV prevalence ranges from 5 to 10% in the general population [11,12], the vast majority of pregnant women are not screened for hepatitis B surface antigen (HBsAg) during antenatal care (ANC). This is due to the lack of laboratory capacity in primary health care centers where the majority of ANC takes place. For those who are HBsAg-positive, HBV DNA quantification is accessible only in some laboratories in Phnom Penh and its high cost is prohibitive. Hepatitis B e antigen (HBeAg) positivity is correlated to high HBV DNA level [6] and therefore to an increased risk of MTCT [13], and could be a surrogate marker of HBV replication, at least in youngest populations, including in women of childbearing age. Rapid Diagnostic tests (RDTs) to detect HBsAg and, more recently, HBeAg in plasma are available in Cambodia. They can be used as point of care tests, without the need for costly laboratory infrastructures trained staff, and provide results in 15 min. They are thus adapted for tests performed in remote decentralized areas where most ANC visits take place.

2. Objectives

The purpose of the study is to evaluate simple diagnosis tools achievable in decentralized area to identify women at risk of HBV MTCT in order to implement specific preventive actions as antiviral drugs during the third trimester of pregnancy.

We report the performance of a serial algorithm using two SD Bioline HBV RDTs, HBsAg and HBeAg, among pregnant women from one hospital in Cambodia. SD Bioline HBsAg RDT accuracy was assessed by comparing results with the HBsAg ELISA results. Samples positive for HBsAg ELISA were further tested for SD Bioline HBeAg RDT to assess its accuracy as a surrogate marker for HBV replication used to identify women at high risk of MTCT of HBV.

3. Study design

3.1. Data collection

From January to May 2015, blood samples were prospectively collected from 250 pregnant women who were followed-up for ANC at the Maternity Unit of the Calmette Hospital in Phnom Penh, Cambodia. Among these, 128 women with a known positive HBsAg status were selected. For each woman, one EDTA tube of 5 mL was collected and sent within 4–6 hours to the HIV/Hepatitis Unit at Institut Pasteur in Cambodia. Each tube was immediately centrifuged and the separated plasma specimens were immediately stored at -80°C . Biological analysis were made between February and May 2015.

3.2. Biological analysis

SD BIOLINE HBsAg is an *in vitro* one step, immunochromatographic, rapid assay designed for the qualitative detection of Hepatitis B

surface antigen, in human serum and plasma (heparin, EDTA and sodium citrate). SD BIOLINE HBeAg test is an *in-vitro* one step, immunochromatographic assay designed for qualitative detection of HBeAg in human serum or plasma. A volume of 100 μL of specimen is needed to perform the assay. This type of assay requires no sophisticated equipment and can therefore be performed in laboratories with limited facilities. Reading of the results can be done visually. Reading time for test result interpretation is 20 min. Storage temperature is $1-30^\circ\text{C}$. The two HBV RDTs were performed following a sequential testing algorithm. All specimens were first tested with the SD BIOLINE HBsAg RDT kit (Standard Diagnostics [SD], INC., Kyonggi-do, Korea), and along with the Murex HBsAg v3.0 assay (Murex Biotech Ltd, Dartford, UK). No further serological test was performed on samples found nonreactive by ELISA and results were given to the participants. All samples found reactive for HBsAg with ELISA were further assessed with the SD BIOLINE HBeAg RDT kit (which was the only commercially available HBeAg RDT on the market, at the time of the study) and HBV DNA quantification was performed using a quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) assay targeting the S gene of HBV (PUMA HBV kit, Omunis, Clapiers, France) according to the manufacturer instruction. Briefly, for each sample, 100 μL of HBV DNA was extracted from 200 μL of plasma with the MPLC DNA isolation kit (Roche, Germany) using the MagNA Pure LC 2.0 instrument (Roche) and amplified using the CFX96 thermocycler (Bio-Rad, USA). Results of HBV DNA viral load were calculated and expressed in International Unit (IU)/mL as previously described [14]. The lower limit of detection of the assay is $1.95 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$. Samples showing discordant results between HBeAg status and HBV DNA quantification (negative HBeAg and HBV DNA $> 5.3 \text{ Log IU/mL}$) were subjected to HBV DNA amplification in the core gene (307 bp) as described elsewhere [15] for detection of basal core promoter and precore (BCP/PC) mutations. All purified PCR products were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequence chromatograms were analyzed using Seq2000 (Beckman Coulter) software.

3.3. Statistical analysis

For HBsAg, the RDT accuracy was assessed by comparing results with the HBsAg ELISA results, which was used as the gold standard. Then, for positive HBsAg ELISA samples, the accuracy of the HBeAg RDT to identify HBV DNA VL higher than different thresholds ($5.3, 6.3$ and $7.3 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$) was estimated.

The definition of the analytic categories was the following: true positive results (= positive in both tests), true negative results (negative in both tests), false positive results (positive in RDT and negative in ELISA for HBsAg or below the selected HBV DNA threshold for HBeAg), false negative results (negative in RDT and positive in ELISA for HBsAg or above the selected HBV DNA threshold for HBeAg).

The sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) for each rapid test were calculated, as well as their respective 95% confidence intervals (95% CI) using the following definitions:

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

$$\text{PPV} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false positives}}$$

$$\text{NPV} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false negatives}}$$

HBV DNA VL median among positive and negative HBeAg RDT were compared using the Fisher exact test.

Statistical analyses were performed using Excel (Microsoft Excel 2010) and R (3.4.0 version) softwares.

3.4. Ethical issues

The study protocol was reviewed and approved by the National Ethics Committee for Health Research (n°0328 NECHR) of Cambodia. A written informed consent was obtained from all women who participated to the study.

4. Results

Among the 250 pregnant women (median age, 29 years; interquartile range, 25–32), 128 (51.2%) tested positive for HBsAg with ELISA while 122 (48.8%) tested negative for HBsAg. Among the 128 pregnant women tested positive for HBsAg with ELISA, 29 (23%) tested positive with RDT HBeAg, 34 (26.5%) had a HBV DNA VL > 5.3 Log₁₀ IU/mL and 28 (21.2%) had a HBV DNA VL > 7.3 Log₁₀ IU/mL.

4.1. Performance of HBsAg RDT compared to ELISA

Among 128 HBsAg ELISA-positive samples, 127 were HBsAg RDT positive, leading to a sensitivity of 99.2% (95% Confidence Interval (CI): 97.7–100). Of the 122 ELISA HBsAg negative, 122 were also RDT HBsAg negative, corresponding to a specificity of 100% (95% CI 96.9–100). The false negative RDT HBsAg case was an HBsAg carrier. Results are reported in Table 1.

4.2. Performance of HBeAg RDT compared to HBV DNA quantification

The sensitivity and specificity of HBeAg RDT to detect an HBV DNA level > 5.3 Log₁₀ IU/mL was 76.5% (95%CI: 62.2–90.7) and 96.8% (95%CI: 93.3–100), respectively. Sensitivity, specificity, predictive values according to different thresholds of HBV DNA level are reported in Table 2 and Fig. 1.

4.3. Distribution of HBV DNA VL for all positive HBsAg women and according to HBeAg RDT status

Distribution of HBV DNA VL for all positive HBsAg women is reported in Fig. 2. Among the 128 positive HBsAg women with ELISA, 94 (73.5%) had a low HBV DNA VL level (< 5.3 Log₁₀ IU/mL) while 34 (26.5%) had a high HBV DNA VL level (> 5.3 Log₁₀ IU/mL).

Distribution of HBV DNA VL according to HBeAg RDT status is reported in Fig. 3.

HBV DNA VL median for positive HBeAg RDT women was 8.4 Log₁₀ IU/mL vs 2.5 Log₁₀ IU/mL for negative HBeAg RDT (p-value of the Fisher exact test was 3.124e-9).

4.4. Genetic analysis of the discordant results

Eight samples were negative HBeAg RDT with a HBV DNA level > 5.3 Log₁₀ IU/mL. Genetic analysis performed on these eight samples showed that 7 of them carried the core pre-core BCP/PC

mutation as reported in Table 3.

5. Discussion

Our study reports that, HBsAg RDTs has very high sensitivity and high specificity to detect HBsAg in pregnant women as compared to ELISA. Performance of HBeAg RDT to predict HBV DNA quantification above 5.3 Log₁₀ IU/mL was dichotomous; the specificity (96%) was good meaning that a pregnant woman with positive HBeAg RDT could be considered at risk of MTCT; but the sensitivity is lower (76.5%) meaning that a proportion of pregnant women with a negative HBeAg RDT could still have a high HBV DNA level but would not be detected as at risk of MTCT. Nevertheless, the sensitivity of HBeAg RDT reached 89% for an HBV DNA threshold of 7.3 Log₁₀ IU/mL with a specificity of 96%.

For HBsAg RDT accuracy, our results are coherent with a meta-analysis from Amini et al showing that various brands of HBsAg RDTs, performed on either serum, plasma or whole blood, have a pooled sensitivity > 90% and specificity > 98% compared to laboratory methods of HBsAg detection, using EIAs as the reference standard [16]. SD Bioline HBsAg RDT is available in Cambodia at low price (0.6 USD) and its use could increase access to HBV screening for pregnant women at the lowest level of the health care system, including remote areas lacking of laboratory facilities. At the time of the study, SD Bioline HBsAg RDT was only validated in plasma, which requires centrifuge machines. Since then, the SD Bioline HBsAg WB was prequalified by WHO and could be used on whole blood as reported with other RDTs [17–19].

Distribution of HBV DNA level highlights that 73.5% of pregnant women have a low HBV DNA VL (< 5.3 Log₁₀ IU/mL). For these women, international guidelines recommend the use of immunoprophylaxis for newborn at birth (within 24 h), including HBV vaccine and anti-HBs immune-globuline (HBIG). In Cambodia, HBV vaccination coverage with ≥ 3 vaccine doses ranges from 64% in decentralized province to 91% in Phnom Penh [20]. However, vaccination coverage at birth is lower, ranging from 22% in province to 55% in Phnom Penh [20] and access to HBIG remains problematic in the whole country. In the absence of HBIG, two studies, in Thailand and Vietnam, report that vaccination alone could protect 85% of newborns if the first injection is done at birth and the second done before 10 weeks of life [21,22]. Further studies are needed to evaluate the effectiveness of very early HBV vaccine alone directly after birth for women with low HBV DNA VL, in countries with poor access to HBIG.

Distribution of HBV DNA level highlights that 26.5% of pregnant women have a high HBV DNA VL (> 5.3 Log₁₀ IU/mL), which is considered as the threshold above which the majority of MTCT is known to occur [6]. For these highly viremic women, further interventions to prevent perinatal transmission are needed. In 2016, a randomized clinical trial conducted in China on 200 mothers with HBV DNA VL levels > 5.3 Log₁₀ IU/mL demonstrated that a short course of tenofovir (TDF) compared to placebo led to a significant decrease of the HBV MTCT (5% vs 18% in intent to treat analysis) [23]. Recently, a double-blind clinical trial conducted in Thailand has reported that the maternal use of TDF did not result in a significantly lower rate of transmission

Table 1
HBsAg RDT performances compared to HBsAg ELISA.

	HBsAg ELISA		Se (95% CI)	Sp (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)
	Positive	Negative				
HBsAg RDT	(n = 128)	(n = 122)	99.2% (97.7–100)	100%	100%	99.9% (99.8–100)
Positive	127	0				
Negative	1	122				

HBsAg : hepatitis B s antigen; HBeAg: hepatitis B e antigen; RDT: rapid diagnostic test; ELISA: enzyme-linked immuno-assay; 95% CI: Confidence interval; Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Table 2
HBe RDT performances to screen HBV DNA Viral Load quantification according to different thresholds.

Viral load positivity threshold (Log IU/mL)	Viral load	HBeAg RDT		Se (95% CI)	Sp (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)
		Positive (n = 29)	Negative (n = 99)				
5.30 Log IU/mL	Positive	26	8	76.5%	96.8%	89.7%	91.9%
	Negative	3	91	(62.2 - 90.7)	(93.3 - 100)	(78.6 - 100)	(86.6 - 97.3)
6.30 Log IU/mL	Positive	26	7	78.8%	96.8%	93.5%	88.7%
	Negative	3	92	(64.8 - 92.7)	(93.3 - 100)	(84.6 - 100)	(82.5 - 95.0)
7.30 Log IU/mL	Positive	25	3	89.3%	96.0%	92.8%	93.9%
	Negative	4	96	(77.8 - 100)	(92.2 - 99.8)	(83.4 - 100)	(89.2 - 98.6)

HBeAg; hepatitis B e antigen RDT; rapid diagnostic test; 95% CI: Confidence interval; Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; Log: logarithm; IU/mL: international units per milliliter.

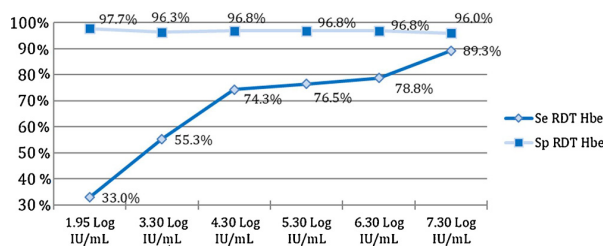


Fig. 1. Performance of HBeAg RDT according to HBV DNA VL thresholds.

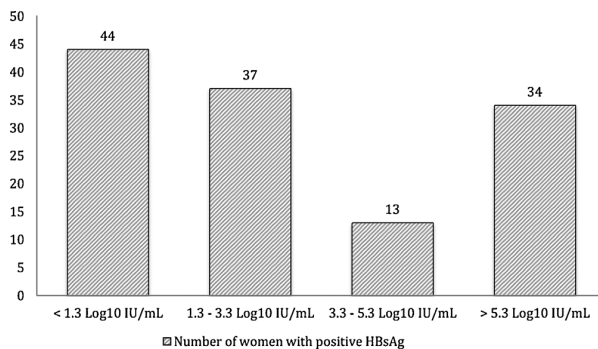


Fig. 2. Distribution of HBV DNA VL for the 128 women with positive HBsAg ELISA.

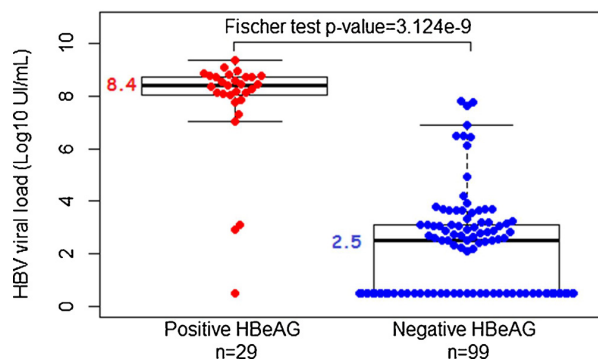


Fig. 3. HBV DNA VL according to HBeAg RDT results.

when administration of HBIG and HBV vaccine was made very early after birth (< 2 h) [24]. However, the 2% rate of perinatal transmission with placebo was much lower than the expected 12%, leaving the study underpowered to confirm a statistically significant difference [25]. In Cambodia, HBIG is available only in one maternity in Phnom Penh and access is not possible in province. On the other hand, thanks to HIV

national program, TDF is available all over the country and could be easily provided to pregnant women at risk of MTCT. The main issue is the poor access to HBV DNA VL to identify these women needing antiviral drug to prevent HBV transmission.

The use of HBeAg RDT as a surrogate marker for HBV replication could be an acceptable trade-off for opportunities to increase identification of pregnant women with high MTCT risk in countries with high HBV prevalence and poor access to HBV DNA VL quantification. Sensitivity seems to increase for women with very high HBV DNA level (> 7.3 Log₁₀ IU/mL) for whom a higher risk of HBV transmission has been previously shown [7,26]. Nevertheless, among the 99 women with negative HBeAg RDT, 8 had an HBV DNA level > 5.3 Log₁₀ IU/mL and 7 harbored BCP (A1762 T/G1764 A) HBV mutants and 3 PC (G1896 A) HBV mutants. As reported elsewhere, HBV mutants with nucleotide substitutions in the BCP and/or PC regions might abolish or down-regulate HBeAg production while HBV DNA levels are preserved [27–29]. An Indonesian study reported that two thirds of the 12 HBeAg-negative women, which could be sequenced, harbored BCP (A1762 T/G1764 A) and/or PC (G1896 A) variants and 2 have a HBV DNA > 6 Log₁₀ IU/mL [30]. A recent Chinese study reports that the risk ratio of intrauterine transmission for HBeAg-negative mothers with HBV DNA level > 2 × 10³ IU/mL was substantially high [31]. Proportion of these BCP/PC HBV mutants and impact on HBV DNA level and HBV transmission needs to be confirmed in a larger and more representative sample size. A new simple diagnostic score for treatment eligibility, which only consists of HBeAg and alanine aminotransferase level was recently evaluated in Africa [32] and could be useful to improve identification of women with high MTCT risk.

Our results are from a small sample of woman in a single hospital in Phnom Penh and should therefore be confirmed with a larger sample size, more representative of the country. An operational research study, the ANRS 12345 - TA PROHM clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02937779), is currently implemented in Cambodia. It is a phase IV multicentre observational and interventional prospective study conducted in 4 maternities (2 in Phnom Penh and 2 in province) aiming to assess the effectiveness of a strategy to prevent HBV MTCT based on 1/ use of this HBsAg and HBeAg RDTs serial algorithm to identify women at risk MTCT and 2/ a treatment by TDF from 24 weeks of pregnancy for women with a both positive HBsAg and HBeAg RDT 3/ an early vaccination at birth (< 2 h) for all new-borns. This study will allow further evaluation of the relation between HBeAg RDT and HBV DNA level as well as the accuracy of these RDTs on whole blood.

In a public health strategy, implementation of these two RDTs could be a feasible cost-effective approach to screen women in ANC and assess eligibility for TDF initiation to prevent MTCT. This is especially relevant in a country like Cambodia where the HBV prevalence ranges from 5 to 10% in general population and where HBV DNA quantification is not routinely available. In a country where the Annual Household Income per Capita was 1228.51 USD in Dec 2016, introduction of these low costs HBsAg and HBeAg RDT (0.6 \$ for HBsAg and 1.5 \$ for HBeAg) could be a timely and highly feasible strategy to

Table 3BCP/PC mutations for the 8 women with negative HBeAg RDT and HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL.

Age	HBV DNA Log ₁₀ IU/mL	Genotype	BCP/PC mutations					Mutation profile		
			1762	1764	1809-1812	1858	1862		1888	1896
29	7.78	C	T	A	GCAC	T	G	G	G	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴
31	6.90	C	T	A	GCAC	T	G	G	G	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴
36	6.47	C	T	A	GCAC	T	G	G	R	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴ PC A ¹⁸⁹⁶
25	6.45	C	T	A	GCAC	T	G	G	G	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴
28	7.80	C	T	A	GCAC	Y	G	G	G	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴
30	7.60	C	T	A	GCAC	T	G	G	A	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴ PC A ¹⁸⁹⁶
29	6.49	B	A	G	GCAC	T	G	G	G	Wild type
31	6.13	C	T	A	GCAC	T	G	G	A	BCP T ¹⁷⁶² A ¹⁷⁶⁴ PC A ¹⁸⁹⁶

HBeAg: hepatitis B e antigen; RDT: rapid diagnostic test; Log: logarithm; IU/mL: international units per milliliter; BCP: Basal core promoter; PC: precore.

improve HBV screening during ANC and integrate them as an ANC screening package together with the current HIV and syphilis rapid tests already implemented up to the primary health care level nationwide.

Conflict of interest

All the authors do not have an association that might pose a conflict of interest.

Author contributions section

Conceptualization: Olivier Ségéral, Anne-Marie Roque-Afonso, Nicole Ngo-Giang-Huong, François Rouet.

Collection of data: Sophearot Prak, Janin Nouhin, Kenrena Chim, Sotheara Hout, François Rouet.

Virological analysis: Sophearot Prak, Janin Nouhin, François Rouet.

Data interpretation: Olivier Ségéral, Dieynaba S. N'Diaye, Janin Nouhin, Anne-Marie Roque-Afonso, Patrice Piola, Laurence Borand, Samsorpha Chhun, François Rouet.

Data analysis: Olivier Ségéral, Dieynaba S. N'Diaye, Patrice Piola.

Original writing: Olivier Ségéral, Dieynaba S. N'Diaye, Janin Nouhin, Wootichai Khamduang, Anne-Marie Roque-Afonso, Patrice Piola, Laurence Borand, François Rouet.

Review writing: Olivier Segeral, Janin Nouhin, Sophearot Prak.

Final approval of the version

All authors.

Funding

This work was supported by the French Agency for Research on HIV/AIDS and Viral Hepatitis.

Acknowledgments

The authors would like to thank participants and their families for participation in the study as well as all the staff of the maternity and laboratory of Calmette hospital. This paper is dedicated to the memory of our colleague and friend, Dr Francois Rouet, who passed away on June 13, 2018.

References

- [1] A. Schweitzer, J. Horn, R.T. Mikolajczyk, G. Krause, J.J. Ott, Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013, *Lancet* 386 (2015) 1546–1555, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X).
- [2] J.J. Ott, J. Horn, G. Krause, R.T. Mikolajczyk, Time trends of chronic HBV infection over prior decades - a global analysis, *J. Hepatol.* 66 (2017) 48–54, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.013>.

- [3] WHO, *Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021*, World Health Organization, Geneva, 2016.
- [4] Z.-J. Shao, L. Zhang, J.-Q. Xu, D.-Z. Xu, K. Men, J.-X. Zhang, H.-C. Cui, Y.-P. Yan, Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a Chinese experience, *J. Med. Virol.* 83 (2011) 791–795, <https://doi.org/10.1002/jmv.22043>.
- [5] H. Zou, Y. Chen, Z. Duan, H. Zhang, C. Pan, Virologic factors associated with failure to passive-active immunoprophylaxis in infants born to HBsAg-positive mothers, *J. Viral Hepat.* 19 (2012) e18–25, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01492.x>.
- [6] W.-H. Wen, M.-H. Chang, L.-L. Zhao, Y.-H. Ni, H.-Y. Hsu, J.-F. Wu, P.-J. Chen, D.-S. Chen, H.-L. Chen, Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus infection: significance of maternal viral load and strategies for intervention, *J. Hepatol.* 59 (2013) 24–30, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.015>.
- [7] P. Sellier, S. Maylin, R. Amarsy, M.-C. Mazon, L. Larrouy, S. Haïm-Boukobza, A. Lopes, M.-D. Moreno, A. Ricbourg, G. Simoneau, J.-D. Magnier, S. Mercier-Delarue, V. Delcey, J. Evans, E. Cambau, E. Barranger, F. Simon, J.-F. Bergmann, Untreated highly viraemic pregnant women from Asia or sub-Saharan Africa often transmit hepatitis B virus despite serovaccination to newborns, *Liver Int.* 35 (2015) 409–416, <https://doi.org/10.1111/liv.12561>.
- [8] N.A. Terrault, N.H. Bzowej, K.-M. Chang, J.P. Hwang, M.M. Jonas, M.H. Murad, AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B, *Hepatology* 63 (2016) 261–283, <https://doi.org/10.1002/hep.28156>.
- [9] S.K. Sarin, M. Kumar, G.K. Lau, Z. Abbas, H.L.Y. Chan, C.J. Chen, D.S. Chen, H.L. Chen, P.J. Chen, R.N. Chien, A.K. Dokmeci, E. Gane, J.L. Hou, W. Jafri, J. Jia, J.H. Kim, C.L. Lai, H.C. Lee, S.G. Lim, C.J. Liu, S. Locarnini, M. Al Mahtab, R. Mohamed, M. Omata, J. Park, T. Piratvisuth, B.C. Sharma, J. Sollano, F.S. Wang, L. Wei, M.F. Yuen, S.S. Zheng, J.H. Kao, Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update, *Hepatol. Int.* 10 (2016) 1–98, <https://doi.org/10.1007/s12072-015-9675-4>.
- [10] European Association For The Study Of The Liver, EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection, *J. Hepatol.* 57 (2012) 167–185, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.010>.
- [11] H. Yamada, M. Fujimoto, S. Svay, O. Lim, S. Hok, N. Goto, M. Ohisa, T. Akita, J. Matsuo, S.H. Do, K. Katayama, Y. Miyakawa, J. Tanaka, Seroprevalence, genotypic distribution and potential risk factors of hepatitis B and C virus infections among adults in Siem Reap, Cambodia, *Hepatol. Res.* 45 (4) (2015) 480–487, <https://doi.org/10.1111/hepr.12367>.
- [12] P. Sa-Nguanmoo, P. Tangkijvanich, N. Thawornsup, P. Vichaiwattana, K. Prianantathavorn, A. Theamboonlers, Y. Tanaka, Y. Poovorawan, Molecular epidemiological study of hepatitis B virus among migrant workers from Cambodia, Laos, and Myanmar to Thailand, *J. Med. Virol.* 82 (2010) 1341–1349, <https://doi.org/10.1002/jmv.21828>.
- [13] D.-Z. Xu, Y.-P. Yan, B.C.K. Choi, J.-Q. Xu, K. Men, J.-X. Zhang, Z.-H. Liu, F.-S. Wang, Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study, *J. Med. Virol.* 67 (2002) 20–26.
- [14] D. Kania, L. Ottomani, N. Meda, M. Peries, P. Dujols, K. Bolloré, W. Rénier, J. Viljoen, J. Ducos, P. Van de Perre, E. Tuailon, Performance of two real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA detection and quantitation, *J. Virol. Methods* 201 (2014) 24–30, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.01.015>.
- [15] K. Takahashi, K. Aoyama, N. Ohno, K. Iwata, Y. Akahane, K. Baba, H. Yoshizawa, S. Mishiro, The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection, *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 12) (1995) 3159–3164, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-12-3159>.
- [16] A. Amini, O. Varsaneux, H. Kelly, W. Tang, W. Chen, D.I. Boeras, J. Falconer, J.D. Tucker, R. Chou, A. Ishizaki, P. Easterbrook, R.W. Peeling, Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis, *BMC Infect. Dis.* 17 (2017) 698, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2772-3>.
- [17] H.F. Njai, Y. Shimakawa, B. Sanneh, L. Ferguson, G. Ndow, M. Mendy, A. Sow, G. Lo, C. Toure-Kane, J. Tanaka, M. Taal, U. D'alessandro, R. Njie, M. Thurst, M. Lemoine, Validation of rapid point-of-care (POC) tests for detection of hepatitis B surface antigen in field and laboratory settings in the Gambia, Western Africa, *J. Clin. Microbiol.* 53 (2015) 1156–1163, <https://doi.org/10.1128/JCM.02980-14>.

- [18] H.M. Cruz, L. de P. Scalioni, V.S. de Paula, E.F. da Silva, K.M.R. do Ó, F.A.P. Milagres, M.S. Cruz, F.I. Bastos, P. Pollo-Flores, E. Leal, A.R.C. Motta-Castro, J.H. Pilotto, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe, L.M. Villar, Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations, *BMC Infect. Dis.* 15 (2015) 548, <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1249-5>.
- [19] S. Chevaliez, D. Challine, H. Naija, T.C. Luu, S. Laperche, L. Nadala, J.-P. Allain, H.H. Lee, J.-M. Pawlotsky, Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations, *J. Clin. Virol.* 59 (2014) 89–93, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.010>.
- [20] B. Mao, M.K. Patel, K. Hennessey, R.J.W. Duncan, K. Wannemuehler, S.C. Soeung, Prevalence of chronic hepatitis B virus infection after implementation of a hepatitis B vaccination program among children in three provinces in Cambodia, *Vaccine* 31 (2013) 4459–4464, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.009>.
- [21] P. Tharmaphornpilas, A. Rasdjarmrearnsook, S. Plianpanich, P. Sa-nguanmoo, Y. Poovorawan, Increased risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers as a result of delayed second dose of hepatitis B vaccination, *Vaccine* 27 (2009) 6110–6115, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.034>.
- [22] A. Milne, D.J. West, D.V. Chinh, C.D. Moyes, G. Poerschke, Field evaluation of the efficacy and immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine without HBIG in newborn Vietnamese infants, *J. Med. Virol.* 67 (2002) 327–333, <https://doi.org/10.1002/jmv.10071>.
- [23] C.Q. Pan, Z. Duan, E. Dai, S. Zhang, G. Han, Y. Wang, H. Zhang, H. Zou, B. Zhu, W. Zhao, H. Jiang, China study group for the mother-to-child transmission of hepatitis B, tenofovir to prevent hepatitis B transmission in mothers with high viral load, *N. Engl. J. Med.* 374 (2016) 2324–2334, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508660>.
- [24] G. Jourdain, N. Ngo-Giang-Huong, L. Harrison, L. Decker, W. Khamduang, C. Tierney, N. Salvadori, T.R. Cressey, W. Sirirungsi, J. Achalpong, P. Yuthavisuthi, P. Kanjanavikai, O.P. Na Ayudhaya, T. Siriwachirachai, S. Prommas, P. Sabsanong, A. Limtrakul, S. Varadisai, C. Putiyanun, P. Suriyachai, P. Liampongabuddhi, S. Sangsawang, W. Matanasarawut, S. Buranabanjasatean, P. Puerngooluerm, C. Bowonwatanuwong, T. Puthanakit, V. Klinbuayaem, S. Thongsawat, S. Thanprasertsuk, G.K. Siberry, D.H. Watts, N. Chakhtoura, T.V. Murphy, N.P. Nelson, R.T. Chung, S. Pol, N. Chotivanich, Tenofovir versus placebo to prevent perinatal transmission of hepatitis B, *N. Engl. J. Med.* 378 (2018) 911–923, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708131>.
- [25] N. Terrault, R. Brown, A. Lok, J. Wong, K.-M. Chang, M. Jonas, B. McMahon, Preventing perinatal transmission of hepatitis B necessitates consideration of anti-viral treatment in pregnancy, *Hepatology* 68 (4) (2018) 1658–1660, <https://doi.org/10.1002/hep.30137>.
- [26] Z. Guo, X.H. Shi, Y.L. Feng, B. Wang, L.P. Feng, S.P. Wang, Y.W. Zhang, Risk factors of HBV intrauterine transmission among HBsAg-positive pregnant women, *J. Viral Hepat.* 20 (2013) 317–321, <https://doi.org/10.1111/jvh.12032>.
- [27] A.J.V. Thompson, T. Nguyen, D. Iser, A. Ayres, K. Jackson, M. Littlejohn, J. Slavina, S. Bowden, E.J. Gane, W. Abbott, G.K.K. Lau, S.R. Lewin, K. Visvanathan, P.V. Desmond, S.A. Locarnini, Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers, *Hepatology* 51 (2010) 1933–1944, <https://doi.org/10.1002/hep.23571>.
- [28] J.-F. Wu, Y.-H. Ni, H.-L. Chen, H.-Y. Hsu, M.-H. Chang, The impact of hepatitis B virus precore/core gene carboxyl terminal mutations on viral biosynthesis and the host immune response, *J. Infect. Dis.* 209 (2014) 1374–1381, <https://doi.org/10.1093/infdis/jit638>.
- [29] D.-W. Kim, S.-A. Lee, E.-S. Hwang, Y.-H. Kook, B.-J. Kim, Naturally occurring precore/core region mutations of hepatitis B virus genotype C related to hepatocellular carcinoma, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047372> e47372.
- [30] M. Fujiko, M.T. Chalid, null Turyadi, S.I. Je, null Maghfira, null Syafri, R. Wahyuni, M. Roni, I. Patellongi, M.N. Massi, D.H. Muljono, Chronic hepatitis B in pregnant women: is hepatitis B surface antigen quantification useful for viral load prediction? *Int. J. Infect. Dis.* 41 (2015) 83–89, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.11.002>.
- [31] T. Chen, J. Wang, H. Qiu, Q. Yu, T. Yan, C. Qi, F. Cao, Z. Tian, D. Guo, N. Yao, Y. Yang, Y. He, Y. Zhao, J. Liu, Different interventional criteria for chronic hepatitis B pregnant women with HBeAg(+) or HBeAg(-): epidemiological data from Shaanxi, China, *Medicine (Baltimore)* 97 (2018) e11406, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011406>.
- [32] Y. Shimakawa, R. Njie, G. Ndow, M. Vray, P.S. Mbaye, P. Bonnard, R. Sombié, J. Nana, V. Leroy, J. Bottero, P. Ingiliz, G. Post, B. Sanneh, I. Baldeh, P. Suso, A. Ceasay, A. Jeng, H.F. Njai, S. Nayagam, U. D'Alessandro, I. Chemin, M. Mendy, M. Thurst, M. Lemoine, Development of a simple score based on HBeAg and ALT for selecting patients for HBV treatment in Africa, *J. Hepatol.* 69 (2018) 776–784, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.024>.

5.2. Conclusion

Le TDR plasmatique AgHBs a une sensibilité et une spécificité très élevées (respectivement 99.2% [IC95%, 97.7 - 100] et 100% [IC95%, 96.9 - 100]) pour dépister l'infection VHB chez les femmes enceintes par rapport à l'ELISA, sa seule limitation étant la nécessité de centrifuger le tube pour recueillir le plasma. Concernant la performance du TDR AgHBe pour un seuil de quantification de l'ADN du VHB de 5,3 Log₁₀ UI/mL, la spécificité est élevée (96.8% [IC95%, 93.3 - 100]) mais la sensibilité est plus faible (76,5% [IC95%, 62.2 – 90.7]). Une proportion de femmes enceintes avec un TDR AgHBe négatif peut donc avoir un niveau élevé d'ADN du VHB et ne pas être détectée comme à risque de TME. Cette sensibilité basse semble s'expliquer par la présence de mutations dans la région précore et du promoteur basal du core chez les femmes négatives pour l'AgHBe avec un ADN VHB > 5.3 Log₁₀ UI/mL.

Au regard de ces premiers résultats, il a été décidé d'utiliser ces deux tests rapides dans l'étude TA PROHM, l'AgHBs pour dépister les femmes enceintes dans les centres investigateurs et l'AgHBe comme marqueur de répllication virale, et de débiter un traitement antiviral prophylactique pour toutes les femmes AgHBe positives. Néanmoins, il a été décidé de poursuivre pendant l'étude TA PROHM l'évaluation du TDR AgHBe comme marqueur de répllication virale afin de confirmer ces résultats chez une population de femmes enceintes plus large et de proposer un nouvel algorithme pour améliorer la sensibilité, en évaluant l'utilité d'une mesure du taux d'ALAT chez les femmes négatives pour l'AgHBe, comme cela venait d'être évalué en Afrique en population générale (45).

6. Développement de l'étude TA PROHM

6.1. Contexte

Au début de l'étude en 2015-2016, deux essais contrôlés randomisés étaient en cours en Chine et en Thaïlande pour évaluer l'efficacité d'une stratégie utilisant le TDF en comparaison au placebo pour réduire la TME du VHB en association avec une immunoprophylaxie précoce (vaccin à la naissance + HBIg) dans les deux bras. Ces deux études étaient réalisées dans des pays où l'accès aux HBIg était possible. En revanche, aucune étude n'avait évalué jusqu'à

présent une stratégie sans HBlg. Au regard des difficultés d'approvisionnement au Cambodge, et compte tenu du fait qu' aucune étude ne prouvait leurs bénéfices en termes de PTME chez des femmes Ag HBe négatives ou pour des femmes sous traitement antiviral pendant la grossesse, il semblait important d'apporter des données scientifiques visant à évaluer une stratégie sans HBlg. Cependant, leur possible utilisation dans un des hôpitaux de l'étude nous a conduit, pour des raisons éthiques, à ne pas les retenir comme critère de non-inclusion. Par ailleurs, aucune prise en charge de prévention de la TME VHB n'était disponible au Cambodge en dehors de la vaccination. Il paraissait donc pertinent d'évaluer l'apport de cette stratégie alternative dans un cadre opérationnel permettant de guider les autorités nationales de santé et d'avoir une approche pragmatique en utilisant les outils disponibles et en faisant évoluer ces outils. C'est dans cette optique que la validation du test AgHBe comme marqueur de répllication virale s'est poursuivie lors de la mise en place de l'étude.

6.2. Les objectifs de l'étude

Objectif principal

Évaluer l'efficacité d'une stratégie alternative sans HBlg de PTME du VHB au Cambodge basée sur :

- 1- L'utilisation des TDRs AgHBs et AgHBe pour le dépistage et la prise en charge de l'infection VHB en péripartum
- 2- Un traitement par TDF à partir de 24 semaines d'aménorrhées des femmes éligibles intégrant une stratégie de traitement immédiat pour celles vues après 24 semaines d'aménorrhées
- 3- Une vaccination précoce pour tous les enfants à la naissance (< 2 heures)

Objectifs secondaires

- Poursuivre l'évaluation du TDR AgHBe comme marqueur de répllication virale.
- Estimer le taux de transmission du VHB à l'enfant à 6 mois de vie en fonction du terme d'introduction du traitement par TDF et de la durée de traitement pendant la grossesse pour les mères éligibles
- Estimer le taux de transmission du VHB à l'enfant à 6 mois de vie pour les mères non éligibles au traitement antiviral prophylactique
- Évaluer la tolérance clinique et biologique de ces interventions chez la mère et l'enfant
- Évaluer la maladie hépatique chez la mère en postpartum et la nécessité de poursuivre

ou non le TDF chez les femmes traitées

6.3. Méthodologie

Il s'agit d'un essai interventionnel de phase IV prospectif non comparatif ouvert multicentrique.

6.4. Les acteurs de la recherche

6.4.1. Les centres investigateurs

L'étude a été menée dans 5 hôpitaux, deux hôpitaux nationaux à Phnom Penh (l'hôpital Calmette et le Centre national de santé maternelle et infantile), deux hôpitaux provinciaux dans les provinces de Kampong Cham et Takeo (voir figure 2) et l'hôpital Jayavarman VII à Siem Reap qui est un hôpital mère-enfants financé par la fondation Kantha Bopha via des dons privés.

Les sites d'investigation comprenaient le service de consultation anténatale, le service de grossesses pathologiques, la salle d'accouchement, le service de soins intensifs néonataux et le service de suite de couches.

L'évaluation hépatique en postpartum chez les mères était réalisée dans le service d'hépatologie et de radiologie de l'hôpital Calmette et dans le service de radiologie de l'hôpital Jayavarman VII.

L'évaluation de l'enfant à 6 semaines et 6 mois postpartum était réalisé à l'Hôpital National Pédiatrique à Phnom Penh ou à l'hôpital Jayavarman VII.

Par ailleurs, 7 centres de santé périphériques ont été impliqués uniquement en tant que centres de dépistage dans les provinces de Kampong Cham et Takeo. Ces centres de santé étaient situés en périphérie des deux hôpitaux provinciaux et y réfèrent les patientes en cas de positivité de l'AgHBs. Des centrifugeuses ont été fournies par l'étude afin de permettre à ces centres de santé de réaliser le test AgHBs plasmatique. Une formation a été réalisée en ce sens par l'équipe de recherche clinique.

En dehors de la vaccination à la naissance qui était réalisée en salle de naissance, les autres injections vaccinales étaient réalisées dans les centres de santé périphériques ou à l'Hôpital National Pédiatrique selon les recommandations nationales. La présence d'un carnet de vaccination pour tous les enfants au Cambodge permettait de vérifier la réalisation et les dates d'injection.

6.4.2. Le centre de méthodologie et de gestion de l'étude

Le groupe de recherche clinique de l'Unité d'épidémiologie et santé publique de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) était responsable de la méthodologie et de la gestion des données de l'étude. Ce groupe était constitué de :

- 6 assistant.e.s de recherche clinique : préparation du matériel, respect des procédures et des bonnes pratiques cliniques, gestion du calendrier de l'étude, monitoring mensuel et résolution des demandes de renseignements, archivage
- 1 gestionnaire de données : conception de la base de données, entrée des données et nettoyage, lien avec l'équipe statistique
- 3 moniteur.ice.s de laboratoire : réparation du matériel, respects des procédures biologiques, supervision/formation, gestion des envois aux différents laboratoires et de la biobanque
- 2 coordinateurs cliniques : gestion des évènements indésirables, membres du comité d'aide à la décision pour le suivi clinique pendant l'étude et l'évaluation hépatique en postpartum

L'unité INSERM SC10/US019, Essais Thérapeutiques et Maladies Infectieuses, à Villejuif, France, était responsable des analyses statistiques en collaboration avec le gestionnaire de données et moi-même.

6.4.3. La formation des investigateurs

Des sessions de formation d'une semaine ont été organisées dans chaque centre investigateur. Ces sessions comprenaient la présentation du protocole et du matériel de l'étude, les procédures d'information et de recueil du consentement, les bonnes pratiques cliniques en recherche et le mode de remplissage des cahiers d'observation.

Des sessions de rappel pouvaient être organisées à la demande des investigateurs.

Par ailleurs, les assistantes de recherche clinique étaient régulièrement sollicitées pour répondre aux questions des investigateurs lors du déroulement de l'étude.

6.4.4. L'information aux participantes

Deux notes d'information détaillées (une pour la phase de dépistage et une pour la phase d'inclusion dans l'essai) ont été rédigées en anglais, traduites en khmer et relues par des associations de patients cambodgiens pour s'assurer de la bonne compréhension.

Des brochures d'information étaient disponibles dans tous les centres ainsi qu'un tableau à feuilles mobiles de table pour aider les investigateurs à présenter l'étude aux participantes.

6.5. La population d'étude

6.5.1. Critères d'inclusion

- Femme âgée de 18 ans ou plus le jour de l'inclusion ;
- Grossesse ;
- Positivité de l'Ag HBs ;
- Obtention d'un consentement libre et éclairé avec explication et remise de la notice d'information et signature du formulaire de consentement de l'essai par la patiente et l'investigateur au plus tard le jour de l'inclusion et avant tout examen réalisé dans le cadre de l'essai

6.5.2. Critères de non-inclusion

- Femmes refusant le test de dépistage ;
- Femmes co-infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ;
- Femmes co-infectées par le Virus de l'Hépatite C (VHC);
- Femmes traitées pour elles-mêmes pour leur hépatite B le jour de l'inclusion ;
- Clairance de la créatinine < 30 mL/min ;
- Pathologie gravidique sévère mettant en jeu le pronostic vital de la mère et/ou de l'enfant au moment de l'inclusion ;
- Anomalies fœtales préexistantes incompatibles avec la vie de l'enfant ;
- Accouchement imminent défini par une dilatation du col supérieure à 7 centimètres
- Prévision de ne pas accoucher dans un centre de suivi de l'essai ;
- Toute condition médicale qui, selon les investigateurs de l'étude, compromettrait la participation dans l'étude ;
- Participation à un autre essai clinique au moment de l'inclusion en l'absence d'accord écrit entre les deux équipes de recherche

6.6. Les critères de jugement

6.6.1. Critère de jugement principal

Pourcentage d'infection VHB active chez l'enfant à 6 mois de vie, estimé par la mesure de

l'AgHBs (et confirmé par une mesure de l'ADN VHB) parmi l'ensemble des enfants nés de mères positives pour l'AgHBs.

Les enfants pour lesquels le statut VHB était disponible à 6 mois ont été inclus pour l'analyse du critère de jugement principal, que la mère soit traitée ou non par TDF et que l'enfant reçoive ou non des HBIg.

Les enfants perdus de vue ou ayant abandonné l'étude avant 6 mois et les enfants décédés pour d'autres raisons qu'un problème hépatique n'ont pas été inclus dans l'analyse du critère de jugement principal.

6.6.2. Critères de jugement secondaires

- Proportion de femmes et d'enfants perdus de vue avant l'évaluation du statut VHB de l'enfant à 6 mois de vie
- Proportion de femmes éligibles acceptant la stratégie antivirale
- Proportion de femmes traitées par TDF avec une observance > 90% à chaque visite de suivi de l'initiation du traitement à l'accouchement
- Proportion de femmes avec une charge virale ADN VHB < 5.3 Log₁₀ copies/mL à l'accouchement
- Proportion de femmes ayant dû poursuivre le traitement en postpartum
- Tolérance chez les mères et les enfants
 - Proportion de femmes ayant dû arrêter le traitement antiviral à cause d'un événement indésirable grave (EIG)
 - Proportion et caractérisation des femmes et enfants avec un EIG et/ou un événement indésirable grade 3 ou 4 (classification ANRS)
 - Proportion de rebond cytolytique (« flare ») à l'arrêt du traitement défini par un taux d'ALAT > 5N

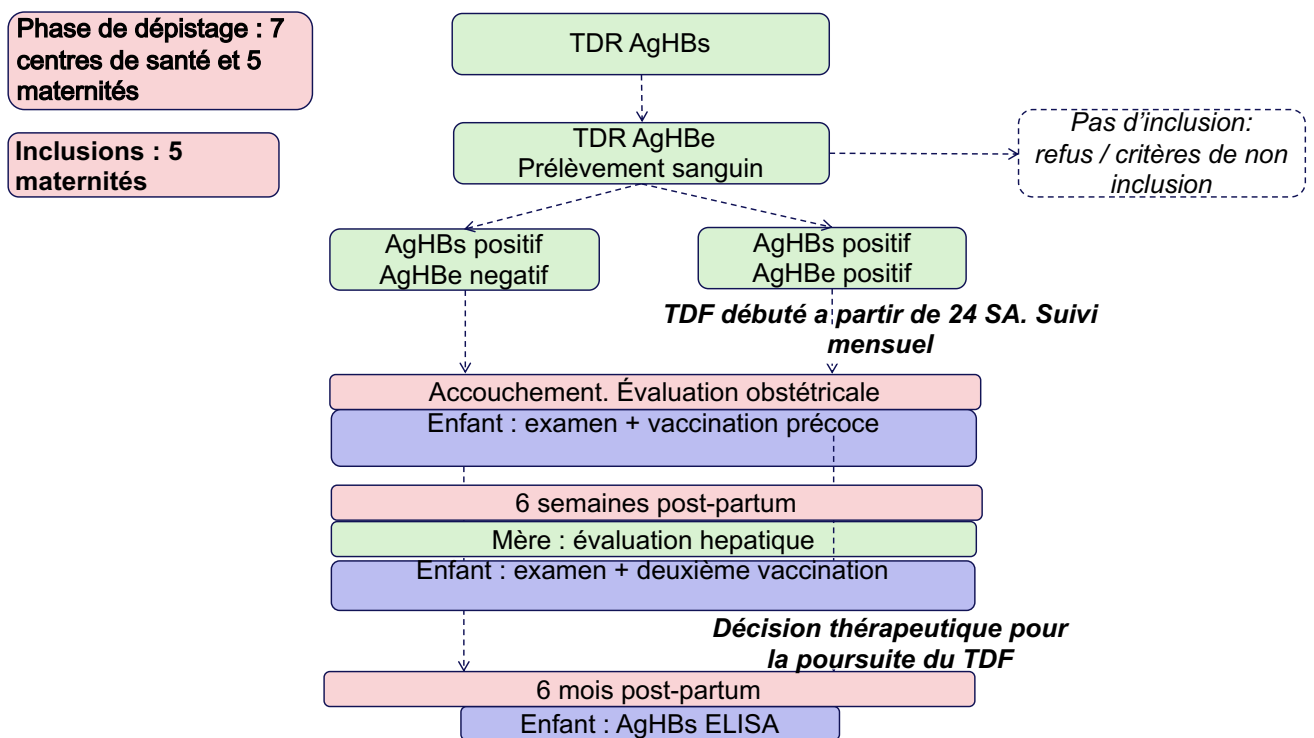
6.7. Les stratégies d'intervention

L'étude comprenait 5 phases distinctes, représentées en rose sur la figure 5 :

- Une phase de dépistage de l'AgHBs par TDR qui était suivi par un dépistage du VIH et de l'hépatite C en cas de positivité du TDR AgHBs

- Une phase d'inclusion qui ne concernait que les patientes positives pour l'AgHBs et négatives pour le VIH et l'hépatite C. Lors de cette visite, un bilan d'inclusion était réalisé et permettait de confirmer l'éligibilité de la patiente dans l'étude et l'éligibilité à un traitement antiviral prophylactique par TDF
- L'accouchement où était réalisée une évaluation des paramètres obstétricaux et une évaluation clinique du nourrisson ainsi que l'administration de la première dose vaccinale
- L'évaluation de la mère et de l'enfant à 6 semaines postpartum qui comprenait une évaluation de la maladie hépatique pour la mère et un examen clinique pour le nourrisson ainsi que la vérification de l'administration de la deuxième dose vaccinale
- La dernière visite de suivi à 6 mois postpartum qui comprenait un bilan biologique de l'infection VHB chez la mère et un examen clinique, une mesure de l'AgHBs chez l'enfant ainsi qu'une vérification du carnet vaccinal

Figure 6 : schéma d'organisation de l'étude avant l'amendement

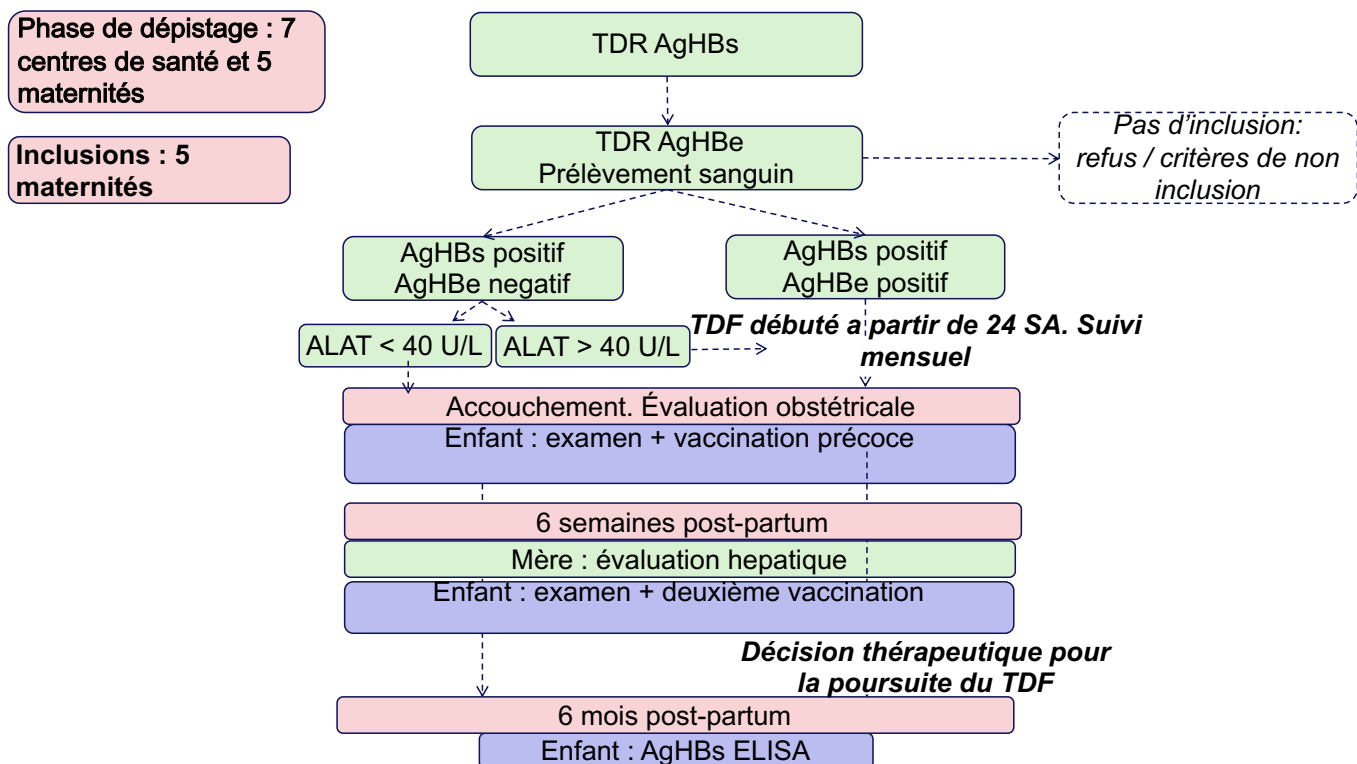


6.7.1. Validation d'un nouvel algorithme d'identification des femmes éligibles au TDF et amendement au protocole

D'octobre 2017 à décembre 2018, la validité d'un nouvel algorithme sélectionnant les femmes AgHBe positives et celles AgHBe négatives avec un taux d'ALAT > 40 U/L vis-à-vis de deux

niveaux différents de charges virales VHB (5.3 et 7.3 Log₁₀ IU/mL) a été évaluée. Cette évaluation a mis en évidence la supériorité de ce nouvel algorithme par rapport au test AgHBe seul (comme expliqué au chapitre 7, article 2 de la thèse). Ces résultats ont conduit à la réalisation d'un amendement au protocole en décembre 2018, après accord du comité scientifique et du comité d'éthique Cambodgien. Il a donc été utilisé dans l'étude à partir de Janvier 2019 et ce, jusqu'à la fin de l'étude.

Figure 7 : schéma d'organisation de l'étude après l'amendement



6.7.2. Le traitement antiviral prophylactique

D'octobre 2017 à décembre 2018, l'éligibilité au TDF était définie par une positivité de l'AgHBe et une clairance de créatinine supérieure à 30 ml/mn. A partir de janvier 2019, suite aux résultats de l'article 2 de la thèse (voir chapitre 7), les femmes AgHBe positives et celles AgHBe négatives avec un taux d'ALAT > 40 U/L étaient éligibles au TDF avec toujours le même critère de clairance de créatinine supérieure à 30 ml/mn.

Chez les femmes éligibles, le TDF a été utilisé à la posologie de 300 mg par jour en une prise per os pour les femmes présentant une clairance de la créatinine > 50 ml/mn. Il était prévu une posologie de 300 mg tous les deux jours pour les femmes présentant une clairance de la

créatinine comprise entre 30 et 50 ml/mn mais cela n'a jamais eu besoin d'être appliqué.

Le traitement a été initié à partir de 24 SA pour les femmes consultant avant cette date et à partir de la première consultation anténatale pour celles consultant plus tard et ce, jusqu'au terme avec un suivi mensuel de la tolérance et de l'observance. La mère continuait pendant 6 semaines post-partum le traitement initié en prépartum.

A 6 semaines postpartum, une évaluation de la fibrose hépatique était réalisée par trois techniques (tests biologiques, échographie hépatique et élastométrie) afin de juger de l'indication de poursuite du traitement par TDF. Un Comité d'Aide à la décision statuait sur la nécessité ou non de poursuivre le traitement chez la mère en fonction des résultats du bilan. La décision était prise dans les deux semaines suivant le bilan et la mère était convoquée à 8 semaines post-partum. La date de 6 semaines postpartum a été choisie pour correspondre à la date de la deuxième injection vaccinale de l'enfant.

En cas d'arrêt du TDF, le bilan hépatique était contrôlé tous les mois jusqu'à la fin de l'étude. Une réactivation virale ou « flare » a été définie comme une élévation des transaminases à plus de 5 fois la valeur normale. Une procédure ad hoc et des modalités de reprise immédiate du traitement par TDF étaient consignés dans chaque centre ainsi qu'une liste de personnes ressources susceptibles d'être consultées immédiatement en cas de flare.

6.7.3. En salle de naissance

Le mode d'accouchement était laissé au choix des obstétriciens et un recueil de toutes les complications obstétricales était réalisé ainsi qu'un recueil des manœuvres obstétricales suivantes : épisiotomie, forceps, ventouses. La durée d'ouverture de l'œuf (délai entre la rupture de la poche des eaux et l'accouchement) était également recueillie.

En post-partum, le mode d'allaitement était laissé au choix de la mère.

Concernant le nourrisson, avant la première dose vaccinale ou toute injection d'HBsIg, un prélèvement de 5 gouttes de sang séché (DBS) au talon était réalisé afin de mesurer l'AgHBs et la charge virale ADN VHB.

6.7.4. Seroprophylaxie de l'enfant

Chez les enfants, la première dose vaccinale était réalisée dans les deux premières heures de vie, en salle de naissance, par l'administration d'un vaccin recombinant monovalent, administré en intramusculaire à la dose de 0,5 mL soit 10 microgrammes d'AgHBs. L'approvisionnement

en vaccin était assuré par le Ministère de la Santé Cambodgien selon les procédures de routine. Les doses vaccinales étaient conservées au réfrigérateur dans tous les centres de l'essai. Les vaccinations suivantes étaient réalisées selon le calendrier vaccinal national cambodgien à 6, 10 et 14 semaines de vie par un vaccin pentavalent (DTP-HepB-HIB3) administré en intramusculaire.

Les HBIg n'étaient pas fournies par l'essai. En revanche, l'information était délivrée auprès des femmes accouchant à Phnom Penh et celles qui souhaitaient les utiliser pouvaient s'approvisionner à l'Institut Pasteur du Cambodge ou à l'hôpital Calmette à leur frais et ce, sans que cela ne remette en question leur participation dans l'essai.

6.8. Nombre de sujets nécessaires

Pour s'assurer que le pourcentage de transmission du VHB observé dans l'étude se situait bien dans une précision de 2% de l'IC95% autour de la valeur attendue de 3%, un total de 280 femmes avec indication de TDF préventif évaluables étaient nécessaires. Afin de tenir compte d'un taux de perdus de vue de 5%, il a été prévu d'inclure 295 femmes éligibles au TDF.

6.9. Les méthodes statistiques

- La description des caractéristiques des femmes et des nourrissons à l'inclusion et à l'accouchement a été décrite par leur médiane, leur écart interquartile, leur moyenne, leur écart-type ou leur fréquence (%), selon le cas.
- L'analyse du critère de jugement principal : Le pourcentage, et son intervalle de confiance à 95%, de nourrissons ayant un AgHBs positif à 6 mois de vie a été estimée selon 1/ l'éligibilité au TDF pour les femmes 2/ le statut HBIg du nourrisson, 3/ la durée de traitement pour les femmes traitées par TDF.
- Acceptabilité du TDF : Le pourcentage, et son intervalle de confiance à 95%, de femmes commençant le TDF parmi celles éligibles a été estimé.
- Perte de suivi et abandon : Le pourcentage, et son intervalle de confiance à 95%, de femmes et de nourrissons n'ayant pas atteint la dernière visite de l'étude a été donné, stratifié sur l'éligibilité au TDF.

- Statut virologique à l'accouchement : Le pourcentage, et son intervalle de confiance à 95%, de femmes ayant un ADN VHB > 5,3 Log10 UI/mL a été évalué, stratifié sur 1/ l'éligibilité au TDF 2/ la durée du TDF (\leq 1 mois, > 1 mois) chez les femmes ayant débuté le traitement.
- La survenue des événements indésirables (tableau de classification de l'ANRS) a été évaluée de la façon suivante :
 - Le pourcentage et son intervalle de confiance à 95% des sujets ayant présenté au moins une fois un événement indésirable de grade 3-4 ou un événement indésirable grave (EIG)
 - Le pourcentage et son intervalle de confiance à 95 % des sujets ayant présenté au moins une fois un événement indésirable de grade 3-4 ou un EIG en rapport avec une cytolysé hépatique
 - Le pourcentage et l'intervalle de confiance à 95 % des sujets qui ont présenté une augmentation du taux d'ALT > 5 ULN après l'arrêt du TDF
 - Le type d'événement indésirable, globalement et en fonction de l'éligibilité au TDF

6.10. Considérations éthiques

L'étude a été menée conformément aux directives éthiques de la Déclaration d'Helsinki de 1975 et a été approuvée par le Comité national d'éthique pour la recherche en santé du Cambodge. Chaque participante incluse a signé deux formulaires de consentement éclairé correspondant respectivement à la phase de dépistage et à la phase d'inclusion de l'étude. Un comité indépendant a examiné chaque année le déroulement de l'étude et les données de sécurité. Un rapport annuel de sécurité comprenant la liste de toutes les suspicions d'effets indésirables graves attendus et inattendus, survenus dans l'essai, pendant la période couverte était soumis au Comité national d'éthique pour la recherche en santé du Cambodge et à l'unité de pharmacovigilance de l'ANRS.

7. Article 2 de la Thèse. « HBeAg rapid test and ALT level-based algorithm to identify pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission: the ANRS 12345 TA PROHM study »

7.1. Introduction

Dans le premier article, les sensibilités et spécificités du test AgHBe étaient respectivement de 76.5% (62.2-90.7) et 96.8% (93.3-100) pour un seuil HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL et de 89.3% (77.8-100) et 96.0% (92.2-99.8) pour un seuil HBV DNA > 7.3 Log₁₀ IU/mL. La sensibilité basse semblait liée à la présence de mutations dans la région pre-core responsables d'une diminution ou d'une inhibition de la synthèse de l'AgHBe. Les patients porteurs de ces mutations peuvent être négatifs pour l'AgHBe mais présenter une charge virale ADN VHB élevée et/ou un taux d'ALAT/ASAT élevé.

Nous avons donc voulu évaluer au cours de l'étude si cette baisse de sensibilité se confirmait et si l'ajout d'une mesure du niveau d'ALAT pour les femmes AgHBe négatives permettait d'améliorer l'identification des femmes hautement virémiques et à risque de transmission.

La validité du test AgHBe seul et d'un algorithme sélectionnant les femmes AgHBe positives et celles AgHBe négatives avec un taux d'ALAT > 40 U/L pour deux niveaux différents de charges virales VHB (5.3 et 7.3 Log₁₀ IU/mL) a été évalué chez les 515 premières femmes incluses dans l'étude TA PROHM.

7.2. L'article 2

Hepatitis B e Antigen (HBeAg) Rapid Test and Alanine Aminotransferase Level–Based Algorithm to Identify Pregnant Women at Risk of HBV Mother-to-Child Transmission: The ANRS 12345 TA PROHM Study

Olivier Segeral,¹ Bunnet Dim,² Christine Durier,³ Sophearot Prak,⁴ Kearena Chhim,⁵ Chanlina Vong,⁶ Sothy Pech,⁷ Say Tiv,⁸ Bunthoeun Nem,⁹ Kay Hout,¹⁰ Janin Nouhin,^{3,11} Samsorphea Chhun,⁵ and Laurence Borand²

¹University of Health Sciences/Agence Nationale de Recherche sur le Sida, Phnom Penh, Cambodia, ²Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia, ³INSERM SC10/USO19, Essais Thérapeutiques et Maladies Infectieuses, Villejuif, France, ⁴Virology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia, ⁵Maternity Department, Hôpital Calmette, Phnom Penh, Cambodia, ⁶Hepatology Department, Hôpital Calmette, Phnom Penh, Cambodia, ⁷National Maternal and Child Health Center, Phnom Penh, Cambodia, ⁸Maternity Department, Jayavarman VII Hospital, Siem Reap, Cambodia, ⁹Maternity Department, Kompong Cham Provincial Hospital, Kompong Cham, Cambodia, ¹⁰Maternity Department, Takeo Referral Hospital, Takeo, Cambodia, and ¹¹Department of Medicine, Stanford University, Stanford, California

Background. The paucity of hepatitis B virus (HBV) DNA measurement in low-/middle-income countries hinders the identification of HBV-infected pregnant women at risk of perinatal transmission. This study evaluates the validity of an algorithm selecting HBeAg-positive women and HBeAg-negative women with alanine aminotransferase (ALT) ≥ 40 IU/L as a predictor of high HBV DNA level.

Methods. All women with reactive samples for hepatitis B surface antigen (HBsAg) were assessed with an SD BIOLINE HBeAg rapid test and HBV DNA quantification was performed. Validities of HBeAg and of the algorithm to identify HBV DNA > 2 thresholds (5.3 and 7.3 \log_{10} IU/mL) were evaluated.

Results. For the 515 HBsAg-positive women, median age was 29 years, 92 (17.9%) were HBeAg positive, 47 (9.1%) were HBeAg negative with ALT ≥ 40 IU/L, and 144 (28.0%) had an HBV DNA $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL. Sensitivity and specificity of HBeAg were 61.8% and 99.2% for HBV DNA $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL and 81.3% and 96.7% for HBV DNA $> 7.3 \log_{10}$ IU/mL. For the algorithm, sensitivity and specificity were 79.2% and 93.3% for HBV DNA level $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL and 92.7% and 88.1% for HBV DNA $> 7.3 \log_{10}$ IU/mL. The AUCs for the algorithm (0.92 and 0.94 for HBV DNA > 5.3 and 7.3, respectively) were significantly greater ($P < .001$) than the AUCs for HBeAg (0.81 and 0.89 for HBV DNA > 5.3 and 7.3, respectively).

Conclusions. An algorithm using HBeAg and ALT level could be an effective strategy to identify HBV-infected pregnant women at risk of perinatal transmission in countries where HBV DNA quantification is not routinely available.

Keywords. hepatitis B; mother-to-child transmission; HBeAg rapid test; public health; Western-Pacific area.

Among the estimated 257 million people living with hepatitis B virus (HBV) infection, 45% are in the Western Pacific Region [1, 2]. The World Health Organization (WHO) aims to eliminate viral hepatitis as a public health threat by 2030 by reducing the incidence and mortality of chronic HBV infection by 90% and 65%, respectively [3]. Most of the HBV epidemic is driven by perinatal transmission—infection transmitted from

mother to child during the third trimester of pregnancy in utero or at delivery [4]. Universal immunization remains the first-line prevention against perinatal infection for all infants. The WHO recommends at least 3 doses of HBV vaccination for all children worldwide, with the first dose to be administered at birth. However, mother-to-child transmission (MTCT) still occurs in infants born from women with a high HBV DNA viral load and/or with a positive hepatitis B e antigen (HBeAg) test [5–7]. International guidelines (American Association for the Study of Liver Diseases, Asian Pacific Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of the Liver) recommend the use of antiviral drugs during the third trimester of pregnancy if maternal HBV DNA viral load is greater than $5.3 \log_{10}$ IU/mL [8–10], in addition to HBV vaccine with or without anti-hepatitis B immunoglobulin (HBIG). However, the paucity of HBV DNA measurement in many low- and middle-income countries (LMICs) presents a major obstacle to identifying women at risk of MTCT who require these

Received 20 August 2019; editorial decision 4 March 2020; accepted 18 March 2020; published online March 19, 2020.

Correspondence: O. Segeral, ANRS, University of Health Sciences, 73 Preah Monivong Boulevard, Phnom-Penh, Cambodia (oliseq@hotmail.com, olivier_segeral@uhs.edu.kh).

Clinical Infectious Diseases® 2020;71(10):e587–93

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com DOI: 10.1093/cid/ciaa282

additional preventive strategies. A positive HBeAg test is associated with high HBV DNA levels [6] and, therefore, can act as a surrogate marker of HBV replication, including in women of childbearing age [11].

In Cambodia, HBV prevalence ranges from 3% to 5% in the general population [12, 13], but the vast majority of pregnant women are not screened for HBV infection during antenatal care (ANC). For those who are hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive, HBV DNA quantification is costly and accessible in only a few laboratories located in Phnom Penh, the capital city of Cambodia. As recently described in the Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS) 12328 study in Cambodia, the performance of the SD Bioline HBeAg rapid diagnosis test (RDT) has a 76.5% sensitivity and a 96% specificity to predict a threshold of 5.3 log₁₀ IU/mL of HBV DNA [14]. Sensitivity issues for this RDT seem relate to mutations in the basal core promoter (BCP) and precore (PC) genes [14] responsible for down-regulation of HBeAg production despite HBV DNA and alanine aminotransferase (ALT) levels remaining elevated. Therefore, we questioned whether we could improve the sensitivity of HBeAg RDT to predict HBV DNA viral load thresholds if ALT level was added to the algorithm for women with a negative HBeAg RDT.

The objective of the study was to evaluate the performance of an algorithm selecting HBeAg-positive women and HBeAg-negative women with ALT of 40 IU/L or higher as a predictor of high HBV DNA viral load to identify pregnant women most at risk of HBV MTCT in Cambodia.

METHODS

Data Collection

The present analysis is part of the ANRS 12345-TA PROHM study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02937779), which has been implemented in Cambodia since October 2017. It is a phase IV, multicenter, observational and interventional prospective study conducted in 5 maternity wards (2 in Phnom Penh and 3 in province) aimed at assessing the effectiveness of a strategy to prevent HBV MTCT based on the following: (1) use of an HBsAg and HBeAg RDT serial algorithm to identify women at risk of MTCT, (2) tenofovir disoproxil fumarate (TDF) treatment from 24 weeks of pregnancy in women positive for both HBsAg and HBeAg RDT, and (3) early vaccination at birth (<2 hours of life) for all newborns. Women with a positive HBeAg RDT are treated with TDF, with a daily administration of one 300-mg pill, from 24 weeks of amenorrhea until 8 weeks postpartum. For women with their first ANC visit after 24 weeks of amenorrhea, treatment begins on the day of inclusion. For women needing HBV treatment for themselves, TDF is funded by the study until 24 weeks postpartum, followed by referral to the hepatology unit of 1 national hospital involved in the study to continue care and treatment. Women with a negative HBeAg RDT women are

not treated with TDF but remain in the study for follow-up. In all cases, vaccination of the newborn is performed according to the Cambodian national protocol—1 injection at birth and 6, 10, and 14 weeks of age, with the first dose of vaccine provided within the first 2 hours of life.

The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected by a priori approval by the Cambodian National Ethics Committee for Health Research (NECHR). Each participant signs an informed-consent form.

Algorithms

In the current ANRS 12345-TA PROHM study, a positive HBeAg RDT identifies pregnant women eligible for the TDF preventive strategy. Here, we proposed a new algorithm using 2 biological markers (HBeAg RDT and ALT) to identify women eligible for TDF (Figure 1). The threshold of 40 IU/L for ALT level was chosen based on the publication of the TREAT-B score in Africa [15].

Biological Analysis

Two HBV RDTs were performed following a sequential testing algorithm. First, all pregnant women were tested with the SD BIOLINE HBsAg RDT (Standard Diagnostics [SD], Inc, Kyonggi-do, Korea). All samples found positive for HBsAg RDT were further assayed with the SD BIOLINE HBeAg RDT. HBV DNA quantification was performed in the Virology Unit of the Institut Pasteur du Cambodge using a quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay targeting the S gene of HBV (PUMA HBV kit; Omunis, Clapiers, France). ALT level was measured on the ABX PENTRA C400 by using the IFCC method (UV without pyridoxal phosphate).

Statistical Analysis

Summary statistics are presented as percentages, medians, and interquartile ranges (IQRs). Wilcoxon test and Fisher tests were

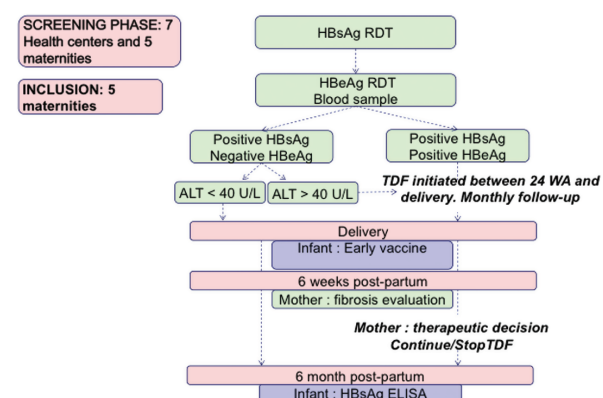


Figure 1. Description of the evaluated algorithm. Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; ELISA, enzyme-linked immunoassay; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; RDT, rapid diagnosis test; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; WA, weeks of amenorrhea.

applied to test differences. Spearman correlation was used to assess the association between 2 quantitative variables.

The validity of HBeAg RDT to identify HBV DNA viral load higher than 2 thresholds (5.3 and 7.3 log₁₀ IU/mL) was evaluated using sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values obtained with asymptotic 95% confidence intervals (95% CIs). Interpretation of positive and negative predictive values is related to the prevalence of high HBV DNA among HBsAg-positive women calculated in this population. The threshold of 7.3 log₁₀ IU/mL was chosen to identify highly viremic women, those most at risk of MTCT [6].

The validity of the new algorithm for selecting not only an HBeAg-positive RDT but also an HBeAg-negative RDT with ALT of 40 IU/L or greater as a predictor of high HBV DNA viral load level was evaluated with the same thresholds (5.3 and 7.3 log₁₀ IU/mL).

Receiver operating characteristic (ROC) curves were obtained to assess the reference cutoff value of 40 IU/L for ALT. Cutoff values were characterized by the usual criteria based on the Youden index (ie, specificity + specificity - 1) and the minimal-distance-to-0,1 (ie $\sqrt{[1 - \text{sensitivity}]^2 + [1 - \text{specificity}]^2}$). A nonparametric approach was used to compare the areas under the ROC curve (AUC) of the current and the new algorithms with DeLong's method [16] in the LOGISTIC procedure in SAS/STAT. All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Participants' Characteristics at Inclusion

From 4 October 2017 to 19 December 2018, 519 HBsAg-positive women were enrolled in the ANRS 12345-TA PROHM study and 515 were retained in the analysis. Median age was 29 years (26–33 years), 92 (17.9%) were HBeAg positive, and 47 (9.1%) were HBeAg negative with an ALT of 40 IU/L or greater. HBV DNA viral load greater than 5.3 log₁₀ IU/mL was found in 144 (28.0%), and 96 (18.6%) had an HBV DNA level greater than 7.3 log₁₀ IU/mL. Characteristics of the participants are reported in Table 1.

Overall, HBsAg-positive women with HBV DNA greater than 5.3 log₁₀ IU/mL were significantly younger, had a higher

frequency of HBeAg RDT positivity, and a higher frequency of ALT level of 40 IU/L or greater.

Correlation Between HBV DNA Levels and ALT Values in HBeAg-Positive and -Negative Women

A moderate correlation was observed between HBV DNA levels and ALT in HBeAg-negative women ($r = 0.28$, $P < .0001$); however, this association was not observed in HBeAg-positive participants ($r = -0.08074$, $P = .44$) (Figure 2).

Performance of the HBeAg RDT and Novel Algorithm for Identifying HBV DNA Viral Load at Variable Thresholds (5.3 and 7.3 Log₁₀ IU/mL)

The sensitivity and specificity of the HBeAg RDT for identifying viremic samples were 61.8% (95% CI, 53.9–69.7%) and 99.2% (95% CI, 98.3–100%) for HBV DNA levels greater than 5.3 log₁₀ IU/mL and 81.3% (95% CI, 73.4–89.1%) and 96.7% (95% CI, 94.9–98.4%) for HBV DNA levels greater than 7.3 log₁₀ IU/mL, respectively. On an individual level, with a 28% and 18% prevalence of HBV DNA level greater than 5.3 or 7.3 log₁₀ IU/mL among HBsAg-positive women, positive predictive values were 96.7% (95% CI, 93.1–100%) and 84.8% (95% CI, 77.4–92.1%) and negative predictive values were 87% (95% CI, 83.8–90.2%) and 95.7% (95% CI, 93.8–97.7%), respectively. Results are presented in Table 2.

The sensitivity and specificity of the novel algorithm were 79.2% (95% CI, 72.5–85.8%) and 93.3% (95% CI, 90.7–95.8%) for HBV DNA levels greater than 5.3 log₁₀ IU/mL and 92.7% (95% CI, 87.5–97.9%) and 88.1% (95% CI, 85.0–91.2%) for HBV DNA levels greater than 7.3 log₁₀ IU/mL, respectively. On an individual level, with a 28% and 18% prevalence of HBV DNA levels greater than 5.3 and 7.3 log₁₀ IU/mL among HBsAg-positive women, positive predictive values of the novel algorithm were 82% (95% CI, 75.6–88.4%) and 64% (95% CI, 56.1–72.0%) and negative predictive values were 92% (95% CI, 89.3–94.8%) and 98.1% (95% CI, 96.8–99.5%), respectively. Results are presented in Table 3.

The ROC curves showed high AUCs to assess viremic samples (Figure 3). The AUCs for the novel algorithm (0.92 and 0.94 for HBV DNA viral load >5.3 and 7.3, respectively) were significantly greater ($P < .001$) than the AUC for the current algorithm (0.81 and 0.89 for HBV DNA viral load >5.3 and 7.3, respectively).

Table 1. Characteristics of Participants at Inclusion

	Total (N = 515)	HBV DNA >5.3 log ₁₀ IU/mL (n = 144; 28.0%)	HBV DNA ≤5.3 log ₁₀ IU/mL (n = 371; 72.0%)	P
Age, median (IQR), years	29 (26–33)	27 (24–32)	30 (26–34)	<.001
Weeks of amenorrhea at inclusion, median (IQR)	26 (19–34)	25 (18–31.5)	26 (20–34)	.049
Known HBV status, n (%)	237 (46.0)	57 (39.6)	180 (48.5)	.076
Prior HBV treatment, n (%)	22 (4.3)	10 (6.9)	12 (3.2)	.086
Positive HBeAg, n (%)	100 (18.5)	97 (63)	3 (0.8)	<.001
ALT ≥40 IU/L at inclusion, n (%)	62 (12.0)	40 (27.8)	22 (5.9)	<.001
APRI score ≥1.5, n (%)	11 (2.1)	6 (4.2)	5 (1.4)	.082

N = 515.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; APRI, AST to Platelet Ratio Index; AST, aspartate aminotransferase; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; IQR, interquartile range.

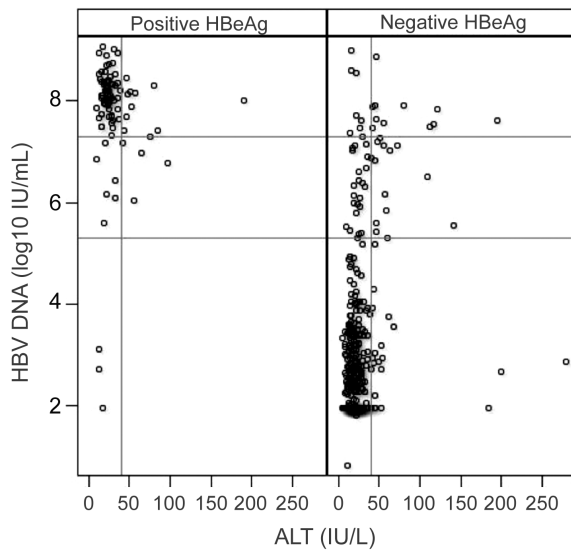


Figure 2. HBV DNA serum levels and ALT values in HBeAg-positive and -negative women (N = 515). Reference lines at HBV DNA = 5.3 and 7.3 log₁₀ IU/mL and ALT = 40 IU/L. Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus.

Similar sensitivity and specificity were observed for the reference level of ALT (40 IU/mL) and for the optimal cutoffs, as well as for the Youden index and the minimum “distance to 0,1” (Table 4).

Characteristics of Participants at Inclusion According to the Outcomes of the Novel Algorithm

Of the 515 pregnant women evaluated, 30 had an HBV DNA level greater than 5.3 log₁₀ IU/mL but were not identified by the novel algorithm (false negative) and 25 were identified by the novel algorithm but did not have an HBV DNA level greater than 5.3 log₁₀ IU/mL (false positive). Characteristics of participants at inclusion according to the outcomes of the novel algorithm are reported in Table 5. For the 30 false-negative women, median HBV DNA was 6.5 log₁₀ IU/mL compared with 7.95 log₁₀ IU/mL in the true-positive women and 23% had HBV DNA greater than 7.3 log₁₀ IU/mL compared with 78% in true-positive women.

DISCUSSION

A simple algorithm selecting HBeAg RDT-positive pregnant women and HBeAg RDT-negative pregnant women with ALT

of 40 IU/L or greater as a predictor of high HBV DNA viral load level has a 79% sensitivity and 93% specificity to predict an HBV DNA level greater than 5.3 log₁₀ IU/mL, which is the threshold used to recommend antiviral preventive strategies. Algorithm sensitivity improved to 92.7% for women with an HBV DNA level greater than 7.3 log₁₀ IU/mL. These women are considered as highly viremic and most at risk for perinatal transmission [6].

When compared with using the HBeAg RDT alone, sensitivity improves by 17% at 5.3 log₁₀ IU/mL and by 11% at 7.3 log₁₀ IU/mL thresholds, respectively. These results are specifically relevant to public health response. Indeed, increasing the ability to detect pregnant women at high risk of HBV MTCT is critical to implement preventive strategies like HBIG and/or antiviral preventive treatment. In 2016, a randomized clinical trial conducted in China in 200 mothers with HBV DNA viral load greater than 5.3 log₁₀ IU/mL demonstrated that short-course TDF administration in addition to immunoprophylaxis of newborns at birth led to a significant decrease in the HBV MTCT compared with placebo [16]. Conversely, a double-blind clinical trial conducted in Thailand reported that maternal use of TDF did not significantly lower the rate of transmission in conjunction with HBIG and HBV vaccine administration very early after birth [17]. However, the 2% rate of perinatal transmission with placebo was much lower than the initially expected 12%, leaving the study underpowered to detect a statistically significant difference [18]. A recent meta-analysis based on 9 studies highlights the efficacy and safety of TDF to prevent HBV MTCT [19]. Furthermore, HBIG remains unavailable and/or unaffordable in many LMICs, including Cambodia, and TDF represents an interesting alternative option as this drug is available through the human immunodeficiency virus (HIV) national programs.

HBV DNA quantification remains the reference method to determine eligibility for alternative preventive strategies. Recently, a point-of-care (POC) GeneXpert (Cepheid) HBV DNA viral load was marketed and 1 article reported good performance compared with the Aptima Quant HBV assay [20]. Further in-field evaluation of this POC assay as a predictive tool for MTCT risk is necessary, and logistical issues remain in terms of costs, availability of tests, and testing platforms. Furthermore, the optimal HBV DNA threshold predicting the risk of MTCT and for deciding preventive therapy needs to be confirmed. A large prospective cohort in China of 1177 mother–infant dyads reported

Table 2. Performance of HBeAg Rapid Diagnosis Test Alone to Predict Hepatitis B Virus DNA >5.3 and 7.3 Log₁₀ IU/mL

HBV DNA Thresholds (log ₁₀ IU/mL)	HBeAg+	HBeAg–	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
>5.3	89	55	61.8 (53.9–69.7)	99.2 (98.3–100)	96.7 (93.1–100)	87.0 (83.8–90.2)
≤5.3	3	368
>7.3	78	18	81.3 (73.4–89.1)	96.7 (94.9–98.4)	84.8 (77.4–92.1)	95.7 (93.8–97.7)
≤7.3	14	405

Abbreviations: CI, confidence interval; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; NPV, negative predictive values; PPV, positive predictive value; +, positive; –, negative.

Table 3. Performance of Novel Algorithm to predict Hepatitis B Virus DNA >5.3 and 7.3 Log10 IU/mL

HBV DNA Thresholds (log ₁₀ IU/mL)	Eligible for TDF With New Algorithm	Noneligible for TDF With New Algorithm	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
>5.3	114	30	79.2 (72.5–85.8)	93.3 (90.7–95.8)	82.0 (75.6–88.4)	92.0 (89.3–94.8)
≤5.3	25	346
>7.3	89	7	92.7 (87.5–97.9)	88.1 (85.0–91.2)	64.0 (56.1–72.0)	98.1 (96.8–99.5)
≤7.3	50	369

Abbreviations: CI, confidence interval; HBV, hepatitis B virus; NPV, negative predictive values; PPV, positive predictive value; TDF, tenofovir disoproxil fumarate.

a 7 log₁₀ IU/mL maternal HBV DNA threshold associated with perinatal transmission of HBV [21].

The WHO global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021 emphasizes the necessity to develop and update

global guidance on a comprehensive package of interventions to eliminate HBV MTCT, including the possible role of perinatal usage of antiviral drugs [3]. While HBV DNA quantification remains the gold standard to identify pregnant women eligible

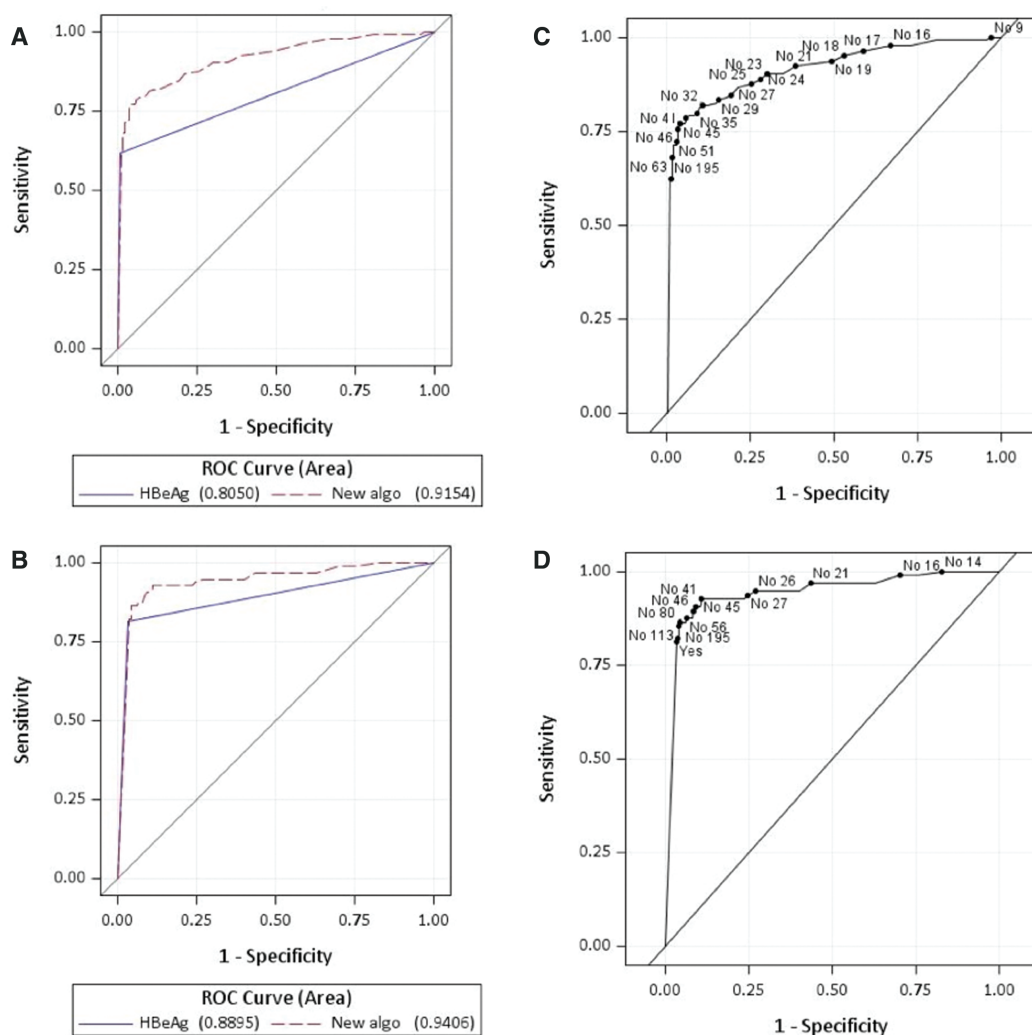


Figure 3. ROC curves for (A) the current algorithm (HBeAg only) and the novel algorithm (HBeAg and ALT) for HBV DNA >5.3 log₁₀ IU/mL, (B) for HBV DNA >7.3 log₁₀ IU/mL, (C) for the novel algorithm (HBeAg and ALT) for HBV DNA >5.3 log₁₀ IU/mL, and (D) for HBV DNA >7.3 log₁₀. Points are labeled with HBeAg positivity and ALT. Abbreviations: algo, algorithm; ALT, alanine aminotransferase; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; ROC, receiver operating characteristic.

Table 4. ROC Curve Analysis—Reference and Optimal Cutoffs

Criterion	ALT Cutoff	Sensitivity	Specificity	Youden Value	Distance to 0,1 Value
HBV DNA >5.3					
Reference	40	0.792	0.933	0.725	0.219
Distance to 0,1	32	0.819	0.889	0.708	0.212
Youden	45	0.771	0.960	0.730	0.232
HBV DNA >7.3					
Reference	40	0.927	0.881	0.808	0.140
Distance to 0,1	41	0.927	0.89	0.817	0.132
Youden	80	0.865	0.955	0.81924	0.142

N = 515.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; HBV, hepatitis B virus; ROC, receiver operating characteristic.

for antiviral drugs, it is crucial to identify alternative strategies in many countries facing challenges in term of access to HBV DNA quantification, including Cambodia, where this study was conducted. In many of those countries, ANC and deliveries are conducted by midwives at the decentralized level (primary health centers, district hospitals) with no access to HBV DNA viral load measurement. On the contrary, liver function tests and HBeAg RDTs could be performed in all district hospitals and these 2 tests could easily be scaled-up in all decentralized areas, resulting in improved availability of testing and subsequent access to TDF prophylaxis. A simple algorithm selecting HBeAg-positive women and HBeAg-negative women with ALT levels of 40 IU/L and higher as eligible for antiviral preventive treatment by TDF in conjunction with immediate HBV vaccination of newborns at birth could be an effective strategy to prevent HBV MTCT, as evaluated in the ANRS 12345-TA PROHM clinical trial.

Utilizing our novel algorithm, 30 women were not identified as being at risk of transmission at an HBV DNA level above 5.3 log₁₀ IU/mL. The majority of these women had an HBV DNA level between 5.3 and 7.3 log₁₀ IU/mL. In true-positive women, HBV DNA was mainly higher than 7.3 log₁₀ IU/mL. Therefore, the risk of perinatal transmission could be lower for these false-negative women but, as stated above, exact thresholds need to be confirmed.

Compared with using the HBeAg RDT alone, this novel algorithm reduces the specificity to predict an HBV DNA level greater

than 5.3 log₁₀ IU/mL from 99% to 93%. This reduction would lead to prescribing TDF to 25 pregnant women of 371 with HBV DNA levels of 5.3 log₁₀ IU/mL or less, so with limited risk of HBV MTCT. The safety of prenatal exposure to TDF has been well documented in association with HIV infection [22, 23], and data on HBV infection point in a similar direction [19, 24]. Therefore, the strategy to decrease specificity but increase sensitivity could be an acceptable trade-off for a public health approach.

Recently, the performance of a simple score (Treat-B score) based on HBeAg and ALT for selecting patients for HBV treatment in Africa was reported [15]. The score of 2 and above (HBeAg-positive and ALT ≥20 IU/L or HBeAg-negative and ALT ≥40 IU/L) had a sensitivity and specificity for treatment eligibility of 85% and 77%, respectively. This algorithm identified patients eligible for treatment in the general population in Africa, thus combining fibrosis, HBV-DNA, and ALT as a gold standard. In our study, adding an ALT measurement for HBeAg-negative women was included because of the lowered sensitivity of the current assay potentially related to the presence of BPC/PC mutations [14]. Indeed, according to the new nomenclature, HBeAg-negative chronic hepatitis B (phase 4) is characterized by the lack of serum HBeAg, persistent or fluctuating moderate to high levels of serum HBV DNA, and fluctuating or persistently elevated ALT values [25]. Most of these subjects harbor HBV variants in the PC and/or the BCP regions that impair or abolish HBeAg expression. Patients carrying these mutations, and more specifically, the precore G1896A mutation, could not express

Table 5. Characteristics of Participants at Inclusion According to the Outcomes of the Novel Algorithm

	False Negative (n = 30)	False Positive (n = 25)	True Negative (n = 346)	True Positive (n = 114)
Age, median (IQR), years	32 (26–34)	32 (30–34)	29.5 (26–33)	27 (23–30)
Weeks of amenorrhea at inclusion, median (IQR)	25.5 (19–30)	28 (18–35)	26 (20–34)	25 (18–32)
Known HBV status, n (%)	10 (33.3)	12 (48)	168 (48.5)	47 (41.2)
Prior HBV treatment, n (%)	0 (0)	1 (4)	11 (3.2)	10 (8.8)
Positive HBeAg, n (%)	0 (0)	3 (12)	0 (0)	89 (78.1)
ALT at inclusion, U/L, median (IQR)	23 (18–27)	44 (42–52)	17 (14–23)	28 (21–46)
ALT ≥40 IU/L at inclusion, n (%)	0 (0)	22 (88)	0 (0)	40 (35)
HBV DNA at inclusion, median (IQR)	6.5 (6–7.3)	2.8 (1.9–3.1)	2.3 (1.95–3)	7.95 (7.5–8.3)
HBV DNA >7.3 log ₁₀ IU/mL, n (%)	7 (23.3)	0 (0)	0 (0)	89 (78.1)

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; IQR, interquartile range.

HBeAg and still suffer from severe liver disease with high HBV DNA levels and persistently elevated ALT values [26]. Therefore, adding an ALT measurement for HBeAg-negative pregnant women could represent an option to identify pregnant women with HBeAg-negative chronic hepatitis B. This information is particularly relevant as these women should probably continue treatment after delivery regardless of the degree of fibrosis [25].

This study does have some limitations. First, we are not able to rule out all the possible reasons for elevated ALT. Coinfections with HIV and hepatitis C virus were excluded as noneligible criteria in the TA PROHM study. However, hepatitis A and hepatitis E virus infections were not screened systematically, and the possibility of traditional or conventional medicine consumption could not be excluded. Second, analyses of BCP/PC mutations were not conducted on samples from the 55 women with negative HBeAg RDT and HBV DNA viral load levels greater than 5.3 log₁₀ IU/mL. Finally, no direct comparison was performed with a strategy using the HBV DNA GeneXpert POC, which could represent an attractive alternative to scale-up access to HBV DNA quantification.

In conclusion, a comprehensive, affordable package of interventions to eliminate HBV MTCT needs to be scaled-up at the decentralized level in order to reach the WHO 2030 target of less than 0.1% prevalence of HBsAg among children. In the absence of increased access to HBV DNA testing, implementation of this novel algorithm could be a timely and highly feasible strategy to improve detection of pregnant women eligible for alternative preventive strategies, specifically in remote areas where many ANC visits take place. The effectiveness and cost-effectiveness of this free-HBIG strategy to reduce HBV MTCT need to be confirmed through the currently ongoing ANRS 12345-TA PROHM study.

Notes

Acknowledgments. The authors thank all of the pregnant women and their families for their participation in the study; all the medical, laboratory, and methodology staff for their contribution to the study; all the members of the Scientific Committee and Data and Safety Monitoring Board for their advice; Professor Laurence Meyer for her support and advice; Claire Rekacewicz, Isabelle Fournier, Nicolas Rouveau, Maria-Camila Calvo Cortes, and Laura Fernandez from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) for their support; and Erik Karlsson for grammatical and textual corrections.

Financial support. This work was supported by the ANRS.

Potential conflicts of interest. The authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

References

- Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* **2015**; 386:1546–55.
- Ott JJ, Horn J, Krause G, Mikolajczyk RT. Time trends of chronic HBV infection over prior decades—a global analysis. *J Hepatol* **2017**; 66:48–54.
- World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. Available at: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/gghs-hep/en/>. Accessed 9 October 2019.
- Shao ZJ, Zhang L, Xu JQ, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a Chinese experience. *J Med Virol* **2011**; 83:791–5.
- Zou H, Chen Y, Duan Z, Zhang H, Pan C. Virologic factors associated with failure to passive-active immunoprophylaxis in infants born to HBsAg-positive mothers. *J Viral Hepat* **2012**; 19:e18–25.
- Wen WH, Chang MH, Zhao LL, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus infection: significance of maternal viral load and strategies for intervention. *J Hepatol* **2013**; 59:24–30.
- Sellier P, Maylin S, Amarsy R, et al. Untreated highly viraemic pregnant women from Asia or sub-Saharan Africa often transmit hepatitis B virus despite serovaccination to newborns. *Liver Int* **2015**; 35:409–16.
- Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH; American Association for the Study of Liver Diseases. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* **2016**; 63:261–83.
- Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int* **2016**; 10:1–98.
- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **2012**; 57:167–85.
- Xu DZ, Yan YP, Choi BC, et al. Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study. *J Med Virol* **2002**; 67:20–6.
- Yamada H, Fujimoto M, Svay S, et al. Seroprevalence, genotypic distribution and potential risk factors of hepatitis B and C virus infections among adults in Siem Reap, Cambodia. *Hepatol Res* **2015**; 45:480–7.
- Sa-Nguanmoo P, Tangkijvanich P, Thawornsuk N, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus among migrant workers from Cambodia, Laos, and Myanmar to Thailand. *J Med Virol* **2010**; 82:1341–9.
- Ségéral O, S N'Diaye D, Prak S, et al. Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study. *J Clin Virol* **2018**; 109:29–34.
- Shimakawa Y, Njie R, Ndw G, et al. Development of a simple score based on HBeAg and ALT for selecting patients for HBV treatment in Africa. *J Hepatol* **2018**; 69:776–84.
- Pan CQ, Duan Z, Dai E, et al; China Study Group for the Mother-to-Child Transmission of Hepatitis B. Tenofovir to prevent hepatitis B transmission in mothers with high viral load. *N Engl J Med* **2016**; 374:2324–34.
- Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Harrison L, et al. Tenofovir versus placebo to prevent perinatal transmission of hepatitis B. *N Engl J Med* **2018**; 378:911–23.
- Terrault N, Brown R, Lok A, et al. Preventing perinatal transmission of hepatitis B necessitates consideration of antiviral treatment in pregnancy. *Hepatology* **2018**; 68:1658–60.
- Li W, Jia L, Zhao X, Wu X, Tang H. Efficacy and safety of tenofovir in preventing mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a meta-analysis based on 6 studies from China and 3 studies from other countries. *BMC Gastroenterol* **2018**; 18:121.
- Abbravanel F, Lhomme S, Trémeaux P, et al. Performance of the Xpert HBV viral load assay versus the Aptima Quant assay for quantifying hepatitis B virus DNA. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2020**; 96:114946.
- Lu Y, Zhu FC, Liu JX, et al. The maternal viral threshold for antiviral prophylaxis of perinatal hepatitis B virus transmission in settings with limited resources: a large prospective cohort study in China. *Vaccine* **2017**; 35:6627–33.
- Sibiude J, Mandelbrot L, Blanche S, et al. Association between prenatal exposure to antiretroviral therapy and birth defects: an analysis of the French perinatal cohort study (ANRS CO1/CO11). *PLoS Med* **2014**; 11:e1001635.
- Brogly SB, Abzug MJ, Watts DH, et al. Birth defects among children born to human immunodeficiency virus-infected women: pediatric AIDS clinical trials protocols 219 and 219C. *Pediatr Infect Dis J* **2010**; 29:721–7.
- Greenup AJ, Tan PK, Nguyen V, et al. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus. *J Hepatol* **2014**; 61:502–7.
- European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **2017**; 67:370–98.
- Lapalus M, Laouenan C, Cardoso AC, et al. Precore/Core promoter variants to predict significant fibrosis in both HBeAg positive and negative chronic hepatitis B. *Liver Int* **2015**; 35:2082–9.

7.3. Conclusion

Cette évaluation a permis de confirmer les résultats obtenus lors de la première évaluation, à savoir une forte spécificité (99%) mais une sensibilité insuffisante (62%) du test AgHBe seul d'identifier les femmes avec un taux d'ADN du VHB > 5,3 Log₁₀ UI/mL. Le nouvel algorithme a une sensibilité de 79 % et une spécificité de 93 % d'identifier les femmes avec un taux d'ADN du VHB > 5,3 Log₁₀ UI/mL. La sensibilité de l'algorithme atteint 92,7 % pour les femmes présentant un taux d'ADN du VHB > 7,3 Log₁₀ UI/mL, qui sont considérées comme des femmes fortement virémiques et les plus à risque de transmission périnatale. En comparaison à une utilisation du test AgHBe seul, le nouvel algorithme permet d'augmenter de 17% la sensibilité pour un niveau de quantification virale supérieur ou égal à 5.3 Log₁₀ UI/mL et de 11% pour un niveau de 7.3 Log₁₀ UI/mL. Cet algorithme permet donc de mieux détecter des femmes nécessitant une couverture antivirale prophylactique au dernier trimestre de la grossesse. L'avantage de cet algorithme est également son utilisation possible en zones décentralisées et pour un coût accessible au système de santé (3 USD pour le test AgHBe et la mesure du taux d'ALAT). L'utilisation de ce nouvel algorithme entraîne une baisse de spécificité de 6% par rapport au test AgHBe seul, ce qui est un compromis acceptable au regard des données de tolérance rassurantes concernant l'utilisation du TDF chez les femmes enceintes.

L'utilisation de cet algorithme pour l'étude TA PROHM a été validé par le comité scientifique de l'étude en octobre 2018 et un amendement au protocole en ce sens a été soumis et approuvé par le Comité d'Éthique Cambodgien en décembre 2018. Il a donc été utilisé dans l'étude à partir de Janvier 2019 et ce, jusqu'à la fin de l'étude.

8. Article 3 de la thèse. « Immunoglobulin-free alternative strategy to prevent HBV mother-to-child transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA-PROHM study »

8.1. Introduction

L'étude TA PROHM a débuté en Octobre 2017, initialement à l'hôpital Calmette et à l'hôpital provincial de Kampong Cham afin de mettre en place progressivement les procédures et les formations dans deux contextes hospitaliers différents. Les autres centres ont ouvert progressivement à la suite. Les dates d'ouverture sont reportées dans le tableau 9.

Au total, d'octobre 2017 à décembre 2019, 21 251 femmes ont été dépistées en consultation anténatale. Parmi elles, 1326 (6.2%) étaient positives pour l'AgHBs. Ce premier résultat ne doit pas être interprété comme une prévalence car l'étude n'a pas été conçue pour cela et le taux élevé retrouvé à l'hôpital Calmette (15.2%) est dû à l'existence d'un des seuls services d'hépatologie de la capitale. Les femmes suivies pour leur infection VHB dans le service étaient de fait, suivies pour leur grossesse dans le même hôpital. La fréquence retrouvée à Siem Reap (4.2%) chez plus de 11 000 femmes reflète plus la réelle prévalence nationale et est proche du taux retrouvé (4.39%) dans l'étude nationale de séroprévalence réalisée en 2017 (42).

Tableau 9 : Dépistage et inclusions dans l'étude TA PROHM

	Nombre de femmes dépistées	Nombre de femmes positives AgHBs	Nombre de femmes incluses dans l'étude	Nombre de femmes éligible au TDF
Hôpital Calmette (Oct 2017)	3773	574 (15.2%)	539 (91.7%)	121 (22.4%)
Centre National de santé Maternelle et infantile (Dec 2017)	1294	83 (6.4%)	74 (89.1%)	17 (23%)
Hopital provincial de Kampong Cham (Oct 2017)	2274	111 (4.9%)	93 (83.8%)	23 (24.7%)
Hopital provincial de Takeo (Feb 2018)	2378	71 (3%)	65 (87.8%)	22 (33.8%)
Hopital Jayavarman VII Siem Reap (Sept 2018)	11532	487 (4.2%)	423 (87.6%)	155 (36.6%)
Total	21251	1326 (6.2%)	1194 (90%)	338 (28.3%)

Parmi les 1326 femmes positives pour l'AgHBs, 1194 (90%) ont pu être incluses dans l'étude dont 338 (28.3%) étaient éligibles au TDF : 86/500 (17.2%) avant l'amendement au protocole et 252/694 (36.3%) après l'amendement.

8.2. L'article 3 (préparé pour une soumission au journal « Lancet Infectious Diseases »)

Immunoglobulin-free alternative strategy to prevent HBV mother-to-child transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA-PROHM study

SEGERAL Olivier, DIM Bunnet, DURIER Christine, NHOUENG Sovann, SOVANN Saren, YIN Song, CHHIM Kearena, TIV Say, SAR Polinn, PECH Sothy, NEM Bunthoeun, HOUT Kay, VONG Chanliina, GUILLEBAUD Julia, NANG Boraneath, CAROUPAYE-CAROUPIN Layana, LAURENT Denis, YAY Chantana, Kim Rattana, MEYER Laurence, CHHUN Samsorphea, BORAND Laurence for the ANRS 12345 Study Group

Background

Among the estimated 257 millions of people living with Hepatitis B virus (HBV) infection, 45% are in the Western Pacific Region, which includes Cambodia¹². Most chronic HBV infections are acquired through perinatal transmission – infection transmitted from mother-to-child during the third trimester of pregnancy in utero or at delivery³⁴. WHO recommends that all infants receive at least three doses of hepatitis B vaccine (HepB), with the first dose administration within the first 24 hours of life (HepB-BD). Birth-dose vaccination is a key intervention for prevention of hepatitis B virus infection and WHO targets to achieve a coverage of 50% by 2020 and 90% by 2030, with special attention given to births occurring outside of health care settings and in remote areas⁵.

Additionally, for newborns born from HBsAg-positive mothers, meta-analyses have suggested that dual immunization with HepB and immunoglobulins (HBIg) could prevent the mother-to-child-transmission (MTCT) of HBV infection⁶⁷ while more recent reviews report uncertainties related to the benefit of such intervention, specifically for Hepatitis B e antigen (HBeAg) negative women at lower risk of HBV MTCT⁸⁹¹⁰. Moreover, given the high cost and limited access to HBIg in many low and middle-income countries, the assessment of HBIg-free regimens was highlighted by WHO as a research gap¹¹.

Despite immunoprophylaxis, MTCT still occurs in infants born from women with a high HBV DNA viral load and/or with positive HBeAg test¹²¹³¹⁴. The WHO global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021 emphasizes the necessity to develop a comprehensive package of interventions to eliminate HBV MTCT, including HBV testing for pregnant women and the role of perinatal intake of prophylactic antiviral drugs⁵. Peripartum antiviral prophylaxis was reported as highly effective at reducing the risk of HBV MTCT¹⁵ and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) was recently recommended by WHO for pregnant women testing positive for

HBV infection with an HBV DNA $\geq 5.3 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}^{11}$. While HBV DNA quantification remains the gold standard to identify pregnant women eligible for antiviral drugs¹⁶¹⁷¹⁸, HBeAg was reported as an effective alternative in settings where HBV DNA assays are unavailable¹⁹¹¹.

In 2017, HBsAg prevalence among pregnant women, young children and infants of HBsAg-positive mothers in Cambodia was estimated to 4.4%, 0.6% and 10.1%, respectively²⁰. Intervention to prevent HBV MTCT is limited to childhood vaccine, with a national coverage close to the 2020 WHO target (88.7% for HepB and 45% for timely birth-dose)²⁰. Antenatal care (ANC) and deliveries are mainly conducted by midwives at the decentralized level (primary health centers, district hospitals) where screening of HBV infection is not routinely performed and access to HBIg and HBV DNA quantification is extremely limited. However, two plasmatic HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests (RDTs) are available in the country and their use was reported as a feasible approach to screen women in ANC and to identify HBV-infected pregnant women at risk of MTCT²¹. Therefore, we designed an immunoglobulin-free strategy using HBsAg/HBeAg RDTs algorithm to screen HBV infection and assess eligibility for TDF prophylaxis, combined with an early vaccination of new-born.

Methods

Study design and population

A phase 4 multicentre interventional prospective study was conducted from October 2017 to November 2020 in 5 maternities in Cambodia (2 national hospitals in Phnom Penh and 3 provincial hospitals in Siem Reap, Kampong Cham and Takeo). The objective was to evaluate the effectiveness of a HBIg-free strategy to prevent HBV MTCT in Cambodia based on: 1/ use of HBsAg/HBeAg RDTs algorithm to screen pregnant women and assess TDF prophylaxis eligibility 2/ TDF treatment for those eligible, from 24 weeks of amenorrhea including a "test and treat" strategy for those seen later 3/ early vaccination for all infants at birth (<2 hours of life).

Eligible pregnant women were 18 years old or above and with a positive HBsAg RDT. Women were not included if they had a positive serological test for human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis C virus (HCV), were receiving an anti-HBV treatment on the day of inclusion, had a creatinine clearance of less than 30 ml/minute (according to Cockcroft–Gault formula), had a severe gravid disease the day of inclusion, had evidence of a pre-existing foetal anomaly incompatible with life or had planned to deliver in another maternity than one of the study sites.

There were two steps in the study. At the first step, after signature of the written informed consent form, pregnant women were screened using HBsAg RDT during an ANC visit. Seven primary health centres in Kampong Cham and Takeo provinces were involved in addition to maternities in Phnom Penh and Siem Reap province. In case of positive HBsAg RDT, HIV and HCV RDTs were performed. Women positive for HIV or HCV were not included and referred to HIV national program or hepatology consultation, respectively. The second step only involved HBsAg positive women, who were included after written informed consent, and were assessed for TDF-eligibility. From October 2017 to December 2018, eligibility for receiving 300 mg of TDF administered once daily from 24 weeks of gestation was decided for positive HBeAg RDT women after control of creatinine clearance. From January 2019, the algorithm was adapted to improve the TDF treatment eligibility to a larger proportion of pregnant women at-risk of HBV MTCT, i.e. also including those who were HBeAg-negative women with ALT ≥ 40 IU/L. Following the results of the evaluation performed among the first 515 pregnant women enrolled in the TA-PROHM study²² of an algorithm selecting HBeAg positive women and HBeAg-negative women with ALT ≥ 40 IU/L as a predictor of high HBV DNA viral load level, this algorithm was applied for TDF eligibility. Briefly, when compared to HBeAg RDT alone, the sensitivity of the novel algorithm improved 17 % at 5.3 Log₁₀ IU/mL (61.8% vs 79.2%) and 11 % at 7.3 Log₁₀ IU/mL (81.3% vs 92.7%) thresholds, respectively²². An amendment to use this algorithm was approved by the Scientific Advisory Board and the National Ethics Committee for Health Research (NECHR) in December 2018 and this algorithm was used from January 2019 to the end of enrolments.

Women enrolled before 24 weeks of gestation were appointed for a week-24 consultation to start TDF. Women enrolled at 24 weeks of gestation or later started TDF treatment immediately. Maternal visits were planned every month from TDF initiation to delivery to record potential adverse events and adherence.

No additional protocol visit was planned for women not eligible for TDF prophylaxis until delivery.

At delivery, obstetrical outcomes were recorded. No specific recommendations for labour management, type of delivery and breastfeeding were provided. All infants born in one of the study sites had to receive HepB-BD (at a dose 10 μ g) in delivery room, within the first 2 hours of life. HBIG were not recommended and not funded by the study but could be done upon clinician decision when accessible, which was the case in one of the 5 maternities (Calmette

Hospital in Phnom Penh).

After delivery, maternal and infants' visits were scheduled at 6 weeks and 6 months postpartum. At 6 weeks postpartum, women liver disease assessment included biological samples, APRI score, Transient Elastography (Fibroscan) and liver ultrasound. For TDF-treated women, decision to continue or stop treatment was made by an external committee of clinicians within the 2 weeks after liver disease assessment.

Following the birth-dose, infants' vaccine schedule followed the Cambodian national protocol with one injection of pentavalent vaccine (DTP-HepB-HIB3) at 6, 10 and 14 weeks of age.

The last study visit was planned at 6 months postpartum. At this visit, infants had blood samples for the determination of HBsAg by ELISA and in case of positivity, an HBV DNA quantification was performed. Women had a last blood sample including HBV DNA and ALT/AST measurement.

Outcomes

The primary outcome was the percentage of active HBV infection in infant at 6 months of life estimated by plasmatic HBsAg positivity, confirmed by positive HBV DNA quantification. Infants lost to follow-up (LTFU) or who withdrew before 6 months and infants dead for other reasons than liver disease were not included in the primary outcome analysis.

The secondary outcomes were the percentages of women and infants not reaching the last study visit, the proportion of women starting TDF among those eligible, the proportion of TDF-treated women with adherence > 90%, the proportion of women with HBV DNA < 5.3 Log₁₀ IU/mL at delivery, the proportion of women needing TDF continuation in postpartum and the occurrence of serious adverse events and grade 3-4 adverse events (ANRS grading table).

Biological analysis

HBsAg and HBeAg RDTs were performed following a sequential testing algorithm. First, all pregnant women were tested with the SD BIOLINE HBsAg RDT (Standard Diagnostics [SD], INC., Kyonggi-do, Korea). Women positive for HBsAg RDT were further tested with the SD BIOLINE HBeAg RDT (Standard Diagnostics [SD], INC., Kyonggi-do, Korea). HBV DNA quantification was performed using a quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) assay targeting the S gene of HBV (PUMA HBV kit, Omunis, Clapiers, France). Results AST/ALT level was measured on ABX PENTRA C400 by method IFCC (UV without pyridoxal phosphate).

Ethical considerations

The study was conducted according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of

Helsinki and was approved by the Cambodian NECHR. Each included participant has signed two informed consent forms corresponding to the screening phase and to the inclusion phase of the study, respectively. A data and safety monitoring board and a Scientific Advisory Board annually reviewed the study progress and safety data.

Statistical analysis

The sample size was calculated for an expected percentage of infants with positive HBs Ag at 6 months of 3% and a two-sided 95% confidence interval (CI) using the normal approximation extending 2% from the observed proportion. A sample size of 295 TDF-eligible women was required, assuming 5% of lost to follow-up.

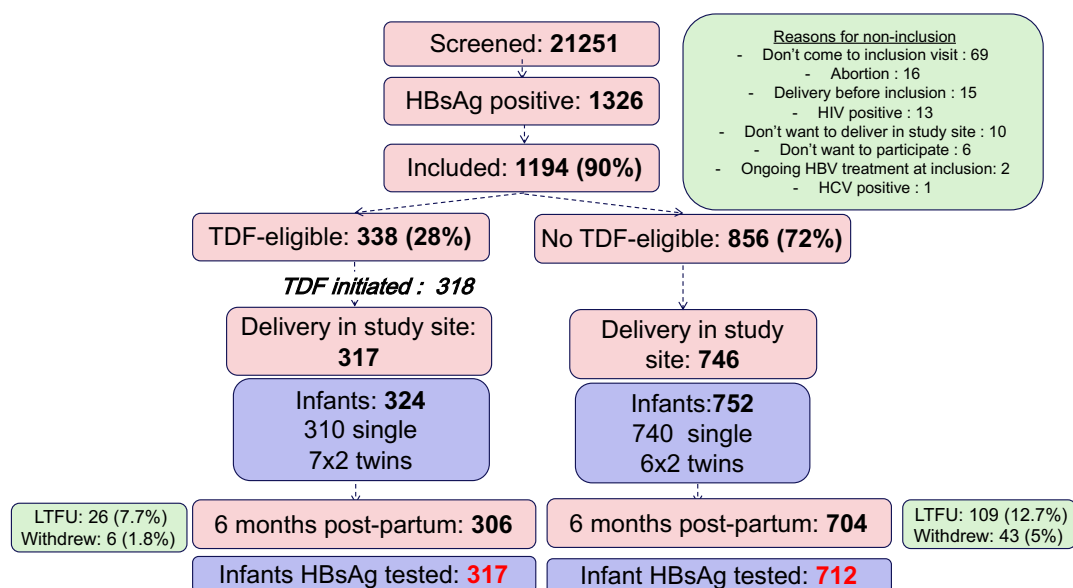
All included women were used in the descriptive analyses at inclusion and for safety analyses. Data from women and infants with 6 months post-partum visit were included in the efficacy analyses. Women who delivered in study sites and their infants contributed to the descriptive analyses at delivery and data from TDF-treated women were used for adherence analysis until delivery. Data were presented for each treatment group: TDF-eligible and TDF-ineligible women.

For the primary outcome, the percentages, and their 95% confidence intervals, of infants with a positive HBsAg at 6 months of life were stratified according to infant's HBIg status or duration of TDF treatment. Grade 3-4 adverse events (ANRS grading table) and serious adverse events were analysed descriptively: occurrence of at least once of a grade 3-4 adverse event and/or serious adverse event, occurrence of at least once of a grade 3-4 adverse event and/or serious adverse event related to liver cytolysis and types of adverse events according to MedDRA version 24.0. Adherence was calculated as the percentage of adherence using pill count data (number of pills actually taken/number of pills that should have been taken) at each visit before the delivery. If the difference between the number of pills taken and the number of pills that should have been taken was above 1, adherence was classified as 'over adherence'. For percentages, binomial exact 95% confidence intervals were used. No imputation of missing data was performed. All analyses were conducted with R version 3.6.2.

Results

From October 2017 to December 2019, 21251 pregnant women were screened, 1326 (6.2%) were positive for HBsAg and 1194 (90%) were enrolled in the study. The reasons for non-inclusion are reported in Figure 1.

Figure 1: Screening, enrolment and follow-up of participants



Characteristics of participants at inclusion

Women eligible for TDF-prophylaxis were significantly younger, more frequently primiparas and less frequently aware of their HBV status (Table 1). The median HBV DNA was 7.91 log₁₀ IU/mL (IQR, 6.42-8.37) in TDF-eligible women as compared to 2.51 log₁₀ IU/mL (IQR, 1.95-3.58) in TDF-ineligible women (p<0.001). Of note, 11% of not TDF-eligible women had an HBV DNA > 5.3 log₁₀ IU/mL at inclusion.

Among the 338 women eligible for TDF-prophylaxis, 318 (94%) started TDF treatment. Among the 20 women not started on TDF, 13 were lost to-follow-up (but 6 came back for delivery), 4 underwent an abortion, 2 withdrew and 1 refused to start TDF but continued to be followed.

Table 1: Characteristics of women at inclusion (N=1194)

Variable	Overall, N = 1,194 ¹	TDF-eligible group		p-value ²
		No, N = 856 ¹	Yes, N = 338 ¹	
Age (y)	29 (26-33)	30 (27-34)	27 (24-31)	<0.001
Primiparous	510 (42.7%)	339 (39.6%)	171 (50.6%)	<0.001
Term pregnancy (w)	23 (19-31)	24 (20-31)	23 (18-27)	<0.001
Term pregnancy >32 weeks	249 (20.9%)	199 (23.2%)	50 (14.8%)	0.001
Known HBV status	441 (36.9%)	339 (39.6%)	102 (30.2%)	0.002
HBeAg+	253 (21.2%)	0 (0.0%)	253 (74.9%)	<0.001
ALT ≥40 & HBeAg -	119 (10.0%)	34 (4.0%) ³	85 (25.1%)	<0.001
HBV DNA median (IQR)	3.11 (1.95-6.67)	2.51 (1.95-3.58)	7.91 (6.43-8.37)	<0.001
HBV DNA > 5.3 log ₁₀ IU/mL	367 (30.7%)	94 (11.0%)	273 (80.8%)	<0.001

Variable	TDF-eligible group			p-value ²
	Overall, N = 1,194 ¹	No, N = 856 ¹	Yes, N = 338 ¹	

¹Median (IQR) or Frequency (%)

²Wilcoxon rank sum test; Pearson's Chi-squared test

³Before amendment of the protocol

Obstetrical outcomes and characteristics of infants at birth

Obstetrical outcomes and characteristics of infants at birth were recorded for 317 TDF-eligible women and their 324 related infants and 746 TDF-ineligible women and their 752 related infants. Results are reported in Tables 2 and 3.

Table 2: Characteristics of women at delivery (N=1063)

Variable	TDF-eligible group	
	No, N = 746 ¹	Yes, N = 317 ¹
Number of infants		
Birth of a single infant	740 (99.2%)	310 (97.8%)
Twin birth	6 (0.8%)	7 (2.2%)
Delivery outcomes		
Live birth	740 (99.2%)	316 (99.7%)
Stillbirth antepartum	6 (0.8%)	1 (0.3%)
Type of delivery ²		
Vaginal	574 (77.2%)	265 (83.9%)
C-section	169 (22.7%)	51 (16.1%)
Gestational age ³		
Median (IQR)	39 (38, 40)	39 (38, 40)
<32	7 (0.9%)	2 (0.6%)
[32-36]	43 (5.8%)	18 (5.7%)
≥ 37	687 (93.2%)	296 (93.7%)
Duration of TDF (weeks) median (IQR)		13.6 (8.9, 14.9)
≤ 4		46 (14.5%)
>4		261 (82.3%)
Never started treatment		10 (3.2%)
HBV DNA ≤ 5.3 Log ₁₀ IU/mL ⁴	580 (90.3%)	237 (82.9%)
Delta HBV DNA from inclusion to delivery Log ₁₀ IU/mL, median (IQR)	0.00 (-0.50, 0.18)	-3.49 (-4.54, -1.85)

Variable	TDF-eligible group	
	No, N = 746 ¹	Yes, N = 317 ¹

¹n (%); Median (IQR)

²Missing data: 3 in not TDF-eligible group and 1 in TDF-eligible group

³Missing data: 9 in not TDF-eligible group and 1 in TDF-eligible group

⁴Missing data: 104 in not TDF-eligible group and 31 in TDF-eligible group

Table 3: characteristics of infants at birth (N=1076)

Variable	TDF-eligible group	
	No, N = 752 ¹	Yes, N = 324 ¹
Weight (g)	3,100 (2,850, 3,400)	3,000 (2,800, 3,400)
Height (cm)	50 (48 - 50)	49 (48 - 50)
Head circumference (cm)	33 (32 - 34)	32 (32 - 33)
HBIG done at birth ²		
No	626 (83.7%)	278 (86.6%)
Yes	122 (16.3%)	43 (13.4%)
HBV vaccine < 2 hours after birth ³	589 (87.5%)	267 (88.7%)
HBV vaccine < 24 hours after birth ⁴	701 (96.2%)	309 (97.5%)
Time from birth to HBV vaccine (minutes) ³	15 (10 - 45)	15 (10 - 40)
HBV vaccine ≤ 7 days after birth ⁴	729 (100.0%)	317 (100.0%)

¹n (%); Median (IQR)

²Missing data: 4 in not TDF-eligible group and 3 in TDF-eligible group

³Missing data for time of vaccine: 79 in not TDF-eligible group and 23 in TDF-eligible group

⁴Missing data for date of vaccine: 23 in not TDF-eligible group and 7 in TDF-eligible group

For TDF-eligible women, the median duration of effective treatment was 13.6 weeks (IQR, 8.9 - 14.9), 14.5% were treated for less than one month and 3.2% never initiated the treatment. The proportion of women with HBV DNA at delivery < 5.3 Log₁₀ IU/mL was 89.8% for those treated for more than one month as compared to 50% for those treated less than one month (p<0.001).

The median time from birth to the administration of the first dose of hepatitis B vaccine was 15 minutes (interquartile range, 10 – 40). More than 85% of infants received the first dose of HBV vaccine within 2 hours of life and more than 95% within 24 hours of life. The proportion of infants who received HBIG was 13% in the TDF-eligible group and 16% in the TDF-ineligible group.

Efficacy

The primary outcome was evaluated in 317 infants in the TDF-eligible group and in 712 infants in the TDF-ineligible group. Results are reported in Table 4.

In the primary analysis, 4 out of 317 infants (1.26%, 95% CI 0.34 - 3.20) had HBV infection at 6 months in the TDF-eligible group and 7 of 712 infants (0.98%, 95% CI 0.40 - 2.02) in the TDF-ineligible group. In the subgroup of infants not receiving HBIg, 4 out of 271 infants (1.48%, 95% CI 0.40 - 3.74) had HBV infection at 6 months in the TDF-eligible group and 6 of 567 infants (1.06%, 95% CI 0.39 - 2.30) in the TDF-ineligible group.

For TDF-eligible women, none of the 254 infants (0%, 95% CI 0 - 1.41) in total and none of the 227 infants not receiving HBIg (0%, 95%CI 0 – 1.61) had HBV infection at 6 months when TDF treatment was taken for more than 4 weeks before delivery. In comparison, 3 of 46 infants (6.52%, 95%CI 1.37 - 17.90) in total and 3 of 36 infants not receiving HBIg (8.33%, 95%CI 1.75 - 22.47) had HBV infection at 6 months when TDF was started but taken for 4 weeks or less before delivery.

All TDF-eligible mothers of the 4 HBV-infected infants were HBeAg positive and had an HBV DNA > 8 Log₁₀ IU/mL at inclusion. For 3 of these women, TDF was initiated at 34, 36 and 37 weeks of amenorrhea respectively and the last one never started TDF. Maternal HBV DNA at delivery ranged from 3.3 to 6.6 log₁₀ IU/mL for 3 women and was missing for the women who never started TDF as she did not deliver in a study sites. All infants received the first dose of vaccine within the first 2 hours of life and did not receive HBIg.

All TDF-ineligible mothers of the 7 infants HBV-infected were HBeAg negative with ALT < 40 U/L and had an HBV DNA > 5.3 log₁₀ IU/mL at inclusion. Maternal HBV DNA at delivery ranged from 4 to 8.9 Log₁₀ IU/mL for 6 women (one missing data). Six on seven infants received vaccine in less than 2 hours of life, one in less than 24 hours and one infant received HBIg.

Table 4: Primary outcomes (N= 1029)

Variable	TDF-eligible group			
	No, N = 712 ¹		Yes, N = 317 ¹	
	n [N]	%[95%CI]	n [N]	%[95%CI]
Positive HBsAg for infants without HBIg				
Overall	6 [567]	1.06 [0.39-2.30]	4 [271]	1.48 [0.40-3.74]
According to TDF duration				
≤ 4 weeks			3 [36]	8.33 [1.75-22.47]
>4 weeks			0 [227]	0 [0-1.61]
Never started treatment			1 [8]	12.5 [0.32-52.65]

Positive HBsAg whatever HBIg status

Variable	TDF-eligible group			
	No, N = 712 ¹		Yes, N = 317 ¹	
	n [N]	%[95%CI]	n [N]	%[95%CI]
Overall	7 [712]	0.98 [0.40-2.02]	4 [317]	1.26 [0.34-3.20]
According to TDF duration ²				
≤ 4 weeks			3 [46]	6.52 [1.37-17.90]
>4 weeks			0 [254]	0 [0-1.44]
Never started treatment			1 [10]	10 [0.25-44.50]

¹ n [N]: number of event, number of participants

² 0[7]: Missing data

Table 5: Secondary outcomes

Variable	TDF-eligible group			
	No		Yes	
	n[N] ¹	%[95%CI]	n[N] ¹	%[95%CI]
Proportion of eligible women starting TDF			318	94.1 [91.0-96.3]
Proportion of TDF-treated women with adherence > 90%			212 [269]	78.8 [73.4-83.5]
Women LTFU/withdrawal at 6 months	152 [856]	17.8 [15.3-20.5]	32 [338]	9.5 [6.6-13.1]
Infants LTFU/withdrawal from birth to 6 months	121 [843]		20 [339]	
HBV DNA ≤ 5.3 Log IU/mL at delivery according to TDF duration²				
≤ 4 weeks			22 [44]	50.0 [34.6-65.4]
>4 weeks			212 [236]	89.8 [85.2-93.4]
Never started treatment			3 [6]	50.0 [11.8-88.2]
TDF indication in postpartum³				
TDF continuation			117 [296]	39.5 [33.9-45.3]
TDF stopping			179 [296]	60.5 [54.7-66.1]
Any AE grade 3,4 or SAE in women	50 [856]	5.8 [4.4-7.6]	47 [338]	13.9 [10.4-18.1]
Any AE grade 3,4 or SAE in women related to elevated ALT	20 [856]	2.3 [1.4-3.6]	42 [338]	12.4 [9.1-16.4]
Any AE grade 3,4 or SAE in infants	35 [843]	4.2 [2.9-5.7]	20 [339]	5.9 [3.6-9.0]

¹ n [N]: number of event, number of participants

² Missing data: 52

³ 22 TDF-treated women missed the evaluation

Safety

A total of 105 women (31%, 95%CI: 26.2-36.3) in the TDF-eligible group and 128 women (15%,

95%CI: 12.6-17.5) in the TDF-ineligible group experienced at least one adverse event. In the TDF-eligible group, the most frequent event was elevation of ALT (in 79 women [23.4%]), followed by peripartum conditions (in 25 women [7.4%], including two stillbirth). In the TDF-ineligible group, the most frequent event was peripartum conditions (in 67 women [7.8%], including 10 stillbirth), followed by elevation of ALT (in 41 women [4.8%]). A total of 42 women (12.4%, 95% CI: 9.1-16.4) in the TDF-eligible group and 20 women (2.3%, 95%CI: 1.4-3.6) in the TDF-ineligible group experienced at least one adverse event grade 3 or 4 or a serious adverse event related to elevation of ALT.

A total of 46 infants (13.6%, 95%CI: 10.1-17.7) in the TDF-eligible group and 69 infants (8.2%, 95%CI: 6.4-10.2) in the TDF-ineligible group experienced at least one adverse event. Perinatal/postnatal deaths occurred for 2 infants (0.6%) in the TDF-eligible group and 10 infants (1.2%) in the TDF-ineligible group. The most frequent event was low birth weight (in 26 infants [7.7%] in the TDF-eligible group and 34 [4%] in the TDF-ineligible group).

Discussion

An immunoglobulin-free strategy using an HBeAg RDT/ALT-based algorithm to assess eligibility for TDF prophylaxis associated to an early vaccination in the delivery room could reduce HBV MTCT to 1.48% [95% CI, 0.40 - 3.74] for TDF-eligible pregnant women and to 1.06% [95% CI, 0.39 - 2.30] for TDF-ineligible women. For TDF-eligible women, the HBV transmission rate was 0% [95% CI, 0 - 1.41] for those treated more than one month and 8.33% [IC95%, 1.75 – 22.5] for those treated less than one month. Early vaccination in delivery room within the first 2 hours of life was feasible for more than 85% of infants.

To our knowledge, our study is the first large study evaluating an immunoglobulin-free strategy using TDF prophylaxis. Based on a recent meta-analysis¹⁵, WHO recommended TDF for pregnant women tested positive for HBV infection with an HBV DNA $\geq 5.3 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$. In this meta-analysis, the 19 studies using TDF prophylaxis reported a protective effect of maternal antiviral prophylaxis during pregnancy for the prevention of MTCT (OR: 0.16 (0.10 – 0.26)), all associated with birth-dose vaccine and HBIg. In the majority of these randomized controlled trials (RCTs), the transmission rate in the TDF arm, in per protocol analysis, was 0%^{23,24,25}, excepted for one trial in which one infection occurred, possibly related to amniocentesis²⁶. In all these trials, TDF was initiated between 24 and 32 weeks of pregnancy. In accordance with these RCTs, but in absence of HBIg, no transmission occurred in our study

when TDF was initiated before 32 weeks while, for the 4 infants HBV-infected, TDF was initiated after 32 weeks of pregnancy for 3 women and one never started the treatment. For all these women, the maternal HBV DNA at inclusion was above 8 Log₁₀ IU/mL and ranged from 3.3 to 6.6 Log₁₀ IU/mL at delivery. Despite the rapid decrease of HBV DNA viral load during the first month of TDF-treatment³², a late administration of TDF is probably not enough to reduce the HBV DNA viral load below the threshold required to prevent transmission in highly viremic women. This result highlights the importance to provide HBV testing as early as possible during pregnancy to enable pregnant women to benefit most from early antiviral preventive strategies.

For TDF-ineligible women, among the mothers of the 7 infants HBV-infected, all of them had an HBV DNA > 5.3 Log₁₀ IU/mL while the HBeAg RDT/ALT algorithm was negative. A point-of-care (POC) GeneXpert (Cepheid) HBV DNA viral load is now marketed and one recent article reported a good correlation between the GeneXpert POC and Roche and Abbott assays²⁷ with the greatest discrepancies seen at the limits of quantification, which is not problematic in the context of PMTCT. Implementation of this POC HBV DNA viral load in rural setting is feasible as GeneXpert machines are already available for tuberculosis diagnosis in many referral hospital laboratories. However, logistical issues remain in terms of costs, availability of cartridges and availability of testing platforms. By using plasmatic rapid tests and ALT measurement, the TA-PROHM algorithm could easily be scaled-up in all referral hospital laboratories at low cost (three to four dollars for the two tests), resulting in improved availability of testing and subsequent access to TDF prophylaxis. Highly specific, this algorithm could be used as a triage option in a public health approach, the HBV DNA viral load being reserved only for women negative for the HBeAg RDT/ALT-based algorithm, which represent 69% of positive HBsAg women in our study.

As recognized by WHO in the 2009 report²⁹ and in the March 2015 recommendations³⁰, difficulty in accessing HBIg due to poor availability, high cost and cold chain results in serovaccination failures worldwide²⁸. A decision analysis model performed in Taiwan suggests that the choice of the optimal HBV serovaccination strategy depends on the prevalence of HBV and the willingness-to-pay threshold of countries. For developed countries with adequate financial resources and medical capacity, a strategy combining universal vaccination plus maternal HBsAg screening and HBIg administration to newborns of positive HBsAg mothers would likely be cost-effective and provide the best protection. In contrast, for less developed

countries, an easier and more affordable strategy would be preferable³¹. In Cambodia, access to HBIg is limited to National Hospitals or private clinics in the capital city while the majority of pregnant women are followed in rural settings. The HBIg-free TA-PROHM strategy, could have a main public health impact, allowing decentralization of the PMTCT at the district level where the vast majority of ANC and deliveries occur.

Timely birth-dose vaccination is strongly recommended by WHO and is essential for the earliest HBV post-exposure prophylaxis. Cambodia's Ministry of Health performed numerous efforts to train midwives and health care workers on the importance of hepatitis B vaccination and to promote delivery in health facilities by trained health care workers, which is essential for timely-birth dose administration. Consequently, health facility birth rates increased from below 20% in 2006 to 85% in 2016. However, timely birth dose coverage was estimated to be 45% in 2017, in a national survey and birth outside primary health centres was reported as a risk factor of timely birth-dose failure²⁰. Injection of the first dose of vaccine just after birth, in the delivery room, could be an effective measure to minimize the time after HBV exposure and to avoid missed opportunities. This simple and rapid medical procedure could be integrated into the standard of care of all infants at birth.

Serious adverse events or adverse events grade 3 or 4 related to elevated ALT were more frequent for TDF-eligible women as compared to TDF-ineligible women. The algorithm selecting specifically women with elevated ALT for TDF eligibility and the flare associated to TDF cessation could explain this result. All liver cytolysis resolved spontaneously and no decompensated acute liver cytolysis occurred during the study.

This study has some limitations. First, the proportion of women LTFU/withdrew was 9.5% in the TDF group and 17.7% in the non-TDF group. The high proportion of LTFU was already reported in several RCTs²⁴²⁵, explaining the difference between intent-to-treat and per-protocol analyses in these studies. The decision not to consider as a failure infants LTFU or withdrawn before 6 months was taken when developing the protocol to take into account the common local practice of pregnant women to move just before giving birth and during postpartum to follow their family in law.

In conclusion, an HBIg-free strategy using an HBeAg RDT/ALT-based algorithm to assess eligibility for TDF prophylaxis is very effective to prevent HBV MTCT if TDF is administered for at least one month before delivery. This strategy could have a significant impact on public health by allowing decentralization of HBV PMTCT to rural areas where most of pregnancies

are managed in Cambodia and in many others LMICs. These results need to be complemented by an implementation research to evaluate the efficiency of such a program in rural areas, including the evaluation of drug and reagent supply chains and a cost analysis.

References

- 1 Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015; **386**: 1546–55.
- 2 Ott JJ, Horn J, Krause G, Mikolajczyk RT. Time trends of chronic HBV infection over prior decades - A global analysis. *J Hepatol* 2017; **66**: 48–54.
- 3 Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; **39 Suppl 1**: S64–69.
- 4 Jonas MM. Hepatitis B and pregnancy: an underestimated issue. *Liver Int* 2009; **29 Suppl 1**: 133–9.
- 5 WHO | Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. WHO. <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/> (accessed April 16, 2021).
- 6 Wong VC, Ip HM, Reesink HW, *et al.* Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin. Double-blind randomised placebo-controlled study. *Lancet* 1984; **1**: 921–6.
- 7 Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2006; **332**: 328–36.
- 8 Eke AC, Eleje GU, Eke UA, Xia Y, Liu J. Hepatitis B immunoglobulin during pregnancy for prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **2017**. DOI:10.1002/14651858.CD008545.pub2.
- 9 Chen Z, Zeng M, Liu D, Wu L, Zhang L. Antenatal administration of hepatitis B immunoglobulin and hepatitis B vaccine to prevent mother to child transmission in hepatitis B virus surface antigen positive pregnant women. *Medicine (Baltimore)* 2020; **99**. DOI:10.1097/MD.0000000000019886.
- 10 Machaira M, Papaevangelou V, Vouloumanou EK, Tansarli GS, Falagas ME. Hepatitis B vaccine alone or with hepatitis B immunoglobulin in neonates of HBsAg+/HBeAg- mothers: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 396–404.

- 11 Prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: Guidelines on antiviral prophylaxis in pregnancy. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/978-92-4-000270-8> (accessed Oct 12, 2020).
- 12 Zou H, Chen Y, Duan Z, Zhang H, Pan C. Virologic factors associated with failure to passive-active immunoprophylaxis in infants born to HBsAg-positive mothers. *J Viral Hepat* 2012; **19**: e18-25.
- 13 Wen W-H, Chang M-H, Zhao L-L, *et al.* Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus infection: significance of maternal viral load and strategies for intervention. *J Hepatol* 2013; **59**: 24–30.
- 14 Yi P, Chen R, Huang Y, Zhou R-R, Fan X-G. Management of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: Propositions and challenges. *J Clin Virol* 2016; **77**: 32–9.
- 15 Funk AL, Lu Y, Yoshida K, *et al.* Efficacy and safety of antiviral prophylaxis during pregnancy to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 70–84.
- 16 Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2016; **63**: 261–83.
- 17 Sarin SK, Kumar M, Lau GK, *et al.* Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int* 2016; **10**: 1–98.
- 18 European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017; **67**: 370–98.
- 19 Boucheron P, Lu Y, Yoshida K, *et al.* Accuracy of HBeAg to identify pregnant women at risk of transmitting hepatitis B virus to their neonates: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 85–96.
- 20 Ork V, Woodring J, Shafiqul Hossain M, *et al.* Hepatitis B surface antigen seroprevalence among pre- and post-vaccine cohorts in Cambodia, 2017. *Vaccine* 2019; **37**: 5059–66.
- 21 Ségéral O, S N’Diaye D, Prak S, *et al.* Usefulness of a serial algorithm of HBsAg and HBeAg rapid diagnosis tests to detect pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission in Cambodia, the ANRS 12328 pilot study. *J Clin Virol* 2018; **109**: 29–34.
- 22 Segeral O, Dim B, Durier C, *et al.* HBeAg rapid test and alanine aminotransferase level-based algorithm to identify pregnant women at risk of HBV mother-to-child transmission: the ANRS 12345 TA PROHM study. *Clin Infect Dis* 2020; published online March 19. DOI:10.1093/cid/ciaa282.
- 23 Lin Y, Liu Y, Ding G, *et al.* Efficacy of tenofovir in preventing perinatal transmission of HBV infection in pregnant women with high viral loads. *Sci Rep* 2018; **8**: 15514.

- 24 Pan CQ, Duan Z, Dai E, *et al.* Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission in Mothers with High Viral Load. *N Engl J Med* 2016; **374**: 2324–34.
- 25 Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Harrison L, *et al.* Tenofovir versus Placebo to Prevent Perinatal Transmission of Hepatitis B. *N Engl J Med* 2018; **378**: 911–23.
- 26 Chen H-L, Lee C-N, Chang C-H, *et al.* Efficacy of maternal tenofovir disoproxil fumarate in interrupting mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology* 2015; **62**: 375–86.
- 27 Samadi Kochaksaraei G, Castillo E, Osman M, *et al.* Clinical course of 161 untreated and tenofovir-treated chronic hepatitis B pregnant patients in a low hepatitis B virus endemic region. *J Viral Hepat* 2015; published online July 20. DOI:10.1111/jvh.12436.
- 28 Jackson K, Tekoaoua R, Li X, Locarnini S. Real-world application of the Xpert® HBV viral load assay on serum and dried blood spots. *J Med Virol* 2021; **93**: 3707–13.
- 29 Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; **84**: 405–19.
- 30 Who Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons With Chronic Hepatitis B Virus Infection. World Health Organization, 2015.
- 31 Willis BC, Wortley P, Wang SA, Jacques-Carroll L, Zhang F. Gaps in hospital policies and practices to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus. *Pediatrics* 2010; **125**: 704–11.
- 32 Chen SC-C, Toy M, Yeh JM, Wang J-D, Resch S. Cost-effectiveness of augmenting universal hepatitis B vaccination with immunoglobulin treatment. *Pediatrics* 2013; **131**: e1135-1143.

8.3. Conclusion

En utilisant une stratégie alternative sans HBIg avec utilisation maternelle du TDF basée sur un algorithme AgHBe/ALT et une vaccination très précoce à la naissance, le taux de TME du VHB est de 1.48% [IC95%, 0.40 - 3.74] pour les femmes éligibles au TDF et de 1.06% [IC95%, 0.39 - 2.30] pour celles non-éligibles au TDF. Pour les femmes éligibles au TDF, le taux de transmission est de 0% [IC95%, 0 - 1.41] pour celles traitées pendant plus d'un mois avant l'accouchement et de 8.33% [IC95%, 1.75 – 22.5] pour celles traitées pendant moins d'un mois. Parmi les femmes éligibles, 94% ont pu débuter un traitement par TDF et la vaccination précoce des enfants en salle de naissance dans les 2 et 24 premières heures de vie a été possible pour 85% et 95% d'entre eux, respectivement. Le pourcentage de femmes ayant présentées un évènements indésirables graves et/ou de grade 3 ou 4 en rapport avec une

cytolysé hépatique est significativement plus élevé chez les femmes éligibles au TDF en comparaison aux femmes non-éligibles.

En utilisant un algorithme thérapeutique décisionnel accessibles pour les hôpitaux de districts, cette stratégie sans HBIg pourrait permettre de décentraliser la prise en charge au niveau des districts où la majorité des femmes enceintes sont suivies. Le taux de transmission élevé pour les femmes traitées moins d'un mois plaide en faveur d'un dépistage du VHB le plus précoce possible en consultation anténatale afin d'avoir le temps d'évaluer l'indication thérapeutique prophylactique. L'utilisation de techniques de quantification virale du VHB de type « point of care » pourrait permettre de détecter les faux négatifs avec l'algorithme et réduire ainsi le taux de transmission pour les femmes non-éligibles au TDF. Ces résultats sont à compléter par une recherche d'implémentation afin d'évaluer l'efficacité d'un tel programme en zones rurales incluant l'évaluation des chaînes d'approvisionnement en médicaments et réactifs et une analyse des coûts.

9. Discussion générale

La conception et l'évaluation de la stratégie TA PROHM étaient basées sur 4 fondements que nous allons discuter point par point : 1/ l'utilisation de deux tests rapides pour dépister les femmes enceintes pour le VHB en consultation anténatale et décider ensuite de l'éligibilité au traitement antiviral prophylactique 2/ la faisabilité d'une vaccination très précoce des enfants en salle de naissance 3/ l'efficacité en terme de PTME VHB d'une stratégie sans immunoglobulines 4/ l'efficacité d'une stratégie antivirale prophylactique de rattrapage pour les femmes vues tardivement en consultation anténatale.

Puis, dans un second temps, nous discuterons des possibilités d'implémentation de la stratégie pour un passage à l'échelle au Cambodge.

9.1. L'utilisation des deux tests rapides

9.1.1. L'AgHBs

Dans de nombreux pays à revenus faibles ou intermédiaires, la décentralisation des soins prénataux constitue un défi pour appliquer la recommandation OMS de dépistage systématique et précoce de l'AgHBs pendant la grossesse(31). Comme souligné dans un

document OMS de la région Pacifique Ouest, l'utilisation de TDRs de l'AgHBs pourrait améliorer la couverture du dépistage du VHB, en particulier dans des contextes où l'accès aux tests de laboratoire est limité et/ou dans des populations où l'accès à un test rapide faciliterait le lien avec les structures de soins et de traitement(46). Les résultats présentés dans l'article 1 indiquent que le test plasmatique rapide AgHBs utilisé dans l'étude TA PROHM est un test fiable pour le dépistage de l'infection VHB. Ces résultats sont tout à fait en accord avec d'autres données de la littérature dans des pays à revenus faibles ou intermédiaires (47)(48)(49). Une méta-analyse évaluant plusieurs types de TDR AgHBs sur plasma, sérum ou sang total confirme une sensibilité globale > 90% et une spécificité > 98% en comparaison aux techniques immunoenzymatiques (50). Dans cette même méta-analyse, 8 études présentaient des données sur 5 TDR différents utilisant du sang total ou du sang capillaire avec des sensibilités et spécificités comparables à celles du plasma. Le TDR SD Bioline utilisé dans l'étude TA PROHM est un test plasmatique qui a nécessité la mise en place de centrifugeuses dans les centres de santé pour l'étude, ce qui peut constituer un frein pour un passage à l'échelle de la stratégie. Pendant l'étude, en 2018, la même compagnie SD Bioline a commercialisé un TDR sur sang total avec une évaluation réalisée sur un nombre limité de prélèvements. Dans ce contexte il nous a semblé important, dans le cadre de l'étude, de comparer les résultats du TDR plasmatique et du TDR sur sang total. Aucune discordance entre les deux tests n'a été retrouvée (article joint en annexe 1). L'utilisation de ce nouveau TDR sur sang total pourrait permettre un large accès au dépistage du VHB dans les centres de santé primaires, en complément de celui déjà en place pour le VIH et la syphilis (double test de diagnostic rapide), sous la réserve d'évaluer son utilisation sur le terrain (conservation) et de confirmer ces bons résultats sur sang capillaire.

9.1.2. L'AgHBe

Dans des pays où l'accès à la charge virale VHB n'est pas possible, l'utilisation du test AgHBe comme marqueur substitutif de répllication virale a été récemment recommandée par l'OMS en juillet 2020 (31) suite aux résultats d'une méta-analyse qui retrouvait une sensibilité cumulée de 88.2% et une spécificité de 92.6% de l'AgHBe pour identifier une charge virale supérieure au seuil de 5.3 Log₁₀ UI/mL (51). Dans cette méta-analyse, seules deux études dont l'article 1 de la thèse, utilisaient un TDR AgHBe, toutes les autres études utilisant des

techniques immunoenzymatiques. La sensibilité des TDRs AgHBe semble être inférieure à celle des techniques immunoenzymatiques en laboratoire et pourrait être liée à leur faible sensibilité analytique pour la détection de l'AgHBe(52). Néanmoins, leur possible utilisation en zones décentralisées est un atout majeur pour de nombreux pays de la région où il n'est pas possible d'avoir accès aux techniques enzymatiques ou à la quantification de la charge virale en dehors de la capitale. C'est dans cette optique que nous avons voulu, dans l'article 2, évaluer l'ajout d'une mesure d'ALAT pour améliorer la sensibilité du test rapide AgHBe, sachant que cette mesure était accessible dans les hôpitaux de districts du Cambodge qui disposent d'un laboratoire avec une centrifugeuse pour le test plasmatique AgHBe. Néanmoins, les limites en termes de sensibilité de ce nouvel algorithme rapportées dans l'article 2 (79% pour un seuil à $5.3 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$) pose la question de la gestion des faux négatifs. Récemment une technique de quantification de la charge virale ADN VHB (GeneXpert) réalisable auprès des patients (« point of care », POC) a été commercialisée par une compagnie ayant déjà commercialisé ce type de quantification virale pour le VIH, le VHC ou le papillomavirus. Un article récent fait état d'une bonne corrélation entre cette technique POC et les tests classiques commercialisés pour l'ADN VHB, les écarts les plus importants étant observés aux limites de la quantification, ce qui ne pose pas de problème dans le contexte de la PTME où le but est de détecter les femmes hautement viremiques (53). Des systèmes de type GeneXpert 4 modules sont déjà disponibles dans tous les laboratoires des hôpitaux de districts du Cambodge pour le dépistage de la tuberculose. L'implémentation de ces tests ADN VHB POC pourraient permettre de détecter les faux négatifs avec l'algorithme TA PROHM. Néanmoins, des questions logistiques demeurent comme le coût et la disponibilité des cartouches et des machines ainsi que leurs maintenances dans un contexte d'utilisation déjà importante pour la tuberculose. À l'inverse, l'algorithme TA PROHM pourrait facilement être étendu à toutes les zones décentralisées et à un faible coût. Dans une approche de santé publique, cet algorithme pourrait être utilisé comme une option de triage en raison de sa haute spécificité, la charge virale VHB n'étant réservée qu'aux femmes négatives pour l'algorithme, ce qui représente 70% des femmes incluses dans notre étude.

9.2. La faisabilité d'une vaccination très précoce des enfants en salle de naissance

L'injection de la première dose vaccinale dans les 24 premières heures de vie est fortement

recommandée par l'OMS et essentielle pour permettre une prophylaxie post-exposition la plus précoce possible afin de prévenir la transmission aux nourrissons exposés au VHB en période périnatale. D'après les données de l'OMS-UNICEF, la couverture vaccinale en 2019 était de 88% pour la première dose à la naissance. Cependant, l'étude nationale de séroprévalence VHB mère-enfant, réalisée en 2017, retrouvait une couverture vaccinale de 78% pour la première dose à la naissance mais de seulement 45% pour une administration dans les 24 premières heures de vie. Dans cette même étude, le fait d'accoucher à la maison ou en dehors des centres de santé primaires était retrouvé comme facteur de risque indépendant du fait de ne pas recevoir la première dose vaccinale dans les 24 premières heures de vie (42). Une étude portant sur 142 établissements de santé aux Philippines a révélé que la couverture vaccinale à la naissance était plus faible chez les nouveau-nés dans les hôpitaux privés que chez ceux nés dans les hôpitaux publics(54). La vaccination au Cambodge est sous la responsabilité du programme national d'immunisation ce qui implique que le couple mère/enfant soit référé juste après l'accouchement. Une telle organisation est parfaitement adaptée à la situation des centres de santé primaires où la salle d'accouchement est dans le même bâtiment que la salle de vaccination. En revanche, si le service d'immunisation ne se trouve pas dans la même structure de santé (cliniques privées) ou si les suites obstétricales nécessitent quelques jours d'hospitalisation, ou si la mère et l'enfant sortent du lieu de l'accouchement avant d'avoir pu être référés, cela retarde ou empêche la réalisation de la première injection vaccinale. Il nous est donc paru particulièrement intéressant d'administrer cette injection en salle de naissance dans les 2 premières heures de vie, considérant que cette notion de prophylaxie post-exposition justifiait une intervention immédiate et que cela permettrait de limiter le risque de perte de vue ou de retard d'administration de la première injection vaccinale après l'accouchement. La proportion de nourrissons ayant reçu l'injection vaccinale dans les 2 et les 24 premières heures de vie a été de plus de 85% et 95% respectivement. Deux freins majeurs ont été identifiés :

1- Un accouchement en dehors des centres investigateurs. Malgré que nous ayons prévu dès le départ de ne pas inclure les femmes qui ne souhaitaient pas accoucher dans un des centres de l'étude, 8% des femmes incluses ont été perdues de vue entre l'inclusion et l'accouchement ou nous ont signalé un accouchement en secteur privé. La mobilité en fin de grossesse est décrite au Cambodge, le plus souvent en raison d'un déplacement pour rapprochement familial. Pour la majorité de ces femmes, nous n'avons malheureusement pas pu obtenir

d'informations obstétricales ni avoir de bilan biologique mais la date de la première injection vaccinale a pu être récupérée pour certains enfants grâce au carnet de vaccination lors de la visite ultérieure.

2- La prématurité est souvent jugée par les soignants comme un frein à la vaccination car le nourrisson est jugé « trop faible en poids » pour recevoir le vaccin. Ce constat est d'autant plus préoccupant que le retard à l'injection vaccinale chez les enfants prématurés a été identifié comme un facteur de risque de TME du VHB (55). Nous avons organisé des réunions de formation avec les équipes médicales pour expliquer le risque encouru par les enfants prématurés ne recevant pas la vaccination à la naissance et rappeler que le CDC recommande la vaccination dans les 12 premières heures pour les bébés ayant un poids de naissance de moins de 2 kgs. Néanmoins, dans notre étude, parmi les enfants nés avant 37 semaines d'aménorrhée, la couverture vaccinale à 2 heures était de 80% comparé à 88.5% chez ceux nés après 37 semaines d'aménorrhée ($p=0.05$).

L'injection de la première dose vaccinale en salle de naissance juste après l'accouchement pourrait représenter une mesure de santé publique efficace en mettant en place une prophylaxie post-exposition immédiate et permettrait d'éviter des opportunités manquées. C'est un geste médical simple et rapide qui pourrait être intégré aux soins standards de tous les nourrissons en salle de naissance, sous la responsabilité des sages-femmes déjà habituées à réaliser une injection de vitamine K aux nouveau-nés. Lors de l'implémentation de l'étude, cette nouvelle pratique n'a pas été facilement acceptée par les sages-femmes qui jugeaient que ce n'était pas de leurs responsabilités. Nous avons organisé plusieurs réunions pour expliquer l'importance de cette vaccination précoce et nous avons fournis des réfrigérateurs en salle de naissance pour la conservation des doses vaccinales. Une étude qualitative ultérieure pourrait être utile pour évaluer les freins inhérents à un passage à l'échelle.

9.3. Une stratégie sans immunoglobulines

A notre connaissance, l'étude TA PROHM est la première étude ayant évalué une stratégie de prévention de la TME du VHB avec traitement antiviral prophylactique par TDF sans immunoglobulines. Suite à une récente méta-analyse (56), le TDF a été recommandé par l'OMS pour les femmes enceintes positives pour l'AgHBs présentant un ADN du VHB $\geq 5,3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$. Dans cette méta-analyse, les 19 études utilisant la prophylaxie par TDF ont rapporté un

effet protecteur de la prophylaxie antivirale maternelle pendant la grossesse pour la prévention de la TME (OR : 0,16 (0,10 - 0,26)), toutes associées à la vaccination et aux HBIg. Dans plusieurs de ces études randomisées contrôlées, le taux de transmission était de 0% en analyse per-protocole lorsque le TDF était débuté entre 28 et 32 semaines d'aménorrhée en association avec vaccination et HBIg (57)(36)(37). De la même manière, dans notre étude, le taux de transmission est de 0% pour les 254 femmes traitées par TDF depuis plus d'un mois (soit avant 32 semaines d'aménorrhée) avec une vaccination précoce mais en l'absence d'HBIg. En revanche, ce taux de transmission est de 8% pour les 36 femmes traitées moins d'un mois. Dans notre étude, la moitié des femmes traitées moins d'un mois avaient encore un taux d'ADN VHB > 5.3 Log IU/mL à l'accouchement contre 10% pour celles traitées plus d'un mois. La décroissance de la charge virale VHB sous TDF étant particulièrement rapide pendant le premier mois de traitement (baisse de 2 à 3 Log₁₀ UI/mL), un délai d'un mois de traitement semble donc essentiel pour assurer un contrôle virologique du VHB à l'accouchement, élément clé dans la prévention de la transmission.

Pour les femmes non-éligibles au TDF, le taux de transmission est de 1%. Les 7 femmes non éligibles au TDF d'après l'algorithme TA PROHM et ayant transmis le virus avaient toutes un ADN VHB > 5.3 Log₁₀ IU/mL à l'inclusion et auraient donc été considérées comme éligibles au TDF sur des critères virologiques si la charge virale était disponible au moment du dépistage. Ce taux de transmission pourrait donc être encore réduit en améliorant l'identification des femmes faussement négatives pour l'algorithme, possiblement par la mise en place de technique de quantifications virales POC, comme précédemment discuté.

Bien qu'il n'y ait pas de recommandation officielle de l'OMS sur l'utilisation des HBIg pour les nourrissons nés de femmes infectées par le VHB, cette pratique fait partie de la norme de soins dans de nombreux pays. Pourtant, dans les dernières recommandations OMS de juillet 2020, il est écrit que, chez les nouveau-nés à terme nés de mères positives pour l'AgHBs mais négatives pour l'AgHBe, la protection contre l'infection périnatale obtenue par la vaccination immédiate contre le VHB (administrée dans les 24 heures de vie) pourrait ne pas être améliorée de manière significative par l'ajout d'HBIg. Au premier abord, si les preuves du bénéfice en termes de transmission sont nettement plus importantes pour les enfants nés de mères AgHBe positives, il semble plus simple et plus efficace d'administrer les HBIg aux nourrissons de toutes les mères AgHBs positives, indépendamment du statut AgHBe de la mère. Pour autant,

d'autres implications programmatiques liées à l'approvisionnement, à l'assurance qualité (y compris le maintien de la chaîne du froid) ainsi qu'au coût conséquent des HBIg doivent être pris en considération. Un modèle d'analyse décisionnelle réalisé à Taiwan suggère que le choix de la stratégie optimale de sérovaccination contre le VHB dépende de la prévalence du VHB et du seuil de consentement à payer des pays. Pour les pays développés disposant de ressources financières et de capacités médicales adéquates, une stratégie associant dépistage maternel de l'AgHBs plus vaccination universelle et administration d'HBIg aux nouveau-nés de mères AgHBs(+) serait probablement rentable et offrirait la meilleure protection. En revanche, pour les pays moins développés disposant de capacités financières, techniques et logistiques insuffisantes, une stratégie plus simple et plus abordable associant dépistage maternel de l'AgHBs plus une vaccination universelle isolée serait préférable (58). Les résultats de l'étude TA PROHM montrent qu'avec un traitement antiviral prophylactique débutée plus d'un mois avant l'accouchement pour les femmes éligibles, et une vaccination précoce, il est possible de prévenir la transmission du VHB sans HBIg. Ces résultats sont essentiels pour de nombreux pays comme le Cambodge qui n'ont encore pas inscrit l'approvisionnement en HBIg et leurs administrations comme une priorité de santé publique. Ils permettent d'envisager la mise en place d'une stratégie de prévention de la TME du VHB, à l'échelle nationale, utilisant des outils disponibles dans le pays, à savoir : tests rapides, TDF et vaccination.

9.4. Une stratégie antivirale prophylactique de rattrapage pour les femmes vues tardivement en consultation anténatale

Au Cambodge, 10 à 20% des femmes enceintes n'ont leur première visite anténatale qu'au cours du troisième trimestre de la grossesse (rapport DHS 2014). Dans notre étude, 21% des femmes ont eu leur visite d'inclusion après 32 semaines de grossesse (15% pour les femmes éligibles au TDF et 23% pour celles non éligibles au TDF). A notre connaissance, aucune étude n'a évalué les facteurs de risque de consultation anténatale tardive au Cambodge. Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être évoquées : un manque d'information persistant dans certains districts, un éloignement du domicile par rapport aux structures de santé, des raisons socio-économiques comme une activité professionnelle obligeant à une migration dans les pays voisins (Thaïlande, Vietnam) ou des horaires de travail (notamment en usine) incompatibles avec la venue en consultation. Pour ces femmes, au regard de la décroissance

rapide de la charge virale ADN VHB durant le premier mois de traitement avec le TDF, le bénéfice d'une thérapie de sauvetage pour réduire la TME du VHB a été évaluée. Les résultats montrent que le taux de transmission du VHB reste élevé si le TDF n'est pas administré pendant au moins un mois chez des femmes hautement virémiques. A notre connaissance, aucune étude n'avait précédemment évalué le taux de TME du VHB après une administration très tardive du TDF. Une étude taiwanaise, réalisée de 2011 à 2013, retrouvait un taux de transmission de 2% lorsque le TDF était administré entre 30 et 32 SA en association à une sérovaccination chez des femmes présentant une charge virale ADN VHB $> 7,5 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ (59). Lors de la méta-analyse ayant conduit aux recommandations OMS de juillet 2020, il n'y avait pas de différence significative en termes de transmission que le TDF soit débuté avant ou après 28 semaines d'aménorrhée. Mais aucune comparaison n'a été faite pour un terme d'introduction du TDF après 32 semaines puisque toutes ces études démarraient le TDF avant 32 semaines.

La conjonction d'une charge virale maternelle très élevée et d'une durée de traitement trop courte conduisent à un manque d'efficacité d'une thérapie de sauvetage pour réduire la TME du VHB après la 32ème semaine d'aménorrhés. Ce résultat souligne l'importance de proposer un dépistage du VHB le plus tôt possible pendant la grossesse afin de permettre aux femmes enceintes positives pour l'AgHBs de bénéficier au maximum de potentielles stratégies préventives précoces. Le bénéfice des HBIg se situe peut-être d'ailleurs en stratégie de rattrapage chez des femmes non contrôlées virologiquement à l'accouchement et fortement à risque de transmettre le VHB à leur enfant.

9.5. Implémentation de la stratégie pour un passage à l'échelle : nécessité d'un engagement politique

L'élimination de la transmission mère-enfant du VHB nécessite un ensemble complet d'interventions reposant sur 1/ un programme solide de vaccination des nourrissons contre l'hépatite B qui assure à la fois une couverture élevée de vaccination à la naissance dans les 24 premières heures de vie et une couverture élevée pour les 2 ou 3 doses supplémentaires 2/ un dépistage précoce de l'AgHBs en consultation anténatale et une prise en charge des femmes positives incluant information, conseil, éducation et liaison avec des services de soins et de traitement.

Par ailleurs, cet ensemble d'interventions doit pouvoir être dispensé sur l'ensemble du pays, que ce soit en zones urbaines ou en zones rurales et s'adresser à la fois au secteur public et au secteur privé.

Au Cambodge, le Programme National d'Immunisation est en charge de coordonner la politique vaccinale du pays et le Centre National de Santé Maternelle et Infantile est en charge de coordonner le programme de triple élimination du VIH, de la syphilis et de l'hépatite B, ces deux départements étant sous l'égide du Ministère de la Santé.

Le plan stratégique du Programme National d'Immunisation est défini tous les 4 à 5 ans. L'achat des vaccins se fait par l'intermédiaire de l'UNICEF. Ceux-ci sont initialement stockés dans le Central Medical Stores (CMS) dans la capitale, Phnom Penh, et la distribution est gérée par le CMS sur une base trimestrielle à travers un réseau de magasins provinciaux. La plupart des vaccinations sont effectuées par le personnel au niveau des centres de santé, que ce soit sur site ou dans des zones de proximité. En effet, de nombreuses communautés sont éloignées des centres de santé et l'accès peut être limité dans certaines zones rurales pendant la saison des pluies. La vaccination de proximité permet donc d'atteindre ces communautés. Le Programme National d'Immunisation fournit également certains vaccins à un petit nombre d'établissements agréés du secteur privé mais cela reste très minoritaire. Pour pouvoir appliquer la stratégie vaccinale en salle de naissance, telle qu'utilisée dans l'étude TA PROHM, une coordination entre le Programme National d'Immunisation et le Centre National de Santé Maternelle et Infantile est nécessaire que ce soit en termes de gouvernance, de mise en place de l'intervention, de formations des sages-femmes et de lieux de distribution/stockage des vaccins. Une telle stratégie est plus facilement applicable au niveau des centres de santé primaires ou des hôpitaux de districts de niveaux inférieurs puisque les deux services, immunisation et obstétrical, sont situés dans le même bâtiment, le plus souvent juste à côté, que les vaccins sont déjà sur place et que le personnel en charge des vaccins et les sages-femmes travaillent déjà côte à côte toute la journée. Un système de rémunération incitative est déjà en place pour les sages-femmes qui reçoivent 15 USD pour chaque accouchement réalisé dans les centres de santé ou les hôpitaux de districts. Cette rémunération incitative pourrait être étendue à la vaccination en salle de naissance. En revanche, la situation est différente pour les hôpitaux provinciaux et nationaux et encore plus pour les structures privées car le couple mère-enfant est le plus souvent référé vers une autre structure pour la vaccination. Appliquer la stratégie vaccinale en salle de naissance dans ces établissements

nécessite de mettre en place un système de délivrance et de stockage des vaccins dans les services obstétricaux et un programme de formations des sages femmes. Cela ne peut se concevoir qu'avec une directive forte de la part du Ministère de la Santé et une répartition claire de la gouvernance entre les deux départements.

Le Centre National de Santé Maternelle et Infantile a pour objectifs l'élimination de la TME du VIH et de la syphilis pour 2025 et du VHB pour 2030. Avec le soutien du Fonds mondial, le Cambodge s'efforce d'assurer l'intégration du dépistage du VIH, de la syphilis, de la tuberculose et du paludisme dans les services de soins prénataux de routine. Le pourcentage de femmes enceintes dépistées pour le VIH et le pourcentage de femmes enceintes séropositives bénéficiant d'un traitement antirétroviral ont tous deux augmenté régulièrement, atteignant des niveaux très proches de ceux requis pour l'élimination de la TME : 94 % pour une cible de 95 % et 86 % pour une cible de 90 % respectivement en 2020. Le pourcentage de femmes dépistées pour la syphilis en consultation anténatale était de 74% en 2020 avec, cependant, 30% des femmes perdues de vue entre le dépistage et le traitement qui s'effectue dans les centres de prise en charge des maladies sexuellement transmissibles. En 2021, il est prévu que les femmes puissent être traitées pour la syphilis, directement dans les services de maternité. Ces résultats soulignent la capacité du pays à mettre en place un programme de dépistage et de soins anténataux efficace.

Concernant l'hépatite B, le Centre National de Santé Maternelle et Infantile a défini la prévention de la TME du VHB comme une des priorités pour les prochaines années. Les recommandations nationales pour la prévention de la transmission du VIH, de la syphilis et de l'hépatite B de la mère à l'enfant, 6e édition (2021), préconisent un dépistage précoce de l'AgHBs en consultation anténatale, et une prise en charge des femmes positives pendant la grossesse, en utilisant soit la charge virale ADN VHB, soit l'algorithme TA PROHM pour identifier l'éligibilité au traitement antiviral prophylactique. De la même manière, la subvention Fonds Mondial, renforcement des systèmes de sante 2021-2023, étend le paquet de services anténataux à la détection et la prise en charge du VHB pendant la grossesse, initialement à Phnom Penh, en utilisant la stratégie de l'étude TA PROHM. L'expérience de Phnom Penh sera évaluée et un plan national de déploiement de la PTME du VHB en province sera développé pour 2023.

Si la stratégie fait déjà partie des recommandations du pays, de nombreux défis persistent

pour un passage à l'échelle :

- Le personnel médical et de laboratoire des hôpitaux provinciaux et de district et des centres de santé manque de compétences pour gérer l'infection par le VHB pendant la grossesse. Le département de contrôle des maladies transmissibles du Ministère de la Santé (MoH-CDC) dispose d'un programme de formation à l'échelle nationale en matière de soins et de traitement du VHB mais ne dispose pas des ressources nécessaires pour le mettre en œuvre
- L'étude TA PROHM a été réalisée dans des hôpitaux nationaux et provinciaux. Les capacités du personnel de santé, et les contraintes auxquelles il est confronté, peuvent différer considérablement pour des niveaux inférieurs de l'échelle de soins, tout comme la réponse et l'adhésion des femmes. Avant que la prise en charge du VHB pendant la grossesse ne puisse être complètement déployée à l'échelle nationale, il est nécessaire de valider l'approche TA PROHM au niveau des hôpitaux ruraux et des centres de santé
- Les outils nécessaires au diagnostic et au traitement du VHB pendant la grossesse ne sont pas largement disponibles. Les tests rapides AgHBs et AgHBe ne figurent pas encore sur la liste des produits essentiels et n'ont jusqu'à présent été achetés qu'en petites quantités pour être utilisés dans des programmes financés par des sources extérieures. Le TDF a été ajouté à la liste des médicaments essentiels pour le VHB en 2018 mais n'est autorisé que pour les hôpitaux nationaux et les hôpitaux provinciaux, et n'a pas encore été commandé par le ministère de la Santé pour le traitement du VHB
- Le Fonds d'équité en matière de santé, qui subventionne les coûts des soins médicaux des personnes précaires, ne rembourse pas actuellement la prise en charge et le traitement contre le VHB, pas plus que le Fonds national de sécurité sociale qui assure les personnes employées dans le secteur privé
- Le suivi et l'évaluation du programme se fait via un système en ligne relié au principal système d'information national sur la gestion de la santé (HMIS). Les prestataires de soins prénataux et obstétricaux saisissent chaque mois les données relatives à la PTME et le système peut facilement générer des résultats pour n'importe quelle période et n'importe quel lieu, national, province, district ou établissement individuel. Ce système doit être complété par des indicateurs pertinents pour la PTME du VHB. Par ailleurs, dans le cadre de la subvention du Fonds mondial, une société informatique locale va être engagée pour dé-

velopper une plateforme mobile de saisie de données, car la plateforme actuelle est conçue pour être utilisée sur des ordinateurs, alors que la plupart des prestataires utilisent des téléphones portables. La nouvelle plateforme permettra également de sauvegarder les données hors ligne, car de nombreux établissements de santé disposent de connexions internet irrégulières.

10. Perspectives

10.1. Implementation de la stratégie en zones rurales

Pour pouvoir faire face à ces défis, l'efficacité de la stratégie TA PROHM doit être évaluée en zones rurales en développant des projets d'implémentation avec une approche mixte quantitative et qualitative afin d'évaluer les freins potentiels et en incluant la formation du personnel, l'évaluation des chaînes d'approvisionnement en médicaments et en réactifs ainsi qu'une analyse des coûts. Afin de compléter la subvention Fonds Mondial, renforcement des systèmes de santé 2021-2023, un projet a été soumis en juin 2021 à l'Initiative 5% par le Centre National de Santé Maternelle et Infantile en partenariat avec l'ANRS, l'Institut Pasteur du Cambodge et la Clinton Foundation avec pour objectifs :

- 1- De doter les hôpitaux provinciaux et de districts de niveaux supérieurs des connaissances techniques nécessaires pour prendre en charge le VHB pendant la grossesse, en utilisant l'algorithme de l'étude TA-PROHM, par une combinaison de formation/coaching/supervision
- 2- De veiller à ce que ces hôpitaux aient accès aux médicaments et aux outils diagnostics nécessaires
- 3- De mettre en place une étude de recherche opérationnelle pilote au sein des hôpitaux de districts de niveaux inférieurs avec un design hybride efficacité-implémentation type 2. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de la stratégie TA PROHM dans deux districts opérationnels en associant un dépistage de l'AgHBs au niveau des centres de santé primaires et une prise en charge des femmes positives dans les hôpitaux de districts de niveaux inférieurs (6000 femmes enceintes dépistées sur une année). Cette étude associerait des méthodes quantitatives et qualitatives et une analyse des coûts et des chaînes d'approvisionnement. Les résultats permettront au Ministère de la Santé de décider s'il faut inclure ce niveau de l'échelle de soins dans le déploiement national prévu pour la prise en charge du VHB.
- 4- De s'attaquer aux obstacles financiers à la prise en charge du VHB en réduisant le coût des produits par le biais d'achats groupés, en établissant des frais de santé abordables pour les

usagers et en promouvant l'inclusion des services VHB dans les programmes de protection sociale pour les pauvres.

Enfin, pour aller plus loin dans la décentralisation de la stratégie, il pourrait être utile d'évaluer une prise en charge des femmes positives pour l'AgHBs dans les centres de santé primaires. Le projet soumis à l'Initiative 5% prévoit le suivi des femmes positives dans les hôpitaux de districts de niveaux inférieurs, sous la responsabilité d'un médecin. Une étape supplémentaire serait d'assurer le suivi des femmes positives dans les centres de santé, sous la responsabilité des sages-femmes et des infirmières. Une telle approche permettrait d'appliquer la stratégie au plus près du domicile des patientes et de limiter le risque de perte de vue comme cela est décrit pour la syphilis.

10.2. Évaluation de la maladie hépatique en postpartum

Dans le cadre de cette thèse, l'évaluation de la maladie hépatique en postpartum n'a pas été abordée. Toutes les femmes incluses ont eu une évaluation de la maladie hépatique à 6 semaines postpartum incluant un bilan biologique, une évaluation de l'élasticité hépatique et une échographie du foie. Pour les femmes sous traitement antiviral prophylactique, un comité clinique décidait de la nécessité ou non de poursuivre le traitement antiviral en suivant initialement les recommandations OMS puis les recommandations cambodgiennes à partir de 2019, date de leur édition. L'évaluation de cette approche sera réalisée dans un second temps en décrivant les motifs de poursuite du TDF chez les femmes traitées pendant la grossesse et en évaluant et comparant, chez les femmes non-éligibles au TDF, une éventuelle indication au traitement antiviral en fonction de plusieurs recommandations et critères simplifiés comme cela a récemment été publié au Vietnam en population générale (60).

Par ailleurs, lors de cette évaluation hépatique à 6 semaines postpartum, un certain nombre de femmes présentaient une cytolysse majeure avec un taux d'ALAT > 5 fois la limite supérieure de la normale. Un bilan systématique des facteurs de risque a alors été réalisé et l'utilisation de la médecine traditionnelle pendant cette période a été identifiée comme une explication possible après exclusion des autres causes potentielles (consommation isolée d'alcool, médicaments à toxicité potentielle, infections par le VIH, le VHC, le VHA et le VHE). Nous avons donc conduit une étude ethnobotanique dans le but de décrire la consommation de médicaments traditionnels pendant la phase post-partum chez 75 femmes participant à

l'étude en termes d'ingrédients utilisés (plantes, animaux, minéraux, etc.), de méthode de préparation et d'administration, et étudier l'association possible entre la consommation de médicaments traditionnels et la toxicité hépatique aiguë (article joint en annexe 2). Les résultats montrent que la consommation de remèdes traditionnels est une pratique courante pendant la période post-partum chez les femmes incluses dans l'étude (70%) et que la consommation orale d'au moins un remède traditionnel, préparé sous forme d'une macération alcoolique, est significativement associée à la cytolyse hépatique en période post-partum. Parmi les 127 plantes identifiées dans ces remèdes traditionnels, 4 plantes ont été rapportées comme possiblement associées à la cytolysé hépatique et 2 d'entre elles ont été décrites comme contenant des composés hépatotoxiques. Chez des femmes infectées par le VHB en période de restauration immunitaire postpartum, une telle consommation pourrait représenter un facteur cumulatif de risque de décompensation hépatique. Le niveau de transaminases est un facteur clé dans la décision thérapeutique en postpartum pour les femmes. Un délai plus important entre l'accouchement et l'évaluation hépatique pourrait être bénéfique afin de se mettre à distance de cette potentielle cause toxique et ainsi de mieux prendre en compte les lésions hépatiques propres au VHB.

11. Conclusion

L'objectif de cette thèse était de mettre en place un programme de réduction de la TME du VHB en utilisant une stratégie basée sur les outils disponibles au Cambodge. Ce travail de thèse montre qu'une stratégie alternative sans HBIg utilisant un traitement antiviral prophylactique maternel par TDF pendant au moins un mois avant l'accouchement associé à une vaccination très précoce du nourrisson à la naissance peut permettre de prévenir la TME du VHB. En utilisant un algorithme décisionnel pour l'indication thérapeutique prophylactique basée sur un test rapide AgHBe et une mesure du taux d'ALAT, cette stratégie est applicable en zones décentralisées, au niveau des structures de santé provinciales et de districts, ce qui est essentiel pour des pays comme le Cambodge où l'accès aux plates formes biologiques est limité aux capitales ou aux grandes villes. Cette stratégie ayant déjà été incluse dans les dernières recommandations nationales Cambodgiennes pour la prévention de la transmission

du VIH, de la syphilis et de l'hépatite B de la mère à l'enfant (6e édition, 2021), il est maintenant essentiel d'en évaluer son efficacité en zones rurales en développant des projets de recherche d'implémentation intégrant une analyse des coûts et des chaînes d'approvisionnement en médicaments et réactifs. Le projet déposé à l'Initiative 5% par le Centre National de Santé Maternelle et Infantile va en ce sens et permettrait, s'il est accepté pour financement, d'apporter un plaidoyer supplémentaire auprès du Ministère de la Santé. En effet, seul un engagement politique associant formation du personnel et intégration et prise en charge des tests biologiques et des médicaments à tous les niveaux de l'échelle sanitaire permettra d'envisager un déploiement de la stratégie à l'échelle nationale. Au regard des bons résultats en termes de dépistage et de prise en charge anténatale du VIH et de la syphilis, la mise en place de la stratégie TA PROHM sur l'ensemble du pays pourrait permettre au Cambodge d'atteindre la triple élimination VIH/Syphilis/VHB prônée par l'OMS pour 2030.

12. References

1. World Health Organization, World Health Organization, Global Hepatitis Programme. Global hepatitis report, 2017 [Internet]. 2017 [cited 2021 Mar 30]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol.* 2003;39 Suppl 1:S64-69.
3. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis.* 1985 Apr;151(4):599–603.
4. Burk RD, Hwang LY, Ho GY, Shafritz DA, Beasley RP. Outcome of perinatal hepatitis B virus exposure is dependent on maternal virus load. *J Infect Dis.* 1994 Dec;170(6):1418–23.
5. Beasley RP, Trepo C, Stevens CE, Szmuness W. The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol.* 1977 Feb;105(2):94–8.
6. Wen W-H, Chang M-H, Zhao L-L, Ni Y-H, Hsu H-Y, Wu J-F, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus infection: significance of maternal viral load and strategies for intervention. *J Hepatol.* 2013 Jul;59(1):24–30.

7. Zou H, Chen Y, Duan Z, Zhang H, Pan C. Virologic factors associated with failure to passive-active immunoprophylaxis in infants born to HBsAg-positive mothers. *J Viral Hepat.* 2012 Feb;19(2):e18-25.
8. Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Hepatitis B immunisation for newborn infants of hepatitis B surface antigen-positive mothers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Apr 19;(2):CD004790.
9. Keane E, Funk AL, Shimakawa Y. Systematic review with meta-analysis: the risk of mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection in sub-Saharan Africa. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Nov;44(10):1005–17.
10. Yang J, Zeng X, Men Y, Zhao L. Elective caesarean section versus vaginal delivery for preventing mother to child transmission of hepatitis B virus--a systematic review. *Virol J.* 2008;5:100.
11. Zhang L, Gui X-E, Wang B, Fan J-Y, Cao Q, Mullane K, et al. Serological positive markers of hepatitis B virus in femoral venous blood or umbilical cord blood should not be evidence of in-utero infection among neonates. *BMC Infect Dis.* 2016 Aug 12;16(1):408.
12. WHO | Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021 [Internet]. WHO. World Health Organization; [cited 2021 Apr 16]. Available from: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>
13. Consolidated strategic information guidelines for viral hepatitis: planning and tracking progress towards elimination (2019) [Internet]. [cited 2021 May 5]. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hepatitis/publications/2019/consolidated-strategic-information-guidelines-for-viral-hepatitis-planning-and-tracking-progress-towards-elimination-2019>
14. WHO | Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021 [Internet]. WHO. [cited 2019 Oct 9]. Available from: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>
15. Li X, Dumolard L, Patel M, Hennessey K. Implementation of hepatitis B birth dose vaccination – worldwide, 2016. *WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD.* 2018;(7):12.
16. Wiesen E, Diorditsa S, Li X. Progress towards hepatitis B prevention through vaccination in the Western Pacific, 1990-2014. *Vaccine.* 2016 May 27;34(25):2855–62.
17. Childs L, Roesel S, Tohme RA. Status and progress of hepatitis B control through vaccination in the South-East Asia Region, 1992–2015. *Vaccine* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2021 May 5];36(1):6–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774012/>
18. Shimakawa Y, Yan H-J, Tsuchiya N, Bottomley C, Hall AJ. Association of Early Age at Establishment of Chronic Hepatitis B Infection with Persistent Viral Replication, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *PLoS One* [Internet]. 2013

Jul 19 [cited 2021 May 5];8(7). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3716646/>

19. Shimakawa Y, Lemoine M, Njai HF, Bottomley C, Ndow G, Goldin RD, et al. Natural history of chronic HBV infection in West Africa: a longitudinal population-based study from The Gambia. *Gut* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 May 5];65(12):2007–16. Available from: <https://gut.bmj.com/content/65/12/2007>
20. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lai M-W, Wu T-C, et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. *Gastroenterology*. 2016 Sep;151(3):472-480.e1.
21. Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2016 Jan;63(1):261–83.
22. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017;67(2):370–98.
23. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int*. 2016 Jan;10(1):1–98.
24. Willis BC, Wortley P, Wang SA, Jacques-Carroll L, Zhang F. Gaps in hospital policies and practices to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus. *Pediatrics*. 2010 Apr;125(4):704–11.
25. Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009 Oct 1;84(40):405–19.
26. Who Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons With Chronic Hepatitis B Virus Infection. World Health Organization; 2015.
27. Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2006 Feb 11;332(7537):328–36.
28. Machaira M, Papaevangelou V, Vouloumanou EK, Tansarli GS, Falagas ME. Hepatitis B vaccine alone or with hepatitis B immunoglobulin in neonates of HBsAg+/HBeAg- mothers: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Feb;70(2):396–404.
29. Tharmaphornpilas P, Rasdjarmrearnsook A, Plianpanich S, Sa-nguanmoo P, Poovorawan Y. Increased risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers as a result of delayed second dose of hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2009 Oct 19;27(44):6110–5.

30. Milne A, West DJ, Chinh DV, Moyes CD, Poerschke G. Field evaluation of the efficacy and immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine without HBIG in newborn Vietnamese infants. *J Med Virol*. 2002 Jul;67(3):327–33.
31. Prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: Guidelines on antiviral prophylaxis in pregnancy [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/978-92-4-000270-8>
32. van Zonneveld M, van Nunen AB, Niesters HGM, de Man RA, Schalm SW, Janssen HLA. Lamivudine treatment during pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2003 Jul;10(4):294–7.
33. Brown RS, McMahon BJ, Lok ASF, Wong JB, Ahmed AT, Mouchli MA, et al. Antiviral therapy in chronic hepatitis B viral infection during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2015 Nov 13;
34. Han L, Zhang H-W, Xie J-X, Zhang Q, Wang H-Y, Cao G-W. A meta-analysis of lamivudine for interruption of mother-to-child transmission of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*. 2011 Oct 14;17(38):4321–33.
35. Lai C-L, Dienstag J, Schiff E, Leung NWY, Atkins M, Hunt C, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar 15;36(6):687–96.
36. Pan CQ, Duan Z, Dai E, Zhang S, Han G, Wang Y, et al. Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission in Mothers with High Viral Load. *N Engl J Med*. 2016 Jun 16;374(24):2324–34.
37. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Harrison L, Decker L, Khamduang W, Tierney C, et al. Tenofovir versus Placebo to Prevent Perinatal Transmission of Hepatitis B. *N Engl J Med*. 2018 Mar 8;378(10):911–23.
38. Li W, Jia L, Zhao X, Wu X, Tang H. Efficacy and safety of tenofovir in preventing mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a meta-analysis based on 6 studies from China and 3 studies from other countries. *BMC Gastroenterol*. 2018 Aug 2;18(1):121.
39. Terrault N, Brown R, Lok A, Wong J, Chang K-M, Jonas M, et al. Preventing Perinatal Transmission of Hepatitis B Necessitates Consideration of Antiviral Treatment in Pregnancy. *Hepatology*. 2018 Aug 2;
40. Ozano K, Simkhada P, Thann K, Khatri R. Improving local health through community health workers in Cambodia: challenges and solutions. *Hum Resour Health [Internet]*. 2018 Jan 6 [cited 2018 Oct 24];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5756401/>
41. Yamada H, Fujimoto M, Svay S, Lim O, Hok S, Goto N, et al. Seroprevalence, genotypic distribution and potential risk factors of hepatitis B and C virus infections among adults in Siem Reap, Cambodia. *Hepatol Res*. 2014 Jun 6;

42. Ork V, Woodring J, Shafiqul Hossain M, Wasley A, Nagashima S, Yamamoto C, et al. Hepatitis B surface antigen seroprevalence among pre- and post-vaccine cohorts in Cambodia, 2017. *Vaccine*. 2019 14;37(35):5059–66.
43. Samadi Kochaksaraei G, Castillo E, Osman M, Simmonds K, Scott AN, Oshiomogho JI, et al. Clinical course of 161 untreated and tenofovir-treated chronic hepatitis B pregnant patients in a low hepatitis B virus endemic region. *J Viral Hepat*. 2015 Jul 20;
44. Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu TC, Laperche S, Nadala L, et al. Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations. *J Clin Virol*. 2014 Feb;59(2):89–93.
45. Shimakawa Y, Njie R, Ndow G, Vray M, Mbaye PS, Bonnard P, et al. Development of a simple score based on HBeAg and ALT for selecting patients for HBV treatment in Africa. *J Hepatol*. 2018 Oct;69(4):776–84.
46. operationalizing-elimination-of-mother-to-child-transmission-of-hepatitis-b-in-the-western-pacific.pdf [Internet]. [cited 2021 Jul 4]. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/emtct/operationalizing-elimination-of-mother-to-child-transmission-of-hepatitis-b-in-the-western-pacific.pdf?sfvrsn=4885ffcb_5
47. Sanou AM, Toyé R, Kagoné T, Nikiéma A, Testa J, Sakandé J, et al. Analytical performance of eight rapid point-of-care tests routinely used for the detection of HBsAg in Burkina Faso: A cross-sectional study. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104546.
48. Dembele B, Affi-Aboli R, Kabran M, Sevede D, Goha V, Adiko AC, et al. Evaluation of Four Rapid Tests for Detection of Hepatitis B Surface Antigen in Ivory Coast. *J Immunol Res*. 2020;2020:6315718.
49. Kabamba AT, Mwamba CM, Dessilly G, Dufrasne F, Kabamba BM, Longanga AO. Evaluation of the analytical performance of six rapid diagnostic tests for the detection of viral hepatitis B and C in Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. *J Virol Methods*. 2020 Nov;285:113961.
50. Amini A, Varsaneux O, Kelly H, Tang W, Chen W, Boeras DI, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2017 01;17(Suppl 1):698.
51. Boucheron P, Lu Y, Yoshida K, Zhao T, Funk AL, Lunel-Fabiani F, et al. Accuracy of HBeAg to identify pregnant women at risk of transmitting hepatitis B virus to their neonates: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2021 Jan;21(1):85–96.
52. Seck A, Ndiaye F, Maylin S, Ndiaye B, Simon F, Funk AL, et al. Poor Sensitivity of Commercial Rapid Diagnostic Tests for Hepatitis B e Antigen in Senegal, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Aug;99(2):428–34.
53. Jackson K, Tekoaua R, Li X, Locarnini S. Real-world application of the Xpert® HBV viral load assay on serum and dried blood spots. *J Med Virol*. 2021 Jun;93(6):3707–13.

54. Patel MK, Capeding RZ, Ducusin JU, de Quiroz Castro M, Garcia LC, Hennessey K. Findings from a hepatitis B birth dose assessment in health facilities in the Philippines: opportunities to engage the private sector. *Vaccine*. 2014 Sep 3;32(39):5140–4.
55. Li F, Wang Q, Zhang L, Su H, Zhang J, Wang T, et al. The risk factors of transmission after the implementation of the routine immunization among children exposed to HBV infected mothers in a developing area in northwest China. *Vaccine*. 2012 Nov 19;30(49):7118–22.
56. Funk AL, Lu Y, Yoshida K, Zhao T, Boucheron P, van Holten J, et al. Efficacy and safety of antiviral prophylaxis during pregnancy to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2021 Jan;21(1):70–84.
57. Lin Y, Liu Y, Ding G, Touqui L, Wang W, Xu N, et al. Efficacy of tenofovir in preventing perinatal transmission of HBV infection in pregnant women with high viral loads. *Sci Rep*. 2018 Oct 19;8(1):15514.
58. Chen SC-C, Toy M, Yeh JM, Wang J-D, Resch S. Cost-effectiveness of augmenting universal hepatitis B vaccination with immunoglobulin treatment. *Pediatrics*. 2013 Apr;131(4):e1135-1143.
59. Chen H-L, Lee C-N, Chang C-H, Ni Y-H, Shyu M-K, Chen S-M, et al. Efficacy of maternal tenofovir disoproxil fumarate in interrupting mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology*. 2015 Aug;62(2):375–86.
60. Hai VV, Shimakawa Y, Kim J, Do Ngoc H, Le Minh Q, Laureillard D, et al. Assessment and simplification of treatment eligibility among patients with chronic hepatitis B infection in Vietnam. *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 17;ciaa1814.

13. Annexes

Annexe 1: "In-field Evaluation of SD Bioline HBsAg Whole Blood Rapid Test in Pregnant Women in Cambodia: the ANRS 12345 TA PROHM Study". *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Oct;101(2):115452.

Annexe 2: "Traditional medicine consumption as a possible risk factor of liver cytolysis in postpartum for HBV-infected women: the ANRS 12345 TA PROHM study". Article prêt à être soumis au journal "Phytomedicine"



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Case Report

In-field Evaluation of SD Bioline HBsAg Whole Blood Rapid Test in Pregnant Women in Cambodia: the ANRS 12345 TA PROHM Study

Olivier Segeral^{a,*}, Wathanakpiseychoupoan Phirum^b, Ousa Khan^c, Hyna Chea^b, Saren Sovann^c, Sovann Nhoeng^c, Kearena Chhim^d, Song Yin^c, Bunnet Dim^c, Chantana Yay^e, Denis Laurent^e, Samsorphea Chhun^d, Laurence Borand^c

^a University of Health Sciences/ANRS, Phnom Penh, Cambodia^b Laboratory Department, Jayavarman VII Hospital, Siem Reap, Cambodia^c Institut Pasteur du Cambodge, Epidemiology and Public Health Unit, Phnom Penh, Cambodia^d Department of Maternity, Hôpital Calmette, Phnom Penh, Cambodia^e Direction Department, Jayavarman VII Hospital, Siem Reap, Cambodia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2021

Revised in revised form 4 June 2021

Accepted 6 June 2021

Available online 11 June 2021

Keywords:

Cambodia

Hepatitis B Virus

Rapid diagnosis tests

Pregnant women

Mother-to-child transmission

ABSTRACT

The objective is to assess the in-field performance of HBsAg whole blood rapid diagnosis test (RDT) as compared to plasmatic HBsAg RDT to diagnose HBV infection among pregnant women in Cambodia. Blood was collected on EDTA tubes from pregnant woman screened for the TA PROHM - ANRS 12345 study. Whole blood HBsAg RDT results were crossed compared with the plasmatic HBsAg RDT results, which was defined for this study as the gold standard. From December 2018 to May 2019, 4997 pregnant women were screened. The median age was 27.2 years old, 14% were screened in Phnom Penh and 86% in Siem Reap. Whole blood HBsAg RDT perform excellently with a sensitivity of 100% (95% CI, 98.7 – 100) and specificity of 100% (95% CI, 99.9 – 100). Whole blood HBs Ag RDT is as accurate as plasmatic one and could be used in remote areas.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Background

Among the estimated 257 millions of people living with Hepatitis B virus (HBV) infection, 45% are in the Western Pacific Region (Schweitzer et al., 2015, Ott et al., 2017). The epidemic is mostly driven by mother-to-child transmission (MTCT) in peripartum. Diagnosis of HBV infection at antenatal care (ANC) should be integrated to an ANC screening package together with HIV and syphilis rapid tests to reach the triple elimination recommended by WHO (2020).

In many low and middle income countries (LMIC), decentralization of ANC is a challenge to scale-up HBV diagnosis during pregnancy. Implementation of hepatitis B surface antigen (HBsAg) rapid diagnosis tests (RDT) in primary health centers could be helpful to improve HBV testing coverage.

In Cambodia, where HBV prevalence among pregnant women was reported to be 4.39% (Ork et al., 2019), the vast majority of pregnant women are not screened for HBsAg during ANC. Strong accuracy of SD Bioline HBsAg plasmatic rapid tests was reported as compared to ELISA (Ségéral et al., 2018) but the need of centrifugation to obtain

plasma is a barrier. SD Bioline HBs Ag whole blood (WB) RDT was recently launched with validation performed for a limited number of patients.

2. Objective

The objective is to assess the in-field performance of the SD Bioline HBsAg WB RDT as compared to the SD Bioline plasmatic HBsAg RDT to diagnose HBV infection among pregnant women in Cambodia.

3. Study design

3.1. Study population

Samples were collected from pregnant woman screened for the TA PROHM - ANRS 12345 study (clinicaltrials.gov number: [NCT02937779](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02937779)) which is a phase IV multicenter interventional non randomized prospective study aiming to assess the effectiveness of an immunoglobulin-free strategy to prevent HBV MTCT in Cambodia.

Samples were collected in two maternities of national hospitals located in urban areas: the maternity of Calmette Hospital in

* Corresponding author. Tel.: +85-512479313.
E-mail address: oliseg@hotmail.com (O. Segeral).

Phnom Penh and the maternity of Jayavarman VII Hospital in Siem Reap.

3.2. Ethical considerations

The National Ethics Committee for Health Research in Cambodia has approved the TA PROHM – ANRS 12345 study. Each participant has signed a written informed consent form. No additional blood was collected from the pregnant women for this nested study.

3.3. Sample collection and RDT procedures

Pregnant woman coming for ANC visit had a 5 mL of blood collection on EDTA tube.

SD Bioline HBsAg whole blood and plasmatic RDT, which are 2 different products from the same company (Standard Diagnostics [SD], INC., Abbott – Alere), were performed following the manufacturer's instructions by trained laboratory technicians.

The procedure was different in the 2 hospitals:

In Calmette hospital, samples were firstly tested with the SD BIOLINE WB HBsAg RDT, 20 minutes after blood collection. Using a micropipette, 100 μ L of whole blood was dispensed into the specimen well "S" and result was interpreted after 20 minutes. Then, the EDTA tube was centrifuged at 5000 rpm during 5 minutes and plasma was collected and used to do the SD BIOLINE plasmatic HBsAg RDT.

In Jayavarman VII Hospital, the EDTA tube was stored at 0 to 7°C during 18 hours. Plasma was collected and tested with the SD BIOLINE plasmatic HBsAg RDT. Then the tube was shaken and 100 μ L of whole blood was dispensed into the specimen well "S" of the SD BIOLINE WB HBsAg RDT and result was interpreted after 20 minutes.

3.4. Statistical analysis

Whole blood HBsAg RDT results were crossed compared with the plasmatic HBsAg RDT results.

Participants' characteristics are presented as percentages, medians, interquartile ranges (IQR). Accuracy of the WB HBsAg RDT to correctly identify HBsAg positive participants was presented by sensitivity and specificity.

The concordance between the whole blood and plasmatic results of each HBsAg RDT were assessed by the calculation of the Cohen's kappa coefficient (κ).

4. Results

4.1. Participant characteristics

From December 2018 to May 2019, 5000 pregnant women were screened, 3 failed to be tested and 4997 finally received their result. The median age was 27.2 years old (IQR, 23.6 – 31.3), 14% were screened in Phnom Penh and 86% in Siem Reap. The median term of

pregnancy at screening was 9 weeks of amenorrhea (IQR, 6 – 12). The prevalence of HBV infection was 5.7%.

4.2. Accuracy of the WB HBsAg RDT to correctly identify HBsAg positive participants

The WB HBsAg RDT performs excellently with a sensitivity of 100% (95% CI, 98.7 – 100) and specificity of 100% (95% CI, 99.9 – 100) (Table 1).

5. Discussion

We report a perfect accuracy of the SD Bioline WB HBsAg RDT to detect HBV infection among pregnant women as compared to the SD Bioline plasmatic HBsAg RDT, for which sensitivity and specificity compared to ELISA were previously reported as 99.2% (97.7 – 99.9) and 100% (97.0 – 100), respectively (Ségéral et al., 2018).

Our in-field findings are consistent with the high HBsAg RDT accuracies reported in others low and middle-income countries (Kabamba et al., 2020 Nov, Dembele et al., 2020, Sanou et al., 2020). A meta-analysis of eight studies evaluating five RDTs reported a pooled sensitivity and specificity in capillary or venous whole blood comparable to plasma or serum at 91.7% and 99.9% (Amini et al., 2017 01).

Whole blood rapid tests present the advantage of a centrifuge-free point of care testing with results' availability in 20 minutes. It is particularly relevant for countries where antenatal care are mainly conducted by midwives at decentralized level (households, primary health centers) outside of laboratory settings.

Identification of positive HBsAg pregnant women is crucial to address these women for MTCT preventive strategies. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) was recently recommended by WHO for pregnant women testing positive for HBV infection with an HBV DNA ≥ 5.3 Log₁₀ IU/mL (2020) and HBeAg was reported as an effective alternative in areas where HBV DNA assays are unavailable (Boucheron et al., 2021). In Cambodia, an algorithm using HBeAg RDT and alanine aminotransferase (ALT) level was reported as an effective strategy to identify HBV-infected pregnant women at risk of perinatal transmission (Segéral et al., 2020). The addition of SD Bioline WB HBsAg RDT and to this algorithm could be a comprehensive package of interventions to identify pregnant women in need of tenofovir prophylaxis as recommended by WHO (Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021, 2021). WHO 2016 - 2021.

This study has some limitations. First, this in-field evaluation was realized in two National Hospital's laboratories and need to be completed by an in-field evaluation in rural settings. Indeed, RDTs may be stored and used in uncontrolled environments and/or performed by not experimented staff. Secondly, a specific evaluation on capillary whole blood could be beneficial as it would ease the blood collection. Lastly, the number of RDT indeterminate results was not recorded.

Table 1
Accuracy of WB HBsAg RDT as compared to plasmatic HBsAg RDT (N = 4997).

Plasmatic HBsAg	WB HBsAg Negative	Positive	Total of samples	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Kappa coefficient (95% CI)
Negative	4713	0	4713	100 (98.7 – 100)	100 (99.9 – 100)	1 (Schweitzer et al., 2015)
Positive	0	284	284			
Total	4713	284	4997			

To reach the WHO target of less than 0.1% of infants HBV-infected in 2030, identification of HBsAg positive pregnant women will be necessary to identify those in need of preventive strategies. Easy to perform, accurate, and centrifuge-free whole blood HBs Ag RDT are beneficial to the MTCT prevention of HBV in remote areas of low and middle income countries.

Authors' contributions

Conceptualization: OS, DB, DL, YC, CS, LB; Data collection: PW, OK, CH, SS, CK, SY; Data analysis: OS, SN; Data interpretation: OS, DB, LB; Original writing: OS, SN, LB.

Declaration of Competing interest

All the authors do not have an association that might pose a conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank all pregnant women and their families for their participation in the study; all the medical, laboratory and methodology staff for their contribution to the study; all the members of the Scientific Committee and DSMB for their advices; Claire Rekacewicz, Isabelle Fournier, Nicolas Rouveau, Maria-Camila Calvo Cortes and Laura Fernandez from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) for their support and Abbott - Alere company for complimentary providing the whole blood and plasmatic RDT.

Funding

This work was supported by the French Agency for Research on HIV/AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). Plasmatic and whole blood HBsAg RDT were provided free of charge by Abbott – Alere company.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.diagmicrobio.2021.115452](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115452).

References

- Amini A, Varsaneux O, Kelly H, Tang W, Chen W, Boeras DI, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17(Suppl 1):698.
- Boucheron P, Lu Y, Yoshida K, Zhao T, Funk AL, Lunel-Fabiani F, et al. Accuracy of HBeAg to identify pregnant women at risk of transmitting hepatitis B virus to their neonates: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2021;21(1):85–96.
- Dembele B, Affi-Aboli R, Kabran M, Sevede D, Goha V, Adiko AC, et al. Evaluation of four rapid tests for detection of hepatitis B surface antigen in ivory coast. *J Immunol Res* 2020;2020: 6315718.
- Kabamba AT, Mwamba CM, Dessilly G, Dufirasne F, Kabamba BM, Longanga AO. Evaluation of the analytical performance of six rapid diagnostic tests for the detection of viral hepatitis B and C in Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. *J Virol Methods* 2020;285: 113961.
- Ork V, Woodring J, Shafiqul Hossain M, Wasley A, Nagashima S, Yamamoto C, et al. Hepatitis B surface antigen seroprevalence among pre- and post-vaccine cohorts in Cambodia, 2017. *Vaccine* 2019;37(35):5059–66.
- Ott JJ, Horn J, Krause G, Mikolajczyk RT. Time trends of chronic HBV infection over prior decades - A global analysis. *J Hepatol* 2017;66(1):48–54.
- Regional. Regional framework for the triple elimination of mother-to-child transmission of HIV, hepatitis B and syphilis in Asia and the Pacific, 2018-2030. Accessed October 7, 2020. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789290618553>.
- WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. WHO. World Health Organization; 2021. Accessed July 1, 2021. Available at: <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>.
- Prevention. Prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: Guidelines on antiviral prophylaxis in pregnancy. Accessed October 12, 2020. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/978-92-4-000270-8>.
- Sanou AM, Toyé R, Kagoné T, Nikiéma A, Testa J, Sakandé J, et al. Analytical performance of eight rapid point-of-care tests routinely used for the detection of HBsAg in Burkina Faso: a cross-sectional study. *J Clin Virol* 2020;129: 104546.
- Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015;386(10003):1546–55.
- Segeal O, Dim B, Durier C, Prak S, Chhim K, Vong C, et al. HBeAg rapid test and alanine aminotransferase level-based algorithm to identify pregnant women at risk of

Traditional medicine consumption as a possible risk factor of liver cytolysis in postpartum for HBV-infected women: the ANRS 12345 TA PROHM study

Moeung Sotheara, Goyet Sophie, Chassagne François, Nhoeng Sovann, Sun Lynecta, Yang Dorina, Vilhem Steve, Dim Bunnet, Chhun Samsorphea, Borand Laurence, Kim Sothea, Segeral Olivier

BACKGROUND

Among the estimated 257 millions of people living with Hepatitis B virus (HBV) infection, 45% are in the Western Pacific Region, which includes Cambodia(1). The majority of the HBV epidemic is driven by perinatal transmission – infection transmitted from mother-to-child during the third trimester of pregnancy in utero or at delivery(2). In 2017, in Cambodia, the prevalence of HBV infection among pregnant women, children aged 5 years old and infants born from HBsAg-positive mother were estimated to be 4.39%, 0.56% and 10.11%, respectively (3). From 2017 to 2020, a multicenter interventional prospective study, the ANRS 12345 TA PROHM study, was conducted to assess the effectiveness of an immunoglobulin (HBIg)-free strategy to prevent HBV Mother-to-Child-Transmission (MTCT) in Cambodia. In this study, all women enrolled were evaluated for liver disease at 6 weeks postpartum. During this evaluation, several women developed acute liver cytolysis and the use of traditional medicine in early postpartum phase was identified as a possible explanation after exclusion of others potential causes (alcohol consumption, medication, HIV, HCV, HAV and HEV infections).

Historically, Khmer medicine is based on the use of natural substances (e.g., herbs, animals, minerals) and traditional practices (e.g., dermabrasive practices, spiritual rites) (4)(5). Nowadays, Khmer traditional medicine continues to play a significant role in the daily life of Cambodian people. During pregnancy, traditional medicine is commonly described as being used at two time points : one month before birth to facilitate the delivery and during postpartum to increase the breast milk production and prevent “toas” (postpartum disorders attributed to cultural food intolerance) (7)(8). Herbal treatments used to treat or prevent postpartum disorders are sometimes prepared in alcohol, and thus present a risk of liver toxicity (9). Furthermore, herbal medicines are also used for the treatment of liver diseases. Some of these plants are reported to be hepatotoxic (10). Adverse effects of Cambodian traditional medicine are poorly described but drug-induced liver injury (DILI) following herbal medicine consumption have already been reported in China (11) and Korea (12).

The present study aims to describes traditional medicine consumption during postpartum phase for women enrolled in the TA PROHM study in terms of ingredients used (plants, animals, minerals, etc.), and method of preparation and administration, as well as to investigate the possible association between traditional medicine consumption and acute liver toxicity.

MATERIALS AND METHODS

This study is an ethnobotanical survey nested in the ANRS 12345 TA PROHM study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02937779). The ANRS TA PROHM study is a multicentre observational and interventional prospective study conducted in five maternities in Cambodia from October 2017 to October 2019 aiming to assess the effectiveness of a HBIg-free strategy to prevent HBV MTCT based on 1/ the use of HBsAg and HBeAg rapid diagnostics tests (RDTs) and ALT level serial algorithm to identify women at risk of HBV MTCT 2/ a preventive treatment by tenofovir disoproxil fumarate (TDF) from 24 weeks of pregnancy for eligible pregnant women 3/ an early vaccination at birth (< 2 hours of life) for all newborns. Eligibility criteria for ANRS 12345 TA PROHM study were pregnant women aged 18 or over on the day of inclusion, tested positive for HBsAg and having signed the study informed consents. Liver disease assessment was performed at 6th week postpartum for all women enrolled including liver-function tests.

Study population

Two groups of women (with and without post-partum liver cytolysis) were selected from ANRS 12345 TA PROHM study's database. The first group consisted of women included in the ANRS 12345 TA PROHM study with normal ALT at inclusion visit but with ALT > 2.5 times the Upper Limit of Normal (ULN = 40 U/L) at the 6th week postpartum visit without common risk factors of liver cytolysis (alcohol consumption, use of hepatotoxic drugs, HIV, HCV, HAV and HEV infections). The other group (control group) consisted of women with normal ALT both at inclusion visit in the ANRS 12345 TA PROHM study and at the 6th week postpartum visit. The participants of the second group were randomly selected from the ANRS 12345 TA PROHM study's database.

Ethical consideration

The study was approved by the National Ethics Committee for Health Research (NECHR) of Cambodia (N° 107, April 29, 2019). An information consent process was conducted and a signed informed consent was obtained prior to any study procedure.

Data collection

After the informed consent was obtained, each woman was interviewed face-to-face in Khmer language, preferably at their house by a previously trained interviewer using a standardized questionnaire. When in-house interview was not possible, the interview was conducted by phone. The cytolysis status of each woman was blinded to the person carrying out the interview.

The questionnaire was developed based on the results of previous ethnobotanical studies carried out in Cambodia (13)(14), and modified to meet the objectives of the present study. It was then tested on 8 women to validate its use. The questionnaire consisted of two parts. The first part detailed sociodemographic information, the traditional remedies consumed and their period of

consumption (during pregnancy or postpartum), as well as the western-medicine consumption. Then, for each type of traditional remedy (e.g., preparations containing one plant or a package of plants, alcoholic drink, pill or cream ...), information on duration, posology, ingredients used, method of preparation (e.g., decoction, alcoholic maceration ...) and administration (e.g., oral, local, inhalation, ...), as well as reasons for use and source of information was collected. The information related to a remedy could be given by the person who delivered it (e.g., members of the family or traditional practitioners). The ingredients of each herbal remedy (e.g., package of plants from market or single herb from home garden) were collected at the time of the interview (if the woman had kept them) and stored until identification; otherwise, if possible, those ingredients were collected later at the place/market where they originated from.

Botanical identification

The identification of herbal ingredients was performed as follow: First, packages of dried plants were labeled with the patient code and a remedy number and stored in Phnom Penh at the Institut Pasteur du Cambodge and at the Phytochemistry laboratory at the University of Health Sciences . The plant parts of each package were then sorted by similar appearance, packed in separate small plastic bags and labelled with the patient code, remedy number and sub-number. Two recognized traditional healers (Mr. KY Bouhaing and Mr. HUON Chhom) then identified the local name of the plant specimen based on their knowledge in medicinal plants. In case of discordance between them, a consensus was obtained after a discussion with both of them. The identification of plants significantly associated with liver cytolysis was later confirmed by a third traditional healer (Mr. THAY Savy). Latin names were then obtained using the book “Cambodian Plants”, volume 1-5, published by the National center of Traditional Medicine (Ministry of Health in Cambodia) and cross-checked for accuracy by consulting The Plant List website (www.theplantlist.org). For 16 women, the local name of homegrown herbs was given by the women directly during the interview, then the scientific name was obtained using the books mentioned above.

Biological analysis

ALT level was measured on ABX PENTRA C400 by IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) method (UV without pyridoxal phosphate) at the Institut Pasteur du Cambodge.

Statistical method

Participants’ characteristics are presented as percentages, medians, interquartile ranges (IQR). Comparison between the two groups of women (i.e. with and without hepatic cytolysis) was performed using Student’s t-test for quantitative variables and Chi-square test for qualitative ones. The proportion of women using a specific plant species were compared between the two groups using Chi-square test. When an association between a plant species and cytolysis was found ($p < 0.1$ regarding the low sample size), a specific literature review was performed to search for its potentially already described therapeutic and/or pharmacological effects and its potentially known liver toxicity.

RESULT

A total of 108 women were contacted from March 12th 2019 to April 7th 2020. Among the 108 women, 25 could not be reached and one refused to participate. Of all the 82 women interviewed, 7 were not included in the database because their ALT level at the 6th week post-partum ranged between the ULN and 2.5 times the ULN. Finally, 75 women were included in the analysis, of whom 36 had cytolysis and 39 had normal ALT level at the 6th week post-partum.

There was no significant difference between the two groups in terms of characteristics except AST/ALT level at the 6th week post-partum as shown in Table 1.

Table 1: Characteristics of women included in the study (N=75)

Description	Cytolysis N=36	No cytolysis N=39	p Value
Age (in years, median, IQR*)	31 (28-35)	32 (28-36)	0.656
Location, N (%)			0.630
<i>Phnom Penh</i>	12 (33.3)	11 (28.2)	-
<i>Province</i>	24 (66.7)	28 (71.8)	-
Ethnic group, N (%)			1
<i>Khmer</i>	36 (100)	39 (100)	-
Level of education, N (%)			0.926
<i>No education or primary</i>	13 (36.1)	13 (33.3)	-
<i>Secondary</i>	15 (41.7)	18 (46.2)	-
<i>University</i>	8 (22.2)	8 (20.5)	-
Average family income per month, N (%)			0.477
<i>< 100 USD</i>	2 (5.6)	1 (2.6)	-
<i>100-300 USD</i>	13 (36.1)	16 (41.0)	-
<i>300-600 USD</i>	9 (25.0)	15 (38.4)	-
<i>600-1000 USD</i>	4 (11.1)	3 (7.7)	-
<i>>1000 USD</i>	8 (22.2)	4 (10.3)	-
Medical status			
<i>Positive HBeAg status, N (%)</i>	12 (33.3)	11 (28.2)	0.630
<i>Tenofovir (TDF) treatment, N (%)</i>	15 (41.7)	14 (35.9)	0.391
Liver biological test			
<i>AST at week 6 post-partum, median (IQR)</i>	110 (80-127)	27 (24-31)	< 0.001
<i>ALT at week 6 post-partum, median (IQR)</i>	136 (110-162)	28 (22-33)	< 0.001

Overall, 52 women (69.3%) used at least one traditional remedy whatever the mode of absorption. A total of 151 different traditional remedies were collected, composed of 127 different plants and 12 alcoholic macerations of porcupine stomach. Overall, 80 traditional remedies were ingested, 39 applied on the skin, 3 inhaled and 25 used for steamed bath. Modes of absorption and preparation are reported in Table 2.

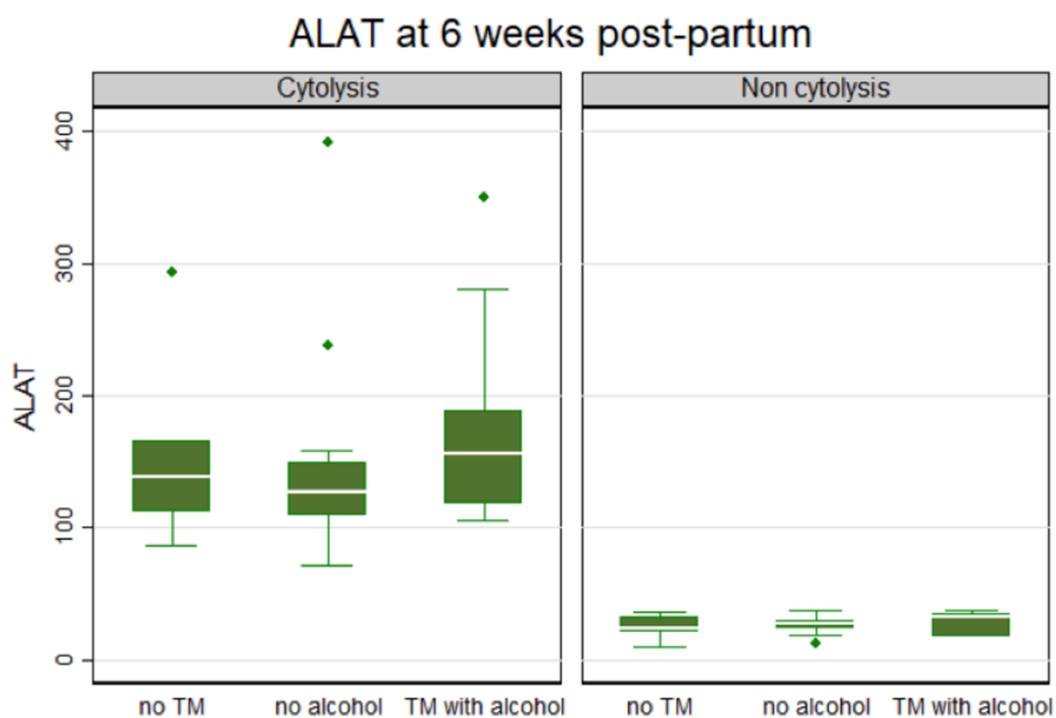
Table 2: Modes of administration and preparation (n=75)

	Cytolysis N=36	No cytolysis N=39	Total N=75	p Value
<i>Use at least one traditional remedy</i>	29 (80.6)	23 (59.0)	52 (69.3)	0.037
Mode of administration, N (%)				
<i>Drunk or swallowed at least 1 remedy</i>	27 (75.0)	20 (51.3)	47 (62.7)	0.034
<i>Swallowed at least 1 remedy</i>	2 (5.6)	4 (10.3)	6 (8.0)	0.453
<i>Drunk at least 1 remedy</i>	27 (75.0)	17 (43.6)	44 (58.7)	0.006
<i>Applied at least 1 remedy</i>	14 (38.9)	15 (38.5)	29 (38.7)	0.970
<i>Used at least 1 remedy as steam bath</i>	22 (61.1)	26 (66.7)	48 (64.0)	0.617
Mode of preparation, N (%)				
<i>Drunk or swallowed at least 1 remedy with alcohol</i>	12 (33.3)	5 (12.8)	17 (22.7)	0.034
<i>Took at least 1 remedy containing porcupine stomach*</i>	9 (25.0)	2 (5.1)	11 (14.7)	0.015
<i>Drunk or swallowed at least 1 remedy without alcohol</i>	15 (41.7)	15 (38.5)	30 (40)	0.77
<i>Inhaled at least 1 remedy or applied remedy followed by steam bath</i>	14 (38.9)	15 (38.5)	29 (38.7)	0.970
Number of remedies ingested by each patient (median, IQR)	2 (1 – 3)	1 (0 – 3)	2 (0 – 3)	0.105

*Porcupine stomach is always associated with alcohol

Drinking or swallowing at least one traditional remedy with alcohol was significantly associated with liver cytolysis. Among women with cytolysis, median ALT level at the 6th week post-partum was 148 U/L [114-204] for 12 women who orally consumed traditional medicine with alcohol, 126 [102-149] for 15 women with non-alcoholic traditional remedies and 136 [112-150] for 9 women without any traditional remedies (p=0.34) as shown in Figure 1.

Figure 1: ALT levels for 3 groups of women (1/Not drunk or swallowed TM; 2/Drunk or swallowed TM without alcohol; 3/Drunk or swallowed TM with alcohol)



Among all plants collected and identified (supplementary file), four were significantly associated with liver cytolysis ($p < 0.1$) (Table 3).

Table 4: Plants significantly associated with cytolysis (N=75)

Plant name	Total N(%)	Cytolysis N(%)	No cytolysis N(%)	p Value
<i>Amphineurion marginatum</i> (Roxb.) D.J.Middleton	5 (10.6)	5 (13.9)	0 (0.0)	0.022
<i>Selaginella tamariscina</i> (P.Beauv.) Spring	4 (8.5)	4 (11.1)	0 (0.0)	0.048
<i>Mitragyna speciosa</i> (Korth.) Havil.	6 (12.8)	5 (13.9)	1 (2.6)	0.099
<i>Tetracera indica</i> (Christm. & Panz.) Merr	9 (19.1)	7 (19.4)	2 (5.1)	0.079

DISCUSSION

Traditional medicine consumption was a common practice during post-partum period among women enrolled in ANRS12345 - TA PROHM study and included in this ancillary study. Drinking or swallowing at least one traditional remedy was found to be significantly associated with post-partum liver cytolysis, in association with alcohol. Among the 127 plants identified in the collected traditional remedies, four plants (*Amphineurion marginatum*, *Mitragyna speciosa*, *Tetracera indica* and *Selaginella tamariscina*) were reported as possibly associated with liver cytolysis. Two of these plants (*Amphineurion marginatum* and *Mitragyna speciosa*) are known for containing hepatotoxic compounds.

In total, 69.3% of the women consumed traditional remedies in our study, composed of 127 different plants and 62.7% orally absorbed traditional remedies in the form of infusion, decoction of herbal ingredients (dry or fresh plants) and/or alcoholic maceration (dry plants or porcupine stomach). In Cambodia, the use of herbal medicine during postpartum is a practice that has been described in a number of ethnobotanical studies. This could be explained by the low physician-to-patient rate, the local cost of Western treatments, and the high proportion of persons living in rural areas. A cross-sectional survey conducted in outpatients in two urban and two rural primary health centres reported that 27% of participants had at least one consultation with a traditional healer during the year preceding the survey, and herbal medicine represented 89% of the prescriptions (6). The common method of preparation is to boil the herbal ingredients or, optionally, to macerate the plant mixture in rice wine, then to drink it (9,15–17). The use of porcupine stomach is also a common practice in postpartum period and has been mentioned in some studies (13,18). In Cambodia, there is scarce information related to the composition of plant mixture orally consumed during postpartum. To date, 65 and 75 plant species consumed during postpartum as an infusion tea or alcoholic maceration have been identified in Prey Lang area and Monduliri province respectively (13,17). Postpartum consumption of herbal medicine in the form of decoction/infusion is also described in some other countries in Southeast Asia such as Thailand, Laos, and Malaysia (19–22). The ingestion of alcoholic maceration of herbal ingredients is also documented in Thailand (23–25). A review of medicinal plants for women's healthcare in Southeast Asia focusing on about 200 studies reported that nearly 2000 different plant species are used in over 5000 combinations. These plants are mainly used to treat postpartum hemorrhage, postpartum pain, microbial infections, and as lactation stimulants (26).

Biochemical- hepatic flares with increased ALT levels have been reported during early postpartum when immune reconstitution occurs (27,28). The reported rates of ALT flares in postpartum are variable according to the definition and the presence of antiviral therapy and could be more common for positive HBeAg women (29,30). In our study, while the proportions of positive HBeAg women and TDF-treated women are similar in the two groups, drinking at least one traditional remedy in association with alcohol was significantly associated with acute liver cytolysis. Drug-induced liver injury (DILI) during pregnancy and postpartum was documented

with many medications (31) but few with herbal medications and traditional medicines (32,33). In a recent systematic review of 31 articles evaluating DILI/Herb-induced liver injury (HILI) in general population, 60.7% were reported by conventional drugs and 25.0% by herbs (34). In this systematic review, liver cytolysis was significantly more frequent for HILI as compared to DILI and cholestatic presentation more frequent for DILI as compared to HILI. However, in this review, while 35 different herbs were identified, no information was provided about a possible association with alcohol. As previously mentioned, alcoholic maceration is frequently reported in Southeast Asia. Alcoholic maceration of plants or porcupine stomach may represent a confounding and/or exacerbating factor of acute liver cytolysis, specifically for patients with pre-existing risk factor of liver disease as HBV infection (35). DILI was reported more severe for patients with a pre-existing liver disease (36). The use of traditional medicine in combination with alcohol may represent a cumulative factor for postpartum acute liver cytolysis among HBV-infected pregnant women exposed to immune restoration.

Four of the 127 plants identified were possibly associated with post-partum cytolysis, and two, *Amphineurion marginatum* and *Mitragyna speciosa*, have been found to contain hepatotoxic compounds. Root, leaf and stem material of *Amphineurion marginatum* contain pyrrolizidine alkaloids (37). This group of compounds are found in a variety of plant species and were the cause of large and recurring episodes of acute hepatotoxicity in several countries (38). Following oral absorption, these alkaloids are converted to their ester metabolites, which are biological alkylating agents capable of causing tissue damage and inducing genetic mutations. In animals, an acute intoxication results in massive elevations in activity of serum liver enzymes while in chronic poisoning, transient elevations in the activities of these enzyme were observed. In human, during acute poisoning, these alkaloids cause thickening and fibrosis of the hepatic sinusoids and central veins, which leads to increased pressure in the portal venous system; collectively termed “hepatic sinusoidal obstruction syndrome or veno-occlusive disease”. However, the time span between the onset of the consumption and the apparition of signs of intoxication was not mentioned (38,39). *Mitragyna speciosa*, on the other hand, has been found to be hepatotoxic in *in vitro* and *in vivo* studies (40,41) as well as in a number of case reports (42,43). Its hepatotoxicity is probably due to its main alkaloid, mitragynine, which has been found to cause liver injury via hepatocellular damage and cholestatic mechanisms (44,45).

Our study has some limitations. First, the small sample size is a limit to differentiate the confounding factors represented by the plants and alcohol. Due to heterogenous posology of alcohol-based traditional remedies, their daily and total quantity could not be determined. Secondly, the study would have benefited from an *in vitro* analysis of cytolysis on hepatocytes to confirm the possible toxicity of the four plants identified.

In conclusion, the consumption of traditional medicine in postpartum is a common practice in Cambodia, possibly in association with alcohol. Such consumption, in postpartum, in HBV-infected women may be responsible for acute liver cytolysis, thus impairing appropriate liver disease assessment for future therapeutic decision. The complex mixtures of herbs, which have a

higher metabolic demand for liver and potential interaction among ingredients, needs to be further evaluated by *in vitro* and *in vivo* studies.

List of abbreviations:

ALT: Alanine aminotransferase

ANRS: Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales

DILI: drug-induced liver injury

HAV: hepatitis A virus

HBV: hepatitis B virus

HBsAg: hepatitis B virus antigen

HCV: hepatitis C virus

HEV: hepatitis E virus

HIV: human immunodeficiency virus

IFCC: (International Federation of Clinical Chemistry)

IQR: interquartile ranges

MTCT: mother-to-child-transmission

NECHR: National Ethics Committee for Health Research

ULN: Upper Limit of Normal

References

1. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015 Oct 17;386(10003):1546–55.
2. Jonas MM. Hepatitis B and pregnancy: an underestimated issue. *Liver Int*. 2009 Jan;29 Suppl 1:133–9.
3. Ork V, Woodring J, Shafiqul Hossain M, Wasley A, Nagashima S, Yamamoto C, et al. Hepatitis B surface antigen seroprevalence among pre- and post-vaccine cohorts in Cambodia, 2017. *Vaccine*. 2019 14;37(35):5059–66.
4. Bulletin de la Société des Études Indochinoises, Tome XL, Nos. 1-2-3-4. [Internet]. [cited 2021 Mar 10]. Available from: <https://www.livre-rare-book.com/book/5473021/8080>

5. Chhem - 2007 - La médecine au service du pouvoir angkorien Unive.pdf [Internet]. [cited 2021 Mar 10]. Available from: <https://journals.sfu.ca/cjbs/index.php/cjbs/article/viewFile/78/75>
6. Pearson H, Fleming T, Chhoun P, Tuot S, Brody C, Yi S. Prevalence of and factors associated with utilization of herbal medicines among outpatients in primary health centers in Cambodia. *BMC Complement Altern Med*. 2018 Apr 2;18(1):114.
7. White PM. Crossing the river: Khmer women's perceptions of pregnancy and postpartum. *J Midwifery Womens Health*. 2002 Aug;47(4):239–46.
8. Turner C, Pol S, Suon K, Neou L, Day NPJ, Parker M, et al. Beliefs and practices during pregnancy, post-partum and in the first days of an infant's life in rural Cambodia. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2017 12;17(1):116.
9. Richman MJ, Nawabi S, Patty L, Ziment I. Traditional Cambodian Medicine. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* [Internet]. 2010 Jan 12 [cited 2021 Mar 10];7(1). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2202/1553-3840.1194/html>
10. Chassagne F, Deharo E, Punley H, Bourdy G. Treatment and management of liver diseases by Khmer traditional healers practicing in Phnom Penh area, Cambodia. *J Ethnopharmacol*. 2017 Apr 18;202:38–53.
11. Liu C, Fan H, Li Y, Xiao X. Research Advances on Hepatotoxicity of Herbal Medicines in China. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7150391.
12. Lee W-J, Kim H-W, Lee H-Y, Son C-G. Systematic review on herb-induced liver injury in Korea. *Food Chem Toxicol*. 2015 Oct;84:47–54.
13. Chassagne F, Hul S, Deharo E, Bourdy G. Natural remedies used by Bunong people in Mondulakiri province (Northeast Cambodia) with special reference to the treatment of 11 most common ailments. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2016 Sep [cited 2021 Mar 10];191:41–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874116303555>
14. Chassagne F, Deharo E, Punley H, Bourdy G. Treatment and management of liver diseases by Khmer traditional healers practicing in Phnom Penh area, Cambodia. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2017 Apr [cited 2021 Mar 10];202:38–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117300156>
15. Deur, Kayla N., "Traditional Medicine Usage and the Transmission of Traditional Ecological Knowledge in Three Villages Near Phnom Kulen National Park" (2015). *Environmental Studies / Environmental Science Student Scholarship*. 1. <https://digitalcommons.hollins.edu/esstudents/1>
16. Bazzano AN, Stolow JA, Duggal R, Oberhelman RA, Var C. Warming the postpartum body as a form of postnatal care: An ethnographic study of medical injections and traditional health practices in Cambodia. *PLOS ONE*. 2020 Feb 6;15(2):e0228529.

17. Grape VH, Turreira-Garcia N, Holger-Schmidt L, Srisanga P. (2016) Postpartum phytomedicine and its future in maternal healthcare in Prey Lang, Cambodia. *Cambodian Journal of Natural History*, 2016, 119-133.
18. White P. Heat, Balance, Humors, and Ghosts: Postpartum in Cambodia. *Health Care for Women International*. 2004 Feb 1;25(2):179–94.
19. Withers M, Kharazmi N, Lim E. Traditional beliefs and practices in pregnancy, childbirth and postpartum: A review of the evidence from Asian countries. *Midwifery*. 2018 Jan 1;56:158–70.
20. Panyaphu K, Van On T, Sirisa-ard P, Srisa-nga P, ChansaKaow S, Nathakarnkitkul S. Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011 May 17;135(2):226–37.
21. Barennes H, Simmala C, Odermatt P, Thaybouavone T, Vallee J, Martinez-Ussel B, et al. Postpartum traditions and nutrition practices among urban Lao women and their infants in Vientiane, Lao PDR. *Eur J Clin Nutr*. 2009 Mar;63(3):323–31.
22. Cs T, A MHI, Wf WM, Sh A, Nh MZ, Na MI, et al. Herbal Ingestion During Pregnancy and Post-Partum Period is A Cause For Concern. *Med J Malaysia*. 2013 Apr 1;68(2):157–60.
23. Rice PL, Naksook C, Watson L. The experiences of postpartum hospital stay and returning home among Thai mothers in Australia. *Midwifery*. 1999 Mar 1;15(1):47–57.
24. Suksamarnwong M, Hemachatra A, Laosooksatit W, Baiya N, Puapornpong P. The Lactating Mothers' Drug Use and Associated Factors during the First Month Postpartum. *JOURNAL OF THE MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND*. 2017 Oct 1;100(10):48.
25. Purnell LD. People of Thai Heritage. In: Purnell LD, Fenkl EA, editors. *Textbook for Transcultural Health Care: A Population Approach: Cultural Competence Concepts in Nursing Care* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2021 Jun 16]. p. 699–716. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-51399-3_27
26. de Boer HJ, Cotington C. Medicinal plants for women's healthcare in southeast Asia: A meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014 Feb 3;151(2):747–67.
27. Bzowej NH, Tran TT, Li R, Belle SH, Smith CI, Khalili M, et al. Total Alanine Aminotransferase (ALT) Flares in Pregnant North American Women With Chronic Hepatitis B Infection: Results From a Prospective Observational Study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2019 Aug [cited 2021 Jun 5];114(8):1283–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7132838/>

28. Chang CY, Aziz N, Poongkunran M, Javaid A, Trinh HN, Lau D, et al. Serum Alanine Aminotransferase and Hepatitis B DNA Flares in Pregnant and Postpartum Women with Chronic Hepatitis B. *Am J Gastroenterol*. 2016 Oct;111(10):1410–5.
29. Giles M, Visvanathan K, Lewin S, Bowden S, Locarnini S, Spelman T, et al. Clinical and virological predictors of hepatic flares in pregnant women with chronic hepatitis B. *Gut*. 2015 Nov;64(11):1810–5.
30. Kushner T, Shaw PA, Kalra A, Magaldi L, Monpara P, Bedi G, et al. Incidence, determinants and outcomes of pregnancy-associated hepatitis B flares: A regional hospital-based cohort study. *Liver Int*. 2018 May;38(5):813–20.
31. Lao TT. Drug-induced liver injury in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jun 5];68:32–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693420300468>
32. Bruno LO, Simoes RS, de Jesus Simoes M, Girão MJBC, Grundmann O. Pregnancy and herbal medicines: An unnecessary risk for women's health-A narrative review. *Phytother Res*. 2018 May;32(5):796–810.
33. Dağ M, Öztürk Z, Aydın M, Koruk İ, Kadayıfçı A. Postpartum hepatotoxicity due to herbal medicine *Teucrium polium*. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 5];34(6):541–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6074566/>
34. Byeon J-H, Kil J-H, Ahn Y-C, Son C-G. Systematic review of published data on herb induced liver injury. *J Ethnopharmacol*. 2019 Apr 6;233:190–6.
35. Couzigou P, Foucher J, Castera L, De Ledinghen V. [Managing comorbidities in hepatology: toward a more holistic medicine]. *Presse Med*. 2008 Sep;37(9):1274–80.
36. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, Lee W, Stolz A, Talwalkar J, et al. Features and Outcomes of 899 Patients With Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Jun 7];148(7):1340-1352.e7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650851500311X>
37. Colegate SM, Gardner DR, Betz JM, Fischer OW, Liede-Schumann S, Boppré M. Pro-toxic 1,2-Dehydropyrrolizidine Alkaloid Esters, Including Unprecedented 10-Membered Macrocyclic Diesters, in the Medicinally-used *Alafia cf. caudata* and *Amphineurion marginatum* (Apocynaceae: Apocynoideae: Nerieae and Apocynaeae). *Phytochem Anal*. 2016 Sep;27(5):257–76.
38. Edgar JA, Molyneux RJ, Colegate SM. Pyrrolizidine Alkaloids: Potential Role in the Etiology of Cancers, Pulmonary Hypertension, Congenital Anomalies, and Liver Disease. *Chem Res Toxicol*. 2015 Jan 20;28(1):4–20.
39. Stegelmeier BL, Colegate SM, Brown AW. Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2016 Nov 29 [cited 2019 Oct 18];8(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198550/>

40. Harizal SN, Mansor SM, Hasnan J, Tharakan JKJ, Abdullah J. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Rodent. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010 Sep 15;131(2):404–9.
41. Ilmie MU, Jaafar H, Mansor SM, Abdullah JM. Subchronic toxicity study of standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Sprague-Dawley Rats. *Front Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 May 20];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00189/full>
42. Rivero M, Chang M, Soldevila-Pico C, Lai J, Liu X. Histologic Characterization of Kratom Use-Associated Liver Injury. *Gastroenterology Research*. 2018 Feb 23;11(1):79–82.
43. Aldyab M, Ells PF, Bui R, Chapman TD, Lee H. Kratom-Induced Cholestatic Liver Injury Mimicking Anti-Mitochondrial Antibody-Negative Primary Biliary Cholangitis: A Case Report and Review of Literature. *Gastroenterology Research*. 2019 Aug 24;12(4):211–5.
44. Pantano F, Tittarelli R, Mannocchi G, Zaami S, Ricci S, Giorgetti R, et al. Hepatotoxicity Induced by “the 3Ks”: Kava, Kratom and Khat. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 16;17(4):580.
45. Schimmel J, Dart RC. Kratom (*Mitragyna Speciosa*) Liver Injury: A Comprehensive Review. *Drugs*. 2020 Feb;80(3):263–83.

Titre : Stratégie alternative de prévention de la transmission mère-enfant de l'hépatite B au Cambodge : l'étude ANRS 12345 TA PROHM

Mots clés : virus de l'hépatite B, femmes enceintes, transmission mère-enfant, sante publique, Cambodge

Résumé: La transmission mère-enfant (TME) de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est à l'origine de la plupart des hépatites B chroniques dans les pays à forte endémie pour le VHB. La prévention repose sur la vaccination précoce des nouveau-nés à la naissance et, pour les femmes positives pour l'AgHBs, sur l'administration d'un traitement antiviral au troisième trimestre si la charge virale VHB est $> 5.3 \log_{10}$ UI/mL et d'immunoglobulines (HBIg) au nouveau-né. Au Cambodge, les prévalences du VHB chez les femmes enceintes, les enfants âgés de 5 à 7 ans et chez ceux nés de mères positives pour l'AgHBs ont été estimées à 4%, 0.6% et 10%, respectivement.

L'objectif de cette thèse était de concevoir et évaluer un programme de réduction de la TME du VHB au Cambodge en utilisant une stratégie basée sur les outils disponibles dans le pays. Ce travail s'est construit autour de l'étude ANRS 12345 TA PROHM dont l'objectif était d'évaluer l'efficacité d'une stratégie alternative sans HBIg de prévention de la TME du VHB au Cambodge basée sur 1/l'utilisation de tests de diagnostic rapides (TDR) AgHBs et AgHBe pour le dépistage et la prise en charge de l'infection VHB en peripartum 2/un traitement par Tenofovir à partir de 24 semaines d'aménorrhée des femmes éligibles 3/une vaccination précoce pour tous les enfants à la naissance (< 2 heures de vie).

La première étape du travail de thèse a été de valider l'utilisation des 2 TDRs, l'AgHBs pour le dépistage de l'infection VHB et l'AgHBe pour décider de l'éligibilité au TDF. Une première évaluation a mis en évidence l'excellente performance du TDR AgHBs comparé à une technique immunoenzymatique mais une sensibilité insatisfaisante du TDR AgHBe pour identifier les femmes avec un niveau d'ADN VHB $> 5,3 \log_{10}$ UI/mL.

Un nouvel algorithme sélectionnant les femmes AgHBe positives et celles AgHBe négatives avec un taux d'ALAT > 40 U/L a permis d'augmenter la sensibilité de 17% pour ce seuil de charge virale et a été utilisé dans l'étude à partir de Janvier 2019. De 2017 à 2020, 21 251 femmes ont été dépistées en consultation anténatale dans 5 hôpitaux cambodgiens. Parmi elles, 1194 ont pu être incluses dans l'étude dont 338 (28%) étaient éligibles au TDF. En l'absence d'HBIg, le taux de TME du VHB était de 1.48% [IC95%, 0.40-3.74] pour les femmes éligibles au TDF et de 0% [IC95%, 0-1.41] pour celles traitées plus d'un mois avant l'accouchement. Ce taux était de 8.33% [IC95%, 1.75-22.5] pour celles traitées moins d'un mois, soulignant l'importance du dépistage précoce pendant la grossesse. Pour les femmes non éligibles au TDF, le taux de transmission était de 1.06% [IC95%, 0.39-2.30], la transmission survenant chez des femmes hautement virémiques non dépistées par l'algorithme.

Ce travail montre qu'une stratégie alternative sans HBIg utilisant un traitement antiviral prophylactique maternel par TDF pendant au moins un mois avant l'accouchement associé à une vaccination précoce du nourrisson à la naissance permet de prévenir la TME du VHB. Cette stratégie est applicable en zones décentralisées, ce qui est essentiel pour des pays comme le Cambodge où l'accès au plateau technique est limité aux capitales ou aux grandes villes. Une telle stratégie doit maintenant être implantée en zones rurales en intégrant une analyse des coûts et des circuits d'approvisionnement en médicaments et réactifs afin d'amorcer l'engagement politique nécessaire pour un passage à l'échelle sur l'ensemble du pays.

Title : Alternative strategy to prevent HBV mother-to-child transmission in Cambodia: the ANRS 12345 TA PROHM study

Keywords : Hepatitis B virus, pregnant women, mother-to-child transmission, public health, Cambodia

Abstract : Mother-to-child transmission (MTCT) of hepatitis B virus (HBV) infection is the cause of most chronic hepatitis B in countries with high HBV endemicity. Prevention is based on early vaccination of newborns at birth and, for HBsAg-positive women, on the administration of antiviral treatment in the third trimester of pregnancy if the HBV DNA viral load is $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL and immunoglobulin (HBIg) to the newborn. In Cambodia, the prevalence of HBV infection among pregnant women, children aged 5 to 7 years, and those born to HBsAg-positive mothers was estimated at 4%, 0.6%, and 10%, respectively.

The objective of this thesis was to design and evaluate a strategy to reduce HBV MTCT in Cambodia using tools available in the country. This work was structured around the ANRS 12345 TA PROHM study which objective was to evaluate the effectiveness of an HBIg-free alternative strategy to prevent HBV MTCT in Cambodia based on 1/ the use of HBsAg and HBeAg rapid diagnostic tests (RDT) for the screening and management of HBV infection in peripartum 2/a treatment with tenofovir from 24 weeks of amenorrhea of eligible women 3/an early vaccination for all infants at birth (< 2 hours of life).

The first step was to validate the use of the two RDTs, HBsAg for screening HBV infection and HBeAg for deciding eligibility for TDF. A first evaluation reported the excellent performance of the HBsAg RDT as compared to an enzyme immunoassay technique but an unsatisfactory sensitivity of the HBeAg RDT to identify women with an HBV DNA viral load level $> 5.3 \log_{10}$ IU/mL.

A new algorithm selecting HBeAg-positive women and HBeAg-negative women with ALT > 40 U/L increased sensitivity by 17% for this viral load threshold and was used in the study from January 2019.

From 2017 to 2020, 21,251 women were screened in antenatal care. Of these, 1194 could be included in the study, of whom 338 (28%) were eligible for TDF. In the absence of HBIg, the rate of HBV MTCT was 1.48% [CI95%, 0.40-3.74] for women eligible for TDF and 0% [CI95%, 0-1.41] for those treated more than one month before delivery. In contrast, the rate of HBV MTCT was 8.33% [CI95%, 1.75-22.5] for those treated less than one month, highlighting the importance of HBV early detection during pregnancy. For women not eligible for TDF, the transmission rate was 1.06% [CI95%, 0.39-2.30], with transmission occurring in highly viremic women not identified by the algorithm. This work shows that an HBIg-free alternative strategy using maternal antiviral prophylaxis with TDF for at least one month before delivery combined with an early infant vaccination at birth can prevent HBV MTCT. This strategy is applicable in decentralized areas, which is essential for countries such as Cambodia where access to technical facilities is limited to the capital or major provincial cities. Such a strategy needs to be implemented in rural settings, including an analysis of the costs and supply chains of drugs and reagents, to initiate the political commitment necessary for a nationwide scaling-up.