

# THESE

Pour le

doctorat de l'université de Bordeaux 2

mention : *Sciences Biologiques et Médicales*

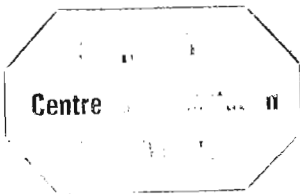
Option : *Epidémiologie et Intervention en Santé Publique*

Présentée et soutenue publiquement le 11 Mai 1998

100 000

0

par



François SIMONDON

EFFICACITE VACCINALE, DEFINITION, MESURE ET INTERPRETATION.  
EXEMPLE DES VACCINATIONS CONTRE LA COQUELUCHE

**Membres du Jury :**

Monsieur R. Salamon, Professeur, Bordeaux  
Monsieur F. Dabis, Professeur, Bordeaux  
Madame H. Sancho-Garnier, Professeur, Montpellier  
Monsieur B. Philippon, Directeur de Recherche, Paris  
Madame N. Guiso, Chef de laboratoire, Paris  
Monsieur M. Cadoz, Chef de Projet, Lyon  
Monsieur J. Drucker, Professeur, Tours  
Monsieur R. Salmi, Professeur, Bordeaux

Président  
Directeur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

05  
SIM



## Remerciements

Je remercie Monsieur François Dabis, Professeur à la faculté de médecine, Université de Bordeaux 2, d'avoir accepté de diriger ce travail. Son accueil toujours chaleureux et son expérience m'ont été utiles à discipliner les bouffées accumulées lors de ces dernières années de terrain.

Je remercie Monsieur Roger Salamon, Professeur à la faculté de médecine, Université de Bordeaux 2, et président de ce Jury, pour avoir accepté le thème de ce travail ainsi que les conditions de sa réalisation.

Je remercie Madame Hélène Sancho-Garnier, Professeur à la faculté de Médecine, Université de Montpellier 1, qui a bien voulu juger ce travail et en être rapporteur.

Je remercie Monsieur Bernard Philippon, Directeur de Recherche à l'Institut Français de Recherches Scientifiques pour le Développement en Coopération (ORSTOM), d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je le remercie également pour son soutien décisif lors de la mise en place de ce programme au Sénégal, et au cours de sa réalisation.

Je remercie Madame Nicole Guiso, Chef de Service à l'Institut Pasteur, pour son intervention décisive pour l'organisation du laboratoire lors de l'épidémie de 1993, qui a conditionné la réussite de l'étude, et pour son enthousiasme. La collaboration qui a suivi, impliquant aussi son équipe à Pasteur, est pour moi un exemple de complémentarité entre disciplines. Je la remercie également d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Michel Cadoz pour son soutien constant au cours de ces années. Nous avons admiré sa capacité à préserver son indépendance d'esprit et son intuition. Je le remercie également d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Monsieur Jacques Drucker, Professeur à la faculté de Médecine, Université de Tours, d'avoir accepté d'être membre du jury. Sa présence discrète a suivi le déroulement de ce travail, au détour des publications et des rencontres.

Je remercie Monsieur Rachid Salmi, Professeur à la faculté de Médecine, Université de Bordeaux 2, d'avoir accepté d'être membre du jury. Ses avis lors de l'élaboration de l'étude au Sénégal ont contribué à son bon déroulement.

Je remercie toute « mon » équipe du « programme coqueluche » du centre ORSTOM de Hann et de l'hôpital Le Dantec à Dakar : Jean Christophe Busquet, Laurence Chabirand, Elisabeth Delajudie, Marème Dia, Sekou Djiba, Alassane Faye, Jean Yves Gagnepain, Babacar Gning, Coumba Toure Kane, Souleymane Mboup, Aïda Ndiaye, Emilie Ndiaye, Malick Ndiaye, Tofen Ndiaye, Etienne Ndong, Antoine Ndour, Marie-Pierre Preziosi, Marie Sane, Aminata Simaga, Cheikh Sy, Ablaye Yam. Nous avons vécu ensemble ce travail.

Je remercie la famille d'accueil de ce programme envahissant. Mais Valérie Delaunay, Joseph Diatte, Bassirou Fall, Ernest Faye, Elisa Manga, Adama Marra, Michel Ndiaye, Emile Ndiaye, Ousmane Ndiaye, tous piliers de l'équipe, ont résisté.

Anouch Chahnazarian avait su prendre naturellement une place centrale dans cette équipe, et son départ tragique nous a unis.

Je remercie Steve Wassilak et Gary Sanden pour leur intérêt stimulant tout au long de notre étude.

Je remercie l'équipe du laboratoire des Bordetelles de l'Institut Pasteur de Paris. Fotini Betsou, Emmanuel Grimprel, Pascale Gueirard, Nadia Khelef, Elisabeth Njamkepo, Sabine Poiret, et Christian Weber ont bien voulu nous faire profiter de leurs connaissances et consacrer du temps à nos études. Ils ont accueilli notre ingénieur de l'ORSTOM affecté chez eux, et lui ont assuré un cadre exceptionnel de travail.

Je remercie Isabelle Iteman, qui a si bien su prendre en charge les analyses par PCR et les analyses sérologiques de l'étude Sénégal à Pasteur.

Je remercie André Fontana, ancien directeur du centre ORSTOM de Dakar, pour son impératif soutien dans les moments difficiles. Je remercie ses successeurs, Monsieur Philippe Mathieu et Madame Dominique Agostini, qui d'une façon différente ont su adapter leur administration à notre dispositif.

Je remercie Sylvie Pretet qui, de son bureau à Paris, a toujours défendu notre budget et fait en sorte que nous n'en soyons pas soucieux.

Je remercie les autorités Sénégalaises, qui ont autorisé nos programmes à Niakhar, et en ont suivi le déroulement. Ils ont souhaité l'intégration de nos équipes aux structures opérationnelles de la circonscription médicale et de la région médicale de Fatick. Cette ouverture nous a beaucoup appris.

Je remercie l'équipe de Pasteur-Mérieux à Marnes, qui nous a toujours aidés, et dont les visites sur le terrain ont toujours été stimulantes : Fabrice Bailleux, Michèle Bodin, Carole Cluchat, Albert Garcia, Patrice Gobert, Bernard Fritzell, Magalie Joullié, Françoise Laurent, Christine Mazeau, Pascale Méridat, Emmanuelle Pines, Murielle Roux, Hervé Salomon.

Je remercie Christine Blondeau et Françoise Fiévet, qui ont réalisé le contrôle des données du laboratoire de Dakar et les analyses par PCR de nos prélèvements.

Je remercie Agnès Hoffenbach pour sa capacité de compréhension et d'attention à nos exigences, et la qualité de notre collaboration.

Je remercie Pierre Saliou pour l'attention et la bienveillance qu'il a porté à cette étude.

Je remercie Stanley Plotkin. Nous avons bénéficié de sa capacité d'écoute et de captation d'information, puis de restitution ordonnée enrichie de son expérience.

Je remercie les membres du comité scientifique de l'étude. Les réunions de ce comité ont rythmé et guidé nos activités. Kathy Edwards nous a toujours encouragés et conseillés, lors de ses visites, mais aussi par courrier en réponse à nos demandes. Elle a accueilli Isabelle Iteman dans son laboratoire, mais aussi dans sa famille, lors de l'acquisition et du transfert de la technique sérologique pour l'étude. Georges Curlin nous a fait bénéficier de son expérience, et nous avons apprécié son intérêt visible pour notre environnement de travail, et l'absence de préjugés. Paul Fine nous a stimulé par son exaspérante lucidité dont nous voudrions continuer

à bénéficier. Patrick Olin, par son intransigeance éclairée, nous a préparé à défendre nos résultats et nos idées.

Je remercie les membres du comité de sécurité de l'étude. Pierre Bégué a accepté de présider ce comité de sécurité, et nous a fait bénéficier de ses conseils et encouragements. Je remercie Awa Coll-Seck d'avoir accepté la lourde tâche de supervision des effets secondaires possibles, à Dakar. Je remercie Laure Papoz d'avoir encore une fois accepté de se détourner de ses activités et de son domaine d'application pour s'adapter à mon indiscipline thématique apparente, et consacrer du temps au suivi des effets secondaires et des décès, en relation avec Pierre Bégué. Ses conseils et son soutien lors de l'élaboration du protocole ont été précieux.

Je remercie Jean Louis Frézil, responsable du Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs au centre ORSTOM de Montpellier, de m'avoir accueilli, moi et mon programme allogène, lors de mon retour du Sénégal. Il m'a ainsi permis de poursuivre mes analyses, et de superviser les protocoles en cours.

Je remercie Christian Bellec pour son accueil, sa confiance, et son intérêt naissant pour l'étude des vaccins.

Je remercie Sybil Pinchinat et Hayet Khodja pour leur...*efficacité* dans le travail, et leur adaptation rapide aux analyses de l'étude Sénégal.

Je remercie l'équipe du service de documentation de l'ORSTOM à Montpellier pour leur aide dans nos recherches bibliographiques, et l'intérêt qu'elles ont manifesté.

Je remercie également, pour son soutien précis dans ce domaine, Peter Aaby et son équipe du département de recherche en épidémiologie du Statens Serum Institut de Copenhague. Je remercie aussi Peter pour la qualité de notre collaboration dans nos recherches sur la rougeole.

Je remercie Colette Roure, du bureau régional de l'OMS à Copenhague, pour son aide à la recherche d'informations sur la situation épidémiologique actuelle.

Je remercie Monsieur Maurice Huet, directeur honoraire du laboratoire national de la santé à Montpellier, pour sa disponibilité et ses renseignements précieux. Sa passion pour l'histoire des maladies infectieuses est contagieuse.

Je remercie Monsieur Edgard Relyveld pour la qualité de la documentation fournie en réponse à mes demandes, et pour ses conseils passionnés.

Je remercie Madame Michelle Simondon, qui a bien voulu consacrer du temps à effectuer des recherches historiques et littéraires sur la notion d'efficacité en médecine, et que nous devons continuer.

Je remercie Kirsten Simondon pour son soutien, ses avis, sa présence. La réalisation conjointe du programme de nutrition dans la zone de Niakhar sous sa direction, et son succès, ont donné un sens à notre investissement dans la direction de l'ensemble du projet.

*A Kirsten, Maria, Karin et Emil*

*« As vaccination against whooping cough is still much discussed, the following observations might perhaps be of some interest.»*

*Thorvald Madsen, 1933*

## **Sommaire**

### **Introduction**

#### **1. Le problème du contrôle de la coqueluche et son contexte méthodologique**

##### **1.1 La coqueluche et sa prévention**

##### **1.2 Mesure de l'efficacité des vaccins**

#### **2. L'évaluation épidémiologique des vaccins contre la coqueluche au Sénégal**

##### **2.1 Etude d'immunogénicité**

##### **2.2 Etude d'efficacité protectrice**

##### **2.3 Interprétation des résultats sérologiques**

##### **2.4 Analyse du critère de jugement**

##### **2.5 Consentement informé**

#### **3. Discussion**

##### **3.1 Standardisation**

##### **3.2 Choix du vaccin de référence**

##### **3.3 Limites des essais cliniques**

### **Références**

### **Table des matières**

### **Résumé**

## **Introduction**

Durant les 20 dernières années, des efforts particuliers ont été déployés au niveau international pour l'amélioration des vaccins contre la coqueluche, pour différentes raisons. Si la recherche d'une amélioration est l'objet même de la recherche, dans le domaine de la coqueluche et de sa prévention il nous semble qu'il y a des éléments particuliers et peut-être nouveaux à l'échelle des acteurs impliqués, qui peuvent être exemplaires, et dont nous souhaitons proposer une analyse. Un enseignement pourrait en être tiré, utile pour d'autres situations. De façon périodique, la collectivité médicale, scientifique, et de plus en plus le public, sont confrontés à des situations nouvelles, suscitées par le fruit des recherches, ou par les effets à long terme des interventions ou de l'activité humaine, souvent résumées sous le terme de développement. Ceci se produit par exemple lors de l'apparition d'une nouvelle thérapeutique efficace contre une maladie grave. La réponse à l'émotion suscitée par les problèmes de disponibilité des nouvelles thérapeutiques dans le cadre du Sida et surtout leur relation avec l'expérimentation (Barriet, communication personnelle) aurait ainsi sûrement profité de la « culture » de l'utilisation contrôlée de la Streptomycine en 1946 en Angleterre (Hill, 1963). Cet aspect avait été souligné par Comstock à propos d'un séminaire sur les essais cliniques dans le domaine des maladies cardio-vasculaires (Comstock, 1978). Il notait une insuffisance de recours à ce qui a déjà été fait dans d'autres domaines, précisément celui de la vaccination, de la chimio-prophylaxie, et de la chimiothérapie de la tuberculose. Ceci conduit au mieux à des efforts inutiles de ré-invention, au pire à des erreurs. Une situation inhabituelle, qui ne serait pas replacée dans un contexte connu, peut entraîner un non respect des principes de base. Mais Comstock explique que son ressentiment fait rapidement place au regret que les acteurs de ces essais sur la tuberculose n'aient pas tiré les leçons générales de



leurs études, au delà de la mise en évidence de l'efficacité de tel ou tel vaccin ou antibiotique contre la tuberculose.

Il nous a semblé qu'il y avait une certaine similitude dans l'exemple des études sur l'amélioration des vaccins contre la coqueluche, qui a représenté une situation nouvelle qui elle-même n'a pas su bénéficier suffisamment des leçons du passé. Par exemple, si le contexte social et scientifique a évolué, les différentes étapes de la vaccination contre la variole dans leur relation avec les interrogations concernant son efficacité, la durée de sa protection, l'importance progressive de la vaccination des adultes et son innocuité (Grmek, 1996) ne sont pas sans analogies avec la coqueluche. La nature dynamique des relations entre l'incidence d'une maladie, la couverture vaccinale et les réactions secondaires liées à la vaccination est maintenant connue (Chen *et al.*, 1996). On peut attendre de l'analyse de ces analogies, tenant compte des contrastes liés à l'évolution des sciences et des sociétés, une attitude optimisée de réponse à une problématique de santé. Par certains aspects, il est sûrement encore trop tôt pour mener une analyse complète selon cette perspective des récentes activités dans le domaine de la prévention de la coqueluche. Une recherche historique objective et de qualité reviendra naturellement à des historiens indépendants. L'interprétation complète des résultats des différentes études est encore inachevée, et peut être influencée par des intérêts de tous ordres. Aussi, le but de ce travail n'est-il pas de mener une analyse historique, mais de proposer une première analyse « d'utilité générale », donc sans interprétation centrée sur les résultats pour eux-mêmes. Notre objectif est de contribuer à initier cette démarche, en faisant porter l'accent sur les aspects méthodologiques des études de protection clinique par des vaccins, tout en tenant nécessairement compte de leur relation avec la société.

Une première partie introduit dans un premier chapitre la coqueluche, sa physiopathologie, son contexte clinique et épidémiologique, et l'évolution de la mise au point

des vaccins. Un travail précis de documentation des textes anciens (relativement à la physiopathologie et aux vaccins contre la coqueluche) a été effectué d'abord par nécessité, puis par intérêt, pour une recherche à posteriori de concepts qui pourraient être utiles. Comme l'a souligné M. Pittman, citant la première phrase d'un de ses articles de 1925 à propos d'une revue sur cette maladie : «*In reviewing the literature, I find it as confusing as extensive*» (Pittman, 1991). Cette remarque reste d'actualité en 1998. Pour situer la problématique actuelle des vaccins acellulaires, il était aussi utile de préciser l'historique du développement des vaccins contre la coqueluche. Le deuxième chapitre de cette première partie traite de la méthodologie de l'évaluation clinique ou épidémiologique de la protection vaccinale. Nous avons cherché à situer la méthode de référence actuelle (l'essai clinique randomisé en double aveugle) par rapport à l'évolution qui y a conduit, pour mieux analyser son utilisation actuelle, et ses limites.

La deuxième partie rapporte les études réalisées au Sénégal sur le vaccin à germes entiers utilisé dans le cadre du programme élargi de vaccinations, considéré comme la référence, et sur un vaccin acellulaire contre la coqueluche. Les deux premiers chapitres rapportent les résultats d'immunogénicité et d'efficacité protectrice, sous la forme de deux publications. Les deux chapitres suivants portent sur des analyses complémentaires qui permettent de préciser l'interprétation des résultats. Il s'agit d'analyses portant sur la qualité du critère de jugement et son influence sur l'estimation de l'efficacité protectrice. Un premier travail porte sur l'interprétation des résultats sérologiques, composante du critère diagnostic, et les risques d'erreur de classification différentielle. Une seconde analyse porte sur l'application de la méthode de capture-recapture sur le critère de jugement lorsqu'il est composite. Notre but ici est de souligner les limites d'interprétation des valeurs d'efficacité vaccinale. Enfin, un dernier chapitre rapporte le travail effectué sur les aspects éthiques de

telles études dans un environnement où la pression en termes de morbidité et de mortalité de maladies comme la coqueluche est toujours forte et où la population demande les vaccinations. Au delà de son intérêt lié à la spécificité de cette expérience, ce travail nous a contraint à réfléchir à la dimension géographique de l'application des principes, et ainsi à poser le problème du choix du groupe vaccinal de référence.

La troisième partie discute des limites d'interprétation entre les différents essais réalisés dans différents pays pendant les dix dernières années. De cette discussion, des enseignements de portée plus générale peuvent être dégagés, comme valeur d'exemple, ou comme écueil. L'exhaustivité des « messages » ou des « principes » n'a pas été recherchée, au profit du choix de certains aspects qui paraissent fondamentaux, et dont l'interprétation dans cette application concrète peut avoir une signification pratique. Les points discutés porteront successivement sur la standardisation de la mesure du critère de jugement, sur l'utilisation commune d'un traitement de référence et sur le problème de la méthodologie de référence. On verra que ces points ne sont ni spécifiques à la coqueluche, ni même aux vaccins, et qu'ils appartiennent en fait plus à la méthodologie de base en épidémiologie.

## **Première partie**

### **Le problème du contrôle de la coqueluche et son contexte méthodologique**

## **Chapitre 1**

### **La coqueluche et sa prévention**

## Introduction

La coqueluche semble avoir été individualisée au niveau clinique en 1578 par Guillaume de Baillou qui décrit une épidémie à Paris touchant essentiellement les enfants, et signale l'utilisation déjà commune du terme « Quinte » (Goupil, 1976). Guillaume de Baillou était doyen de la faculté de Paris quand il s'occupa de « *la grande épidémie qui ravageait alors la capitale* ». Homme érudit et observateur, il connaissait bien les auteurs grecs, surtout Hippocrate, qu'il prit pour modèle et fut l'auteur du premier ouvrage sur les constitutions épidémiques (Darenberg, 1861). Caractérisée comme maladie par les cliniciens du XIX<sup>ème</sup> siècle en Europe, elle survient depuis dans le monde entier sous forme épidémique. Sa nature infectieuse est soupçonnée dès le début de l'ère pastorienne, et le germe responsable est mis en évidence par Bordet et Gengou à l'Institut Pasteur de Bruxelles en 1900 (Bordet et Gengou, 1906, 1907). Ils parviennent à le cultiver seulement 6 ans plus tard, en 1906, sur un milieu particulier enrichi en sang, qui porte leur nom et est toujours utilisé dans une forme proche de la composition initiale. Dès 1909, la nature toxique de la maladie est soupçonnée du fait de la dissociation entre la période où le germe peut être cultivé à partir de prélèvements (la phase catarrhale), et la période des quintes, lors de laquelle le germe est difficilement retrouvé (Bordet et Gengou, 1909). La technique de prélèvement est améliorée par la mise au point du prélèvement sur boîte lors des épisodes de toux (Chievitz et Meyer, 1916). Ceci permet de confirmer la présence du bacille en début de maladie, et surtout de faciliter l'obtention de souches pour le développement de vaccins, en une constante évolution. Cette technique sera généralisée progressivement (Gardner et Leslie, 1932). La mise en évidence de différentes phases de la bactérie lors de la croissance sur gélose (Bordet et Sleswyk, 1910) et la confirmation de leur relation avec la perte de la virulence et du pouvoir immunogène (Leslie et Gardner, 1931) a conduit à l'utilisation de phases précoces de bactéries pour la préparation

des vaccins. Ceci a permis une stabilisation des résultats de protection obtenus lors d'études cliniques, conduisant ainsi à la mise en œuvre de politiques vaccinales de masse au début des années 50. En France, l'introduction de la vaccination a eu lieu dès 1947 avec un vaccin importé des Etats Unis (Zourbas, 1965). Puis l'Institut Pasteur (Dr. Chev ) a fourni en 1948 des vaccins adsorbés sur hydroxyde d'alumine (Perthydral®) ou non adsorbés. La couverture vaccinale n'a  t e bonne qu'avec la disponibilité de la combinaison avec les vaccins contre la diphtérie, le tétanos et la polio en 1966 (Bégué *et al.*, 1992). Dans les pays industrialisés, l'efficience du contrôle a diminué l'importance de la coqueluche en santé publique. La population adulte était naturellement immune, le réservoir de virus était localisé à l'enfance, la couverture vaccinale était haute, et probablement aussi les modifications de la transmission (diminution de la taille des familles, amélioration de l'habitat) ont concouru à la régression de cette maladie. Disparue des services hospitaliers, peu rencontrée en pratique médicale, la symptomatologie clinique et sa potentielle gravité n'étaient plus connues que de quelques services spécialisés et des sujets âgés - grand-parents ou médecins âgés. De même, la difficile culture du germe n'était plus réalisée que dans quelques laboratoires. Cette apparente « lune de miel », selon l'expression de Chen (Chen *et al.*, 1994), a eu comme conséquence une baisse de la qualité de la surveillance, basée en France sur la déclaration obligatoire depuis septembre 1945, et malheureusement interrompue en 1986. Plusieurs facteurs ont contribué à un regain d'intérêt pour cette maladie. Bien que peu étudiée, l'importance de la coqueluche restait réelle dans les pays en développement, du fait d'une prévalence toujours élevée et d'une forte mortalité directe et indirecte par ses répercussions sur l'état nutritionnel (Morley *et al.*, 1966; Muller *et al.*, 1984). Aussi, et peut-être surtout, les vaccins contre la coqueluche ont été associés dès le début de leur utilisation (Madsen, 1933)   des problèmes de réactions secondaires, parfois graves. La recherche d'amélioration des vaccins pour une meilleure

tolérance est d'ailleurs ancienne (Singer-Brooks, 1938). L'évolution relative de l'incidence (en baisse), et des effets secondaires ou accidents concomitants (mieux surveillés) ont fait poser la question de l'intérêt de la vaccination systématique (Ström, 1960) puis il y a eu rejet du vaccin dans différents pays, au Japon en 1975, en Angleterre en 1978, renforcée par un questionnement sur leur efficacité en Suède en 1979. Ceci a été à l'origine de la phase récente de développement de nouveaux vaccins, devant être efficaces et mieux tolérés. Ce mouvement a été renforcé par les perspectives de revaccination des adultes, devenant un réservoir potentiellement important (Fine, 1997a). La survenue chez les nouveau-nés de coqueluches souvent très graves, à la suite des modifications épidémiologiques induites par la vaccination est une autre raison.

Ce chapitre présente tour à tour un rappel sur les aspects physiopathologiques et cliniques de la coqueluche, puis sur les aspects relatifs à son épidémiologie et ses changements, notamment du fait de la vaccination, et enfin sur les aspects relatifs à l'efficacité et la tolérance des vaccins.

Notre objectif, dans ce chapitre, est de situer les contraintes méthodologiques de l'étude de nouveaux vaccins contre la coqueluche dans l'objectif de santé publique posé : l'amélioration des vaccins. L'accent a donc été mis sur les points ayant une importance pour leur étude. Une description systématique plus complète peut être trouvée dans des chapitres de manuels de maladies infectieuses (Pily, 1996 ; Benenson, 1995), ou dans des ouvrages de référence (Bricaire *et al.*, 1984 ; Hewlett, 1990) ou revues sur cette maladie (Olson, 1975), ainsi que les comptes rendus des séminaires internationaux sur cette maladie ( Genève, 1984 ; Copenhague, 1988 ; Bethesda 1990).

### 1.1.1 Etiologie

La coqueluche est due à un Bacille à Gram négatif, le bacille de Bordet et Gengou (*Bordetella pertussis*). Accessoirement, d'autres germes du genre *Bordetella* peuvent être responsables de coqueluches : *Bordetella parapertussis* surtout (Eldering et Kendrick, 1952) mais aussi *Bordetella bronchiseptica* (Kristensen et Lautrop, 1962). Un syndrome clinique proche a été rapporté à des virus, en particulier des adénovirus, (Joseph *et al.*, 1958 ; Connor, 1970 ; Klenk *et al.*, 1972) mais la toux est en général plus courte et surtout il peut s'agir de co-infections (cf. infra en 1.4, diagnostic). Du point de vue de l'étude de vaccins, seules les coqueluches liées à *Bordetella pertussis* sont considérées. Il ne semble pas qu'en dehors de *Bordetella parapertussis*, d'autres agents incriminés épisodiquement dans le syndrome de la coqueluche doivent être pris en compte.

*Les vaccins sont conçus pour prévenir les manifestations cliniques liées à l'infection par Bordetella pertussis. Si des manifestations semblables sont dues à d'autres agents infectieux, il en résulte qu'un critère de jugement clinique manquerait de spécificité pour juger de l'effet protecteur des vaccins.*



### 1.1.2 Pathogénie

Le germe se développe sur l'épithélium cilié respiratoire trachéobronchique et sécrète plusieurs toxines et adhésines (Weiss et Hewlett, 1986 ; Preston, 1988). La synthèse de l'importance pathophysiologique de chacune de ces substances est difficile, car controversée et comme le dit Preston « *If our various ships are to reach the haven of pertussis elimination, their captains and pilots and navigators might do well to read each other's maps and exchange each other's compasses !* ». Des revues détaillées récentes effectuées à l'occasion de recherches spécialisées sont cependant utiles à cette synthèse (Gueirard, 1995; Betsou, 1996; Grimprel 1996). Parmi les nombreux antigènes différents, nous avons essayé de résumer les principaux. Ils sont d'ailleurs repris de façon relativement standardisée dans les revues, et sont au nombre de huit. Peu de bactéries produisent autant de substances actives, et leur rôle respectif dans la physiopathologie de la coqueluche a été étudié pour juger de leur utilité dans la préparation de vaccins acellulaires, et donc de la composition des vaccins. La dynamique et le sens de ces recherches ont dominé les thèmes des symposium internationaux consacrés à la coqueluche (Genève, 1984; Copenhague, 1988 ; Bethesda, 1990) et ont fait l'objet de revues extensives (Pittman, 1979; Weiss et Hewlett, 1986) ou d'ouvrages complets (Wardlaw et Parton, 1988b). Les travaux permettant d'étudier l'effet pathogène de ces différents facteurs couvrent un large spectre, allant d'études de biologie moléculaire aux études des effets de leur injection chez l'homme.

Pour mieux comprendre, et essayer d'apprécier le caractère pathogène de chaque substance, une double lecture « croisée » a été effectuée : A partir des revues synthétiques, et d'articles originaux, un résumé est présenté sur les connaissances pour chaque antigène. Puis le même travail porte sur les modes de raisonnement ou sur les différents types

d'expérimentations. Ceci ayant pour but de parvenir à un tableau d'arguments pour chaque antigène.

#### 1.1.2.1 Différents antigènes :

Les toxines comprennent :

**La toxine dermo-nécrotique, thermolabile, (HLT).** Décrite par Bordet et Gengou, elle est responsable de nécrose ischémique. Ces auteurs cherchaient une toxine soluble (exotoxine), permettant d'expliquer l'observation « *d'une persistance de la toux quinteuse chez l'enfant coquelucheux, à un moment où le microbe spécifique est difficile à retrouver sûrement par l'examen direct des frottis* » (Bordet et Gengou, 1909). Cette recherche fut infructueuse, et ils recherchèrent alors une endotoxine, selon la technique de Besredka utilisée pour la peste, ou le typhus. Ils ont pu reproduire chez le lapin et le cobaye les mêmes symptômes que ceux observés après injection intrapéritonéale de « microbes coquelucheux », sans pullulation microbienne, suggérant la nature toxique de la maladie. Ils expliquent ainsi déjà les échecs de la sérothérapie, appliquée trop tard, et recommandent son utilisation prophylactique au moment de l'exposition. Ils rapportent le caractère très fragile de cette toxine aux agents chimiques et à la chaleur (toxine thermolabile). Depuis ce travail princeps, cette toxine a fait l'objet de très nombreux travaux (Nakase et Endoh, 1988). La toxine est produite par les bactéries en Phase I de croissance, elle est localisée dans le cytoplasme, et est libérée lors de la destruction de la bactérie. Elle induit une contraction des muscles lisses. La même toxine est produite par quatre des espèces du genre *Bordetella*, celle produite par *B. avium* est similaire, ainsi que celle produite par *Pasteurella multocida* (mais cette dernière est sérologiquement différente). Son action pathogénique semble importante dans la phase initiale de la maladie, par ses actions vaso-constrictives et l'inflammation qui en résulterait, mais sans action sur la motilité ciliaire. Elle n'a pas montré de protection chez l'enfant (Cravitz et

Cauley, 1945). Les sérums de convalescents de coqueluche n'ont pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine (Evans, 1947). Chez l'animal, cette protéine est immunogénique chez le lapin et le cochon d'Inde, mais pas chez la souris (Nakase et Endoh, 1988), mais elle ne protège pas la souris lors du test intracérébral (Nakase *et al.*, 1969). Il n'est pas encore possible de produire une anatoxine très antigénique, et la HLT n'est incluse dans aucun vaccin acellulaire.

**L'Adényl cyclase hémolyse, (AC-Hly).** De mise en évidence plus récente (Fishel *et al.* 1970 ; Wolff et Cook, 1973). C'est une toxine RTX possédant à la fois une activité adénylcyclase activable par la calmoduline et des activités hémolytiques et invasives. Elle augmente la concentration intracellulaire en AMPc de l'hôte et provoque spécifiquement la mort des macrophages alvéolaires. Une toxine similaire a été retrouvée seulement chez *Bacillus anthracis*. Des mutants déficients dans l'expression de cette toxine sont avirulents. Des résultats chez la souris sont cependant encourageants car la vaccination avec cette toxine confèrent une immunité protectrice dans les modèles murins dans les tests intra-cérébraux et respiratoires (Guiso *et al.*, 1990). C'est un bon immunogène et des anticorps sont détectés très tôt après le début de l'infection chez la souris et chez l'homme. L'AC-Hly n'a pas encore fait l'objet d'inclusion dans un vaccin acellulaire en raison de la caractérisation récente et de la difficulté à la purifier.

**La toxine pertussique, (PT).** Les activités multiples de cette exotoxine lui ont attribué des noms différents: promotion de la lymphocytose (Lymphocytosis-promoting factor, LPF), sensibilisation à l'histamine (histamine-sensitizing factor, HSF), augmentation de la sécrétion d'insuline (islet-activating protein, IAP). En 1979, Pittman propose qu'il s'agit d'une même protéine, et explique qu'elle est responsable des symptômes de la maladie et de l'immunité prolongée (Pittman, 1979 ; 1984). A un intervalle de 80 ans, depuis les travaux de Bordet et

Gengou, le parallèle avec la diphtérie et le tétanos était fait à nouveau, mais là où ces premiers auteurs n'avaient pu mettre en évidence une exotoxine, les progrès dans l'identification des différents antigènes (Arai et Sato, 1976) permettaient à Pittman de le faire. La PT est une toxine A-B homologue des toxines du choléra (CT), de la diphtérie (DT), et du tétanos (TT). Elle est immunogène et des anticorps sont détectés après infection. Deux étapes de l'infection ont alors été suggérées, la première étant une adhésion à l'épithélium cilié (cf. infra), l'autre étant celle de la colonisation bactérienne, avec libération de toxine. Si la relation entre l'activité de la toxine et des manifestations métaboliques sont claires (elles ont contribué à son identification), la relation avec les manifestations cliniques respiratoires (la toux), n'est pas établie. Il y aurait augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau des vaisseaux pulmonaires, et passage de protéines plasmatiques et de fluide dans l'espace extracellulaire (Ui, 1988). Le phénomène de déciliation, souvent avancé (Berridge, 1985), n'est pas clairement démontré. La PT a aussi un effet adjuvant, bien remarqué dans les associations vaccinales avec les anatoxines diphtériques et tétaniques. Des mutants déficients dans l'expression de cette protéine sont avirulents dans les modèles murins. Il a été montré aussi chez la souris lors de tests d'inoculation intra-cérébrale et d'infection par voie intranasale (cf. infra) que la PT confère une immunité protectrice (Sato et Sato, 1988).

**La Cytotoxine trachéale (TCT)**. C'est pour cette toxine que l'action physiopathologique avancée est la plus claire. Elle paralyserait la motilité ciliaire de l'épithélium bronchique, provoquant ainsi une stase du mucus bronchique et la toux, qui deviendrait le seul moyen de drainage bronchique. Une toxine analogue aurait été isolée lors d'infections à *Neisseria Gonorrhoeae* et reproduirait ce type d'action au niveau de l'épithélium des trompes de Fallope (Goldman, 1988). Cependant, cette toxine n'est pas une protéine, mais un fragment de peptido glycan de la bactérie. Elle est synthétisée par les bactéries en phase virulente (Phase I)

mais aussi avirulente (Phase IV) dans le modèle murin. Il semble que cette protéine ne soit active qu'en association avec les autres toxines, en particulier la PT et l'AC-Hly .

**Le Lipopolysaccharide de la paroi bactérienne (LPSs).** Il induit les effets endotoxiques des bactéries Gram négatif (fièvre, hypotension, induction de la production d'interleukine-1, réaction de Schwartzman), et a un effet adjuvant important. La contribution du LPS à un vaccin a été résumée de la façon suivante (Chaby et Caroff, 1988): Pour la préparation des vaccins, le LPS est en général considéré comme responsable d'effets indésirables. Il a été montré qu'un vaccin contenant moins d'endotoxine était mieux toléré (Sato, 1984). Le LPS n'aurait pas d'importance antigénique pour la protection (Irons *et al.*, 1984). Cependant, comme un vaccin doit contenir des antigènes qui induisent une protection contre l'attachement de l'organisme pathogène et une protection contre la maladie, le LPS pourrait contribuer à la protection par son effet adjuvant et ses activités non spécifiques. Son retrait complet pourrait induire une perte de protection d'un vaccin.

Les adhésines sont responsables de l'adhérence de la bactérie à l'épithélium cilié bronchique. Cette bactérie n'étant pas invasive, et restant localisée, les facteurs d'adhérence sont peut-être importants pour la pathogénicité de *Bordetella pertussis* (Tuomanen, 1988). Il a aussi été suggéré qu'elles pouvaient faciliter l'adhérence d'autres bactéries concomitantes, et être à l'origine de co-infections ou d'infections secondaires.

**L' Hémagglutinine filamenteuse (FHA).** C'est la plus grande protéine bactérienne connue à l'heure actuelle. Elle contribuerait à l'adhésion de la bactérie à la surface de la cellule hôte car elle possède un motif RGD similaire à celui de la fibronectine qui lui permet de se fixer sur les intégrines, un site de fixation de l'héparine et des homologues avec le facteur X. Son rôle par rapport à d'autres adhésines (pertactine, fimbriae), n'est pas évident (Hewlett, 1997).

**La Pertactine (ou PRN ou 69-kDa).** Elle a été mise en évidence à la suite des études sur la rhinite atrophique du porc dû à *Bordetella bronchiseptica* au cours desquelles un homologue de 68 k-Da a été trouvé (Novotny, 1985). Des souches de *B. bronchiseptica* qui n'avaient pas cette protéine étaient rendues avirulentes chez le porc, et l'immunisation contre cette protéine était protectrice. La pertactine a pu être isolée de *B. pertussis*, puis différenciée de l'AC-Hly. Elle agirait en facilitant l'adhésion de la bactérie à l'épithélium cilié bronchique. Son effet protecteur après immunisation a été montré dans le challenge par aérosol chez la souris. Elle entre dans la composition de vaccins acellulaires.

**Les agglutinogènes (AGGs).** Andersen a montré en 1953 que les souches récentes de *B. pertussis* pouvaient être distinguées par la sérologie en différents types (sérotypes) qui avaient une combinaison différente de plusieurs agglutinogènes labiles à la chaleur. Parmi ces agglutinogènes, il y a la PRN et les fimbriae ou FIM. Deux FIM ont été caractérisés, FIM2 et FIM3. Avec l'AGG1 (un domaine du LPS), ils définissent 4 sérotypes principaux : 1,2,3 ; 1,2 ; 1,3 ; et 1. Les FIM auraient un rôle dans l'adhésion de la bactérie sur les cellules épithéliales comme cela a été montré in vitro. leur rôle en tant qu'antigène conférant une immunité protectrice dans les modèles murins n'est pas claire.

#### **1.1.2.2 Différentes méthodes d'étude de la pathogénicité d'un facteur:**

Pour chaque facteur, son intérêt possible dans la composition d'un vaccin est considéré à deux niveaux : Il doit entraîner des effets directement pathologiques ou indirectement, par effet suppresseur de la réponse immunitaire à un facteur pathogène. Il doit aussi être immunogène, c'est à dire induire une production d'anticorps, qui devront le neutraliser en cas de second contact. Ces deux aspects ne sont pas nécessairement liés. Un facteur pathogène

n'est pas forcément immunogène, et un facteur immunogène n'est pas forcément pathogène, mais peut conférer une immunité protectrice.

Les différents types d'expérimentations ou d'études sont résumées dans les tableaux Ia, Ib, Ic, pour les 8 antigènes.

Il y a un premier ensemble (Tableau I a), qui concerne l'isolement du facteur, sa caractérisation, et sa purification. Des hypothèses sur le mode d'action (adhésion, toxicité) peuvent ainsi être formulées et testées *in vitro*. On étudie aussi les similarités avec d'autres agents pathogènes ou toxiques et les différences avec d'autres bactéries du même genre : par exemple, en quoi *B. pertussis* diffère-t-il de *B. parapertussis* (et de *B. bronchiseptica*) qui n'est pas ou moins pathogène pour l'homme, et n'excrète pas de PT ?

Les phénomènes adaptatifs peuvent aussi servir d'arguments, comme la perte de facteurs au cours de la croissance bactérienne, étudiée en parallèle avec la perte de l'effet pathogène et/ou immunisant au cours des phases de la croissance bactérienne, comme par exemple pour la TCT. Beaucoup d'expériences ont été difficiles à interpréter, ou leur interprétation a dû être révisée, pour des problèmes de purification (par exemple le rôle de la PRN a été différencié de celui de l'AC-Hly). Ceci conditionne aussi les possibilités de production pour l'inclusion dans un vaccin, et les études de toxicité.

Un deuxième ensemble (Tableau I b) concerne l'étude de l'effet pathogène : Le but est d'essayer d'associer un facteur aux symptômes de la maladie ou à des manifestations métaboliques de l'infection. Les expériences sont menées de façon positive, par injection ou inhalation du facteur. On cherche alors à provoquer l'effet. A l'inverse, de façon négative, on réalise l'injection ou l'inhalation d'une bactérie rendue déficiente pour le facteur considéré (par mutation, lorsque le gène codant pour cette protéine est connu). Dans ce type d'expérience, on cherche donc à annuler l'effet. Ces deux types d'expérimentation peuvent

**Tableau I. Etudes de la pathogénicité d'un facteur  
a. Connaissances fondamentales**

	HLT	AC-Hly	PT	TCT	LPS	FHA	PRN	FIM 2&3
Isolement	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Gène cloné	oui	oui	oui	non applicable	oui	oui	oui	oui
Purification	oui/non	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Production par phase I uniquement ?	oui	oui	oui	non	non	oui	oui	oui
Type de fonction	endo-toxine	exo-toxine	exo-toxine + adhésine	exo-toxine	endo-toxine	adhésine	adhésine	adhésine
Similitude moléculaire		Toxine RTX	sélectines, toxine A/B			RGD, Facteur X	RGD	
Similitude bactérienne	<i>P. multocida</i> , <i>B. paraptussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , +/- <i>B. avium</i>	<i>B. anthracis</i> <i>E. coli</i> <i>P. multocida</i> <i>Actinobacillus</i>	<i>V. cholerae</i> <i>Coryne diphtheriae</i>	<i>N. Gonorrhoea</i>	Gram -	Haemophilus		
Action moléculaire		augmentation AMPc calmoduline dépendante mortalité macrophages alvéolaires	Inactivation des protéines G régulatrices des cellules eucaryotes par ADP- rybosilation	synthèse NO vir IL-1				
Action in vivo	contraction muscle lisse, vasoconstriction	anti-phagocytose, augmentation de la sécrétion bronchique	augmentation perméabilité capillaire pulmonaire, fuite de protéines plasmatiques dans milieu extracellulaire	paralysie motilité ciliaire, déciliation, stase bronchique	symptômes Gram -, fièvre	adhésion invasion	adhésion	adhésion
Production	-	-	+	-	-	+	+	+



## Tableau I. Etudes de la pathogénicité d'un facteur

### b. Etude de l'effet pathogène

		HLT	AC-Hly	PT	TCT	LPS	FHA	PRN	FIM 2&3
Animal	injection facteur (IV, IM, ID)	négatif	négatif	négatif	non fait		non fait	non fait	non fait
	inhalation facteur	non fait	non fait	non fait	non fait		non fait	non fait	non fait
	inhalation bactérie mutante déficiente	négatif	positif (pas de multiplication bactérienne en début d'infection)	positif (augmentation de la clearance comme dans le cas des infections à Bpp)	non fait		négatif (pas d'augmentation de la clearance)	négatif (pas d'augmentation de la clearance)	négatif (pas d'augmentation de la clearance)
Homme	injection		inhibition des cellules inflammatoires au niveau pulmonaire	injection IV de PT non détoxifiée : pas d'effet					
	inhalation								

être complémentaires, mais diffèrent profondément au niveau fonctionnel puisque dans un cas il n'y a pas infection, et dans l'autre il y a infection. D'autres facteurs peuvent donc compliquer l'interprétation des résultats.

Ces expériences peuvent et ont été conduites chez l'animal et chez l'homme. L'expérimentation animale pose un problème important, car il n'y aurait pas de bon modèle, la coqueluche étant considérée comme étant une maladie exclusivement humaine. Cet aspect est discuté dans le chapitre suivant. L'expérimentation chez l'homme a varié au cours du temps, et la synthèse de son apport à la compréhension de la pathogénie est difficile. Elle intervient surtout au niveau des études de protection.

Un troisième ensemble (Tableau I c) concerne les études immunologiques : Le principe est d'injecter ou de faire inhaler un facteur particulier et de mesurer la réponse immunitaire humorale ou cellulaire contre ce facteur. Les mêmes études peuvent concerner le germe entier, ou un vaccin à germes entiers. Il est possible d'étudier leur caractère neutralisant ou agglutinant in vitro. Puis l'effet protecteur est étudié, soit de façon passive (sérothérapie), soit de façon active, en exposant à une souche virulente après immunisation. Ici encore, les expérimentations peuvent porter sur l'animal, ou sur l'homme.

Les études chez l'homme ne seront que mentionnées dans le tableau, et discutées dans un chapitre ultérieur, puisqu'il s'agit de notre thème principal.

*La lecture de ces trois tableaux fait apparaître que si le premier d'entre eux est bien documenté, la caractérisation de l'effet pathogène est difficile pour toutes les toxines. il n'y a pas d'élément convaincant permettant un choix objectif de facteurs nécessaires et suffisants pour la protection. Trois toxines (TCT, AC-Hly et PT) sont cependant bien caractérisées.*

**Tableau I. Etudes de la pathogénicité d'un facteur**  
**c. Etudes immunologiques**

	HLT	AC-Hly	PT	TCT	LPS	FHA	PRN	FIM 2&3
<b>Animal</b>	<u>Protection active :</u>							
Injection facteur :								
- augmentation des Ac sériques (immunité humorale)	oui/non	oui	oui	non fait	oui	oui	oui	oui
- augmentation de l'immunité cellulaire	non fait	oui	oui	non fait	non fait	oui	oui	oui
Inhalation facteur :								
- augmentation des Ac locaux (immunité mucoale)	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait
- augmentation de l'immunité cellulaire	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait
	<u>Protection passive :</u>							
Injection d'Ac contre ce facteur puis infection	pas d'Ac	oui	oui	non fait	oui	oui	oui	oui
<b>Homme</b>	Maladie naturelle : Ac contre ce facteur ?							
	non	oui	oui	non fait	oui	oui	oui	oui
Vaccination GE : Ac contre ce facteur ?								
	non	oui	oui	non fait	oui	oui	oui	oui
Inclusion dans un vaccin acellulaire								
	non	non	oui	non	non	oui	oui	oui
Présence chez des sujets non vaccinés non immunisés (réactions croisées)								
		oui (avec <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> )				oui (avec <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> )	oui (avec <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> )	
Protection après vaccination avec ce facteur ?								
	non	non fait	oui	non fait	non fait	oui	oui	non fait
Effet adjuvant								
			oui		oui			

**1.1.2.3 Modèles animaux :** Les premiers travaux sur animal visaient à confirmer la responsabilité du bacille de Bordet et Gengou. Ils avaient porté avec succès sur le chien et surtout le singe, dès 1908. Mais au cours de la phase de développement que nous considérons, celle des vaccins acellulaires, il ne semble pas y avoir eu recours à des expérimentations animales sur un autre modèle que celui de la souris. Les revues sur le sujet des modèles animaux (Pittman, 1979 ; Weiss et Hewlett, 1986) rendent compte de l'importance de ces modèles et suggèrent que si il n'y a pas eu de bon modèle pour la protection, celui des primates pourrait cependant être utile. Ce modèle reproduit les symptômes humains, et les résultats inconsistants observés dans le passé pourraient avoir été dus à des stimulations par des bactéries en phase non virulente. Une revue plus ancienne souligne son intérêt (Sauer, 1939): Des coqueluches cliniques ont été obtenues par différents investigateurs chez de jeunes singes (rhésus et chimpanzés). Sauer mentionne aussi les « *ringtail monkeys* », dont l'équivalent en français n'est pas évident (il peut s'agir de cercopithèques, mais aussi de lémuriens). La maladie est obtenue après inoculation par les voies nasale ou intratrachéale de cultures fraîchement isolées. La toux paroxystique, la lymphocytose et les lésions pathologiques ont été reproduites chez des singes inoculés avec des bactéries isolées des bronchioles de singes infectés expérimentalement. L'argument principal pour ne pas utiliser actuellement le modèle primate serait celui de son coût (Mortimer, 1994). Cependant, il est probable que les procédures actuelles de développement des vaccins aux USA et en Europe, qui requièrent avant tout des résultats de protection chez l'homme, ne favorisent pas des études systématiques sur des animaux dont l'utilisation est plus difficile d'un point de vue pratique, économique et maintenant éthique. L'exemple du développement des vaccins acellulaires au Japon illustre cet aspect. Différents modèles dont le modèle primate ont été

utilisés pour tester l'effet protecteur de différents vaccins (Sato, 1984; Sato, 1988), ce qui a été la base de leur application en santé publique.

Les différents modèles utilisés sont (Hewlett et Cherry, 1997):

- Le test d'inoculation intracérébrale (IC) à la souris (test de Kendrick): Il est utilisé pour tester la qualité des vaccins lors de leur production ("potency"), mais est peu informatif dans les études de physiopathologie;

- L'infection par aérosol en chambre (AE) ou par voie intranasale (IN) de souris naïves ou immunisées (Sato, 1988). Les bactéries choisies pour l'aérosol peuvent être soit des bactéries virulentes, soit des bactéries mutantes rendues déficientes en un antigène. Le critère de jugement est basé sur l'apparition d'une lymphocytose, d'une infection pulmonaire avec destruction des cellules ciliées et la survenue du décès avec une sensibilité différente à la maladie selon l'âge. Mais la toux n'est jamais observée.

- Le modèle d'inoculation intranasale à la souris nouveau-née allaitée. Le critère de jugement est la létalité. Mais le mécanisme du décès n'est pas connu, même si il y a reproduction d'une lymphocytose, d'hypoglycémie et de perte de poids;

- L'infection intratrachéale avec des billes d'agar contenant une suspension bactérienne en Phase I entraîne une toux chez le rat (Woods *et al.*, 1989).

#### **1.1.2.4 Différents scénarios physiopathologiques :**

**Modèle toxique :** Il est avancé depuis le début du siècle (cf. Bordet, supra), et argumenté depuis la fin des années 1970 (cf. Pittman, supra). La PT est immunisante, c'est à dire que ses activités biologiques sont annulées lorsque un animal est immunisé contre une toxine dénaturée. Son rôle possible intervient selon la séquence d'événements d'une maladie

infectieuse : entrée et attachement à un tissu cible spécifique, altération cellulaire locale, développement d'une maladie systémique, parallèlement à une altération des mécanismes de défenses de l'hôte.

**Modèle pluraliste :** Les connaissances actuelles sur les différents composants permettent d'élaborer l'hypothèse pathogénique suivante (Mortimer, 1994). En premier, la bactérie doit s'attacher aux cellules épithéliales ciliées. Probablement la FHA, la PT et la PRN sont importantes dans ce processus. Les FIM pourraient faciliter ce processus. En second, pour que la maladie survienne, l'organisme pathogène doit altérer ou éluder. La TCT joue un rôle important en détruisant les cellules ciliées et en inhibant leur régénération, la PT et l'AC-Hly agiraient en synergie pour induire la réaction inflammatoire et diminuer les défenses de l'hôte en altérant les fonctions des cellules phagocytaires ou en provoquant leur mort par cytopoptose. La contribution relative de ces différents composants dans ce processus n'est pas connue, et on ignore si d'autres facteurs comme l'HLT ne sont pas impliqués. Cette explication ne concerne pas l'encéphalopathie de la coqueluche, qui ne serait pas due uniquement à une anoxie, des toxines pourraient y participer.

Comme tout modèle, les modèles proposés sont séduisants parce qu'ils résument l'information et ordonnent les connaissances pour expliquer la physiopathologie. Mais ces modèles reposent sur des faisceaux d'arguments, et le tableau présenté montre bien que des preuves convaincantes manquent. Ces preuves ne pourraient être obtenues qu'à partir d'un modèle animal reproduisant la symptomatologie clinique, et ayant une analogie immunologique avec l'homme, comme le modèle primate, ou par un modèle in vitro reproduisant le mécanisme physiopathologique, mais qui n'existe pas encore.

*Ces aspects sont déterminants dans le choix des composants d'un vaccin acellulaire, dont le principe, par rapport à un vaccin à germes entiers, est de ne garder que la ou le plus petit nombre de protéines immunisantes qui ont un rôle clé dans la pathogénie. Ainsi, le concept de la coqueluche comme maladie toxique favorise-t-il l'élaboration d'un vaccin contenant une seule toxine (la PT), sur le modèle de la diphtérie ou du tétanos (vaccins efficaces) ou du choléra (vaccin inefficace). Au contraire, l'interprétation de la participation de différentes protéines à différentes étapes (colonisation, maladie) favorise l'inclusion de différents composants (FHA, FIM, PRN), agissant aux différentes étapes. Les connaissances actuelles ont pour limitation essentielle de ne pas porter sur des modèles permettant de juger de l'effet sur les symptômes respiratoires, que ce soit sur modèle animal ou sur test in vitro. Le manque de certitude sur les facteurs nécessaires et suffisants pour la protection vaccinale, et les contraintes réglementaires de mise sur le marché ont contribué à la multiplicité des vaccins testés chez l'enfant*

### **1.1.3 Clinique**

Les généralités sur la clinique seront surtout présentées ici pour servir de contexte à la discussion. Cependant, des aspects particuliers seront plus approfondis car ils sont des éléments essentiels du critère de jugement dans les essais vaccinaux. Il en sera de même pour le diagnostic.

Le symptôme majeur de la coqueluche est une toux sévère et prolongée. Morley (Morley, 1977) introduit cet aspect par une illustration du nom chinois de la coqueluche, dite « toux de 100 jours ».

La maladie peut être décrite en 4 phases:

Une phase d'incubation de durée variable selon les auteurs. 7 à 10 jours (Pily, 1997); 6 à 20 jours (Benenson, 1995); 7 à 21 jours (Hewlett et Cherry, 1997); 9 ou 10 jours (Mortimer, 1994).

Une phase catarrhale de 7 à 14 jours, au cours de laquelle des signes non spécifiques d'infection des voies aériennes supérieures (rhinite, éternuement, toux, fébricule) vont évoluer vers une toux spasmodique, émétisante, à maximum nocturne. Cette toux est rebelle, c'est à dire qu'elle ne cède pas aux médicaments.

Une phase paroxystique d'une durée de 2 à 4 semaines. Elle doit son nom à la survenue de quintes, qui sont des successions de secousses expiratoires de plus en plus rapprochées, aboutissant à une apnée de quelques secondes en expiration forcée, entraînant une cyanose et suivie d'une inspiration longue qui, quand elle est bruyante, est appelée une « reprise » (le chant du coq). Plusieurs quintes peuvent se succéder pour aboutir à une expectoration muqueuse, filante. Cette toux provoque des vomissements, une cyanose, une bouffissure du visage qui persiste entre les quintes, et parfois un purpura pétéchial. Entre les quintes, l'examen clinique est pratiquement normal, en dehors d'une rhinite muqueuse et des possibles complications mécaniques de la toux (oedème du visage, pétéchies, ulcération du frein de la langue), ou de possibles répercussions sur l'état nutritionnel. La clinique contraste avec la discrétion des troubles biologiques. Les répercussions principales concernent la lymphocytose et parfois l'hypoglycémie.

La description classique de Trousseau situe remarquablement le contexte de la quinte (Goupil, 1976): *« un enfant est au milieu de ses jeux : quelques minutes avant que la crise arrive, il s'arrête ; sa gaieté fait place à la tristesse ; s'il se trouvait en compagnie de camarades, il s'écarte d'eux et cherche à les éviter. C'est qu'alors, permettez-moi, messieurs, cette expression, c'est alors qu'il médite sa crise, il la sent venir ; il éprouve cette sensation*



*de picotement, de chatouillement dont je vous parlais. D'abord il essaye de faire avorter la quinte ; au lieu de respirer à pleins poumons comme il respirait tout à l'heure, il retient sa respiration ; il semble comprendre que l'air, en arrivant à pleine voie dans son larynx, va provoquer cette toux fatigante dont il a la triste expérience. Mais, je le répète, quoi qu'il fasse, il n'empêchera rien, il ne pourra tout au plus que retarder l'explosion. S'il crie, s'il pleure, s'il est sous l'empire d'une émotion qui excite son système nerveux, cette explosion sera plus prompte. La quinte a lieu. Aussitôt vous voyez le malade chercher autour de lui un point d'appui auquel il puisse se cramponner. Si c'est un enfant à la mamelle, il se précipite dans les bras de sa mère et de sa nourrice. Plus avancé en âge, s'il est debout, vous le voyez trépigner dans un état d'agitation convulsive. S'il est couché, il se dresse vivement sur son séant pour s'accrocher aux rideaux, aux barres de son lit. Il sort de là le visage bouffi, et cette bouffissure du visage, qui persiste quelquefois pendant trois semaines, peut, en quelques cas, suffire à elle seule pour qu'un médecin exercé soupçonne l'existence de la coqueluche ».*

Cette description clinique est intéressante car elle peut être transposée à d'autres contextes toujours actuels et par exemple à l'Afrique, où elle reste vraie. Si l'enfant y est « à la mamelle » plus âgé, s'il ne s'accroche ni aux rideaux ni aux barreaux du lit qui n'existent pas, le tableau est le même. Plus grand, il a la même façon de s'écarter de ses camarades, de méditer sa quinte. Lorsque la toux survient, il trouve son point d'appui sur lui-même, courbé debout, les bras tendus, les mains sur chaque genou, fixant le sol, ou appuyé au mur de la case. Lorsque l'expectoration muqueuse, filante, survient, il a un geste caractéristique de la main ou du pied pour la recouvrir de sable. En période épidémique, la bouffissure du visage caractérise les visages aux regards tournés vers le visiteur. Les apnées sont connues et redoutées des mères pour les plus jeunes. Elles stimulent la reprise en soufflant au visage de l'enfant de l'eau d'unealebasse. Nos observations sont très proches de celles rapportées par

Morley (Morley *et al.*, 1966). Par contre, nous n'avons jamais eu l'occasion de distinguer l'expectoration décrite par Bordet et Gengou chez les plus jeunes enfants (Bordet et Gengou, 1906), probablement en tout début de maladie: « ... *Cet exsudat, au moment où la toux devient caractéristique, est blanc, épais, très riche en leucocytes ; il contient en quantité considérable le microbe de la coqueluche qui, dans les cas favorables, s'y présente en culture presque pure. L'enfant fournit en même temps une sécrétion plus transparente, muqueuse et filante, beaucoup moins riche en cellules, où le microbe spécifique est plus rare.* ». Ces observations avaient pourtant été confirmées (Chievitz et Meyer, 1916).

Un autre aspect intéressant est que cette description caractérise une situation qui apparaît comme étant spécifique, surtout dans un contexte épidémique, mais dont on réalise bien qu'elle sera difficile à résumer, à réduire en une ou en un nombre limité de variables pouvant faire l'objet d'analyse statistique. Ce point sera précisé dans le paragraphe concernant l'étude des vaccins.

Apparaît enfin une phase de convalescence, au cours de laquelle la fréquence et l'intensité des quintes va diminuer et une toux non caractéristique va s'installer puis diminuer.

Cette forme typique peut varier selon le « terrain » du malade:

- Chez le nourrisson, où les quintes peuvent être asphyxiantes, avec absence de reprise et asphyxie entraînant la mort en l'absence de stimulation respiratoire. Les quintes peuvent aussi être responsables d'hémorragies cérébrales. Les apnées peuvent être syncopales, entraînant un arrêt respiratoire et la mort ; les complications respiratoires, en particulier infectieuses, sont fréquentes ;

- Chez le sujet vacciné, chez qui les formes sont le plus souvent atténuées ;

- Chez l'adulte, les formes sont moins graves, il aura d'ailleurs souvent été vacciné dans l'enfance.

- Dans les pays en développement, les problèmes nutritionnels liés aux vomissements sont un des facteurs de gravité de la maladie, comme cela était observé dans le passé dans les pays industrialisés (Morley *et al.*, 1966). Il a été souligné que l'amaigrissement n'est pas dû à une diminution de l'ingéré alimentaire, suggérant ainsi l'effet hypoglycémiant de la PT (Pittman, 1979).

*La coqueluche est une maladie caractérisée par l'importance de la toux, et la pauvreté des autres symptômes. Il s'agit donc d'une maladie cantonnée « à la porte » de l'organisme, et dont la manifestation essentielle (la toux) peut être produite par l'effet pathogène du germe, mais est aussi une manifestation mécanique de défense contre le germe.*

*Le but d'une vaccination est de protéger l'individu contre la maladie, ici la toux, et si possible contre l'infection, pour une meilleure efficacité épidémiologique. La toux est donc le critère de jugement essentiel de l'effet d'un vaccin contre la coqueluche.*

#### **1.1.4 Diagnostic**

##### **1.1.4.1 Diagnostic différentiel clinique**

Les formes typiques doivent être distinguées de syndromes apparentés provoqués par l'inhalation de corps étrangers. Les toux rebelles peuvent être dues à la tuberculose, la mucoviscidose, des allergies respiratoires, ou des pneumonies bactériennes ou virales. En particulier, le rôle d'Adénovirus dans des épidémies de syndromes évoquant la coqueluche a été rapporté (cf. supra en 1.1.1 étiologie). Ce point est important car il a été un argument important du rejet de la clinique de la coqueluche comme « outil diagnostique » dans les essais de vaccins, sur la base d'un manque de spécificité. En fait, la responsabilité des Adénovirus n'est pas établie. Les Adénovirus ont été retrouvés associés au *Bordetella pertussis*, mais lorsqu'ils ont été isolés seuls, les diagnostics faussement négatifs pour la culture ou la

sérologie dans le diagnostic du bacille de la coqueluche n'ont pas été écartés (Klenk *et al.*, 1972).

Une particularité est observée chez les sujets vaccinés, qui de façon constante ont une maladie moins sévère. D'ailleurs, le premier rapport d'efficacité d'un vaccin contre la coqueluche, à partir d'une épidémie observée aux îles Féroé (Madsen, 1933) porte plus sur la réduction de la mortalité attribuée au vaccin que sur l'absence de maladie. La mortalité rapportée dans cette étude était de 2.5% chez les non vaccinés et de 0.24% chez les vaccinés. Dans sa forme atténuée, le syndrome de la coqueluche devient donc moins caractéristique. Le problème de la clinique est qu'il est considéré comme subjectif, c'est à dire dépendant de l'observateur. Il n'y a pas eu de tentative de standardisation, et les termes utilisés sont variés, ou posent des problèmes de traduction. Ainsi, la caractérisation de la toux en anglais est le plus généralement désignée par « *spasmodic cough* », mais parfois aussi par « *paroxysmal cough* ». Si la reprise est bien distinguée (« *whoop* »), la quinte ne l'est pas (Edwards et Karzon, 1990), alors qu'elle l'est en français. Ceci peut entraîner des confusions et augmente les problèmes de comparabilité dans les observations cliniques entre études.

#### 1.1.4.2 Diagnostic de laboratoire

Il repose sur différents éléments (Guiso, 1997a; Hoppe, 1988).

**Bactériologie.** C'est l'élément de certitude, car il ne semble pas y avoir de porteurs asymptomatiques. Sa culture est difficile, d'autant plus souvent positive que le prélèvement est pratiqué tôt dans le cours de la maladie. Ceci a été bien décrit dès le début, et comme dit plus haut, a suggéré la nature toxique de la maladie. Du point de vue pratique, il y a donc un manque de sensibilité de la méthode lié au retard de prélèvement au cours de la maladie. Ce phénomène est important, et il n'a pas beaucoup varié depuis la première étude malgré les possibles améliorations des techniques de prélèvement ou des milieux (Chievitz et Meyer,

1916): « Chez les malades qui ont toussé pendant les 1<sup>ère</sup> - 2<sup>ème</sup> semaines, c'est à dire qui ont eu des quintes caractéristiques pendant 1 semaine tout au plus, nous avons pour ainsi dire toujours pu obtenir les microbes en cultivant. Chez les malades qui ont toussé convulsivement pendant 2 semaines environ, les microbes ont été obtenus dans les deux tiers, à peu près, des cas; chez les malades qui sont à la 3<sup>ème</sup> semaine de la période convulsive dans un tiers, à peu près, des cas. Dans la 4<sup>ème</sup> semaine de la période convulsive nous n'avons réussi à démontrer l'existence des microbes en cultivant que 3 fois d'entre 36 examens. Plus tard, sur 58 examens, nous n'avons réussi à obtenir une culture pure de microbes de l'expectoration, chez un seul malade qui avait toussé de 5 à 6 semaines, à la 40<sup>e</sup> journée de maladie, et encore nous n'avons trouvé qu'une seule colonie à la boîte de Pétri. ».

Le prélèvement est fait soit par ensemencement direct sur boîte au chevet du malade (Chievitz et Meyer, 1916), soit par écouvillonnage nasal, soit maintenant le plus souvent par aspiration nasopharyngée des deux narines. L'ensemencement se fait sur milieu de Bordet et Gengou ou sur milieu de Regan et Lowe, qui peuvent être rendus sélectifs par addition d'antibiotiques. Les colonies sont caractérisées par la coloration de Gram, et les tests biochimiques d'oxydase, uréase et nitrates. Une confirmation par immunofluorescence utilisant les anticorps anti *B. pertussis* et anti *B. parapertussis* est recommandée.

Il a été noté de façon constante que chez les sujets vaccinés, la culture était beaucoup moins sensible que chez les sujets non vaccinés (Storsaeter *et al.*, 1990a).

**Sérologie.** La technique la plus employée est la technique ELISA pour la recherche d'anticorps contre la PT et/ou la FHA. D'autres techniques, comme le Western Blot peuvent être employées. Mais toutes ces techniques ne sont encore réalisées que dans des laboratoires spécialisés. Historiquement, d'autres méthodes ont été utilisées, comme les réactions de fixation du complément, où les réactions d'agglutination. En général, pour la technique

ELISA, une augmentation du taux d'anticorps de 100% entre un sérum de convalescent et un sérum prélevé en début de maladie est considéré comme positif.

Le diagnostic sérologique peut poser un problème dans les études de vaccination, car la présence d'anticorps peut refléter les anticorps associés à la vaccination, dépendant des antigènes vaccinaux, et non les anticorps produits en réponse à la maladie (Storsaeter *et al.*, 1990b). Au Sénégal, nous avons montré que le diagnostic sérologique devait aussi considérer les décroissances sérologiques, en particulier chez les sujets vaccinés. Ceci fera l'objet d'un des développements en deuxième partie.

La sérologie par méthode ELISA a fait l'objet d'un effort de standardisation internationale et de contrôle de qualité, qui a montré une bonne comparabilité entre des études effectuées dans des pays différents (Lynn *et al.*, 1997).

**Caractérisation par PCR.** Elle permet de séparer *B. pertussis* de *B. parapertussis*, et est de plus en plus fréquemment employée. La technique, pour la coqueluche, a été mise au point au cours de la fin des années 80, et n'a été que peu utilisée dans les essais cliniques récents. Son utilisation au Sénégal a permis de souligner la perte de sensibilité lors de la conservation des échantillons. Aussi, l'aliquotage du prélèvement d'aspiration pourrait être un facteur de perte de sensibilité, qui pourrait être mis en rapport avec les observations antérieures de concentration de la bactérie dans certaines parties de l'expectoration (Reizenstein, 1997).

D'autres méthodes sont proposées ou à l'étude, pour pallier à la perte de sensibilité de la culture au cours de l'évolution de la maladie, et permettre un diagnostic plus tardif, en recherchant les toxines ou leurs métabolites. L'une porte sur l'action de la PT comme bloqueur de la pigmentation sur les mélanophores des écailles de poisson (Karlsson *et al.*, 1991). D'autres portent sur la recherche d'activité de l'AC (Eriksson *et al.*, 1991), ou sur la

recherche de traces de métabolites de la PT dans les urines (Sanden, communication personnelle).

*Aucun des moyens diagnostiques ne satisfont aux qualités requises pour un critère de jugement, c'est à dire bonne sensibilité et bonne spécificité. Ces aspects ont conduit à une définition composite utilisée dans les études d'efficacité vaccinale (WHO, 1991), qui est qualifiée de définition OMS: un cas est défini comme une toux paroxystique de 21 jours au moins et confirmée par la bactériologie (culture), ou la sérologie (ELISA, 100% d'augmentation) ou par un contact épidémiologique, c'est à dire un contact dans les 21 jours avec un cas confirmé par la culture. Cet aspect sera approfondi en deuxième partie.*

### **1.1.5 Epidémiologie**

Les épidémies avec individualisation de la coqueluche sont rapportées en Europe depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle par Willis en 1658 et Sydenham (1679) (Goupil, 1976), puis plus précisément au XVIII<sup>ème</sup> siècle dans les capitales européennes. Une des plus importantes revues historiques sur cette maladie aux symptômes caractéristiques (Sticker, 1906), et portant sur plus de 500 références antérieures à 1911 n'a pu permettre d'évoquer l'existence de cette maladie avant 1540. Des évocations d'épidémies survenues en 1414 sont cependant mentionnées en France (Blache, 1868). Des épidémies ont été rapportées à Paris en 1414, 1578, 1695, 1751. En Suède, l'épidémie de 1769 qui aurait duré 4 ans aurait entraîné plus de 40 000 morts (Lemoine, 1832). Cette évocation récente d'une maladie caractéristique a fait suggérer que le complexe *B. pertussis* - *Homo sapiens sapiens* ne soit pas plus ancien qu'environ 500 ans. Avant cette période, la niche écologique pour *B. pertussis* : taille de la population humaine, densité, et contacts (transport par terre et par mer) aurait été inadéquate à maintenir un germe limité à l'homme, conférant une longue immunité, et sans porteur

asymptomatique (Wardlaw et Parton, 1988a). L'origine de la maladie serait alors liée à l'adaptation d'une bactérie animale à l'homme, comme cela a été suggéré par la similitude des ADN des différentes bactéries du genre *Bordetella* (Kloos *et al.*, 1981). Puis la maladie s'est généralisée, avec par exemple le passage probable sur le continent américain par voie maritime au XVIII<sup>ème</sup> siècle lors de liaisons avec l'Angleterre (Sédallian, 1946). La coqueluche est rapportée en Afrique par Livingstone, donc avant 1873, date de son décès (Morley, 1966).

**1.1.5.1 Caractéristiques temporelles :** La coqueluche évolue sur un mode endémo-épidémique avec des pics épidémiques réguliers tous les 3 à 5 ans. Ceci a été observé dans tous les environnements. Au Sénégal, la surveillance épidémiologique de la zone de Niakhar de 1983 à 1997 a montré des pics épidémiques en 1986, 1990, 1993 et 1997 (Preziosi, 1996). Ce phénomène serait attribué à la transmissibilité et aux évolutions du réservoir de virus. Il n'y a pas de tendance saisonnière marquée. Au Sénégal cependant, les débuts d'épidémies correspondent souvent à la période des manifestations sociales (mariages, baptêmes, funérailles), lors du premier trimestre de l'année.

**1.1.5.2 Caractéristiques spatiales :** La maladie est ubiquitaire. Des cas sont rapportés de tous les continents, depuis les régions équatoriales jusque en Islande. Il est probable que la vaste majorité des enfants non vaccinés de moins de 5 ans dans le monde font l'infection (Ivanoff et Robertson, 1997). La proportion de sujets qui font la maladie est plus difficile à déterminer du fait des problèmes de qualité de surveillance et de la variabilité de la sévérité. Les modalités de survenue de la coqueluche dans les petites populations, en particulier les îles, ont été étudiées car elles donnent des indications sur la taille de population minimale pour entretenir la circulation de la bactérie et sur les possibilités d'éradication (Fine, 1988a). De nombreux facteurs interviennent, comme le degré d'isolement, les modalités de contact, le taux de



naissance et des caractéristiques de l'infection (transmissibilité, durée de l'incubation et de la contagiosité). Par analogie avec la rougeole, il a été proposé qu'une taille minimum de 400 000 personnes serait nécessaire (Fine, 1988b). Il est intéressant de noter que si les pics épidémiques sont rythmés pour chaque pays, ils sont aussi en général synchrones entre les différents pays, même si les données de surveillance passive, qui permettent de l'apprécier, sont souvent de mauvaise qualité. L'endémicité est la mieux documentée dans les pays pratiquant peu la vaccination et où des études sur les vaccins contre la coqueluche se sont déroulées récemment (Suède, Italie, Allemagne, Sénégal), ou lorsque des épidémies inhabituelles par leur ampleur sont survenues (Hollande, Australie). Ainsi 1997 était une année épidémique, observée dans des pays aussi éloignés que le Sénégal, la Hollande et l'Australie. De même, 1993 était une année épidémique au Sénégal, en Suède, en Italie, en Allemagne et au Canada. Cette synchronisation entre les différents pays, pour lesquels l'endémicité est différente en particulier du fait de la pratique de vaccinations, et avec des sites géographiques précis comme celui de Niakhar au Sénégal, est étonnante. L'évolution cyclique du réservoir de susceptibles n'en rend qu'incomplètement compte.

**1.1.5.3 Caractéristiques individuelles.** L'homme est considéré comme étant le seul réservoir, même si le rôle possible des primates a été discuté, sur la base d'une évolution des anticorps au cours de l'âge au Japon (Sato, 1988). La coqueluche est une maladie de l'enfance, du fait de sa contagiosité importante et de l'immunité induite. La maladie touche plus les filles que les garçons pour une raison inconnue. Les explications invoquant le rôle possible de la testostérone sur la largeur des voies aériennes ne semblent pas convaincantes (Mortimer, 1994). L'immunité naturelle après la maladie était considérée comme définitive, mais peut être dépendante de stimulations antigéniques lors de nouvelles expositions (Schmitt-Grohé *et al.*, 1995). Les infections de l'adulte sont importantes, car elles peuvent ne

pas être apparentes, ou motivent peu un recours médical, et ne sont pas correctement diagnostiquées. Elles peuvent être responsables de contaminations du nourrisson.

La contamination se fait par voie aérienne par projection de mucus au cours de la toux, donc par contact direct. Le germe ne survit pas longtemps dans l'environnement. Le taux d'attaque intra-familial est de 70 à 80%, parfois 100% en l'absence de vaccination de la source et de l'exposition. En milieu scolaire, le taux d'attaque a été évalué entre 50 et 80%. Le mode de contamination fréquent est celui d'un frère ou d'une sœur plus âgé ayant été contaminé dans une communauté, mais le rôle des adultes, en particulier des jeunes adultes, est de plus en plus important depuis l'ère de la vaccination. Il n'y a pas de porteur asymptomatique sur une période prolongée, bien que des portages transitoires aient été identifiés au cours d'épidémies. Ils ne semblent pas jouer un rôle important dans la propagation de la maladie.

#### **1.1.5.4 Modifications épidémiologiques liées à la vaccination.**

L'endémicité a été modifiée par la vaccination, comme cela est bien documenté aux USA, en Grande Bretagne et en France, mais les pics épidémiques ont subsisté. Les programmes de vaccination sur plusieurs années ont eu pour effet de diminuer l'incidence et la mortalité relative de la coqueluche. L'évolution des incidences annuelles a pu être étudiée pour des pays industrialisés disposant de données. Dans les années 1926 à 1950, des niveaux d'incidence annuelle de 200 à 1000 pour 100000 étaient observés dans les pays comme le Danemark, la Finlande, la Norvège, ou l'Angleterre. Ces incidences ont diminué avec la généralisation de la vaccination. Dans les années 70 à 80, elles étaient estimées à moins de 10 pour 100000 dans les pays étant parvenu à une couverture vaccinale élevée pour au moins trois doses de vaccin. A contrario, dans les pays ayant interrompu ou diminué l'effort de vaccination à la suite d'une mauvaise tolérance sociale (Japon, Suède, Angleterre), les taux

d'incidence annuelle ont atteint en quelques années des taux de 100 pour 100 000 ou plus (Ivanoff et Robertson, 1997).

Dans les pays en développement, les données sont très rares, en particulier pour l'Afrique. Au Nigéria rural, l'effet de la vaccination sur l'incidence a été montré (Morley *et al.*, 1966). De façon indirecte, l'effet de la vaccination peut être apprécié en milieu urbain par la quasi disparition des hospitalisations de coqueluches sévères dans les services de pédiatrie ou de maladies infectieuses, comme à Dakar au Sénégal (Coll-Seck, communication personnelle).

Le fait que les politiques de vaccination diminuent l'importance des épidémies mais n'augmentent pas l'intervalle de temps entre elles serait un argument pour expliquer que la vaccination protège plus contre la maladie que contre l'infection (Fine et Clarkson, 1982). Ceci est différent de l'effet d'autres vaccins, comme celui contre la rougeole. La vaccination a aussi pour effet de diminuer la sévérité de la maladie, la contagiosité, et probablement de prolonger la durée d'incubation (Kallings *et al.*, 1988).

L'effet de la vaccination est aussi de modifier l'âge médian de la coqueluche, du fait de la protection des enfants et d'une baisse de la protection au cours du temps. Avant l'ère de la vaccination, le pic d'incidence survenait avant l'âge de 6 ans. Après l'introduction de la vaccination, l'incidence est restée stable chez les nourrissons, a diminué chez les enfants de 1 à 6 ans. Bien que certains auteurs aient suggéré qu'avant l'ère de la vaccination, les nouveaux nés étaient protégés par les anticorps maternels, et que la vaccination aurait diminué la transmission d'anticorps maternels, il ne semble pas que cela soit fondé (Hewlett, 1990). Les nouveaux nés seraient sensibles dès la naissance et sont les principales victimes de la mortalité. Du fait d'une baisse de protection de la vaccination au cours du temps (Mortimer, 1990), il y a eu augmentation des cas de coqueluche chez les adultes jeunes. En Allemagne ou

aux USA, 21 à 32% des cas de toux prolongées de l'adulte seraient attribuables à la coqueluche (Mortimer, 1994). Les adultes jeunes deviennent ainsi un facteur important de la transmission aux nouveau-nés. Il n'y a pas de perspective raisonnable d'éradication (Fine, 1988b).

**1.1.5.5 Données actuelles.** Les données générales les plus récentes disponibles au niveau de l'OMS datent de 1995 (Ivanoff et Robertson, 1997). Bien qu'il reste une claire différence de morbidité et de sévérité entre les pays industrialisés (PI) et les Pays en Développement (PVD), l'utilisation des vaccins à germes entiers, avec un niveau de couverture vaccinale mondiale pour trois doses données avant l'âge de un an estimé à plus de 80%, a modifié le tribut dû à cette maladie. A un niveau général, la difficulté d'analyse est liée à l'imprécision du système de surveillance. Il y a des arguments vers une sous-estimation due à une sous reconnaissance des cas, surtout pour les formes atypiques, majorée par la nature passive de la surveillance. Les sources hospitalières sont biaisées vers une surestimation de la gravité des cas, et de la contribution des nourrissons. Aux USA et en Angleterre, il a été estimé que seulement 5 à 25% des cas sont déclarés (Galatzka, 1992). La mise en place d'un système de surveillance actif en Nouvelle Ecosse a été suivie d'une multiplication par 9 du nombre de cas. Pour la surveillance de routine organisée par l'OMS, il est estimé que seulement 1% à 2% des cas sont rapportés dans le monde. Une définition des cas pour la surveillance a été proposée (Muller et Leeuwenburg, 1985), mais elle n'est pas appliquée et peut être confondue avec la définition dite de l'OMS (WHO, 1991) qui a été établie pour les études de protection vaccinale. De telles limitations de la surveillance de routine oblitérent une interprétation détaillée, et rendent difficiles les comparaisons entre pays ou entre régions, du fait de la disparité des systèmes de surveillance. Cependant, les informations de ce système de surveillance permettent une appréciation globale. Il était estimé qu'un nombre total de 40

millions de cas étaient survenus dans le monde en 1994, dont 36 millions (90%) dans les pays en développement, et 4 millions (10%) dans les pays industrialisés, y compris l'Europe de l'Est (Ivanoff et Robertson, 1997). Au total, 360 000 enfants seraient morts de coqueluche, plus des 2/3 des décès survenant avant l'âge de 1 an. La coqueluche arrive ainsi en troisième position des maladies à prévention vaccinale pour la mortalité après la rougeole et le tétanos néonatal. Le taux de mortalité par cas est nettement supérieur dans les PVD (estimé à 1-3%) que dans les PI (0,01% à 0,4%). Pour la même année, 600 000 décès par coqueluche auraient été évités par la vaccination. Les coqueluches peuvent se compliquer de pneumopathies, dont le nombre a été estimé à 5 millions en 1990, principalement dans la première année de vie. Les complications neurologiques ont été estimées à 0,8 à 0,08 pour 1000 cas de coqueluche (Mortimer, 1994), dont 1/3 seraient mortelles, 1/3 récupéreraient sans séquelles, le dernier tiers ayant des séquelles neurologiques permanentes. Ceci conduit à estimer à environ 50000 le nombre de complications neurologiques permanentes dues à la coqueluche en 1990 (Galazka, 1992).

Les données de surveillance suggèrent une claire décroissance du nombre de cas rapportés pour les régions Amérique et Pacifique Ouest dans les années 80. Cette évolution est moins évidente pour les régions Afrique, Est Méditerranée, et Asie du sud-est, et il n'y a pas de tendance à la baisse en Europe.

Récemment, des épidémies sont survenues dans des pays à fort taux de couverture vaccinale, en Hollande (De Melker *et al.*, 1997) et en Australie en 1997 où plus de 7000 cas sont survenus, entraînant 9 décès, ce qui correspond à la moitié des décès survenus durant les 20 dernières années en Australie (Promed, 1997). La raison n'en est pas connue : modification de souche circulante entraînant une inadéquation du vaccin, problème de fabrication, ou simplement modification épidémiologique correspondant à une baisse de la protection,

correspondant à la période suivant la « lune de miel » d'un programme de vaccination, et impliquant la nécessité d'un rappel vaccinal. Ces épidémies sont des arguments supplémentaires de l'impossibilité d'envisager l'éradication de cette maladie (Fine, 1988b).

*L'épidémiologie de la coqueluche a été modifiée par la vaccination, du fait de l'efficacité des vaccins. Mais il y avait probablement une interaction positive, la fréquence de l'exposition à la bactérie circulante maintenant une immunité. A long terme, cette interaction diminue du fait de la raréfaction des contacts. Le rôle de plus en plus important des adultes dans la transmission, en particulier aux nouveau-nés, doit faire envisager des rappels vaccinaux, donc des vaccins mieux tolérés.*

**1.1.6 Traitement** : Il n'y a pas de traitement réellement efficace. Que ce soit l'administration d'antibiotiques ou la sérothérapie, leur utilité n'est observée qu'en début de maladie. L'antibiotique le plus couramment utilisé est l'Erythromycine, qui est recommandée pour les nourrissons surtout ou éventuellement le personnel soignant en cas d'exposition.

La sérothérapie a été utilisée soit avec du sérum de cheval, soit à partir de sérum de convalescents. Très tôt, l'efficacité du sérum de convalescent a été montrée, ainsi que le danger de cette technique associé au risque de transmission de maladies comme la syphilis « héréditaire », lors des développements initiaux (Debré, 1923). La production de sérums hyperimmuns à partir de donneurs vaccinés de façon répétée a permis de gagner du temps pour traiter les enfants le plus tôt possible (Kendrick, 1936), permettant de contrôler l'absence de risque de transmission d'autres maladies. Récemment l'efficacité de sérums hyperimmuns obtenus après vaccination par des vaccins acellulaires a été montrée sur la réduction de la durée des reprises (Granström *et al.*, 1991).

*Il n'y a pas de traitement antibiotique réellement efficace. La sérothérapie a eu une efficacité prouvée, et a contribué aux connaissances immunologiques pour la préparation des vaccins. Des sérums hyperimmuns efficaces peuvent être obtenus après vaccination par des vaccins acellulaires.*

### **1.1.7 Prévention par la vaccination :**

**1.1.7.1 Efficacité** Après la découverte du Bacille en 1906, le développement des vaccins a eu lieu au cours de la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle : Le premier essai de vaccination aurait eu lieu en 1912 (Miller *et al.*, 1982) et le vaccin contre la coqueluche est intégré à la liste des remèdes nouveaux et non officiels aux USA en 1914 (Gordon et Hood, 1951). Le développement des vaccins contre la coqueluche peut être schématisé en 4 étapes (Mortimer, 1994). Une étape initiale correspond aux 30 premières années du siècle, où les vaccins étaient préparés à partir de bactéries tuées, mais au contenu imprécis, comportant souvent d'autres germes des voies aériennes, et utilisés pour le traitement et la prophylaxie. La deuxième étape correspond à l'amélioration des méthodes de production et à leur standardisation, permettant une diffusion large de la vaccination. La troisième étape correspond au développement des vaccins acellulaires, et la quatrième étape serait la prochaine étape, celle des vaccins produits par génie génétique. Implicitement, Mortimer associe donc à ces étapes une évolution associée au progrès des connaissances, en particulier physiopathologiques, même si ces étapes se recouvrent chronologiquement au moins en partie.

**Développements initiaux :** Madsen aux îles Féroé semble avoir été le premier à analyser l'effet du vaccin préparé à Copenhague, et ce de façon comparative (Madsen, 1933). Il montre l'effet bénéfique du vaccin entraînant une baisse de la mortalité et souligne la nécessité d'un groupe de contrôle. Les rapports sur les études effectuées jusqu'aux années 30

sont difficiles d'accès, mais il s'en dégage une inconstance des résultats (Cherry, 1984). Les efforts d'amélioration ont porté sur le nombre de bactéries, mesuré par l'opacité de la préparation, sur l'utilisation de milieux de culture standardisés, et sur l'inactivation des bactéries par des méthodes moins agressives. Un des problèmes était aussi celui des variations antigéniques des bactéries, associées très tôt aux conditions de culture (Bordet et Sleswyk, 1910), puis à des différences de « race » de bactéries (Krumwiede *et al.*, 1923), pour revenir aux conditions de culture (Kristensen, 1927) et à la mise en évidence de phases de croissance sur un même milieu (Leslie et Gardner, 1931). Cette constatation confirmait les hypothèses évoquant une relation entre l'ancienneté des colonies et l'efficacité des vaccins « *Cette étude des races de Bacilles de Bordet-Gengou, la première, croyons nous, entreprise en France, démontre donc l'homogénéité du Bacille de la coqueluche à Paris. Toutefois, les variations dans les taux d'agglutination, soit avec les sérums expérimentaux [« races » américaines, ndlr], soit avec le sérum thérapeutique de Bordet, expliquent peut-être la variabilité des résultats thérapeutiques obtenus avec des vaccins ou des sérums préparés avec des souches de Bacilles de la coqueluche, ou trop peu nombreuses, ou trop anciennes...* » (Debré *et al.*, 1928). Après ces travaux, les vaccins étaient donc systématiquement préparés à partir d'isolats frais de Phase I. Dans les années 30 et au début des années 40, de nombreux vaccins étaient étudiés (Miller, 1938 ; Sauer, 1939 ; Kendrick et Eldering, 1939 ; Adams, 1947). Les vaccins étaient évalués sur l'animal et sur l'homme de nombreux essais cliniques ont été conduits (Lapin, 1943).

Il a été montré que la protection clinique et l'immunogénicité des vaccins étaient fonction de leur teneur en organismes tués, et que les vaccins contenaient une endotoxine qui, par ses effets néfastes, limitait le dosage des préparations vaccinales. Les vaccins pouvaient être à germes entiers non lavés, ou à germes entiers lavés, ou contenir la toxine inactivée



(anatoxine), ou enrichis en toxine, ou contenir des antigènes bactériens dénaturés (Cherry, 1984). Les bactéries étaient tuées soit par la chaleur, soit par le formaldéhyde, soit par le merthiolate. En général, les vaccins les plus efficaces étaient des vaccins non lavés dosés à 80 - 120 milliards de bactéries. La mesure du dosage s'effectuait selon l'opacité de la solution, qui d'ailleurs a manqué de standardisation puisque ce n'est que récemment qu'il a été montré que les standards d'opacité américains et celui de l'OMS diffèrent, celui des USA étant au moins deux fois plus dense (Cameron, 1988). Les niveaux d'efficacité des vaccins étudiés étaient alors élevés. Sauer rapporte des résultats de 92% d'efficacité pour un vaccin (méthode cas-contact) sur 2453 vaccinés et 1730 témoins (Sauer, 1939). La même année, l'efficacité d'un vaccin similaire est estimée à 61% (comparaison d'enfants vaccinés dans un dispensaire à des enfants non vaccinés de la population générale) (Kendrick et Eldering, 1939). Les études du Medical Research Council (MRC) en Angleterre (essais cliniques randomisés en double aveugle) confirment l'efficacité satisfaisante des vaccins américains puis britanniques (MRC, 1951 ; 1956 ; 1959). Le premier adjuvant associé à un vaccin contre la coqueluche a été essayé en 1936 à partir de l'expérience sur la diphtérie (Harrisson, 1935), avec une seule injection (allocation du vaccin selon les initiales du nom), sans résultat net de protection (Harrisson *et al.*, 1938). Puis une étude en deux doses a clairement montré une diminution de la sévérité de la maladie (Bell, 1941).

**Utilisation en routine** : A la fin des années 40, les capacités de production de vaccins standardisés ont permis la vaccination généralisée dans de nombreux pays. Les vaccins sont devenus systématiquement adsorbés, progressivement combinés aux autres toxoïdes de la diphtérie et du tétanos, puis du vaccin poliomyélite inactivé. Les volumes injectés ont diminué du fait de l'utilisation d'adjuvants, et l'amélioration des milieux de culture synthétiques puis l'utilisation de fermenteurs ont permis une production industrielle.

Des tests cutanés ont été développés pour étudier la protection, mais aux résultats incertains et peu utilisés (Miller *et al.*, 1948 ; Barysh *et al.*, 1951).

L'évaluation des vaccins restait donc difficile en dehors d'études de protection réelle, car les autres moyens n'étaient pas satisfaisants : Les techniques sérologiques (fixation du complément ou agglutination sur lame) n'apportaient pas de corrélation de façon claire avec la protection, malgré certains résultats positifs surtout concernant l'agglutination (MRC, 1956 ; Standfast, 1958 ; Zourbas, 1965). Certaines de ces corrélations ont été réfutées par la suite. Ce n'est qu'après la deuxième guerre mondiale qu'a été mis au point un test de laboratoire reproductible permettant d'évaluer le pouvoir protecteur des vaccins contre la coqueluche lors de la fabrication. Il s'agit du test de protection de la souris dans lequel des souris vaccinées sont inoculées intra-cérébralement par des bactéries vivantes (Kendrick *et al.*; 1947). Puis il a été montré que ce test corrélait avec la protection chez l'homme, et il a été utilisé jusqu'à maintenant comme standard d'efficacité. En production de routine ou lors de changements de procédures, le test de protection de la souris permet de situer une limite inférieure pour la protection. Le contrôle de la réactogénicité est assuré par un test d'opacité, qui fixe une limite supérieure pour la quantité de bactéries. La toxicité est aussi étudiée par le test de perte de poids de la souris, dans lequel une dose importante de vaccin est administrée par voie intrapéritonéale, et où une altération de la prise de poids de la souris dans les jours suivants est considéré comme une toxicité (OMS, 1953).

Lorsque les vaccins ont été efficaces, et alors que la morbidité restait importante, et la mortalité étant concentrée chez les jeunes enfants, la protection du nouveau-né par la vaccination de la femme enceinte a été recherchée. Des arguments supportaient l'idée que cela pouvait être efficace : Chez le lapin, la vaccination de lapines induisait un transfert d'anticorps fixant le complément surtout en fin de grossesse, mais pas pendant l'allaitement. Chez

l'homme, une corrélation était observée entre les taux d'anticorps naturels maternels et les taux du nouveau-né (Lichty *et al.*, 1938). Enfin, Bradford avait montré l'effet protecteur de sang de convalescent lorsqu'il était administré à un enfant récemment exposé, suggérant un transfert passif d'anticorps, analogue à ce qui pourrait s'observer au niveau du placenta. Les études entreprises ont montré une élévation du taux du nouveau-né après vaccination de la mère (Lichty *et al.*, 1938 ; Kendrick *et al.*, 1945), donc un transfert placentaire d'anticorps. Une autre étude d'immunogénicité prévoyait un suivi de 12 mois après la naissance de 100 enfants dont les mères avaient été vaccinées pendant la grossesse, comparé à 100 enfants dont les mères n'avaient pas été vaccinées. Dans le groupe témoin, au cours des 6 premiers mois, il y a eu 6 expositions et 3 cas, puis 2 cas dans les 6 mois suivants. Dans le groupe vacciné il y avait dans les 6 premiers mois, 8 expositions dont 3 intenses, et pas de cas, puis 2 cas dans les 6 mois suivants. Les auteurs ont conclu que les résultats étaient « *in keeping with the expectancy of passive immunization* », et qu'aucun effet négatif sur le nouveau-né n'était observé (Cohen et Scadron, 1946). Cependant, dans une revue plus récente sur la vaccination contre la coqueluche, les travaux de Vysoka en Tchécoslovaquie sur 71 nouveau-nés sont analysés, et le bénéfice de la vaccination de la mère n'est pas apparent (Boulard, 1968). Enfin plus récemment encore, le passage transplacentaire des anticorps maternels est confirmé, les taux observés chez le nouveau-né correspondant au taux observé chez la mère. Leur demi-vie serait de 6 semaines, et ils disparaîtraient vers le 4<sup>ème</sup> mois de vie (Van Savage *et al.*, 1990). Malgré l'existence d'une transmission transplacentaire d'anticorps, les nouveaux-nés sont susceptibles dès la naissance. Les anticorps transmis ne sont donc pas protecteurs, sans que l'on sache pourquoi.

L'utilisation des vaccins et leur efficacité des années 40 à la fin des années 70 a eu pour effet de diminuer l'importance de la maladie, ce qui est une preuve de leur efficacité

(efficience), comme l'est aussi la reprise des épidémies en cas d'arrêt des programmes. Ceci a été le cas au Japon, avec l'arrêt des vaccinations en 1975 après un programme de 25 ans (Sato, 1997). En Angleterre, avec un arrêt des vaccinations au milieu des années 70, et la survenue d'épidémies en 1977 et 1979. Puis en Suède, où l'arrêt des vaccinations systématiques a eu lieu en 1979.

**Vaccins acellulaires** : Les effets secondaires des vaccins à germes entiers, associés à leur efficacité qui a permis une baisse de l'incidence de la maladie, a donc conduit à un arrêt de leur utilisation, du fait du paradoxe d'un apparent déséquilibre entre les effets néfastes, visibles, et les effets bénéfiques, invisibles (Chen et Orenstein, 1996).

Ceci a confirmé la nécessité d'améliorer les vaccins, et renforcé une recherche de nouveaux vaccins ne comportant que les protéines immunisantes nécessaires à la protection. Cette recherche existait en fait déjà depuis longtemps, comme en attestent les premières études, déjà anciennes, de vaccins acellulaires. Les études initiales furent menées sans support physiopathologique, donc sans connaissance précise des antigènes restant après traitement de la bactérie tuée. Après qu'il fut mis au point, les tests étaient faits contre le test intra-cérébral de protection de la souris, et avant les études cliniques. Le premier vaccin acellulaire semblerait être un vaccin préparé à partir du surnageant d'une culture tuée par le formol et broyée dans un moulin à balles (Singer-Brooks, 1938). Ce produit n'avait pas d'effet protecteur comparé à l'absence de vaccination, alors que le vaccin à germes entiers étudié simultanément conférait une bonne protection.

En 1947, un autre vaccin acellulaire dit de Pillemer, préparé par séparation sonique, a été efficace selon le test de Kendrick, et chez l'homme, mais il provoquait trop d'effets secondaires, et était donc contraire à l'amélioration recherchée (MRC, 1956). En 1955, un autre vaccin acellulaire, préparé comme le vaccin précédent mais avec une étape

supplémentaire de traitement par l'alcool, aurait donné une meilleure protection que le germe entier de comparaison (Felton et Verwey, 1955). Puis en 1962, un vaccin acellulaire était préparé à partir d'extraction saline, le Trisolgen®, commercialisé de 1962 à 1977. Il semblait y avoir des problèmes de standardisation du produit, et sa fabrication a été interrompue. Il paraissait aussi réactogène, et son efficacité était peu démontrée (Hewlett et Cherry, 1997).

Les progrès dans la connaissance des antigènes, ainsi que les inquiétudes concernant les effets secondaires, associés à l'échec de certains vaccins à germes entiers, ont relancé l'intérêt pour de nouveaux vaccins acellulaires. De tels vaccins ont été utilisés en routine au Japon depuis 1981, où ils ont montré leur capacité à contrôler la coqueluche (Sato, 1997). Seulement après qu'ils soient utilisés en routine, une étude d'efficacité individuelle a été menée, selon un protocole non randomisé, non aveugle, et utilisant un diagnostic clinique de coqueluche. Le calendrier étudié comportait deux doses initiales suivies d'une dose de rappel un an plus tard (Sato *et al.*, 1984). Cette expérience a ouvert la voie à la nouvelle génération de vaccins acellulaires. Les mêmes types de vaccins ont été testés en Suède où ils ont été efficaces (Kallings *et al.*, 1988). Mais cette dernière étude n'a pas comporté de vaccin à germes entiers de référence. Les études plus récentes feront l'objet de la deuxième partie pour le Sénégal, et de la discussion pour les autres études menées en Europe.

#### **1.1.7.2 Tolérance**

Les vaccins à germes entiers ont toujours été associés à des effets secondaires. Madsen signale déjà cet aspect et recommande de ne pas vacciner avant l'âge de 3 mois (Madsen, 1933 ; Singer-Brooks, 1938).

Les effets secondaires liés à la vaccination ont fait l'objet de revues spéciales (Mortimer et Cherry, 1988 ; Howson *et al.*, 1991) et ne seront pas détaillés ici. Simplement, on peut souligner une tendance à ce que la société apporte de plus en plus de considération à

des effets indésirables non graves, au fur et à mesure de la baisse de l'incidence de la maladie. Le déclenchement a été l'évocation d'une relation entre la vaccination par les vaccins à germes entiers et des effets neurologiques graves. Des études de différents pays d'Europe ont dès 1960 clairement posé le problème (Ström, 1960, Aicardi et Chevrié, 1975). La nature causale de cette relation a par la suite été infirmée (Miller *et al.*, 1982). Mais d'autres questions persistent, il est vrai dans des environnements éloignés des centres de décision, comme le risque de survenue de poliomyélite après vaccination et le rôle des adjuvants (Banker, 1968 ; Whyatt, 1996 ; Relyveld, 1996). Les travaux du MRC en Angleterre (Wilson *et al.*, 1956) avaient déjà établi la plus grande fréquence des poliomyélites après injection intramusculaire.

L'ensemble de ces effets secondaires ont conduit à un rejet de ces vaccinations et parfois des vaccinations associées (Gangarosa *et al.*, 1998), que l'on peut résumer sous le terme « d'intolérance sociale », par rapport à la même notion au niveau de l'individu. La société, par différentes manifestations au niveau du public, des professionnels (médecins ou avocats) ou des médias, rejette l'utilisation du vaccin.

*Le développement récent des vaccins acellulaires contre la coqueluche a été lié à la "rançon" du succès des vaccins à germes entiers dans le contrôle épidémiologique de la coqueluche, associée à l'effet à long terme des politiques de vaccination et aux modifications épidémiologiques induites, nécessitant d'envisager des rappels. Une meilleure tolérance était ainsi recherchée, pour une efficacité protectrice équivalente. L'augmentation des connaissances a permis d'identifier plusieurs facteurs susceptibles d'être intégrés à un vaccin, mais sans qu'il ne soit possible de préciser les facteurs indispensables sur des bases expérimentales, en amont des essais cliniques randomisés.*

## **Première partie**

**Le problème du contrôle de la coqueluche et son contexte  
méthodologique**

## **Chapitre 2**

**Mesure de l'efficacité des vaccins**

## Introduction

En français, l'efficacité d'un traitement n'est pas un terme technique parfaitement défini, ou plus exactement son utilisation ne correspond pas toujours à sa définition. Les termes techniques recommandés (Leclerc *et al.*, 1990, Hogarth, 1977) et leurs équivalents anglais, souvent plus précis, sont (Last, 1995):

- l'*utilité*, qui correspond en anglais à « *efficacy* » et qui est « *l'avantage que présente pour l'individu le service, le traitement, le médicament, ou la mesure de lutte ou de prévention recommandée ou adoptée* » ; *Efficacy* : « *The extent to which a specific intervention, procedure, regimen or services produces a beneficial result under ideal conditions. Ideally, the determination of efficacy is based on the results of a randomized controlled trial* ».

- l'*efficacité*, qui correspond en anglais à « *effectiveness* » et qui est « *la mesure dans laquelle un plan, un programme ou un projet a atteint ses objectifs dans des limites fixées pour la réalisation de cet objectif* » ; *Effectiveness* : « *The extent to which a specific intervention, procedure, regimen or services, when deployed in the field in routine circumstances, does what it is intended to do for a specified population. To be distinguished from efficacy and efficiency* ».

- l'*efficience*, ou capacité de rendement, qui correspond à l'anglais « *efficiency* », qui est l'étude « *des moyens à mettre en œuvre pour arriver au résultat optimal, à partir des mêmes ressources* ». *Efficiency* : « *The extent to which the resources used to provide a specific intervention, procedure, regimen, or service of known efficacy and effectiveness are minimized* ».

Dans le domaine des vaccins, le français utilise surtout le terme d'efficacité vaccinale, parfois celui de pouvoir protecteur, jamais celui d'utilité. En anglais, la « *vaccine efficacy* » correspond au pouvoir protecteur mesuré dans des conditions idéales, au cours d'essais



cliniques randomisés, et est différenciée de la « *vaccine effectiveness* », mesurée sur le terrain, et qui fait intervenir d'autres facteurs, comme la conservation des vaccins (qualité de la chaîne de froid) ou les effets indirects de la vaccination (Halloran *et al.*, 1991 ; 1997). Cette distinction en français ne se retrouve qu'avec l'utilisation de l'expression « mesure de l'efficacité vaccinale sur le terrain » (Dabis *et al.*, 1992).

Nous utiliserons surtout le terme d'efficacité (cf. infra en 1.2.3.2) à la place de celui d'utilité pour respecter l'usage dans le domaine des vaccins, et parfois celui de pouvoir protecteur, dans la mesure où notre sujet se limite à la mesure de l'efficacité dans les conditions optimales de la méthodologie des essais cliniques randomisés (Chen et Orenstein, 1996).

## **1.2.1 Evolution de la mesure de l'effet**

### **1.2.1.1 Méthodes d'études**

La méthodologie de l'évaluation de l'effet a évolué de façon continue pour parvenir aux essais cliniques randomisés, progressant d'ailleurs souvent lors d'études de vaccins. Un aperçu historique est trouvé dans le manuel de Pocock (Pocock, 1983), qui s'appuie principalement sur une revue déjà ancienne (Bull, 1959) à laquelle nous avons largement emprunté. Auparavant, nous mentionnerons des analyses et interprétations récentes de la méthode de Galien à propos de deux traités sur la composition des médicaments, l'un sur les médicaments composés, l'autre sur la vertu (ou l'efficacité) des médicaments simples (Jacques, 1995). Le terme utilisé par Galien pour exprimer cette vertu ou effet du médicament est le mot grec "*dynamis*". Le principe de la méthode de composition des médicaments exposée par Galien est basé sur la complémentarité entre la connaissance "*logos*" et l'expérimentation "*empiris*".

Il est intéressant de constater que le développement de la méthodologie de l'expérimentation clinique a été dès le début intimement lié à celui de la vaccination. Lors de

l'introduction depuis Constantinople de la variolisation par Maitland et Lady Mary Worley-Montague, un essai d'efficacité de cette méthode, portant sur 6 prisonniers, a été autorisé par le roi en 1721. Tous les sujets survécurent et furent libérés. Un seulement eut une inoculation négative, il avait un antécédent de variole. Un autre sujet fut exposé à la variole et était protégé. Les résultats considérés comme concluants ont permis de généraliser la pratique. Cet essai fut critiqué (il est maintenant surtout connu pour les aspects éthiques d'une telle approche), et d'autres études en ont montré les risques et relativisé la portée. L'efficacité de la variolisation a aussi été étudiée par Bernoulli, qui concluait que l'inoculation protégeait contre la variole à vie. Pierre Louis a aussi étudié l'efficacité de la variolisation. Classiquement, le premier essai clinique rigoureux est attribué à James Lind, qui a expérimenté le traitement du Scorbut en 1747 sur 12 patients, et qui a obtenu des résultats convaincants avec les oranges et les citrons, confirmant d'ailleurs les observations de la compagnie des Indes en 1600. En fait, l'expérimentation s'adressait en particulier à des renèdes « populaires », comme l'utilisation de la digitaline étudiée par Withering, ou la vaccination par Jenner, reprise en 1798 par Pearson, qui confirma la protection apportée par la vaccination, mais recommanda une « *well-directed observation in a thousand of cases of inoculated cowpox* ». Watherhouse, qui, le premier, utilisa la méthode aux USA, vaccina 19 garçons, puis en inocula 12 par la suite, ainsi que 2 non vaccinés. Seuls ces deux eurent une variole.

*Une particularité importante à souligner des études de vaccins, donc de prévention, par rapport aux études curatives est que l'intervention précède la maladie, et que pour juger de l'effet protecteur, il faut attendre ou provoquer la maladie, ce qui a été fait y compris sur des sujets témoins non vaccinés. Dans la terminologie actuelle, on parle souvent de « challenge » ; cette technique est encore utilisée à l'exemple des essais de vaccins contre le choléra et le paludisme.*

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'approche statistique de l'évaluation thérapeutique se développe, avec l'avancée même de la théorie statistique. Cette analyse a alimenté les réflexions des précurseurs comme Bernoulli (1760), puis Laplace sur l'évaluation d'une thérapie (1812) : « *Le calcul des probabilités peut faire apprécier les avantages et les inconvénients des méthodes employées dans les sciences conjecturales. Ainsi, pour reconnaître le meilleur des traitements en usage dans la guérison d'une maladie, il suffit d'éprouver chacun d'eux sur un même nombre de malades, en rendant toutes les circonstances parfaitement semblables. La supériorité du traitement le plus avantageux se manifestera de plus en plus, à mesure que ce nombre s'accroîtra ; et le calcul fera connaître la probabilité correspondante à son avantage* ». Cette approche est développée par Pierre Louis, qui l'a appliquée dans sa « *recherche sur les effets de la saignée* » mais aussi dans le domaine de la typhoïde et de l'effet de la vaccination, ou pour la tuberculose. Il a été une des figures qui ont établi la base des essais cliniques randomisés (Bollet, 1973).

Parallèlement, se développe l'étude de l'effet de médicaments sur modèles animaux, sous l'impulsion de Magendie, principalement pour des études de toxicité et d'action pharmacologique, et il était considéré qu'il y avait équivalence d'effet curatif chez l'homme et chez les animaux.

La tendance à la définition méthodologique d'essais cliniques se poursuit après Louis chez Bartlett et Holmes aux USA. Des essais cliniques sont organisés en Angleterre par Benett pour le traitement de la pneumonie, par Sutton pour la fièvre rhumatismale. Dans le domaine de la chirurgie, l'étude des anesthésiques se développe avec Snow, ainsi que celle des méthodes antiseptiques à l'exemple de Lister et de son travail sur les amputations en 1870. Le développement de la bactériologie suscite de nouvelles initiatives thérapeutiques,

dont le fameux essai de prévention du Charbon par Pasteur en 1881. Cette expérimentation comprend trois groupes de moutons : 25 inoculés et infectés, 25 infectés seulement, et 10 ni inoculés, ni infectés. Une attention spéciale avait été portée sur l'égalité des doses de virus infectant, avec attribution alternée entre les animaux inoculés et non inoculés, à la demande de la critique semble-t-il. Tous les animaux inoculés et infectés survécurent, ainsi que les contrôles, et tous les infectés non-inoculés moururent. Il y a donc ici à nouveau challenge, chez l'animal. L'effet du pouvoir protecteur du vaccin contre la rage a été plus difficile à prouver, et a été basé sur le fait que la maladie est toujours létale après infection. L'affirmation de l'efficacité du procédé était raisonnable, mais il devenait par la suite très difficile de l'améliorer pour des raisons morales, puisque le critère de jugement était l'absence de décès.

Des progrès thérapeutiques ont été obtenus par expérimentation pour la prévention du Béri-béri dans l'armée japonaise (Takaki, 1884) ainsi que pour le myxoedème (Murray, 1891). L'étude de la valeur thérapeutique du sérum antidiphtérique a été menée en Allemagne (Behring *et al.*, 1893), et de façon parallèle ou rivale en France (Roux *et al.*, 1894). Au Danemark (Fibiger, 1895; 1898), une étude contrôlée a été menée sur le sérum antidiphtérique, en introduisant semble-t-il pour la première fois la technique du traitement alterné des cas. Fibiger emprunte cette méthode à un médecin (Wanscher, 1877) qui ne l'avait pas utilisée, mais l'avait recommandée à la suite de ses études sur l'efficacité de la trachéotomie dans la diphtérie. Cette méthode d'attribution alternée des traitements est d'ailleurs recommandée dès 1897, dans un ouvrage faisant une revue méthodologique intéressante de la méthodologie de l'expérimentation de l'effet thérapeutique (Heiberg, 1897). Fibiger analysa la comparabilité des séries traitées et non traitées pour divers facteurs dont l'âge, les symptômes, et la sévérité. L'analyse de la mortalité, de la taille des membranes, de

la fièvre, de la paralysie et de l'albuminurie fut menée par groupe d'âge et par groupe de sévérité. L'échec de ce travail a été que la mortalité a été exceptionnellement faible, de 8%, comparée aux 50% observés dans les autres études. Mais en fin d'étude, Fibiger mentionne que le traitement alterné a été facile à organiser, en rythmant l'alternance par journées. Il signale d'ailleurs qu'à la fin de l'étude, les cas les plus graves recevaient systématiquement la sérothérapie, car les expérimentateurs étaient déjà convaincus de son efficacité. Au tournant du siècle, eu lieu la grande controverse sur le vaccin contre la typhoïde soutenu par Wright et critiqué principalement par Pearson. Cet exemple est intéressant à plus d'un titre (Wright, 1904 a,b,c,d,e,f ; Pearson, 1904 a,b,c,d,e,f ; Greenwood et Yule, 1915 ; Cockburn, 1955). Le problème de la comparabilité des groupes vaccinés et contrôle est reconnu par les deux protagonistes, en particulier concernant la sélection de volontaires pour la vaccination. Ainsi, il semble que Wright ait bien décrit, et semble-t-il pour la première fois, l'effet de dilution de l'effet protecteur lié au manque de spécificité du critère de jugement (Susser, 1977). En effet, Pearson basait en grande partie son jugement sur le fait que l'association observée était plus faible que pour d'autres maladies comme la variole et la diphtérie, et Whright a alors souligné le fait que la typhoïde était diagnostiquée de façon moins spécifique que ces deux maladies. Il souligne aussi l'importance de l'observation d'une même tendance en différents endroits géographiques ou temporels, observation qui fait toujours partie du raisonnement épidémiologique, comme dans l'interprétation plus récente de la réalité des différences de mortalité observées après différents types de vaccins contre la rougeole (Knudsen *et al.*, 1996).

L'importance stratégique de la typhoïde et du choléra dans les armées lors du premier conflit mondial, et donc de leur prophylaxie en particulier par la vaccination, a conduit à une étude extrêmement sérieuse de leur efficacité, et les bases réelles de l'évaluation, préfigurant les essais cliniques randomisés, sont établies par Greenwood et Yule, en 1915, à qui l'on

attribue aussi classiquement la définition de l'efficacité vaccinale. Aussi leur mémoire mérite-t-il une analyse détaillée. Il est organisé en 4 parties dont la première porte sur les conditions de recueil des données qui permettent une conclusion statistique et la prise en compte des fluctuations d'échantillonnage, et donc des conditions d'une inférence valide :

Dans cette première partie, les auteurs résument l'information nécessaire au nombre de sujets vaccinés ayant eu la maladie, au nombre de vaccinés n'ayant pas eu la maladie, au nombre de non vaccinés ayant eu la maladie, et au nombre de non vaccinés n'ayant pas eu la maladie. Ils signalent que la maladie peut être remplacée par le décès. L'objectif des auteurs est de répondre aux questions suivantes : (1) Y a-t-il une différence significative entre les taux d'attaque (ou de décès) entre les deux classes , i.e. la différence observée n'est elle pas due à la chance ? (2) supposant que la réponse à (1) est affirmative, quel est le degré d'association entre le fait d'être vacciné et d'éviter la maladie (ou en développer une forme plus faible), et comment les résultats d'une étude peuvent-ils être comparés à ceux d'une autre de ce point de vue ?

La discussion des méthodes statistiques présume que les 4 catégories sont homogènes excepté pour les vaccinations et les taux d'attaque. C'est à dire que les données doivent satisfaire à toutes les conditions suivantes :

- Les personnes doivent être « *in all material aspects* » identiques. Les vaccinés ne doivent pas différer des non vaccinés en terme d'âge, sexe, constitution sociale ou raciale, à moins qu'il puisse être montré par ailleurs que ces facteurs n'affectent pas la susceptibilité à faire la maladie, ou à en décéder. Les auteurs soulignent la difficulté de la comparabilité, en citant l'exemple des volontaires qui sont « *in all material aspects alike* », mais qui ne sont pas comparables car plus enclins, dans un même environnement, à être moins exposé à la typhoïde par des mesures d'hygiène personnelle du fait de leur attention à cette maladie ;

- L'exposition effective à la maladie doit être identique chez les vaccinés et les non vaccinés. Ceci concerne la durée d'exposition, mais aussi les conditions d'exposition, en particulier d'une année sur l'autre.

- Les critères utilisés pour déterminer le statut vaccinal et le statut de la maladie doivent être indépendants. Par exemple, le fait d'être défini comme vacciné ou pas ne doit pas être influencé dans les cas douteux par la connaissance de la survenue ou pas de la maladie. Les auteurs disent que cet aspect peut sembler tellement évident qu'il peut paraître superflu de le mentionner. Mais ils opposent des situations claires, où le diagnostic est établi seulement sur la bactériologie et le statut vaccinal est bien connu, à des situations où le diagnostic est moins spécifique, et le statut vaccinal de connaissance difficile. La dernière condition est que les effectifs soient suffisants pour que l'on soit en mesure de juger des fluctuations d'échantillonnage, et ceci est discuté dans l'application du test du Chi<sup>2</sup>, introduit par Pearson peu de temps avant.

Dans la deuxième partie du mémoire, sont étudiées les caractéristiques des données disponibles en matière de typhoïde et de choléra par rapport aux conditions détaillées dans la deuxième partie. Ceci leur permet de conclure à l'efficacité des deux types de vaccins. Les deux dernières parties de ce rapport ont trait à l'interprétation et sont discutées dans le paragraphe suivant.

A la même époque, du fait de la guerre, des développements ont lieu sur la prophylaxie du tétanos par l'injection systématique de sérum antitétanique chez les blessés dès la fin de 1914, et l'argument d'efficacité reste basé sur l'étude du déclin de la prévalence. Entre les deux guerres, le traitement du rachitisme fait l'objet d'un essai conclusif à Vienne, montrant son origine nutritionnelle (Chick et Dalyell, 1921). L'étude des vaccins contre le rhume a vu introduire la notion d'aveugle avec l'introduction d'un placebo (Fergusson, 1927).

L'introduction du placebo est ici associée à la subjectivité des symptômes, et à leur évolution favorable spontanée. D'après Pocock, la première randomisation adéquate aurait été réalisée lors de l'étude du MRC en 1948 de l'intérêt de la Streptomycine dans le traitement de la tuberculose pulmonaire, avec lecture des clichés pulmonaires (le critère de jugement) en aveugle. En fait, d'autres études du MRC furent lancées à cette période, avec l'introduction du double aveugle pour l'appréciation de l'effet d'antihistaminiques, mais aussi une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle sur la prévention de la coqueluche par la vaccination, initiée en 1946 et terminée en 1950 (MRC, 1951). Cette méthode diffusera rapidement (Paul, 1971), ce qui se traduira par son application à l'étude contre placebo d'un vaccin contre la poliomyélite aux USA (Francis *et al.*, 1955), après de nombreuses hésitations, semble-t-il. Cette influence anglaise sur la méthodologie de cet essai américain a été nuancée (Susser, 1977), mais elle reste très probable étant donné l'influence de l'école anglaise sur le développement des essais cliniques randomisés (Doll, 1993 ; Lilienfield et Stolley, 1994).

Avant cette date, au cours de la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, et après les travaux concernant la typhoïde et le choléra, les études sur les vaccins contre la coqueluche apportent une bonne description de l'évolution des méthodologies. Dès le début, la nécessité de la comparaison à un groupe d'enfants non vaccinés est perçue, à l'exemple du rapport de Madsen (Madsen, 1933). Shinger-Brooks, à San Francisco dès 1933, puis Kendrick soulignent l'importance du groupe contrôle. En dehors de la technique particulière du challenge, utilisée chez 4 enfants d'une même famille (MacDonald et MacDonald, 1933), la méthode employée est de s'assurer a posteriori de la comparabilité, en s'assurant de la similarité entre groupes pour un certain nombre de facteurs. Une autre méthode, mise au point par W. H. Frost et Sargent pour l'étude de la vaccination contre la diphtérie (Sargent et Merell, 1940), a pour objectif de calculer l'efficacité vaccinale à partir de la connaissance de la proportion de cas



vaccinés et de la proportion de la population vaccinée. Cette méthode a été appliquée avec succès pour la coqueluche (Weiss et Kendrick, 1943), la proportion de cas vaccinés étant calculée à partir d'un échantillon représentatif de la population (il s'agissait des cas d'autres maladies pour lesquelles il y a une « susceptibilité universelle », comme la rougeole, la varicelle, et la scarlatine). On trouve d'ailleurs déjà dans ce travail la formulation de l'efficacité vaccinale actuelle, mais sous le terme approprié « *effectiveness* ». Cette méthode est toujours employée sous la dénomination de méthode « rapide » (Dabis *et al.*, 1992) ou de « screening » (Orenstein *et al.*, 1985).

Après 1950, la méthodologie des essais randomisés se développera dans le domaine des essais curatifs, avec l'utilisation des antibiotiques, et pour le traitement des maladies chroniques. Cette méthodologie reste actuellement la référence pour les études visant à établir un effet thérapeutique ou préventif, et en particulier pour permettre d'obtenir une autorisation de mise sur le marché. Mais le point particulier de l'utilisation quasi systématique d'un groupe placebo est controversée (Rothman et Michels, 1994). Dans le cas particulier des vaccins, donc d'actions à visée préventive, la conception d'une étude incluant un groupe placebo revient de fait à un challenge passif, ou naturel, ce qui pose un problème particulier. Cet aspect sera discuté dans la troisième partie.

D'autres méthodes, en particulier les études dites cas-témoins, développées dans le cadre de l'épidémiologie analytique, ont vu leur utilisation s'étendre à l'évaluation, en particulier des vaccins (Smith *et al.*, 1982; 1984; 1987; Comstock, 1990 ; Cutts 1990). Mais elles sont surtout appliquées aux vaccins déjà utilisés, même si cette règle n'est pas absolue, et ne seront pas développées dans cette étude qui reste limitée aux essais cliniques randomisés.

*L'étude des vaccins et des sérums a été étroitement associée au développement de la méthodologie des essais cliniques. L'importance de la comparabilité des groupes, l'attribution alternée des traitements, l'importance de la spécificité du critère de jugement, la faisabilité d'essais à large échelle sont des notions issues de ces études. Une particularité est que la nature préventive de l'action des vaccins fait porter les études sur des sujets sains. Les « Challenges » pratiqués jusqu'à récemment sur les enfants, et encore actuellement sur les adultes, par exemple pour les études sur le choléra, ne sont plus éthiquement acceptables chez les enfants. Mais le recours quasi systématique à un groupe placebo, de fait, revient à effectuer une sorte de challenge naturel, et il n'est pas certain que le recours à un groupe placebo soit systématiquement nécessaire.*

#### **1.2.1.2 Analyse et interprétation**

La quantification de l'effet est développée dans la revue de Greenwood et Yule (Greenwood et Yule, 1915), qui inspire encore actuellement des réflexions sur la mesure de l'effet des vaccins (Ira *et al.*, 1996). Ils proposent une théorie statistique d'interprétation des données de vaccination, qu'ils intitulent : « *the meaning of immunization and the interpretation of consistent data relating to two or more epidemics* ». Le point de départ de leur analyse est que les taux d'attaque entre épidémies successives et d'intensité différente doivent être corrélés. Ils n'ont pas trouvé cette corrélation dans les données différentes pour des maladies comme la typhoïde, le choléra, la peste et la variole, et ont essayé de modéliser les faits observés. Cet aspect est étudié actuellement comme l'hétérogénéité de l'effet des vaccins sur la réponse de l'hôte, mais il est possible aussi d'interpréter cet effort d'étude des informations de différentes épidémies comme un moyen d'étudier l'effet de vaccins de façon chronologique, c'est à dire en comparant les taux d'attaque avant la mise en place de la

vaccination et après la mise en place, c'est à dire en l'absence d'analyse comparative proprement dite.

La quatrième et dernière partie du rapport de Greenwood et Yule porte sur la mesure de l'"efficacité relative" de différents procédés d'immunisation (« *The measurement of the relative efficiencies of different immunization processes* ») : deux questions sont posées si on a observé une diminution significative de l'incidence de la maladie chez les vaccinés comparés aux non vaccinés : (1) dans quelles conditions le « *process of immunization* », que nous traduirons maintenant par procédure de vaccination produit-il le meilleur résultat ? et (2) si les résultats de la typhoïde incitent à vacciner les troupes se rendant dans une zone où sévit la typhoïde, est-ce que les résultats pour le choléra sont suffisamment bons pour que la même décision soit prise pour des troupes susceptibles d'être exposées à cette infection ? Ainsi, il s'agit de comparer les efficacités relatives de vaccinations pour des maladies différentes. On retrouve là la notion utilisée par Pearson dans son opposition à Wright : L'effet de la vaccination contre la typhoïde était plus faible que celle observée lors de vaccination contre d'autres maladies : diphtérie et variole.

Greenwood et Yule précisent les définitions : Le terme « effectiveness » pouvant avoir plusieurs significations, qu'ils illustrent par un exemple théorique : « *To make the point clear, imagine the case of two diseases the fatalities of which invariable, being in every epidemic 50 and 5 per cent respectively in the case of unimmunized persons. Now, suppose that in each case a process of immunization was employed which resulted in the fatality-rates of inoculated persons being reduced to 30 per cent and zero respectively. In a certain sense, the effectiveness of the immunization process in the second case is perfect, for the fatality-rate cannot be lower than zero. But, in another sense, the effectiveness is greater in the previous case, because there the fatality-rate is reduced by 20 per cent instead of 5 per cent only.*

*Evidently both these points of view are of importance. From the standpoint of the practical sanitarian a reduction of mortality from 50 to 30 per cent is a greater achievement than a diminution from 5 per cent to nothing ; On the other hand, looking at the matter from the point of view of the student of immunizing processes, it might well be argued that the reduction to zero testifies to the establishment of a complete degree of immunity, the fact that the starting point was only 5 per cent limiting the public advantage to be gained from the establishment of such a condition, but not its scientific interest. These considerations immediately suggest the desirability of employing two terms, in clearly defined senses »*

Greenwood et Yule définissent ainsi:

- l'« advantage » d'un procédé de vaccination, comme la différence entre les taux de mortalité (ou les taux d'incidences) des populations vaccinées et non vaccinées;

- l'« efficiency » est définie comme le rapport de l'avantage au taux de mortalité chez les non vaccinés, c'est à dire comme le rapport du nombre de personnes sauvées par la vaccination sur le nombre de personne qui pouvaient l'être :  $(TAV - TANV) / TANV$ . On peut y voir une référence précoce au risque attribuable, qui sera développé plus tard (Miettinen, 1974).

Aussi, il y a dès le début une séparation nette entre des résultats qui renseignent sur l'effet plus biologique du vaccin, et ceux qui renseignent sur son intérêt en santé publique. Ils mentionnent d'emblée que les applications pratiques de ces idées n'est pas simple : Les taux d'attaque ou de létalité varient d'une épidémie à l'autre, ce qui se traduit par une variation de ces deux mesures d'une épidémie à l'autre pour une même maladie, et elles ne sont pas comparables entre maladies.

Lorsque plusieurs années plus tard les données sur la typhoïde sont à nouveau analysées, (Cockburn, 1955), les taux d'attaque chez les vaccinés et les non vaccinés ne sont

pas comparés selon la formule de l'efficacité vaccinale actuelle. La première utilisation selon la formule de Greenwood & Yule, que nous ayons pu retrouver, est associée à l'étude sur le vaccin contre la coqueluche (Weiss et Kendrick, 1943), puis à l'étude pour le vaccin contre la poliomyélite aux USA (Francis *et al.*, 1957). Dans l'étude du MRC sur les vaccins contre la coqueluche publiée en 1951, le rapport des taux d'attaque est aussi calculé pour comparer les vaccins entre eux. Il est intéressant de noter que les auteurs font cette comparaison parce que « *It is justifiable, because of these similarities in the incidence of pertussis in the unvaccinated groups, to compare the prophylactic value of the different vaccines* ». Puis cette formulation des résultats d'efficacité vaccinale s'est généralisée pour les vaccins et elle semble être restée cantonnée à ce domaine.

*La mesure de l'efficacité des vaccins a été associée au développement de la méthodologie de l'évaluation, pour parvenir aux essais cliniques randomisés. La double nature de la mesure, séparant l'effet biologique de l'efficacité de terrain, a été clairement décrite dès le début, et doit rester présente à l'esprit lors de l'interprétation des études récentes.*

### **1.2.2 Etat actuel de la mesure de l'effet.**

La mesure de l'effet est donc la mesure de la protection contre la maladie que l'on attribue à une action préventive ou thérapeutique. Cette mesure fait apparaître deux aspects différents : un aspect qualitatif, qui est celui de savoir si l'effet est significativement différent du hasard, et un aspect quantitatif, qui est de savoir l'importance de l'effet.

Cette quantification de l'effet est, lorsqu'il s'agit d'évaluation d'une thérapeutique ou d'une action de prévention, limitée à un petit nombre de domaines autres que celui des vaccins, dont le dépistage en cancérologie ou lors de méta-analyses, alors que les mêmes termes sont utilisés en pratique: on parle d'effet du traitement, d'efficacité, ou d'utilité. Or la

détermination de l'efficacité vaccinale n'est qu'une application particulière de l'appréciation de l'efficacité comparée de deux traitements ou d'un traitement à un placebo. Dans le dictionnaire d'épidémiologie (Last, 1995), il est possible de trouver une définition de l'efficacité vaccinale : « *(Syn : Protective efficacy). Mathematically, this is defined as the proportion of persons in the placebo group of a vaccine trial who should not have become ill if they had received the vaccine ; alternatively, it is the percentage reduction of cases among vaccinated individuals* ». On trouve aussi la définition de l'effet « *The result of a cause. In epidemiology, frequently a synonym for effect measure* » et de la mesure de l'effet : « *A quantity that measures the effect of a factor on the frequency or risk of a health outcome. Three such measures are attributable fractions, which measures the fraction of cases due to a factor; risk and rate differences, which measure the amount a factor adds to the risk or rate of a disease ; and risk and rate ratios, which measure the amount by which a factor multiplies the risk or rate of disease* ».

Ces définitions sont orientées vers les excès de risque, mais peut tout aussi bien s'appliquer à la mesure de l'effet d'un traitement ou d'une action de prévention, et l'efficacité vaccinale en est un exemple, puisqu'il s'agit d'une fraction attribuable. Cette quantification de l'effet est rarement abordée dans les manuels d'expérimentation clinique. Si presque tous, en introduction, mentionnent la mesure de l'effet d'un traitement ou de la mesure de son efficacité, on n'en reparle pas après en terme précis et définis. Une revue d'un certain nombre de manuels illustre bien cet aspect : Pour cela, nous avons 1) cherché dans l'index, quand il existait, à retrouver les mots suivants: effet, utilité, avantage, bénéfique, mesure de l'effet, et en anglais *effect, efficacy, vaccine efficacy, benefit* (car ce terme apparaît dans le dictionnaire comme « *Advantage or improvement resulting from an intervention* ») ; 2) cherché dans la table des matières le chapitre sur l'effet d'un traitement pour rechercher comment il était

exprimé, soit qualitativement (test de signification), ou quantitativement (mesure de l'effet). Les ouvrages sont désignés par le nom du premier auteur.

Bouvenot, 1996. Il n'y a pas d'index. Le terme d'efficacité est utilisé sans être défini. Un traitement est efficace si le test effectué sur le critère de jugement est significatif, mais l'effet n'est pas quantifié. Dans un chapitre, le terme d'efficacité est opposé au terme d'utilité;

Pocock, 1983. Le terme d'effet (*effect*) est utilisé, mais la quantification n'intervient que dans le calcul du nombre de sujets nécessaires, par la différence. Dans un chapitre « *estimation and confidence limit* », il note (p 206) : « *Although significance test give the strength of evidence for one treatment being better they do not tell one how much better* ». Mais il ne développe que le calcul de l'intervalle de confiance, et pas la mesure de l'effet. Cependant, dans l'historique du développement des essais cliniques, il mentionne l'essai sur la poliomyélite aux USA, et cite les chiffres d'efficacité vaccinale (sans la nommer, p 19);

Meinert (1986), Spriet (1986): Les termes cherchés ne sont pas retrouvés dans les index. L'analyse est distinguée selon que le critère est qualitatif ou quantitatif, et l'effet est significatif ou non;

Iber (1987): Aucun aspect sur l'effet ;

Caulin (1993): dans l'index, la notion d'effet est différente, associée à (effet) secondaire. La mesure est mentionnée dans le cadre de la mesure du critère de jugement, et il n'y a ni notion de bénéfice, ni notion d'efficacité vaccinale. Dans le texte, dans la partie analyse statistique (p 163), un paragraphe sur l'estimation du bénéfice thérapeutique est individualisé : « *Bien que les tests d'hypothèses constituent une dimension essentielle de l'analyse d'un essai thérapeutique randomisé, il est au moins aussi important que l'analyse statistique fournisse une estimation du bénéfice thérapeutique apporté par le nouveau traitement. L'estimation de la différence entre traitement constitue l'un des objectifs majeurs*

de l'essai thérapeutique randomisé, notamment pour en permettre l'impact en termes de prescription ». Le reste du paragraphe propose les formules de calcul de l'intervalle de confiance de la différence d'un pourcentage ou d'une moyenne, mais pas des rapports ;

Shapiro (1983): On ne trouve pas les mots recherchés dans l'index, mais on trouve le terme *efficiency* qui n'est utilisé que pour le « *design efficiency* », c'est à dire la recherche du plus petit nombre de sujets nécessaires. Dans cet ouvrage, Meier parle du bénéfice thérapeutique, et le quantifie, en soulignant que le bénéfice peut s'exprimer soit par la différence de deux traitements, soit par le rapport de deux traitements. Il cite l'exemple du bénéfice thérapeutique lié à l'administration d'antitoxine tétanique (citant Armitage et Gehan, 1974), dans lequel le bénéfice thérapeutique est apprécié par la différence de risque chez les traités par rapport aux contrôles. Mais l'utilisation du rapport des incidences est aussi mentionnée, pour remarquer qu'elle est une mesure plus stable de l'effet, car ne variant pas avec les niveaux d'incidence. Le terme « *efficacy* » est alors utilisé pour référencer le travail sur le vaccin contre la poliomyélite aux USA. Enfin, il mentionne aussi la réduction de mortalité dans les essais de prévention secondaire des infarctus du myocarde, exprimée en termes de proportion de décès évités;

Schwartz (1981): Il n'y a pas d'index. Cependant, c'est dans cet ouvrage que l'on trouve la discussion la plus approfondie sur la signification du pouvoir protecteur des vaccins;

Laplanche (1987): Aucun mot trouvé dans l'index. L'interprétation ne porte que sur la signification de la différence entre deux traitements;

Pour les ouvrages d'épidémiologie:

Rothman (1986): A individualisé un chapitre sur la mesure de l'effet, en séparant effet absolu et effet relatif, mais il ne le discute pas spécifiquement dans le cadre d'une intervention volontaire, thérapeutique ou prophylactique. (p 35 à 40) ;



Jenicek (1982). Seule l'efficacité est retrouvée dans l'index. Le pouvoir protecteur d'un vaccin est défini (p 322), selon la notion de fraction étiologique de risque, et discuté sur l'exemple de la rougeole au Canada, montrant une efficacité de 90%;

Jenicek (1985): Mentionne l'efficacité d'un traitement comme une fraction évitable du risque (p 155), mais utilise surtout ce terme pour l'évaluation d'un rapport coût-efficacité, où l'efficacité est alors exprimée en années de vie gagnées, ce qui est une notion différente ;

Kleinbaum (1982): Dans l'index, on ne trouve que le terme « efficiency », mais qui se rapporte au design des études. On trouve un chapitre sur la mesure de l'impact potentiel qui traite des fractions préventives (p 164) par rapport à des facteurs de risque, mais sans faire allusion à la situation particulière des études d'efficacité ;

Bouyer (1993): On trouve dans l'index les mots effet et mesure (du risque, d'impact), fraction préventive. Le chapitre relatif à la mesure d'impact traite de la fraction de risque attribuable, et de la fraction préventive, qui est la proportion de cas de maladie évités par la présence du facteur. Mais comme dans le cas précédent, sans référence spécifique à un cadre thérapeutique ou préventif ;

Rumeau-Rouquette (1993): On ne trouve « effet » que pour effet placebo, mais on trouve efficacité. Le terme d'efficacité est utilisé à de nombreuses reprises, dans le sens qui nous intéresse, mais sans qu'il ne soit défini ni calculé. Dans un chapitre sur les enquêtes étiologiques, dans un paragraphe sur la mesure du risque, on retrouve le pourcentage de risque attribuable, mais pas la fraction préventive de risque (vérifier) ;

Lilienfeld (1980): On ne retrouve dans l'index aucun des termes recherchés. Il traite de l'épidémiologie expérimentale pour parler des ECR, et la mesure de l'effet n'apparaît que dans l'annexe, pour un test de signification de comparaison de deux pourcentages ;

Dabis (1992): Il s'agit du seul ouvrage qui consacre un chapitre à la mesure de l'efficacité vaccinale, en mettant l'accent sur l'efficacité en condition réelle (effectiveness).

On peut retenir de cette revue, qui sans être exhaustive comprend la majorité des ouvrages d'accès aisé, que les notions de fraction préventive et de quantification de l'effet sont surtout retrouvées dans les ouvrages d'épidémiologie, très peu dans les ouvrages sur les essais cliniques. La quantification du risque est discutée presque exclusivement pour les études de vaccin, alors qu'elle pourrait l'être pour d'autres domaines. L'efficacité relative n'est discutée que par Schwartz, qui souligne que le modèle sous-jacent est peu plausible (cf. infra).

*Le terme d'effet d'un traitement est fréquemment retrouvé dans les ouvrages, mais il reste peu défini. La notion d'efficacité vaccinale est souvent absente. Lorsqu'elle est présente, c'est souvent pour mentionner une particularité, sous forme d'exemple. C'est dans le domaine de l'efficacité des vaccins que l'effet est quantifié, ailleurs il n'est souvent que qualifié.*

### **1.2.3 Caractéristiques de l'efficacité vaccinale**

La mesure de l'efficacité vaccinale semble ainsi être singulière. L'aspect préventif, donc le fait que l'intervention se situe avant la maladie, est une particularité. Historiquement, des expérimentations comme celle du vaccin contre la variole, puis contre le charbon et surtout contre la rage font partie de l'éducation générale, et sont toujours présentes à l'esprit. L'action du traitement préventif, c'est à dire du vaccin, est expliquée par un mécanisme physiopathologique connu, l'immunité, il y a donc une relation causale avec la prévention de la maladie. Cette dernière, dont l'agent causal est connu, semble ainsi parfaitement définie. Il y a donc simplicité d'interprétation apparente.

**1.2.3.1 Nature** L'efficacité vaccinale est un pourcentage, appartenant à la famille du risque attribuable. Il s'agit du risque attribuable chez les exposés, ou plus précisément du risque évitable. Sa singularité d'utilisation est encore traduite par son absence d'une revue relativement récente sur la proportion de cas attribuables en santé publique (Coste et Spira, 1991).

**1.2.3.2 Signification** L'explication de la signification la plus détaillée est trouvée dans Schwartz *et al.* (cf. supra) dans un chapitre sur l'efficacité comparée de deux traitements (p 245 à 249). La différence d'incidence, mais aussi le rapport des incidences, sont analysés, d'ailleurs encore à partir de l'exemple du vaccin contre la poliomyélite aux USA, où l'efficacité est mentionnée sous le terme de pouvoir protecteur des vaccins.

L'exemple de la poliomyélite est commenté de la façon suivante : Lors de l'essai sur la vaccination anti-poliomyélitique effectué aux USA, le pourcentage de cas de poliomyélite observé a été :

- dans le groupe témoin de  $p_0 = 57$  pour 100 000 ;
- dans le groupe traité :  $p_1 = 16$  pour 100 000.

L'efficacité du vaccin est appréciée par l'indice suivant, traduisant son pouvoir protecteur:

$$P = 1 - (p_1/p_0) \text{ soit } 72\%.$$

Cet indice correspond à un « modèle » logique : dans le groupe traité, au lieu des 57 cas probables (par 100 000 enfants), 16 seulement sont apparus, le vaccin a donc protégé (57-16) cas sur 57, soit  $1 - (16/57)$ .

Pour un enfant vacciné, le fait d'avoir la maladie correspond à deux événements indépendants, donc au produit de leur probabilité:

- avoir la maladie en l'absence de vaccination;
- ne pas être protégé par le vaccin.

Ainsi:

$$p_1 = p_0 (1-P)$$

d'où  $P = 1 - p_1/p_0$ .

Au lieu du rapport, il est possible de faire intervenir la différence. L'indice serait alors, en remplaçant  $p_1$  par  $p_0 (1-P)$ :

$p_0 - p_1 = p_0 - p_0 (1 - P) = p_0 P$ , qui fait intervenir le pouvoir protecteur, mais aussi la fréquence  $p_0$  de la maladie chez les non vaccinés.

Lorsqu'il s'agit de comparer deux traitements entre eux, on cherche à apprécier l'efficacité relative. Le but est d'exprimer la supériorité d'un vaccin A par rapport à un vaccin B. On peut procéder comme pour l'efficacité absolue, et considérer donc un « modèle » où le vaccin A réussirait chaque fois que B réussirait, et en outre pour une partie des cas où B échouerait. On peut alors traduire la supériorité de A par rapport à B par un indice  $P_{AB}$  qui est le pourcentage d'échecs de B « récupérés » par A. Par un calcul analogue, on obtient  $P_{AB} = 1 - p_A/p_B$ . Mais le modèle sur lequel est basé ce calcul est moins plausible. Il est en effet difficile d'admettre que le vaccin A réussit chaque fois que B réussit, et en outre pour un certain nombre de sujets supplémentaires.

Il n'y a pas eu à notre connaissance d'étude des conséquences pratiques d'un écart au modèle pour l'efficacité relative. Dans le cas de l'efficacité absolue, c'est à dire lorsque le groupe vacciné est comparé à un groupe non vacciné, la baisse de la probabilité de contracter la maladie pour un enfant vacciné peut résulter de deux mécanismes différents :

- modèle 1 : chaque enfant vacciné a une probabilité plus faible de contracter la maladie (modèle 1) ;

ou :

- modèle 2 : certains enfants vaccinés sont complètement protégés, ce sont des répondeurs, ils ont une probabilité nulle de faire la maladie, et les autres enfants vaccinés ne sont pas protégés du tout, ce sont des non-répondeurs. Le pouvoir protecteur du vaccin dépend alors de la proportion d'enfants répondeurs.

Il n'y a pas de possibilité de savoir lequel de ces deux modèles peut s'appliquer à un vaccin particulier, et il peut y avoir des modèles intermédiaires entre ces deux modèles. Il a été souligné que, sous l'hypothèse du modèle 1, le pouvoir protecteur du vaccin doit diminuer avec le temps d'observation si l'incidence dans chaque groupe est calculée en utilisant comme dénominateur le nombre de sujets présents en début d'étude, alors que ce paramètre restera constant si le dénominateur utilise des personnes années à risque. De façon opposée, dans le deuxième modèle, l'efficacité restera constante au cours du temps selon le premier mode de calcul, et augmentera selon le deuxième mode de calcul (Smith *et al.*, 1984).

La prise en compte de ces aspects dans l'estimation ou l'interprétation de l'efficacité vaccinale continue de faire l'objet de nombreux travaux (Greenland et Frerichs, 1988 ; Ira *et al.*, 1996), qui en soulignent l'importance, mais dont l'application pratique reste difficile du fait de l'absence de données réelles sur le mode d'action des vaccins et/ou sur l'hétérogénéité des réponses des individus vaccinés.

Malgré la précision des définitions des différents termes utilisés pour la mesure de l'effet d'un traitement, ici d'un vaccin, l'usage d'une part, mais surtout la complexité des effets rendent la terminologie difficile. Nous avons résumé ces aspects dans le tableau II, qui juxtapose définitions et usages, avec leurs équivalents anglais. Il serait probablement plus fonctionnel en français de ne pas garder le terme d'utilité, d'ailleurs peu utilisé, d'utiliser le terme d'efficacité dans un sens similaire à celui de l'anglais, c'est à dire à l'effet dans les conditions optimales des essais cliniques randomisés, et d'introduire un terme correspondant à "*effectiveness*",

**Tableau II. Différents termes utilisés pour la mesure de l'effet, usage dans le domaine des vaccins, et proposition de terminologie générale**

Définitions		Usage dans le domaine des vaccins			Nouvelle terminologie proposée
Terme	Equivalent anglais	Terme	Equivalent anglais	Type d'étude	
Utilité	Efficacy	Efficacité vaccinale, Pouvoir protecteur	Vaccine efficacy	ECR	Efficacité
Efficacité	Effectiveness	Efficacité vaccinale de terrain	Vaccine effectiveness	Etude de cohortes Etudes cas-témoins	Effectivité
Effcience	Efficiency	Effcience des vaccinations	Vaccination efficiency	Etude coût / efficacité	Effcience

remplaçant l'ancien sens d'efficacité. Ce terme pourrait être le néologisme *effectivité*, substantif de l'adjectif *effectif*, qui a bien le sens recherché de concret, réel, tangible. C'est le "*caractère de ce qui est effectif*" (Dictionnaire encyclopédique Larousse, 1991).

Cette distinction, séparant l'aspect de l'effet optimal par rapport à l'effet en conditions de routine, offrirait un cadre pour mieux souligner les autres aspects de la complexité de l'effet d'un vaccin, qui ont été revus récemment (Halloran *et al.*, 1997). Cette revue propose un cadre et une terminologie pour individualiser les différents effets des vaccins. On distingue les effets directs sur les individus, qu'ils soient biologiques (diminution de leur susceptibilité à la maladie lors d'une exposition, diminution de la gravité de la maladie, diminution de la contagiosité s'ils ont été malades ou infectés), ou comportementaux (un sujet se sachant vacciné peut modifier (augmenter) son risque d'exposition, par exemple en abandonnant des mesures prophylactiques). Les effets observés au niveau de la population sont en général appelés les effets indirects, mais il a été proposé que la distinction soit faite entre les effets indirects, les effets totaux, et les effets globaux (Halloran *et al.*, 1997). Les effets indirects sont les effets chez les non vaccinés de la vaccination au niveau d'une population. L'effet total est la combinaison chez les vaccinés des effets directs et des effets au niveau de la population. L'effet global d'un programme de vaccination est une moyenne pondérée entre l'effet indirect sur les sujets non vaccinés et l'effet total chez les sujets vaccinés.

Dans notre étude, nous nous focaliserons sur l'analyse des résultats d'efficacité vaccinale estimés dans le cadre d'essais cliniques randomisés, et sans détailler les différents types d'effets décrits ci-dessus, nous les garderons présents à l'esprit pour leur importance sur la nature pragmatique de l'estimation obtenue.

**1.2.3.3 Facteurs de variation** Même lorsque une étude de l'effet d'un vaccin est réalisée dans le cadre précis d'un essai clinique randomisé, l'estimation de l'effet dépend des qualités du

critère de jugement. Ces qualités (exactitude, précision, reproductibilité, coût, sensibilité et spécificité) sont communes à tous les essais (Papoz, 1996). Nous insisterons seulement sur un aspect qui nous a semblé particulièrement important dans notre expérience d'étude des vaccins contre la coqueluche, et pour lequel nous avons effectué une analyse plus précise. Il s'agit de l'influence des erreurs de classification (Rothman, 1986). Ces erreurs de classification sont inhérentes à la réalisation des études. Elles peuvent se situer au niveau du traitement ou au niveau du critère de jugement.

**Erreurs sur l'exposition** : Dans un essai clinique randomisé, l'erreur de classification au niveau de l'exposition, c'est à dire du groupe de traitement, est souvent minimisée. On sait à quel groupe vaccinal appartient un enfant. Mais au cours de l'étude, il peut y avoir des erreurs d'attribution de traitement. Il est souvent recommandé de réaliser une analyse en intention de traiter (Meinert, 1986). Si la comparabilité des groupes assurée par la randomisation est alors respectée, ce type d'analyse introduit une erreur de classification sur le traitement, qui a tendance à minimiser l'effet mesuré du traitement. Ceci a été analysé et traduit par la notion de dilution de l'effet . Dans le cas des vaccins, il est admis que la meilleure estimation de l'effet du vaccin serait celle issue de la comparaison à partir des traitements effectivement reçus (MacMahon et Pugh, 1970). Lorsqu'il s'agit d'essai d'équivalence, c'est à dire pour les vaccins lorsque l'on s'intéresse à l'efficacité relative, il a été souligné que l'analyse en intention de traiter était peu sûre, car elle favorisait la conclusion vers l'équivalence (Lewis *et al.*, 1995).

**Erreurs sur le critère de jugement** : Les erreurs de classification au niveau du critère de jugement sont plus difficiles à évaluer, car leur nombre est inconnu. Dans le domaine des vaccins, le critère de jugement est la définition des cas de la maladie à prévenir. De façon paradoxale, la connaissance de l'étiologie de la maladie ne facilite pas toujours son diagnostic.



Il a été souligné que la sensibilité et surtout la spécificité de la définition des cas avaient une importance sur l'estimation de l'efficacité vaccinale (Radakrishna *et al.*, 1984). L'effet d'un défaut de spécificité est détaillé dans le tableau III. On voit que pour une sensibilité estimée de 100%, une diminution même minime de la spécificité va avoir un impact considérable sur l'efficacité vaccinale mesurée, et ce d'autant plus que l'incidence de la maladie est plus faible. Pour la coqueluche, cet aspect a été bien décrit (Fine *et al.*, 1987), et peut rendre compte des différences d'efficacité observées pour différentes définitions des cas. Cet aspect sera développé dans le chapitre des études menées au Sénégal, et fait l'objet d'analyses complémentaires.

**Efficacité relative.** L'interprétation de l'efficacité relative repose sur un modèle qui était peu vraisemblable (cf. supra). De plus, l'interprétation de l'efficacité relative, souvent exprimée seulement par le rapport des incidences (ou densités d'incidence) entre deux groupes vaccinés par des vaccins différents, nécessite que l'efficacité absolue soit prise en compte.

En effet, (tableau IV), un risque relatif de 2 pour la comparaison d'un vaccin nouveau (VN) à un vaccin de référence (VR) peut être obtenu dans des situations aussi différentes que :

- VN a une efficacité absolue de 96% et VR une efficacité absolue de 98%, ce qui correspond à des différences négligeables ;
- VN a une efficacité de 60% et VR une efficacité de 80% ;
- ou plus encore une efficacité de 20% pour VN et de 60% pour VR.

Ces trois situations pour lesquelles l'efficacité relative est identique correspondent à des protections totalement différentes. Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'une estimation de l'efficacité absolue pour interpréter les données.

**Tableau III. Estimation attendue de l'efficacité protectrice issue d'essais de terrain où l'efficacité réelle du vaccin est de 90%, pour différents niveaux de sensibilité et de spécificité du test diagnostic.**

Incidence maladie* (pour 1000)	Sensibilité (%)	Estimation attendue de l'efficacité protectrice du vaccin pour les niveaux de spécificité suivants (%)						
		100	99	98	96	94	92	90
1	100	90	8	4	2	1	1	<1
	90	90	7	4	2	1	<1	<1
	80	90	7	3	2	1	<1	<1
5	100	90	30	18	10	7	5	4
	90	90	28	16	9	6	4	3
	80	90	25	15	8	5	4	3
10	100	90	45	30	17	12	9	7
	90	90	42	28	16	11	8	7
	80	90	40	25	14	10	7	6
20	100	90	60	45	29	21	17	14
	90	90	58	42	27	20	15	12
	80	90	55	39	25	18	14	11
50	100	90	75	64	49	40	33	28
	90	90	73	62	47	37	30	26
	80	90	72	59	34	34	28	23

\* chez les sujets non vaccinés

(Radakrishna et al, 1984)

**Tableau IV. Evolution des différences d'efficacité absolue de deux vaccins selon leur niveau d'efficacité absolue pour une même efficacité relative de 2. Population théorique de 100 sujets par groupe, taux d'attaque chez les non vaccinés de 100%.**

Non vaccinés	Nouveau vaccin	Vaccin de référence		RR.	
n = 100 nb. malades	n = 100 nb. malades	EVa	n = 100 nb. malades	EVa	
100	4	96	2	98	2
100	10	90	5	95	2
100	20	80	10	90	2
100	30	70	15	85	2
100	40	60	20	80	2
100	50	50	25	75	2
100	60	40	30	70	2
100	70	30	35	65	2
100	80	20	40	60	2
100	90	10	45	55	2

*L'évaluation des vaccins a accompagné l'évolution des techniques d'évaluation, vers le standard des essais cliniques randomisés. Mais la mesure de l'effet d'une intervention est complexe. L'objectif peut être double, à visée explicative en support aux interprétations physiopathologiques ou à visée pragmatique pour l'utilité en santé publique. Aussi, de multiples facteurs de variation existent, qui compliquent l'interprétation des résultats.*

## **Deuxième partie**

# **Evaluation épidémiologique des vaccins contre la coqueluche au Sénégal**

## Introduction

Cette deuxième partie présentera les principaux résultats des études menées sur la coqueluche au Sénégal, dans la zone d'étude de Niakhar, de 1989 à 1996. Le choix a porté sur cinq analyses qui portent sur les résultats principaux et qui contribuent à leur interprétation. Elles correspondent aussi aux analyses les plus achevées, ayant fait l'objet de publications (ou étant soumises). D'autres aspects ont été abordés sur l'ensemble des données recueillies dans le cadre de ce projet, et ne seront pas détaillées. Brièvement, les caractéristiques génétiques des souches de *Bordetella pertussis* isolées au cours des années d'étude au Sénégal ont été comparées aux souches vaccinales, et sont très proches des souches françaises et d'une des souches du vaccin (Guiso *et al.*, 1997b). Une étude complémentaire a montré l'absence d'effet adjuvant du BCG sur l'immunogénicité du vaccin acellulaire, et la meilleure immunogénicité du calendrier espacé à 2,4,6 mois par rapport au calendrier à 2,3,4 mois et proche de celui recommandé et effectué dans le cadre du Programme Elargi de Vaccination de l'OMS (OMS-PEV). Au cours de la même étude, l'effet dépresseur de l'infection par le *Plasmodium falciparum* sur la réponse à ce vaccin acellulaire a été montré (Simondon *et al.*, en préparation). Une étude multicentrique d'immunogénicité a permis d'établir que la réponse observée au Sénégal après vaccination par le vaccin acellulaire était équivalente à celle observée chez des enfants au Chili et en Turquie, et plus élevée que la réponse observée en France, Suède, Belgique et USA. La raison n'en est pas connue. Les associations vaccinales et les interactions avec des vaccins comme celui contre l'hépatite B, contre les infections par *Haemophilus influenzae*, et la poliomyélite inactivée sont aussi analysées dans cette étude (Simondon *et al.*, en préparation). Ces études, au Sénégal, se sont déroulées dans le cadre d'un programme de l'ORSTOM établi depuis le début des années 60 dans la région du Sine Saloum, dont le but était de développer les connaissances démographiques sur des populations

rurales africaines, en l'absence d'état civil. Ce programme a rapidement considéré les aspects relatifs à la santé (Cantrelle, 1969), et en particulier la rougeole. En 1983, le dispositif a été modifié pour concentrer les efforts sur une seule zone, la zone d'étude de Niakhar, qui a été agrandie, passant de 6 à 30 villages (Garenne et Cantrelle, 1991). A cette date, le programme intitulé « Population et Santé » a instauré, parallèlement à la surveillance démographique annuelle, une surveillance de certaines maladies, et des vaccinations, sur le même rythme. En particulier, deux maladies, la rougeole et la coqueluche, facilement caractérisées et connues des populations, d'importance majeure dans la mortalité infantile et pour leurs répercussions sur l'état nutritionnel des enfants, et pour lesquelles des vaccins existaient, ont été systématiquement surveillées lors des recensements annuels. La connaissance accumulée pendant plusieurs années a incité à choisir cette zone en 1987 pour poursuivre des études sur les vaccinations contre la rougeole menées dans des pays limitrophes, en Gambie (Whittle *et al.*, 1988) et en Guinée Bissau (Aaby *et al.*, 1988). L'objectif était d'étudier la possibilité d'une vaccination plus précoce des enfants, en passant de l'âge de 9 mois à l'âge de 5 mois. Du fait de l'action négative des anticorps maternels sur l'efficacité des vaccins vivants standards, des vaccins plus titrés, dits à haut titres, ont été utilisés. Pour les besoins de cette étude, la surveillance tant démographique qu'épidémiologique est passée à un rythme hebdomadaire, et les vaccinations des enfants de la zone d'étude ont été prises en charge par le projet. Une première partie de l'étude s'est déroulée de 1987 à 1989, avec le soutien financier de la Task Force for Child Survival, puis un suivi à long terme (1990 - 1995) a bénéficié d'un financement OMS-PEV. Dès la conception de l'étude sur les vaccins à haut titre contre la rougeole, il avait été envisagé d'introduire un vaccin acellulaire contre la coqueluche. En effet, à cette date (1986, 1987), les premiers vaccins acellulaires japonais étaient déjà utilisés en routine au Japon, et étudiés en Suède. Les vaccins à germes entiers

contre la coqueluche étaient rejetés en Suède et en Angleterre, pour des raisons d'effets secondaires graves, alliés à une faible protection. Spécifiquement pour l'Afrique, et dans le cadre de l'amélioration des vaccins du PEV, l'amélioration du vaccin contre la fièvre jaune permettant de vacciner dès l'âge de 6 mois, les perspectives de vaccination avec les vaccins à haut titre contre la rougeole permettaient d'envisager de compléter le calendrier vaccinal dès l'âge de 6 mois, et allaient dans le sens de l'initiative vers un vaccin unique de l'OMS. L'amélioration du vaccin contre la coqueluche, visant à améliorer la tolérance et à ne garder que le minimum d'antigènes nécessaires à la protection, s'inscrivait dans cette logique (Mortimer, 1990). La tolérance des vaccins est en effet une condition essentielle pour parvenir à une bonne couverture vaccinale, y compris contre les autres maladies. La simplification de la composition visait aussi à faciliter la combinaison des vaccins, donc à faciliter l'intégration d'autres vaccins comme ceux contre la poliomyélite, contre l'hépatite B, ou contre les infections par *Haemophilus influenza* type B. Il s'avérera par la suite que la combinaison avec les vaccins acellulaires n'est pas simple (Granoff et Rappuoli, 1997).

La structuration de l'étude vaccinale sur les vaccins à haut titre contre la rougeole, surveillance démographique et base de données, réalisation des vaccinations, surveillance active des maladies, relations avec la population, équipement, ainsi que l'accumulation de connaissances sur la coqueluche, ont fourni le cadre du développement des études vaccinales pour cette maladie au Sénégal. Ces études ont bénéficié du soutien financier de l'ORSTOM et de l'Institut Mérieux, qui deviendra successivement au cours de la période considérée Pasteur Mérieux sérums et vaccins, puis Pasteur Mérieux Connaught, mais que nous désignerons par Pasteur Mérieux.



## **2.1: Etude de l'immunogénicité et de l'innocuité d'un vaccin acellulaire et du vaccin à germes entiers utilisé dans le cadre du PEV.**

**Article correspondant:** Simondon F., Yam A., Gagnepain J.Y., Wassilak S., Danve B., Cadoz M. Comparative study of the safety and immunogenicity of a DT-acellular pertussis and a DT-whole-cell pertussis vaccine in Senegalese infants. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; **15**:927-932.

**Introduction.** Avant le démarrage de l'étude d'efficacité vaccinale proprement dite, une étude d'immunogénicité et d'innocuité des deux vaccins devant être inclus dans l'étude a été réalisée d'octobre 1989 à février 1990. Le vaccin à germes entiers (DTwC) de référence a été le vaccin Pasteur Mérieux, largement utilisé en Afrique par le PEV, et aussi en France. Malgré sa large utilisation depuis de nombreuses années, et peut être du fait que ce vaccin avait contribué de façon majeure au contrôle de la coqueluche en France, avec une bonne acceptation, ses caractéristiques d'immunogénicité et de tolérance étaient peu connues. Son contrôle était surtout effectué lors de la production sur la base du test de Kendrick, et de tests de toxicité par le producteur et le laboratoire nationale de la santé à Montpellier (Huet, communication personnelle 1997).

En Afrique, les seules indications de protection disponibles (Muller et Leeuwenburg, 1985) étaient celles issues des études réalisées au Nigeria (Morley *et al.*, 1966) et au Kenya (Muller *et al.*, 1984). Le travail au Nigeria montre l'évolution spectaculaire de la courbe épidémique avec l'introduction de la vaccination, mais la population suivie était petite (environ 500 enfants), et le recul après vaccination n'était que de 4 ans, ne permettant pas d'exclure le retour de la coqueluche à l'occasion d'un cycle. L'étude kenyane portait sur un vaccin produit par l'Institut National de la Santé des Pays Bas. Il s'agissait d'une étude d'observation passive, sans diagnostic biologique, et sans que le statut vaccinal des populations contrôle ne

soit connu. Un effet protecteur avait cependant été mis en évidence. Les données d'immunogénicité dans ce contexte manquaient aussi.

Le nouveau vaccin, un vaccin acellulaire (DTaC) contenant seulement de la PT et de la FHA, produit par Pasteur Mérieux, était paradoxalement mieux connu à la fois pour l'immunogénicité et la tolérance. Des études en France et aux USA avaient permis d'établir le dosage optimal en antigène pour une immunogénicité satisfaisante et une bonne tolérance. Il convenait cependant de vérifier ces informations dans le contexte du milieu africain, très différent du point de vue humain et environnemental. Une seule étude d'un vaccin acellulaire avait été effectuée en Afrique, au Ghana (Biritwum *et al.*, 1984) et avait montré une immunogénicité satisfaisante.

Dans notre étude, le calendrier vaccinal était particulier, comme expliqué ci-dessus, puisque la troisième dose de la série des vaccins DTaC (DTwC) respectivement, et IPV était donnée simultanément avec un vaccin à haut titre contre la rougeole et le vaccin contre la fièvre jaune. Des résultats spécifiques d'immunogénicité étaient donc nécessaires.

**Résultats.** Les deux vaccins ont été bien tolérés, le vaccin acellulaire provoquant moins de réactions locales ou générales modérées. L'immunogénicité des deux vaccins a été bonne. Le vaccin acellulaire induisait une réponse comparable à celle observée aux USA, et la plus forte réponse à la PT du DTwC indiquait qu'il semblait plus immunogénique que les vaccins à germes entiers utilisés aux USA. Tous les enfants ont eu des taux d'anticorps considérés comme protecteurs contre le tétanos, la diphtérie, la poliomyélite, même si l'effet adjuvant du DTwC pour la réponse au vaccin contre le tétanos et la diphtérie n'a pas été retrouvé avec le DTaC.

**Discussion.** Les résultats d'immunogénicité et de tolérance satisfaisants ont autorisé le démarrage de l'étude principale. L'étude a aussi permis de roder l'organisation des séances de vaccination, de modifier la technique pratique de randomisation, pour préférer un système d'enveloppes à un système de liste. Les programmes informatiques de gestion des convocations aux séances de vaccination et de l'ensemble de l'information ont été affinés. Un autre aspect a été de développer l'information de la population, vers une amélioration constante qui évoluera d'ailleurs aussi au cours de l'étude principale (cf. infra). La participation volontaire à l'étude, objectivée en particulier par la liberté d'acceptation par la mère du prélèvement sanguin pour l'enfant, non dissocié auparavant de la vaccination, a eu un retentissement initial négatif sur le nombre de prélèvements sanguins obtenus, ce qui s'est traduit par les faibles effectifs disponibles pour les analyses sérologiques par rapport aux prévisions - sans empêcher de conclure.

## Comparative Safety and Immunogenicity of an Acellular versus Whole-Cell Pertussis Component of Diphtheria-Tetanus-Pertussis Vaccines in Senegalese Infants

F. Simondon<sup>1,2\*</sup>, A. Yam<sup>1</sup>, J.Y. Gagnepain<sup>1</sup>, S. Wassilak<sup>3</sup>, B. Danve<sup>4</sup>, M. Cadoz<sup>4</sup>

A diphtheria and tetanus toxoid two-component acellular pertussis vaccine (DTaP), consisting of 25 µg glutaraldehyde-detoxified pertussis toxin (PT) and 25 µg native filamentous hemagglutinin (FHA), was compared with diphtheria and tetanus toxoid whole-cell pertussis vaccine (DTwP) in a randomized, double-blind manner in 286 Senegalese infants inoculated at two, four, and six months of age. In infants receiving DTaP a significantly lower rate of local reactions, crying and fever was observed than in infants receiving DTwP. One month after the third dose, the geometric mean titres for FHA antibodies were higher in the DTaP group, whereas increases in PT antibody titres were higher in the DTwP group. More than 90% of the infants had a fourfold or more increase in antibodies to both PT and FHA with either vaccine. Diphtheria, tetanus, and polio antibody responses were also measured and found to be comparable between the two groups. The results of this pilot study support the implementation of a field trial to compare the protective efficacy of these vaccines against pertussis in the same setting.

The development of highly purified acellular pertussis vaccines has been driven by concern over adverse reactions associated with conventional vaccines and the need for long-term protection. Revaccination of older children and young adults is now being seriously considered but is only acceptable if better-tolerated vaccines are available. The efficacy of the acellular pertussis vaccines demonstrated in recent trials conducted in Europe favours their widespread use (1-4).

The same concerns are shared in developing countries (5, 6) considering the adoption of acellular pertussis vaccines. These considerations and

suggestions that the immune response in African children may differ from that in Caucasian children (7), emphasize the need to compare acellular and whole-cell vaccines in the specific setting of developing countries.

The objectives of this study were to assess in Senegalese children the safety of a diphtheria-tetanus acellular pertussis vaccine (DTaP) compared with a diphtheria-tetanus whole-cell pertussis vaccine (DTwP), to study the immunogenicity of each component of the DTP vaccine, and to study the immunogenicity of the enhanced-potency inactivated polio vaccine routinely used in this region of Africa. This study preceded implementation of a field trial to compare the protective efficacy of these vaccines against pertussis in the same setting.

### Materials and Methods

*DT Acellular Pertussis Vaccine (DTaP).* DTaP (Lot S2112, Pasteur Mérieux, France) consisted of 25 µg of glutaralde-

<sup>1</sup>Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Dakar, Senegal.

<sup>2</sup>Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier, France.

<sup>3</sup>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

<sup>4</sup>Pasteur-Mérieux Sérums et Vaccins, Lyon, France.

**Table 1:** Number of infants who were recruited for the trial and who were analysed for safety and immunogenicity.

	Dose 1				Dose 2				Dose 3			
	n	Percent female	Mean age (months)	Mean weight (kg)	n	Percent female	Mean age (months)	Mean weight (kg)	n	Percent female	Mean age (months)	Mean weight (kg)
Randomisation												
DTwP	145	52	3.1	5.4	123	53	5.1	6.4	107	51	7.1	6.9
DTaP	141	51	3.1	5.4	122	53	5.1	6.4	109	51	7.2	7.0
Safety analysis												
DTwP	118	55	3.0	5.5	87	53	5.0	6.5	80	55	7.0	7.1
DTaP	123	51	3.0	5.5	96	50	5.0	6.5	87	50	7.0	7.0
Immunogenicity analysis												
Pertussis toxin												
DTwP	39	56	2.9	5.4	39	56	4.8	6.4	39	56	6.9	7.0
DTaP	57	47	3.0	5.5	57	47	4.9	6.4	57	47	6.9	7.1
Filamentous haemagglutinin												
DTwP	28	54	2.9	5.6	28	54	4.8	6.5	28	54	6.9	7.1
DTaP	40	40	3.0	5.5	40	40	4.9	6.4	40	40	6.9	7.1

hyde-detoxified pertussis toxin (PT), 25 µg of native filamentous hemagglutinin (FHA), at least 30 IU of purified diphtheria toxoid, and 40 IU of purified tetanus toxoid per 0.5 ml dose adsorbed on aluminium hydroxide (aluminium content 0.29 to 0.61 mg per 0.5 ml dose).

**DT Whole-Cell Pertussis Vaccine (DTwP).** Conventional pertussis vaccine from a single lot (Pasteur Mérieux) contained at least 4 IU of heat-inactivated pertussis vaccine, in accordance with WHO and European Pharmacopeia requirements, at least 30 IU of purified diphtheria toxoid, and 60 IU of purified tetanus toxoid per 0.5 ml dose mixed in the presence of aluminium hydroxide (aluminium content 0.54 to 0.65 mg per 0.5 ml dose).

**Polio Vaccine.** The enhanced-potency inactivated polio vaccine (IPV) was produced by Pasteur Mérieux. Each 0.5 ml dose ready-to-use syringe contained 40, 8, and 32 antigen units of polio types 1, 2, and 3, respectively.

**Study Population.** The study was conducted in Niakhar, Senegal, a rural farming area 150 km from Dakar. The population of approximately 27,000 has been followed up since 1983 in demographic and health studies (8, 9).

**Vaccinations.** Vaccines were administered in monthly sessions organized at vaccination clinics. Eligible infants were summoned to the vaccination session, and those whose parents agreed were vaccinated. The infants received three injections of vaccine at 2 to 3, 4 to 5, and 6 to 7 months of age following this schedule: BCG, DTP1, and IPV1 (2–3 months); DTP2 and IPV2 (4–5 months); DTP3, IPV3, measles, and yellow fever (6–7 months). DTaP and DTwP were randomly assigned in a double-blind manner according to a computerized list by blocks of ten. Vaccines were injected intramuscularly, DTP in the right thigh and IPV in the left thigh.

**Reaction Assessment.** To assess local and systemic reactions, infants were visited at home by a physician within 48 to 72 hours of vaccination. Clinical examination was performed by one of three physicians after training, and data were recorded on a standardized form. The body temperature was measured, and the injection site examined for redness, induration or ten-

derness. A general clinical examination was performed, and the mother was questioned about signs of a moderate reaction, (such as anorexia, vomiting, restlessness, sleepiness, irritability or crying), or signs of a severe reaction, (such as persistent or high-pitched crying, seizure or hypotonia). Induration and redness was recorded only if 3 cm or more in diameter. All deaths were reported and assessed as part of the demographic registration system by the verbal autopsy method in which field workers interviewed parents in order to complete certificates; the likely cause of death was independently assessed retrospectively by two physicians.

**Serological Assays.** Serum samples were obtained by finger-prick before the first and third vaccinations and one month after the third vaccination. Micro-containers with serum separators were centrifuged at the field station and the serum stored at -20°C. All subsequent assays were performed at Pasteur Mérieux in France. Antibodies to PT were measured in duplicate by the Chinese hamster ovary (CHO) cell toxin-neutralization method (10, 11). Results were expressed as the reciprocal of the endpoint dilution, the lower limit of detection being set at a 1:2 dilution. IgG antibodies to FHA were measured in triplicate in an enzyme immunoassay (EIA) (12). Results were expressed in EIA units per milliliter by comparison with an internal reference serum. Tetanus and diphtheria antibody titres were determined by radioimmunoassay and expressed as international units per milliliter (IU/ml). Polio type I and III antibody titres were determined by a seroneutralisation test. For all antigens, seroconversion was defined as a fourfold increase above the pre-vaccination level. For diphtheria and tetanus, serum levels of  $\geq 0.05$  IU/ml were considered to indicate protection. For polio types I and III, neutralizing antibody titres at a dilution of  $\geq 1:5$  were considered to indicate protection.

**Statistical Analysis.** Differences in reaction rates between the groups were tested by the two-tailed chi-square and two-tailed Fisher exact tests, when indicated. The chi-square test for trend was used to test for a trend in adverse reactions in the sequence of doses. Serological data calculations were performed on logarithmically transformed data, reporting the antilogarithm. Within groups, comparisons were made by the

**Table 2:** Local and systemic reactions following immunization with acellular (DTaP) or whole-cell (DTwP) pertussis vaccine.

Reaction	Percent of children with stated reaction								
	Dose 1			Dose 2			Dose 3		
	DTaP (n = 123)	DTwP (n = 118)	p	DTaP (n = 96)	DTwP (n = 87)	p	DTaP (n = 87)	DTwP (n = 80)	p
<b>Local</b>									
Redness	1	3	ns	0	3	ns	1	4	ns
Induration	3	15	<0.01	6	24	< 0.001	13	32	< 0.001
Tenderness	5	11	ns	3	8	ns	9	21	<0.01
<b>Systemic</b>									
Anorexia	1	5	ns	5	6	ns	5	4	ns
Vomiting	7	11	ns	12	10	ns	12	11	ns
Restlessness	10	17	ns	7	8	ns	4	6	ns
Irritability	18	24	ns	11	18	ns	9	12	ns
Sleepiness	11	16	ns	6	11	ns	8	7	ns
Crying	22	53	< 0.001	17	31	<0.01	17	27	<0.05
Unusual cry	3	3	ns	2	1	ns	2	2	ns
Fever > 38°	0	2	ns	0	2	ns	0	6	<0.01

ns, not significant

paired t-test. Inter-group comparisons were subjected to analysis of variance or the Kruskal-Wallis test, when indicated.

## Results

**Sample Size.** A total of 291 infants were recruited into the study. Five of these children received the wrong vaccine at least once during the three-dose series and were excluded from the further analysis. Of the 286 infants who received the first dose and were retained for analysis (Table 1), 245 received the second dose and 216 received all three doses of the study vaccines. The vaccine groups were compared for factors such as age, gender, weight, height and village of origin, with no differences being found. A similar analysis was performed for the evaluation of safety for which more than 75% of the children were seen after

each dose. Comparisons also revealed no differences between the groups in the immunogenicity results, in which only a sub-sample of the children were analysed because either parents refused to allow a blood sample to be collected or an insufficient blood volume was collected.

**Clinical Reactions.** As shown in Table 2, the frequency of observed adverse reactions for each dose in the DTaP group was generally equal to or lower than that in the DTwP group. Differences were significant for induration and crying after each dose, and for local tenderness and fever only after the third dose. A significant positive trend was observed for local reactions in the DTaP group for induration only ( $p < 0.001$ ), and in the DTwP group for induration ( $p < 0.001$ ), tenderness ( $p < 0.01$ ) and fever ( $p < 0.05$ ). No severe reactions were detected at the physicians' visits. Six deaths occurred within two months after injection, four

**Table 3:** Geometric mean antibody titres after acellular and whole-cell pertussis vaccine.

	CHO cell toxin neutralization <sup>a</sup>	Antibody to FHA <sup>b</sup>
<b>Acellular vaccine</b>		
prevaccine	n = 57	n = 40
post-dose 2	5.1	0.45
post-dose 3	15.8 <sup>c</sup>	12.0 <sup>e</sup>
	46.7	38.0 <sup>d</sup>
<b>Whole-cell vaccine</b>		
prevaccine	n = 39	n = 28
post-dose 2	4.9	0.61
post-dose 3	9.9	1.95
	88.1 <sup>e</sup>	22.10

<sup>a</sup>Expressed in reciprocal dilutions.

<sup>b</sup>Expressed in EIA units per milliliter.

<sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>d</sup> $p < 0.01$ , <sup>e</sup> $p < 0.001$  compared with the other vaccine group for the same number of doses.

**Table 4:** Geometric mean antibody titres (expressed as international units per milliliter) after diphtheria, tetanus, polio type I and III vaccine related to the type of pertussis vaccine co-administered.

	Diphtheria		Tetanus		Polio Type I		Polio Type III	
	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT
<b>Acellular vaccine</b>								
Prevaccine	10	0.045	12	0.028	42	6.47	15	1.6 <sup>b</sup>
Post-dose 2	10	0.184	13	0.699 <sup>a</sup>	56	278.6	25	500.0
Post-dose 3	7	0.303	9	1.23	57	739.6	20	1503.1 <sup>b</sup>
<b>Whole-cell vaccine</b>								
Prevaccine	9	0.021	11	0.033	39	5.32	15	5.26
Post-dose 2	11	0.282	12	2.39	41	205.6	29	283.1
Post-dose 3	7	0.296	6	2.48 <sup>a</sup>	51	657.6	21	912.0

<sup>a</sup>p < 0.01<sup>b</sup>p < 0.05

in the DTwP group and two in the DTaP group. According to the verbal autopsy the causes of death were as follows (with vaccine and dose number): unknown (10 days after DTwP1), malaria and pneumonia (14 days after DTwP2), diarrhea (41 days after DTwP3), diarrhea associated with protein energy malnutrition (57 days after DTwP3), meningitis (58 days after DTaP1), and diarrhea (10 days after DTaP2).

**Immune Response.** Pre-vaccine titres for FHA and PT were similar in the two groups. The DTaP vaccine was associated with significantly higher antibody titres to FHA after dose 2 and dose 3, and to PT after dose 2. In contrast, the mean PT-neutralizing antibody titre after dose 3 was significantly higher in the DTwP group (Table 3). With both vaccines, there was a significant increase in both FHA and PT antibody titres after dose 3 compared with dose 2. Seroconversion rates were almost identical in the two vaccine groups: 95% and 93% for PT in the DTaP and DTwP groups, respectively, and 95% and 93% for FHA.

Antibody titres for diphtheria, tetanus and polio types I and III are shown in Table 4. Diphtheria antibody titres were similar in the two vaccine groups. Protective levels were obtained in all subjects in both groups. Although the tetanus antibody titres were comparable before vaccination, rises in titres were significantly higher in the DTwP group; however, seroprotection rates against tetanus were 100% in both groups. Antibody titres for polio virus types I and III were similar in the two vaccine groups but titres for polio virus type III were significantly lower before vaccination in DTaP recipients than in DTwP recipients and higher after dose 3. Nevertheless, seroprotection rates were 100% in both groups after

two doses. The seroconversion rates in infants who had pre-vaccination titres below the seroprotective level were 100% in both groups after two doses.

## Discussion

The present study was performed in a different setting from two other immunogenicity and safety studies which used slightly different immunization regimens to compare the same acellular pertussis vaccine to other whole-cell pertussis vaccines (13, B. Auerbach et al.: Congress of the Society for Pediatric Research, Washington D.C., 1989, abstract). The results confirm the decreased reactogenicity of the acellular vaccine compared to the whole-cell vaccine. In the present study, an increased rate of crying and local induration was observed significantly more frequently after each dose in recipients of DTwP than of DTaP vaccine.

Six deaths occurred within two months of vaccination, four in the DTwP group and two in the DTaP group. As in most parts of sub-saharan Africa, there is very high infant mortality in the study area, and the number and causes of death are thus not unexpected. The verbal autopsy method of assessing the cause of death, developed for large population studies, lacks precision in determining the cause of individual deaths. No serious events associated with DTwP vaccination were observed. Studies with this new generation of vaccines in a larger population are needed to monitor for adverse effects that are less frequent or more severe.

All children had protective levels of antibody against diphtheria, tetanus and polio virus. Diphtheria and polio (types I and III) antibody titres

in the DTaP group were similar to or higher than those observed in the DTwP group, suggesting that the acellular pertussis vaccine does not interfere with the other antigens. Although the tetanus antibody titres were lower in the DTaP group than in the DTwP group, the response of every child was well above the protective level. An adjuvant effect of whole-cell pertussis vaccine on the tetanus and diphtheria response has been suggested but could be lacking with the acellular vaccine (14, 15).

Both vaccines produced a vigorous antibody response to PT and FHA. After the third dose, the acellular vaccine induced higher FHA antibody titres than the whole-cell vaccine, whereas the latter induced higher PT antibody titres. The same batch of acellular pertussis vaccine (lot S2112) was used in a large multicenter study comparing 13 acellular pertussis vaccines and two US whole-cell vaccines, allowing comparison of results between the two studies (16–18). The assays used in the two studies were slightly different and the values obtained are therefore not directly comparable. Nonetheless, the PT-neutralization test results were very similar: prevaccination and post-third dose geometric mean titres were 5.1 and 46.7, respectively, in this study, compared with 3.8 and 43 in the NIAID study (7). Our data do not suggest that there is a better response in black children per se, as suggested in the NIAID study (7).

Comparison of the FHA antibody titres is not possible since our assay was developed in 1989, prior to standardization. In the NIAID study, the present acellular pertussis vaccine induced PT and FHA antibody titres comparable with those induced by the other acellular pertussis vaccines tested, and for both antigens the titres were equal to or higher than those obtained with either of the US licensed whole-cell pertussis vaccines tested. The high PT antibody titres obtained in this study with the whole-cell pertussis vaccine confirm that it is appropriate as control vaccine in clinical trials in a developing country where it is routinely used.

### Acknowledgments

We are grateful to the team of field workers in Niakhar, as well as to the nurses at the local dispensaries who participated actively in the collection of data. We also thank Dr. Marie Pierre Preziosi and Dr. Agnès Hoffenbach for helpful comments and Dr. Mark Fletcher for invaluable editorial assistance. Financial support was provided by Pasteur Mérieux

Sérums et Vaccins (Lyon, France), and by the Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires (ORSTOM, Dakar, Senegal).

### References

1. Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Lind L, Sundh V, Zackrisson G, Lowe CU, Blackwelder W, Robbins JB: A placebo controlled trial of a pertussis toxoid vaccine. *New England Journal of Medicine* 1995, 333: 1045–1050.
2. Greco D, Salmoso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi A, Anemona A, Ciofi Degli Atti M, Giammanco A, Panei P, Blackwelder W, Klein D, Wassilak S, and the Progetto Pertosse Working Group: A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *New England Journal of Medicine* 1996, 334: 341–348.
3. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J: A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *New England Journal of Medicine* 1996, 334: 349–355.
4. Schmitt HJ, von Konig CHW, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H, Gahr M, Schult R, Folkens JU, Rauh W, Clemens R: Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *Journal of the American Medical Association* 1996, 275: 37–41.
5. Wright PF: Pertussis in developing countries: definition of the problem and prospects for control. *Reviews of Infectious Diseases* 1991, 13, Supplement 6: 528–534.
6. Mulholland K: Measles and pertussis in developing countries with good vaccine coverage. *Lancet* 1995, 345: 305–307.
7. Christy C, Pichichero ME, Reed GF, Decker MD, Anderson EL, Rennels MB, Englund JA, Edwards KM, Steinhoff MC: Effect of gender, race, and parental education on immunogenicity and reported reactogenicity of acellular and whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 1995, 96, Supplement 3: 584–587.
8. Aaby P, Samb B, Simondon F, Whittle H, Coll Seck AM, Knudsen K, Bennett J, Markowitz L, Rhodes P: Child mortality after high-titre measles vaccines in Senegal: the complete data set. *Lancet* 1991, 338: 1518.
9. Aaby P, Samb B, Simondon F, Knudsen K, Coll Seck AM, Bennett J, Whittle H: Divergent mortality for male and female recipients of low-titre and high-titre measles vaccines in rural Senegal. *American Journal of Epidemiology* 1993, 138: 746–755.
10. Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, Cowell JL, Guerrant RL: Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infection and Immunology* 1983, 40: 1198–1203.
11. Granstrom M, Granstrom G, Gillenius P, Askelof P: Neutralization antibodies to pertussis toxin in whooping cough. *Journal of Infectious Diseases* 1985, 151: 646–649.



12. Manclark CR, Cowell JL: Pertussis. In: Germanier R (ed): Bacterial vaccines. Academic Press, New York, 1984, p. 69-106.
13. Edwards KM, Bradley RB, Decker MD, Palmer PS, Van Savage J, Taylor JC, Dupont W, Hager CC, Whright PJ: Evaluation of a new highly purified vaccine in infants and children. *Journal of Infectious Diseases* 1989, 160: 832-837.
14. Fleming DS, Greenberg L, Beith EM: The use of combined antigens in the immunization of infants. *Canadian Medical Association Journal* 1948, 59: 101-105.
15. Tarzaali A, Viens P, Quevillon M: Inhibition of the immune response to whooping cough and tetanus vaccines by malaria infection, and the effect of pertussis adjuvant. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1977, 26: 520-524.
16. Edwards KM, Meade BD, Decker MD, Reed GF, Rennels MB, Steinhoff MC, Anderson EL, Englund JA, Pichichero ME, Deloria MA: Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic responses. *Pediatrics* 1995, 96, Supplement 3: 548-557.
17. Steinhoff MC, Reed GF, Decker MD, Edwards KM, Englund JA, Pichichero ME, Rennels MB, Anderson EL, Deloria MA, Meade BD: A randomized comparison of reactogenicity and immunogenicity of two whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 1995, 96, Supplement 3: 567-570.
18. Edwards KM, Decker MD, Halsey NA, Koblin BA, Townsend T, Auerbach B, Karzon DT: Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 1991, 88: 1019-1023.

## 2.2 Etude de l'efficacité des vaccins.

**Article correspondant:** Simondon, F, Preziosi M.P., Yam A, Toure Kane C, Chabirand L., Iteman I., Sanden G., Mboup S., Hoffenbach A., Knudsen K., Guiso N., Wassilak S., and Cadoz M. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*,1997; **15**:1606-612

**Introduction.** L'étude de l'efficacité vaccinale du DTaC comparativement au vaccin DTwC de référence dans ce contexte rural africain a bénéficié de la structure mise en place par le projet Population et Santé à Niakhar, en particulier de l'essai sur les vaccins contre la rougeole. La séquence classique d'un essai clinique randomisé en double aveugle est respectée dans ses étapes d'identification, information, consentement, randomisation, attribution des traitements, surveillance et mesure du critère de jugement. Mais l'environnement a induit certaines spécificités.

Une des particularités est que toutes les étapes décrites ci-dessus se sont réalisées au domicile des enfants, à l'exception de la randomisation et de la vaccination (ainsi qu'un complément d'information pour la participation), réalisées dans chacun des trois dispensaires de la zone d'étude. Depuis 1987, chaque famille est habituée à recevoir à domicile chaque semaine la visite d'un enquêteur qui relève les événements démographiques, et note les signes d'appel des maladies sous surveillance. Pour la coqueluche, il s'agissait d'une toux présente chaque jour pendant 8 jours, c'est à dire entre deux visites de l'enquêteur. L'enfant concerné recevait alors la visite d'un médecin, qui réalisait une investigation épidémiologique (recherche du cas index, des autres cas, facteurs d'exposition), qui pratiquait un examen clinique ainsi que les prélèvements bactériologiques et sérologiques. Puis le suivi hebdomadaire par le médecin de l'enfant, mais aussi le suivi des contacts se faisaient toujours

à domicile, jusqu'à la fin de la toux du dernier cas survenu, ce qui peut correspondre à une période de plusieurs mois.

Le suivi épidémiologique n'était pas restreint aux enfants ayant été vaccinés dans le cadre de l'étude, mais étendu à tous les enfants de la zone d'étude. Ainsi la surveillance portait sur des sujets vaccinés et des sujets non vaccinés, sans que le statut vaccinal ne soit connu. De façon anecdotique, ceci a compliqué le déroulement des audits de site et de données, puisqu'il n'y avait pas adéquation entre les populations (les fichiers) de surveillance ou de laboratoire et la population recevant les vaccins de l'étude. Mais surtout, cette façon de procéder a permis de mieux connaître l'environnement épidémiologique, le mode de propagation des cas, ce qui a permis d'assurer une bonne sensibilité de la surveillance, et d'arriver très tôt après la survenue des cas. Il a été possible d'estimer l'efficacité absolue des vaccins par la méthode cas-contact. Il avait en effet été considéré qu'il était impossible d'introduire dans le protocole principal un groupe d'enfants non vaccinés, étant donné que le traitement de référence dans le pays était la vaccination en 3 doses avec un DTwC et que la maladie était grave chez les enfants non vaccinés. Enfin, cette surveillance élargie à la population a permis d'identifier une catégorie d'enfants dont les manifestations cliniques de coqueluche ont été confirmées par l'exposition, à un degré bien supérieur à d'autres études. Par contre, ceci a entraîné des difficultés pour organiser le laboratoire de bactériologie et les transports quotidiens de prélèvements dans un contexte épidémique puisque, lors de l'épidémie de 1993, il pouvait y avoir près de 100 prélèvements effectués par semaine.

**Résultats.** Le résultat principal est que le vaccin à germes entiers protège mieux que le vaccin acellulaire, comme exprimé par un risque relatif de 1,54 (1,23-1,93). Comme discuté en 1.3.3.3 pour les facteurs de variation (tableau III et IV), l'efficacité relative doit être interprétée en fonction de l'efficacité absolue, ici rapportés dans le tableau 5 de l'article. Le

risque relatif de 1,54 correspond à des niveaux d'efficacité moyenne ou basses (55% pour le DTwC, et 31% pour le DTaC). L'augmentation de la spécificité du critère de confirmation par l'introduction de la positivité en PCR des cas confirmés uniquement par le contact épidémiologique se traduit par une augmentation de l'efficacité absolue des 2 vaccins (74% pour le DTwC et 53% pour DTaC), et du risque relatif (1,85). De même l'augmentation de la sévérité de la définition (définition OMS considérant 21 jours ou plus de toux paroxystique) se traduit par une augmentation de l'efficacité absolue des 2 vaccins, le DTwC ayant une efficacité de 92% (96% avec confirmation par PCR) et le DTaC une efficacité de 74% (85% avec confirmation par PCR). Cette augmentation de l'efficacité absolue avec la sévérité de la maladie avait déjà été observée (Blackwelder, 1990). Le risque relatif correspondant est alors de 3,3 (3,8 avec confirmation par PCR). Le recul important pour le suivi des enfants les plus âgés a donné l'opportunité de mettre en évidence que la différence de protection entre les vaccins pouvait correspondre à une durée de protection plus courte pour le vaccin acellulaire. Ceci illustre la difficulté à porter des recommandations sur l'utilisation des vaccins sur la base d'une estimation ponctuelle de l'efficacité relative, et l'ensemble de ces résultats nous a conduit à recommander que l'utilisation du vaccin acellulaire devait associer une dose de rappel. Enfin, lorsque ces résultats ont été présentés (Monterey, 1995 ; Rome, 1995 ; Washington, 1996), la bonne efficacité du vaccin à germes entiers observée dans notre étude, dans le contexte d'un pays en développement, venait tempérer l'inquiétude suscitée par les résultats issus des études suédoise (Gustafsson *et al.*, 1996) et italienne (Greco *et al.*, 1996) qui montraient la faible protection associée à un autre vaccin à germes entiers (48% d'efficacité en Suède et 36% en Italie). Surtout, cette protection était plus faible que celle associée aux vaccins acellulaires, dont le plus bas entraînait une efficacité de 59%, et les 3 autres des efficacités de l'ordre de 85%. Les autorités de santé publique des pays en

développement s'inquiétaient en effet de la généralité de ce dernier résultat et de son implication dans leur politique de vaccination (Robertson et Ivanoff, communication personnelle). Pour le Sénégal, au vu des résultats, les autorités de santé publique ont décidé de poursuivre l'utilisation du vaccin à germes entiers utilisé en routine.

# A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal

François Simondon\*†<sup>1</sup>, Marie-Pierre Preziosi\*, Ablaye Yam\*, Coumba Touré Kane‡, Laurence Chabirand\*, Isabelle Itean§, Gary Sanden¶, Souleymane Mboup‡, Agnes Hoffenbach||, Kim Knudsen<sup>z</sup>, Nicole Guiso§, Steven Wassilak\*\* and Michel Cadoz||

*A randomized, double-blind trial comparing a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine (DTaP) (pertussis toxoid and filamentous hemagglutinin) with a whole-cell vaccine (DTwP) was conducted. A case-contact study was nested in the trial to estimate absolute efficacy. From 1990 through 1994, 4181 children were randomized to receive one of the vaccines at 2, 4, and 6 months. Severe adverse events were monitored weekly during two visits after vaccination. Fewer serious adverse events were observed after DTaP. Surveillance for cough illnesses persisting more than 7 days, in children under 15 years of age, was made by weekly home visits. Examining physicians, blind to vaccination status, took samples for culture and serologic testing. Pertussis was defined as 21 or more days of cough confirmed by culture, serology, or contact with a culture-confirmed person. Beginning 28 days after the third vaccine dose, the overall ratio of pertussis incidence in the DTaP group relative to the DTwP group ( $RR_{ac/wc}$ ) was 1.54 (95% CI, 1.23-1.93). In children younger than 18 months of age,  $RR_{ac/wc}$  was 1.16 (95% CI, 0.77-1.73) and 1.76 (95% CI, 1.33-2.33) in children older than 18 months, which suggests a shorter duration of protection with the acellular vaccine ( $P = 0.090$ ). Absolute efficacy estimates derived from the case-contact study confirmed the lower protection afforded by the acellular vaccine compared with the whole-cell vaccine: 31% (95% CI, 7-49) versus 55% against the protocol case definition, and 85% (95% CI, 66-93) versus 96% for the more severe WHO case definition. Although vaccination with DTaP provided a lower degree of protection than the highly effective DTwP, this difference was less prominent before 18 months of age, the customary age for a fourth dose. The safer DTaP vaccine may prove a valuable substitute for whole-cell vaccines when used in a schedule that includes a booster dose. © 1997 Elsevier Science Ltd.*

**Keywords:** pertussis, acellular vaccine, whole-cell vaccine, vaccine efficacy, clinical trial, Africa

The development of highly purified acellular pertussis vaccines was triggered by concern over known and purported adverse events associated with conventional

whole-cell vaccines, as well as by some controversy regarding their efficacy<sup>1</sup>.

A randomized, controlled trial demonstrated the protective efficacy of both a monocomponent formalin-inactivated, pertussis toxoid (PT) vaccine and a two-component PT and filamentous hemagglutinin (FHA) acellular pertussis vaccine when the two doses were given at 5-11 months of age<sup>2</sup>. Post-trial surveillance showed the significantly higher efficacy of the two-component vaccine<sup>3</sup>.

In the absence of a whole-cell control group, it was not possible to evaluate the benefit of these acellular vaccines over the whole-cell pertussis vaccines currently given to infants in most countries. New trials that included whole-cell vaccine controls were necessary to establish new vaccination policies.

The relative merits of acellular and whole-cell vaccines are also debated in developing countries. For

\*Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, ORSTOM, Dakar, Senegal. †Present address: Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, Centre ORSTOM de Montpellier, 34032 Montpellier, France. ‡Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal. §Centre National de Référence des Bordetelles, Institut Pasteur, Paris, France. ¶Childhood and Respiratory Disease Branch, CDC, Atlanta, GA, USA. ||Direction Médicale, Pasteur Merieux Serums et Vaccins, Marnes La Coquette, France. <sup>z</sup>Epidemiology Research Unit, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark. \*\*National Immunization Program, CDC, Atlanta, USA. <sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. (Received 10 December 1996; revised version received 21 March 1997; accepted 21 March 1997)

this reason, we conducted a randomized clinical trial that compared the efficacy of diphtheria-tetanus-pertussis whole-cell pertussis vaccine (DTwP) commonly used in Europe and West Africa, with a two-component acellular pertussis vaccine (DTaP). This acellular vaccine had previously been found to be safe and immunogenic in this<sup>4</sup> and other settings<sup>5</sup>.

This trial took place in the Niakhar area of rural Senegal, which has been under continuous demographic and epidemiological surveillance since 1983.

The introduction of the World Health Organization's (WHO) expanded program on immunization in 1986 was followed by a decrease in the incidence and severity of pertussis cases, thus precluding the randomization of a non-immunized placebo group.

The primary objective of this study was to assess the relative efficacy of DTaP with respect to DTwP. The nested case-contact study allowed estimation of the absolute protective efficacy of both vaccines in order to interpret the relative efficacy data.

## METHODS

### Study design

The relative efficacy of the vaccines was assessed in a double-blind, controlled trial. Before the first dose, enrolled infants were randomly assigned to one of the two vaccine groups based on consecutive numbers randomized by computer at the National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) and balanced in blocks of ten. Pertussis surveillance by weekly home visits included all children in the study area aged 0-15 years, irrespective of, and blind to, their vaccination status. Thus, surveillance was not restricted to study children. The comprehensive nature of this surveillance allowed a prospective, nested case-contact study to estimate absolute efficacy of each vaccines to be conducted simultaneously.

The study protocol was reviewed and approved by the Ministry of Health of Senegal and by the investigational review board Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA), which approved it annually. Initial study approval by village chiefs was followed by community information meetings and individual informed consent<sup>6</sup>. Verbal informed consent was given by a mother before each dose, based on standardized information.

### Population

In the Niakhar area of Senegal, the residential unit is the compound where an extended family lives in one or more households. Of the 30 villages in the study area, each compound was visited weekly by a field worker who collected demographic and epidemiological data that were recorded in a centralized database.

Infants were eligible for the trial if born between 1 February 1990 and 30 April 1994 to mothers who resided in the study area and attended the vaccination sessions. Non-inclusion criteria were: (a) serious congenital or chronic illness such as failure to thrive or cardiac failure; (b) a history of seizures or other neurological disorders; (c) previous physician-diagnosed clinical pertussis; (d) previous pertussis vaccination; or (e) parental refusal to participate. Non-included

children received DTwP and IPV (criteria a, d, or e) or DT and IPV (criteria b or c).

Acute febrile infection (temperature  $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ ) or other significant illness delayed inclusion.

### Study vaccines

The heat-inactivated, whole-cell pertussis vaccine had a potency ranging from 5.8 to 11.4 international units (IU), according to WHO and European Pharmacopoeia requirements. It also contained at least 30 IU of diphtheria toxoid and 60 IU of tetanus toxoid adsorbed on aluminum hydroxide (aluminum content 0.54-0.65 mg per 0.5 ml dose).

Each dose of the acellular vaccine contained 25  $\mu\text{g}$  of glutaraldehyde-detoxified PT, 25  $\mu\text{g}$  of native FHA, at least 30 IU of diphtheria toxoid, and 40 IU of tetanus toxoid, all adsorbed on aluminum hydroxide (aluminum content 0.29-0.61 mg per 0.5 ml dose). The two vaccines, identical in appearance, were produced by Pasteur Mérieux Sérums and Vaccins (P.M.s.v., Lyon, France) in three lots (D1379, H0834, K0920) for DTwP and in four lots (S2112, S2301, S2684, S2938) for DTaP.

### Administration of vaccines

Based on the central database, children due to be vaccinated were visited by a field worker the week before a monthly vaccination session and offered transportation. Vaccines were given simultaneously with IPV at approximately 2, 4, and 6 months of age. (In addition, BCG was given to all 2-month-old children.) DTP vaccines were injected i.m. into the anterolateral aspect of the right thigh. Later, children also received yellow fever and measles vaccines at 9 months of age.

The contraindications to receiving further DTP vaccine doses were persistent crying (for an estimated 3 h or more), a high-pitched cry, fever (rectal temperature  $> 40.5^{\circ}\text{C}$ ), or severe alteration in consciousness, collapse, or an anaphylactic reaction within 48 h of DTP vaccination.

### Surveillance of adverse events

During the first two routine weekly visits following each vaccine dose, possible adverse events were screened by the field worker using a standardized questionnaire. For any positive answer, a physician interviewed the parents at home, examined the child, organised further investigations, and treated if needed. Children with a serious adverse event were re-evaluated after 1 month and then further examined 6 months to 1 year later.

### Case ascertainment

*Surveillance for cough illnesses.* Active surveillance of pertussis cases of all children under 15 years of age living in the Niakhar area was initiated in 1988, i.e. before the first infants eligible for the study were born. Field workers visited all compounds weekly in search of children coughing for longer than 7 days. Every coughing child younger than 15 years of age was examined weekly, until the end of all cough illnesses in the compound, by a physician blind to vaccination status. Culture specimens were collected at the first visit and 1 week later. Blood specimens for serology

were collected at the first visit and approximately 6 weeks later. Erythromycin prophylaxis was administered at the first visit to all infants from the compound aged <6 months.

### Laboratory methods

**Bacteriology.** Nasopharyngeal aspirates were collected from both nostrils by a catheter connected to a manual vacuum pump. The catheter tips were directly plated for culture, and were rinsed in 1% casamino acid. Primary plates and aspirates were transported within 10 h at ambient temperature to the laboratory in Dakar, where aspirates were plated. Specimens were cultured on Regan Lowe agar plates containing 10% defibrinated horse blood<sup>7</sup>. Colonies were identified by morphology, Gram staining, oxidase and urease reactions, and direct immunofluorescence with specific *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* antiserum (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA).

**Serology.** Blood samples were collected by finger prick into microtainer tubes, centrifuged at the field station and the serum kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . IgG titers to PT or FHA (supplied by P.M.s.v., Lyon, France) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)<sup>8</sup>. Serial dilutions of paired serum samples, starting at a 1:60 dilution, were added to a microtiter plate, with the internal reference being human serum that had been calibrated against the FDA human serum lot 3. The ELISA units were calculated by the reference line method using standardized software (UNITCALC, Biosys-inova, Sweden). The minimum levels of detection were 2.0 ELISA units  $\text{ml}^{-1}$  for anti-PT IgG and 2.5 ELISA units  $\text{ml}^{-1}$  for anti-FHA IgG.

**Polymerase chain reaction (PCR).** PCR amplification of the pertussis toxin promoter region was used to detect *B. pertussis* DNA in nasopharyngeal aspirates<sup>9,10</sup>.

### Case definition

The primary protocol case definition considered children with at least 21 days of cough confirmed by at least one of the following: (a) isolation of *B. pertussis*; (b) diagnostic serology defined by a twofold increase in IgG antibodies to PT or FHA between the acute and the convalescent serum samples; or (c) epidemiological linkage (epilink), defined as the child who had contact in the compound with a culture confirmed child, and who started coughing within 28 days before or after onset of illness in the culture confirmed child.

A definition adopted at a WHO meeting after the beginning of the trial was used as a secondary case definition<sup>11</sup>. This definition considered 21 days of paroxysmal cough with the same confirmation criteria. Another secondary case definition required confirmation of the epilink by a positive PCR to *B. pertussis* from nasopharyngeal mucus in the child in question.

### Statistical analysis

The calculated sample size assumed that the efficacy of the whole-cell vaccine was 75%, and allowed detection of a relative ratio of 1.5 in the incidences of

pertussis between the acellular and whole-cell vaccine recipients at a 5% significance level. The analysis considered all cases occurring  $\geq 28$  days after the third dose. For each child, surveillance ended either at the onset of pertussis or upon refusal of investigation, additional pertussis immunization, emigration, or death. All surveillance ended 31 December 1994.

Relative efficacy of the acellular vaccine, compared with the whole-cell vaccine, is given as a ratio of the pertussis incidence rates between the acellular and whole-cell vaccine groups ( $RR_{ac/wc}$ ). Because of the epidemic nature of pertussis in this area,  $RR_{ac/wc}$  and 95% confidence interval (CI) were estimated in a proportional hazards model with calendar time as the time scale, and they were stratified by village<sup>12</sup>. This model allows village-specific incidence rates to vary over calendar time, while preserving a rate ratio that is common to all villages. A multivariate proportional hazards model was used to investigate confounding factors. A secondary intention-to-treat analysis was performed and included all children receiving at least one dose of the study vaccines, regardless of later pertussis immunizations.

Epidemiological surveillance registered cases of pertussis among both study and non-study children residing in the Niakhar area. Thus, the authors were able to determine the index cases within each compound. An index case was defined as the first case with cough in the compound which was laboratory confirmed (same confirmation criteria as secondary cases). Secondary cases were those who had onset of cough starting more than 7 days after the index case. Co-primary cases, whose onset of cough occurred <8 days after beginning of cough of the index case, were excluded from the analysis.

To be considered in the case-contact analysis, unvaccinated children had to be similar to study children, i.e. permanent residents of the area and passing the non-inclusion criteria defined in the Population section. The absolute vaccine efficacy was estimated relative to unvaccinated for both the acellular and whole-cell vaccines as  $VE = (1 - AR_v / AR_u) \times 100\%$ , where  $AR_v$  and  $AR_u$  are the secondary attack rates of pertussis for vaccinated and unvaccinated children, respectively. The 95% CI values were derived from a normal approximation of the logarithm of the risk ratio,  $AR_v / AR_u$ <sup>13</sup>.

A cohort analysis, similar to the analysis of relative efficacy, was performed to support the case-contact study results.

Calculations were performed with SAS 6.10<sup>14</sup> and Epi-Info 6.0<sup>15</sup>.

## RESULTS

### Group comparability

Between May 1990 and July 1994, 4181 infants were included and received a first dose of vaccine: 2089 in the DTwP group and 2092 in the DTaP group. More withdrawals were observed in the DTwP group ( $n = 317$ ) than in the DTaP group ( $n = 245$ ) ( $P = 0.001$ ). Comparability between study groups for several background factors was evaluated at 28 days



after the third dose among 3619 children, and no significant differences were found (Table 1).

### Adverse events

Vaccinations continued after the closure date chosen for analysis (December 1994). From May 1990 to June 1995, 4821 children receiving a total of 13724 doses of the study vaccines, were under surveillance for serious adverse events. This surveillance was completed after each dose in 97% of children. As shown in Table 2, no episode of hypotonia hyporesponsiveness, collapse or generalized cyanosis, suggesting an anaphylactic reaction, was observed. All four seizures observed within 48 h following a vaccine dose were febrile seizures. One child (vaccinated with DTaP) had recovered completely at the time of the medical visit. The other three were hospitalized: two (vaccinated with DTwP) suffered from simple febrile convulsions and one (vaccinated with DTaP) experienced symptoms in the context of bacterial meningitis, the onset of which was within a few hours after vaccination. The child initially recovered promptly after i.v. antibiotherapy but subsequently had neurologic sequelae (including seizures and learning disabilities).

Persistent crying was more frequent in the DTwP group ( $P = 0.02$ ).

A similar number of deaths within 2 months of vaccination happened in the DTwP ( $n = 38$ ) and DTaP ( $n = 34$ ) groups, while the overall infant mortality rate in the study area is 85 per thousand.

### Surveillance

During the period of surveillance, 2567 compounds were visited by a physician because of coughing episodes reported to the field worker that lasted more than 7 days. In 837 of these compounds, the physician confirmed at least one episode of more than 7 days of daily cough, and could not ascertain other definite

diagnosis, such as acute lobar pneumonia, asthma, or tuberculosis. For children in these compounds, the physician initiated laboratory investigations and follow-up. In the course of further observation, a total of 3292 children less than 15 years of age and living in these 837 compounds were sampled, yielding positive *B. pertussis* cultures in 764 persons.

The total duration of follow-up was 3165 (DTwP group) and 3193 (DTaP group) person-year at risk. Mean duration of follow-up was 1.79 years in the whole-cell group (median 1.65 years), ranging from 0.01 to 4.25 years, not significantly different than 1.73 years in the acellular group (median 1.58 years), ranging from 0.01 to 4.25 years.

Among randomized groups of children followed at least 28 days after the third study dose, 587 were sampled for bacteriology and serology (with a median 10 days of cough).

### Relative vaccine efficacy

The protocol case definition was met by 123 and 197 children in the DTwP and DTaP groups, respectively (Table 3). DTaP recipients showed a significantly greater rate of pertussis than DTwP recipients, i.e.  $RR_{ac/wc} = 1.54$  (95% CI, 1.23–1.93). The intention-to-treat analysis displayed a slightly smaller point estimate of the rate ratio, as would be expected.

Case confirmation criteria are reported in Table 4. The pertussis rate ratio was greater if confirmation was based on bacteriology or serology rather than epilink. When considering epilink alone, the rate ratio point estimate was even lower ( $RR_{ac/wc} = 1.28$ ), probably due to lower specificity, which could be corrected by the addition of a PCR validation ( $RR_{ac/wc} = 2.31$ ).

Requiring paroxysmal cough and PCR validation in the case definition markedly limited the observed pertussis incidence in both groups, but more so in the DTwP group (Table 3), thus increasing  $RR_{ac/wc}$  to 2.80.

**Table 1** Comparability of vaccine groups at inclusion for analysis

Background factor	Whole-cell vaccine ( $n = 1772$ )	Acellular vaccine ( $n = 1847$ )
Age at inclusion for follow-up <sup>a</sup> (days)	208 [189–257]	209 [189–261]
% female	49.4	50.2
Weight at first dose <sup>a</sup>	5.4 [4.2–6.9]	5.5 [4.2–6.9]
Rank of birth no. (%)		
1	228 (12.9)	234 (12.7)
2–4	616 (34.8)	690 (37.3)
5–9	813 (45.9)	776 (42.0)
10–16	112 (6.3)	143 (7.7)
Age of mother <sup>a</sup> (years)	28.6 [18–41.3]	28.4 [18–40.8]
No. of persons in compound <sup>a</sup>	20 [7–60]	20 [7–60]
No. of persons (< 15 years of age) in household <sup>a</sup>	7 [2–15]	7 [2–16]

<sup>a</sup>Median [5–95 percentile] shown

**Table 2** Severe adverse events occurring within 48 h of a dose

Event <sup>a</sup>	Whole-cell vaccine (6595 doses)		Acellular vaccine (6881 doses)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Seizure	2	0.03	2	0.03
Persistent crying $\geq 3$ h	8	0.12	0	0
HHE <sup>b</sup> /collapse or generalized cyanosis	0	0.0	0	0.0

<sup>a</sup>Physician's assessment or mother's report; <sup>b</sup>hypotonia hyporesponsiveness episode

**Table 3** Relative vaccine efficacy of DTaP compared with DTwP for different case definitions

	No. of cases		Incidence rate ratio with 95% CI
	Whole-cell vaccine	Acellular vaccine	
<i>≥21 days of cough (protocol definition)</i>			
Protocol confirmation criteria <sup>a</sup>	123	197	1.54 [1.23–1.94] <sup>b</sup>
Intention-to-treat	162	233	1.43 [1.16–1.74]
With PCR <sup>c</sup>	65	128	1.87 [1.38–2.52]
<i>≥21 days of paroxysmal cough (WHO definition)</i>			
Protocol confirmation criteria <sup>a</sup>	16	41	2.42 [1.35–4.34]
Intention-to-treat	23	49	2.06 [1.25–3.39]
With PCR <sup>c</sup>	10	31	2.80 [1.36–5.74]

<sup>a</sup>Cases confirmed by culture, serology, epidemiological contact with a culture confirmed case; <sup>b</sup>95% confidence interval; <sup>c</sup>direct proof of exposure for epilink cases provided by positive PCR

A multivariate proportional hazards analysis, using continuous and discrete background factors listed in Table 1, was performed. Only the size of the compound had a significant effect on the risk of pertussis: vaccinated children from compounds with more than 30 members had a greater rate of pertussis than vaccinees from smaller compounds,  $RR = 2.12$  (95% CI, 1.66–2.71). However, including those background factors in the model did not change the value of  $RR_{ac/wc}$ , which was still 1.57 (95% CI, 1.25–1.96).

#### Duration of protection

Duration of protection could be examined by including current age, which is almost equivalent with time since last vaccination, as a time-dependent covariate. For children younger than 18 months, the age-specific rate ratio was 1.16 (95% CI, 0.77–1.73) and for children older than 18 months  $RR_{ac/wc}$  was 1.76 (95% CI, 1.33–2.33) ( $P = 0.09$ ). When PCR validation of the epilink was applied,  $RR_{ac/wc}$  was 1.13 (95% CI, 0.66–1.95) for the younger group and was 2.30 (95% CI, 1.59–3.32) for the older ( $P = 0.035$ ).

#### Absolute vaccine efficacy

Three hundred and eighty-seven vaccinated children from the trial cohort (190 DTwP, 197 DTaP), and 17 unvaccinated children fulfilling the criteria for inclusion in the case–contact study were exposed to pertussis. Considering PCR as a validation criterion, the numbers were 13 from the unvaccinated group, 159 from the DTwP and 168 from the DTaP group. Sex, birth rank, age at exposure, and characteristics of the index case (e.g. vaccination status, age, and cough duration) were

compared between vaccinated and unvaccinated children. Unvaccinated children were more frequently exposed to unvaccinated index cases ( $P = 0.043$ , Fisher's exact test); however, this association was not significant by multivariate logistic regression, thus supporting the assumption of similar risk of infection between groups.

As shown in Table 5, vaccine efficacy against illnesses with 21 or more days of cough was estimated to be 55% (95% CI, 38–68%) for the DTwP vaccine and 31% (95% CI, 7–49%) for the DTaP vaccine. When considering illness involving 21 or more days of paroxysmal cough that had a PCR-validated epilink, the efficacy values were 96% (95% CI, 86–99%) for the DTwP vaccine and 85% (95% CI, 66–93%) for the DTaP vaccine.

In a cohort analysis on 229 unvaccinated children, using the proportional hazards model as was used for the determination of relative efficacy, and with similar inclusion and exclusion for the unvaccinated children of each age cohort, absolute efficacy by the protocol case definition was 66% (95% CI, 46–78) for DTwP and 48% (95% CI, 18–66) for DTaP. The corresponding figures for the WHO definition were 91% (95% CI, 81–96%) for DTwP and 79% (95% CI, 58–89%) for DTaP.

## DISCUSSION

For the adverse events under surveillance in this study, both whole-cell and acellular vaccines were found to be safe. Still, the acellular vaccine was associated with a lower frequency of persistent crying. A prior study in the same population showed markedly lower frequen-

**Table 4** Confirmation of pertussis episodes of  $\geq 21$  days of cough. Number of cases and rate ratios when only using one diagnostic criterion

Criterion	DTwP		DTaP		Rate ratio ( $RR_{ac/wc}$ ) with 95% CI
	n <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	n <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	
Per protocol	123	100	197	100	1.54 [1.23–1.93]
Bacteriology	30	24	59	30	1.82 [1.17–2.84]
Serology	37	30	69	35	1.83 [1.23–2.74]
Epilink <sup>c</sup>					
All	106	86	159	81	1.46 [1.14–1.87]
Bac neg., Ser neg. <sup>d</sup>	66	54	87	44	1.28 [0.92–1.77]
Bac neg., Ser neg. <sup>e</sup> PCR positive	8	7	20	10	2.31 [1.01–5.28]

<sup>a</sup>Number of cases confirmed by this criterion; <sup>b</sup>percent of the total number of confirmed cases; <sup>c</sup>contact within 28 days of onset of cough with a culture confirmed case of the same compound; <sup>d</sup>excluding cases not directly confirmed by culture or serology; <sup>e</sup>epilink cases validated by positive PCR for *B. pertussis* on nasopharyngeal specimens from the ill child

**Table 5** Absolute efficacy of three doses of DTaP and DTwP according to different case definitions by case contact analysis

	Unvaccinated c/E <sup>a</sup>	DTwP			DTaP		
		c/E <sup>a</sup>	VE <sup>b</sup> (%)	95% CI	c/E <sup>a</sup>	VE <sup>b</sup> (%)	95% CI
<i>≥ 21 days of cough (protocol definition)</i>							
Protocol confirmation criteria <sup>c</sup>	13/17	65/190	55	38–68	104/197	31%	7–49
With PCR <sup>d</sup>	8/13	25/159	74	55–85	49/168	53%	23–71
<i>≥ 21 days of paroxysmal cough (WHO definition)</i>							
Protocol confirmation criteria <sup>c</sup>	8/17	7/190	92	81–97	24/197	74%	51–86
With PCR <sup>d</sup>	6/13	3/159	96	86–99	12/168	85%	66–93

<sup>a</sup>Number of secondary cases/number of exposed children; <sup>b</sup>absolute efficacy; <sup>c</sup>cases confirmed by culture, serology or epidemiological contact with a culture confirmed case; <sup>d</sup>direct proof of exposure for epilink cases provided by positive PCR

cies for the acellular vaccine for more common adverse events, such as fever, fussiness, and local reactions, compared with the whole-cell vaccine<sup>4</sup>. These results are consistent with other studies of the same acellular vaccine<sup>16,17</sup>.

Even though less reactogenic, the acellular vaccine afforded significantly less protection than the whole-cell vaccine. The primary estimate of the relative risk was confirmed by secondary analyses.

A large proportion of cases was confirmed by the epilink alone, without direct laboratory confirmation, and thus had lower specificity. When strengthening the epilink by PCR validation, thus adding direct proof that this exposed child was carrying *B. pertussis*, the case definition became more specific.  $RR_{c/wc}$  increased with more severe disease and more specific case definition limiting misclassification bias<sup>13</sup>, as already observed<sup>18</sup>.

The difference in protection between the two vaccines also was associated with a shorter duration of protection with the DTaP.

Interpretation of the relative efficacy data is aided by the estimate of absolute vaccine efficacy as an internal yardstick. Indeed, the same relative risk can have a different practical significance depending on whether it is applied to vaccines of moderate efficacy or to high efficacy vaccines. Absolute efficacy was estimated by the case–contact method<sup>19</sup>. This analysis was performed within the same population and at the same time, with case detection blind to vaccination status. Characteristics of the unvaccinated group were not found to be different from those of vaccinated children, although the small sample size limited the power of the comparison. Nonetheless, absolute efficacy estimates derived from the cohort analysis were consistent with those of the case–contact study. As already observed<sup>1</sup>, the estimation from the case–contact method was lower. The overall efficacy estimate of the DTwP vaccine was closer to estimates obtained for the same vaccine from other countries where it is routinely used<sup>20,21</sup>.

The practical significance of the inferior protection afforded by this DTaP in the control of pertussis is debatable. DTaP will be given most often in a schedule that includes a fourth, and even a fifth dose, which should increase its efficacy. Also, the effectiveness of a vaccination program with acellular vaccines can be enhanced by their better safety.

In developing countries, however, children may be deprived of further vaccination after one year of age. Data from a trial in Sweden<sup>22</sup>, where DTaP vaccine was given at 3, 5 and 12 months of age may indicate that

the third dose augments protection if administered at the end of the first year of life. This is consistent with the recommended age for vaccination against measles and could warrant specific studies on optimal vaccination schedules.

Efficacy trials of other acellular vaccines have been reported recently<sup>22–27</sup>. The content of the vaccines varied from one (PT) to five components (PT, FHA, pertactin and fimbriae). The interpretation of the results across the studies is difficult. One cannot simply compare specific efficacy figures. In addition to the statistical variability, any comparison of absolute efficacy is complicated by marked differences in study design and execution, duration of follow-up, vaccination schedule and disease exposure.

In this population, factors such as the family size, nutritional habits, and high infectious background (e.g. malaria parasitemia) are other specificities.

As an example, in our study, paroxysmal cough was diagnosed by a physician; the diagnosis of cough was likely to have been more specific than in other studies where information was collected from the parents by non-physicians. Also, the duration of observation in the present study was longer than in any other trial.

However, comparing the present findings with those of previously reported studies emphasizes that other studies have usually found that whole-cell vaccines were superior to acellular vaccines<sup>26</sup> except for one whole-cell vaccine in two trials<sup>23,24</sup>. This reinforces two general conclusions. First, these findings confirm the heterogeneity of whole-cell vaccines suggested by immunogenicity studies<sup>28</sup>. In practice, the low efficacy of a particular whole-cell vaccine should not deter national or international health authorities from promoting the use of effective and inexpensive whole-cell vaccines. Furthermore, the extensive use of whole-cell vaccines, including the one found to be less effective, in a five dose regimen, has satisfactorily controlled pertussis in the USA.

Second, the optimal antigen content of acellular vaccines cannot be derived from the available results, and acellular vaccine choice should consider further aspects such as cost, combinations with other vaccines, and duration of protection. In our study, the shorter duration of protection provided by the acellular vaccine was revealed through a prolonged period of follow-up. This finding may well apply to other acellular vaccines, and should encourage long term follow-up and post-licensure surveillance for all acellular pertussis vaccines.

A decision to change to this acellular vaccine should take into account the type of whole-cell vaccine

routinely used, the possibility for a booster dose, combinations with other vaccines and cost.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to participating families of the Niakhar Study area and to personnel of the Niakhar project, especially Malick Ndiaye and Mareme Dia for epidemiological surveillance, Ousmane Ndiaye and Adama Marra for computer programming, Valérie Delaunay for demographic support and supervision, Cheick Sy and Babacar Gning for performing the cultures, Christine Blondeau and Françoise Fievet for PCR analyses, and Mark Fletcher for helpful editorial assistance. The study also has benefited from the contribution made by the experts of the scientific committee: Pierre Begue, Awa Coll-Seck, George Curlin, Kathy Edwards, Paul Fine, Patrick Olin, and Laure Papoz. Pierre Begue, Awa Coll-Seck, and Laure Papoz have also run the safety committee. Nevertheless, results and ideas expressed in this paper are the responsibility of the authors. Constant interest and support was welcomed from the Ministry of Health, Senegal, and Bernard Philippon, acting director of Department of Health, ORSTOM. The study was sponsored by Pasteur Mérieux sérums et vaccins and ORSTOM.

## REFERENCES

- 1 Fine, P.E.M. and Clarkson, J.A. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Review of Infectious Diseases* 1987, **9**, 866-883.
- 2 Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Placebo controlled trial of two acellular vaccines in Sweden—protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **1**, 955-960 [erratum, *Lancet* 1988, **1**, 1238].
- 3 Storsaeter, J. and Olin, P. Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine* 1992, **10**, 142-144.
- 4 Simondon, F., Yam, A., Gagnepain, J.Y., Wassilak, S., Danve, B. and Cadoz, M. Comparative study of the safety and immunogenicity of a DT-acellular pertussis and a DT-Whole-cell pertussis vaccine in Senegalese infants. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1996, **15**, 927-932.
- 5 Edwards, K.M., Meade, B.D. and Decker, M.D. *et al.* Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic responses. *Pediatrics* 1995, **96**, (suppl), 548-557.
- 6 Preziosi, M.P., Wassilak, S., Yam, A., Ndiaye, M., Simaga, A. and Simondon, F. Practical experiences in obtaining informed consent for a vaccine trial in rural Africa. *New England Journal of Medicine* 336, **5**, 370-373.
- 7 Regan, J. and Lowe, F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *Journal of Clinical Microbiology* 1977, **6**, 303-309.
- 8 Manclark, C.R., Meade, B.D. and Burstyn, D.G. Serological response to *Bordetella pertussis*. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd edition (Eds Rose, N.R., Friedman, H. and Fahey, J.L.). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1986, pp. 388-394.
- 9 Grimprel, E., Bégué, P., Anjak, I. and Guiso, N. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, **31**, 2745-2750.
- 10 Reizenstein, E. Diagnostic polymerase chain reaction. *Proceedings of the International Symposium on Pertussis Vaccine Trials, 30 October-1 November 1995*, in press.
- 11 WHO Meeting on Case Definition of Pertussis, Geneva, 10-11 January 1991. World Health Organization, Geneva, 1991, pp. 4-5 (issue no. MIN/EPI/PERT/91.1).
- 12 Breslow, N.E. and Day, N.E. Statistical methods in cancer research: Vol 2. The design and analysis of cohort studies. IARC Scientific Publication no. 82, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1987.
- 13 Rothman, K.J. *Modern Epidemiology*. Little, Brown and Company, Boston/Toronto, 1986.
- 14 SAS version 6.10. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC, USA.
- 15 EPI Info version 6, CDC, Atlanta, 1994.
- 16 Decker, M.D., Edwards, K.M. and Steinhoff, M.C. *et al.* Comparison of 13 acellular vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* 1995, **96**, (suppl), 557-566.
- 17 David, T. and Groupe de Pédiatres de la Région Lyonnaise, Cadoz, M. Acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids and inactivated polio vaccine (AcPDT IPV): comparison to a DTP-IPV with a whole-cell vaccine component (WcPDT IPV) in infants. *31st Annual ICAAC Meeting 1991*, **60**, 108 (abstr.).
- 18 Blackwelder, W.C., Storsaeter, J., Olin, P. and Hallander, H.O. Pertussis vaccines. Efficacy and evaluation of clinical case definitions. *AJDC* 1991, **145**, 1285-1289.
- 19 Orenstein, W.A., Bernier, R.H., Dondero, T.J., Hinman, A.R., Marks, J.S., Bart, K.J. and Sirotkin, B. Field evaluation of vaccine efficacy. *Bulletin of the World Health Organization* 1985, **63**, 1055-1068.
- 20 Baron, S., Begue, P. and Desenclos, J.C. *et al.* Evaluation épidémiologique, clinique et biologique de la coqueluche en France. *BEH* 1995, **19**, 83-85.
- 21 Swartz, A., Roumiantzeff, M. and Peyron, L. *et al.* Use of a combined DTP-Polio vaccine in a reduced schedule. *Developments in Biological Standardization* 1986, **65**, 159-166.
- 22 Trollfors, B., Taranger, J. and Lagergard, T. *et al.* A placebo controlled trial of a pertussis toxoid vaccine. *New England Journal of Medicine* 1995, **333**, 1045-1050.
- 23 Greco, D., Salmoso, S. and Mastrantonio, P. *et al.* A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *New England Journal of Medicine* 1996, **334**, 341-348.
- 24 Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E. and Storsaeter, J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *New England Journal of Medicine* 1996, **334**, 349-355.
- 25 Schmitt, H.J., von Konig, C.H.W. and Neiss, A. *et al.* Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996, **275**, 37-41.
- 26 International Symposium on Pertussis Vaccine Trials, Rome, 30 October-1 November 1995: trial synopses. Istituto Superiore di Sanita, Rome, 1995.
- 27 Edwards, K.M. and Decker, M.D. Acellular pertussis vaccines for infants. *New England Journal of Medicine* 1996, **334**, 391-392.
- 28 Steinhoff, M.C., Reed, G.F. and Decker, M.D. *et al.* A randomized comparison of reactogenicity and immunogenicity of two whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 1995, **96**, (suppl), 567-570.

### 2.3 Interprétation des résultats sérologiques.

**Article correspondant:** Simondon F, Itean I., Preziosi M.P., Yam A and Guiso N. Evaluation of an Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Diagnosis of Pertussis in Senegal. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; **5**:130-134

**Introduction.** Le diagnostic de la coqueluche est compliqué. Chez les sujets vaccinés, il est admis pour les études d'efficacité vaccinale qu'il doit y avoir un critère de confirmation biologique (OMS, 1991). La sérologie a été recommandée, en particulier la technique ELISA. Son interprétation est basée sur une augmentation significative (de 100% ou plus ) du taux d'anticorps IgG contre la PT ou la FHA entre sérums de convalescent et sérum de la phase aiguë. Mais lors de la réalisation des titrages, nous avons constaté assez fréquemment une décroissance du taux d'anticorps. Cette observation a fait l'objet d'une analyse détaillée à partir des données disponibles, objet de l'article présenté ici.

**Résultats:** Nous avons pu mettre en évidence que les décroissances étaient observées fréquemment, pour 25% des enfants testés pour la PT et de 9,4% pour la FHA. Ces décroissances correspondent dans la majorité des cas (59%) à des enfants ayant une coqueluche confirmée par d'autres critères de la définition OMS. Elles ne sont pas dues à des problèmes de dates de prélèvements trop tardives ou trop espacées. Par contre, elles sont observées significativement plus fréquemment chez les sujets vaccinés que chez les sujets non vaccinés (Tableau 4 de l'article). Les décroissances représentent 64% des positifs chez les vaccinés, et seulement 27% chez les non vaccinés. Cette différence est associée à une cinétique différente de réponse des anticorps, plus rapide et plus brève chez les vaccinés (Figure 1 de l'article). Nous avons conclu que les décroissances significative des taux d'anticorps entre sérums de convalescents et sérums de la phase aiguë devaient être

considérées aussi comme étant une confirmation de coqueluche. De ce fait, le nombre de diagnostics sérologiques positifs (tableau 1 de l'article) a varié de 157 (34%) à 266 (58%). Ce résultat doit être intégré à la pratique diagnostique courante, qui porte de plus en plus souvent chez des sujets vaccinés. L'importance possible de cette observation pour l'évaluation de l'efficacité vaccinale a été discutée. En effet, en cas de mesure de l'efficacité absolue, lorsque l'algorithme de décision ne retient que les augmentations des taux d'anticorps, le diagnostic sera confirmé plus souvent chez les sujets non vaccinés, conduisant à une surestimation de l'efficacité vaccinale absolue. Dans notre étude, cet effet peut faire surestimer l'efficacité vaccinale absolue de presque 10% lorsque le contact épidémiologique n'est pas pris en considération, et de 5% lorsqu'il est pris en considération (tableau 5 de l'article).

Cet effet est connu sous l'appellation d'erreur de classification différentielle, c'est à dire que l'erreur sur le critère de jugement est à un niveau différent selon l'exposition, ici le vaccin : Le traitement modifie la performance du diagnostic. Pour les autres études contemporaines, du fait d'une surveillance centrée principalement sur les sujets vaccinés, le critère de confirmation épidémiologique est rarement obtenu, et la correction pour ce biais ne peut pas être faite. Pour ces études, la connaissance de la fréquence des décroissances des taux d'anticorps, et leur prise en compte reste souhaitable.

## Evaluation of an Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Diagnosis of Pertussis in Senegal

FRANÇOIS SIMONDON,<sup>1\*</sup> ISABELLE ITEMAN,<sup>2</sup> MARIE PIERRE PREZIOSI,<sup>1</sup> ABDOULAYE YAM,<sup>1</sup>  
AND NICOLE GUISO<sup>2</sup>

*Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, French Institute for Scientific Research for Development in Cooperation (ORSTOM), 34032 Montpellier Cedex,<sup>1</sup> and Laboratoire des Bordetella et Centre National de Référence des Bordetella, Institut Pasteur, 75824 Paris Cedex 15,<sup>2</sup> France*

Received 13 August 1997/Returned for modification 2 October 1997/Accepted 17 November 1997

The enzyme-linked immunosorbent assay is widely employed for the serological diagnosis of pertussis. It is generally concluded that a significant increase in specific immunoglobulin G (IgG) or IgA against the pertussis toxin (PT) or against filamentous hemagglutinin (FHA) in paired sera correlates with *Bordetella pertussis* infection. However, this type of diagnosis of pertussis has mainly been applied to unvaccinated children, with timely sampling of acute- and convalescent-phase sera. In current practice and in epidemiological studies, such criteria are not always fulfilled. The aim of this study was to analyze the significance of decreases in IgG antibody titers against PT and FHA between paired sera observed in suspected cases of pertussis infection. Serological results from paired sera were available for 460 children experiencing at least 8 days of cough. An anti-PT IgG decrease was observed in 25% of the children, more frequently than the anti-FHA IgG decrease. Fourteen percent of the serologic decreases were observed in children with culture-confirmed infection, and 59% of the decreases were observed in children with confirmation criteria according to World Health Organization recommendations. Most of the decreases were observed when serum samples were collected according to a standard recommended schedule. Serologic decreases were observed more frequently among vaccinated children than among unvaccinated children. This difference, which was highly significant ( $P < 0.00001$ ), was explained by the different kinetics of the antibody responses between vaccinated and unvaccinated children. The importance of the antibody response for the evaluation of vaccine efficacy, namely a bias toward higher absolute vaccine efficacy when this response is not taken into account, is discussed. This study supports an earlier recommendation that a significant decrease in PT or FHA should be added to the diagnostic criteria for pertussis.

Serology is widely employed for the diagnosis of pertussis, and its use has been recommended (15) as part of the case definition in vaccine efficacy trials. Many serological assays have been developed during the last 20 years, but some lack sensitivity and/or specificity. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using purified pertussis factors such as pertussis toxin (PT) or filamentous hemagglutinin (FHA), has recently been used extensively for epidemiological studies (8). This technique has proven to be reasonably sensitive and specific (1, 3, 13). It is generally concluded that a significant increase in specific anti-PT immunoglobulin G (IgG) or IgA and/or anti-FHA IgG or IgA in paired sera correlates with *Bordetella pertussis* infection. However, this type of diagnosis of pertussis has been mainly applied to unvaccinated children, with acute-phase serum collected within 14 days after the onset of illness and convalescent-phase serum collected 4 to 8 weeks later. In current practice and in epidemiological studies, such criteria are not always fulfilled: pertussis may be suspected after it is too late to culture the organism or to obtain an acute-phase serum sample, and convalescent-phase sera may be collected more than 8 weeks after the onset of the cough. Moreover, serological responses after infection may be difficult

to interpret because of previous vaccination (3). Such conditions are observed in pertussis vaccine trials and will probably occur more often with increasing use of pertussis vaccines.

In the present study, we analyzed the serological response of suspected cases of pertussis infection as part of the Senegal Pertussis Trial (11). Increases in anti-PT IgG and anti-FHA IgG titers between paired sera were detected. However, as previously observed (5, 9), we also detected a significant number of anti-PT IgG and anti-FHA IgG decreases between paired sera. The objectives of this study were (i) to undertake a precise analysis of these decreases, compared with increases, in order to determine whether they might also detect children infected with *B. pertussis*; and (ii) to study the possible impact of such findings on the interpretation of vaccine efficacy results.

### MATERIALS AND METHODS

**Subjects.** The study was based on available serological results for children sampled within the pertussis surveillance system of the Senegal Pertussis Trial and included in the main analysis population.

The Senegal Pertussis Trial sought to compare the relative efficacies of three doses of a two-component acellular (AC) vaccine (25 µg of purified detoxified PT and 25 µg of purified FHA) with respect to that of three doses of the French whole-cell (WC) vaccine used by the Expanded Program of Immunization in Senegal. Both vaccines were produced by Pasteur Mérieux. The study and results have been reported elsewhere (11). Briefly, the trial was conducted in Niakhar, Senegal, a rural farming area 150 km from Dakar. The approximately 27,000 inhabitants live in large compounds among scattered hamlets. This population has been monitored since 1983 for demographic and health studies. Pertussis epidemiological surveillance was initiated in 1983, based on annual surveys and

\* Corresponding author. Mailing address: Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Parasitaires, ORSTOM BP 5045, 911 Ave. Agropolis, 34032 Montpellier Cedex, France. Phone: 33-4-67-41-61-62. Fax: 33-4-67-54-78-00. E-mail: Francois.Simondon@mpl.orstom.fr.

declarations of the mothers, and has been continued since 1987 by weekly active detection of cough among all children under 15 years of age by field workers triggering physician investigations. During the trial, from 1990 to 1995, all suspect cases (8 days or more of cough) were investigated: nasopharyngeal aspirates and blood samples were taken from children whose parents agreed. Acute-phase serum samples were taken as soon as possible after the onset of the cough, and convalescent-phase sera were mainly sampled 4 to 8 weeks later.

A total of 1,224 children received three doses of the study vaccines (587 in the WC group and 637 in the AC group; they received no other pertussis vaccine dose outside the study, had not had clinical pertussis prior to 28 days after the third dose, and were living in compounds which have been investigated for possible pertussis. A total of 253 children in the WC group and 361 children in the AC group experienced episodes of at least 8 consecutive days of cough and thus were candidates for bacteriology and serology. Serological results from paired sera were available for 153 children (60%) in the WC group and 228 children (63%) in the AC group. A total of 545 children belonging to the same birth cohorts remained unvaccinated because they had not attended any vaccination session for various reasons and were living in a compound under investigation: 249 of these children had had at least 8 days of cough, and serological results were available for 79 (32%) of them.

This analysis was performed with the children with available serological results. Most of them also had results for bacteriology and information on epidemiological linkage. Results are presented for suspected cases of infection in children with 8 days or more of cough and for children with 21 days or more of paroxysmal cough, corresponding to the clinical part of the definition established by the World Health Organization (WHO).

**Serology.** (i) **Handling of serum specimens.** Blood was collected by finger prick on microtainer tubes (Becton Dickinson) and centrifuged, and sera were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 0.05-ml aliquots in 1.8-ml Nunc tubes. A volume of 0.02 ml was sufficient for two different assays of IgG for PT and FHA.

(ii) **Antigens.** Purified PT and FHA were obtained from Pasteur Mérieux, Lyon, France, in vials containing, respectively, 200 and 500  $\mu\text{g}$  of purified protein per ml. The antigens were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 50% glycerol. One batch of each antigen was used throughout the study.

(iii) **ELISAs.** The main ELISA procedures were as follows. Microtiter plates (Nunc Maxisorp certified) were coated with PT and FHA diluted to 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in bicarbonate buffer (pH 9.6) and phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Coated plates were stored for 1 week maximum.

Sera were diluted in eight twofold dilutions starting with 1:60 with PBS (pH 7.4) containing 0.5% bovine serum albumin, 0.5% Tween 20, and 0.005% polypropylene glycol. Paired sera from the same patient (acute- and convalescent-phase sera) were run on the same plate with a reference human serum containing 217 ELISA units (EU)/ml for anti-PT IgG and 175 EU/ml for anti-FHA IgG (calibrated with the Food and Drug Administration human serum lot 3), a high-positive serum sample, and/or a negative serum sample. The plates were incubated for 2 h at  $28^{\circ}\text{C}$ . After washing, alkaline-phosphatase-conjugated antihuman IgG (Kirkgaard and Perry laboratories) was added, and the mixture was incubated at  $28^{\circ}\text{C}$  overnight.

The system was developed with four nitrophenyl phosphate tablets for 60 min. The enzyme reaction was performed at room temperature. The results were expressed in units by the computer program Unitcalc (Byosis-Inova) developed by R. Möllby and I. Kühn.

The minimum levels of detection were 2 EU/ml for anti-PT IgG and 2.5 EU/ml for anti-FHA IgG. A seropositive serum sample was one that contained at least four times the minimum level of detection. An IgG ELISA titer rise for PT or FHA of 100% or more was considered a significant increase, and an IgG ELISA titer fall of 50% or more was considered a significant decrease. Otherwise, ELISA titer changes were considered not significant. Specifically, high antibody titers of acute- and convalescent-phase serum samples without a rise or decrease were considered nonsignificant.

Sampling techniques for samples with very high antibody concentrations were redone after dilution so that the concentrations would fall within the optimal detection ranges. In these cases, the plates were reexamined with a starting dilution of 1:600 for both acute- and convalescent-phase sera.

(iv) **Culture.** Aspirate specimens were obtained with a suction catheter (Vygon). The aspirates were inoculated in the home (primary plates) and in the laboratory (secondary plates) on Reagan-Lowe agar plates containing 10% defibrinated horse blood and 40 mg of cephalexin per liter. Cultures were inoculated at  $36^{\circ}\text{C}$  and observed regularly during a 7-day period after inoculation. Suspected colonies were identified with antisera specific to *B. pertussis* and *Bordetella parapertussis* (Difco Laboratories). Final verification was done with oxidase and urease.

(v) **Epidemiological linkage.** A suspected case of infection was confirmed as pertussis if the subject was living in the same compound as a child with a culture-confirmed case and if the onset of cough occurred within 28 days either before or after the onset of cough of the reference child.

**Data management and statistics.** Percentages of antibody changes (increases, decreases, or negatives) were compared by the  $\chi^2$  test. Comparisons of means were done by analysis of variance when normal approximation was possible or by the Kruskal-Wallis test, with Epiinfo, version 6 (USD). Significance values were always calculated as two tailed.

TABLE 1. Proportion of increases, seronegative samples, and decreases in anti-PT IgG and anti-FHA IgG titers in paired sera

Anti-PT IgG titer	No. of children with anti-FHA IgG titer <sup>a</sup>			
	Increase	Negative	Decrease	Total
Increase	80	9	1	90
Negative	48	191	14	253
Decrease	18	71	24	113
Total	147 (1)	273 (2)	40 (1)	460 (4)

<sup>a</sup> Increase, increase in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera; Negative, no IgG detected in either acute- or convalescent-phase sera or no change detected in IgG titer between the two serum samples; Decrease, decrease in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera. Values in parentheses represent the number of missing results for PT.

## RESULTS

**PT and FHA IgG titer changes.** As shown in Table 1, an anti-PT IgG increase was detected in 90 children (20%) and an anti-FHA IgG increase was detected in 147 children (32%). An anti-PT IgG decrease was observed in 113 children (25%), more frequently than an increase and more frequently than anti-FHA IgG decreases, which were observed for 40 (9.4%) children.

Decreases in a child whose serologic result was positive for the other antigen were also more frequently observed for PT than for FHA.

Further analysis was restricted to PT IgG because of the small number of decreases observed for FHA IgG.

**Serological results in children with culture-verified pertussis.** Eighty children were culture positive among the 460 children with suspected cases of infection who had 8 days or more of cough and who had been sampled for both bacteriology and serology. Children with increases in IgG titers (19%) among those with suspected cases of infection had a positive culture 40% (36 of 89) of the time, whereas only 14% (16 of 113) of the children with a decrease in the IgG titer (24% of suspected cases of infection) were culture positive (Table 2). Among responders, defined as those experiencing either an increase or a decrease in antibody titers, 31% (16 of 52) involved decreases in culture-positive children. This rate was 65% (97 of 150) among culture-negative children. When the sample was restricted to children with 21 days or more of paroxysmal cough, the rate of decreases rose to 35% (28 of 80), and it was then close to the rate of increases (37% [30 of 80]).

TABLE 2. Serological results as a function of bacteriological results

Anti-PT IgG titer <sup>a</sup>	No. of children with result by bacteriology <sup>b</sup>					
	8 days of cough			21 days of paroxysmal cough		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Increase	36	53	89 [1]	16	14	30
Negative	28	225	253	6	15	21
Decrease	16	97	113	6	22	28
Total	80	379 (4)	460 (4) [1]	28	52 (1)	80 (1)

<sup>a</sup> Increase, increase in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera; Negative, no IgG detected in either acute- or convalescent-phase sera or no change detected in IgG titer between the two serum samples; Decrease, decrease in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera.

<sup>b</sup> Values in parentheses represent number of missing results for PT; values in brackets represent number of missing results for bacteriology.



TABLE 3. Serological results as a function of WHO laboratory confirmation criteria

Anti-PT IgG titer <sup>a</sup>	No. of children with result by WHO confirmation criteria <sup>b</sup>					
	8 days of cough			21 days of paroxysmal cough		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Positive	90	0	90	30	0	30
Negative	130	123	253	15	6	21
Decrease	67	46	113	23	5	28
Total	288 (1)	172 (3)	460 (4)	49 (1)	11	80 (1)

<sup>a</sup> Increase, increase in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera; Negative, no IgG detected in either acute- or convalescent-phase sera or no change detected in IgG titer between the two serum samples; Decrease, decrease in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera.

<sup>b</sup> Values in parentheses represent number of missing results for PT.

**Serological results in children with WHO laboratory confirmation criteria.** By definition, all 90 children with serologic increases were confirmed by WHO criteria (Table 3). However, 67 (59%) of the serologic decreases were also observed in children with laboratory-confirmed pertussis. This rate was 82% in the subsample of children with 21 days or more of paroxysmal cough. Thus, the majority of serologic decreases observed in this sample were from children with pertussis.

**Serological results as a function of timing of the samples.** In the present study, the decreases in IgG titers between acute- and convalescent-phase sera might have been due to a long interval between collection of sera. The median interval was not significantly longer when decreases were observed (48 days) than when increases were observed (42 days) ( $P = 0.07$ ). For 76% of the children, this interval was between 4 and 8 weeks, the interval generally used in other studies.

The decreases observed might also have been due to a long interval between the beginning of the clinical symptoms and collection of the acute-phase serum. The median delays for the acute-phase sample were 9 days when increases were observed and 12 days when decreases were observed ( $P < 0.01$ ). However, 87 and 96% of acute-phase sera were collected before 21 and 28 days, respectively.

Thus, the occurrence of some serologic decreases was associated with the timing at which the two blood samples were taken, but serologic decreases were also observed when the samples were collected according to a standard recommended schedule.

**Serological results as a function of vaccination status.** Because of the results presented above, it was anticipated that anti-PT IgG titers might decrease more rapidly in the weeks following infection in vaccinated children compared to that in unvaccinated children because of a more rapid rise in antibodies related to the anamnestic response following vaccination. As seen in Table 4, increases were more frequently observed among unvaccinated children and decreases were more often observed among vaccinated children. This difference was more pronounced in the subsample of children with paroxysmal cough. When only increases and decreases were considered in Table 4 and since they might both have represented positive serological results, it could be calculated from the full sample that decreases represented 64% of the positive results among vaccinees and only 27% of those among unvaccinated children. This difference was highly significant ( $P < 0.00001$ ). A similar analysis of the two groups showed comparable rates of decreases in the AC group (65%) and in the WC group (62%). When the sample was restricted to those children with parox-

TABLE 4. Serological results according to vaccination status

Anti-PT IgG titer <sup>a</sup>	No. (%) of children with result by vaccination status <sup>b</sup>			
	No dose	3 doses		Total
		AC	WC	
<b>Increase</b>				
All coughs	33 (42)	38 (17)	19 (12)	57 (15)
Paroxysmal cough	20 (57)	7 (25)	3 (18)	10 (22)
<b>Negative</b>				
All coughs	32 (40)	120 (53)	101 (66)	221 (58)
Paroxysmal cough	7 (20)	7 (25)	7 (41)	14 (31)
<b>Decrease</b>				
All coughs	12 (15)	70 (31)	31 (20)	101 (27)
Paroxysmal cough	7 (20)	14 (50)	7 (41)	21 (47)
<b>Total</b>				
All coughs	79 [2] (100)	228 (100)	153 [2] (100)	381 [2] (100)
Paroxysmal cough	35 [1] (100)	28 (100)	17 (100)	45 (100)

<sup>a</sup> Increase, increase in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera; Negative, no IgG detected in either acute- or convalescent-phase sera or no change detected in IgG titer between the two serum samples; Decrease, decrease in IgG titer between acute- and convalescent-phase sera.

<sup>b</sup> Values in brackets represent number of missing results for PT.

ysmal cough, comparable rates were observed. When the analysis was restricted to the classical delay between convalescent- and acute-phase sera of more than 27 days and less than 57 days, similar rates of decreases were observed: 62 and 59% in the AC and WC groups, respectively, compared to 31% among unvaccinated children (data not shown).

These results suggest that the kinetics of IgG antibodies may vary between unvaccinated and vaccinated children, who may express a very rapid rise and decrease in IgG titers.

This is illustrated in Fig. 1, in which anti-PT IgG titers were plotted against time of sampling after onset of cough. Both acute- and convalescent-phase samples were plotted. Absolute levels, which are related to laboratory procedures, were not interpreted as such. Only relative differences were interpreted; these showed different responses for vaccinated and unvaccinated children. An anti-PT IgG rise occurred earlier and was briefer and lower in vaccinated children than in unvaccinated children. The same patterns were observed when the sample was restricted to positive bacteriological results or to titers higher than the minimum detectable limit (data not shown).

One consequence of this observation might be a misclassification bias in trials of vaccine efficacy when serologic decreases are not included in the case definition. Table 5 gives an illustration of this aspect. With reference to the first line, where children with 21 days of paroxysmal cough were confirmed as having pertussis according to WHO recommendations, the consideration of serologic decreases as a confirmation criterion lowered the absolute efficacy in the AC group. This modification was more marked when the epidemiological link was not included in the confirmation criteria.

## DISCUSSION

This study was based on data from the Senegal Pertussis Trial, and therefore the data were not collected specifically to address its objectives. Therefore, the design was not optimized

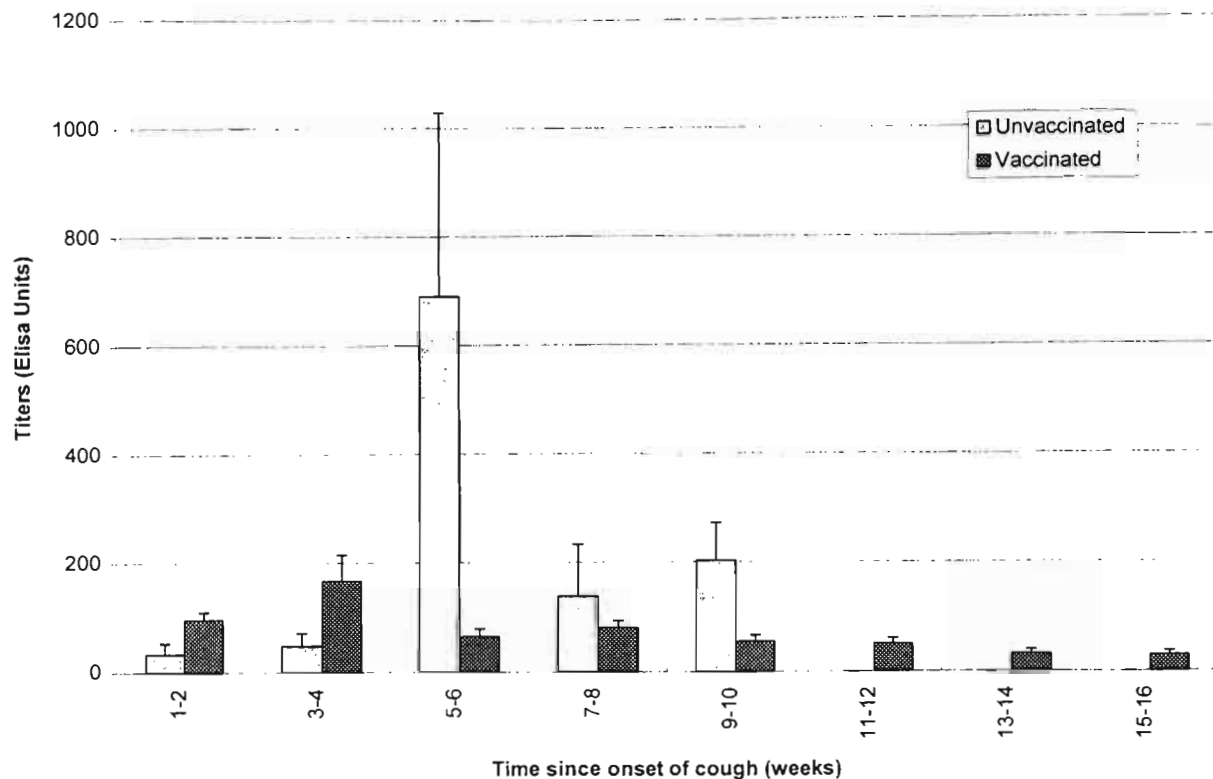


FIG. 1. Evolution of anti-PT IgG antibody titers after exposure to pertussis according to vaccination status. Values are shown as means ± standard errors.

for all aspects. For example, the group of nonvaccinated children was not as comparable to the vaccinated children as were the two groups of vaccine recipients, which had been randomized. Unvaccinated children were younger, before the age at vaccination, or their parents refused vaccination. Also, the study of the kinetics of antibodies lacked balance in terms of the sizes of the classes, as reflected by the standard deviation. However, the design of the trial was unique in providing serologic results within an active surveillance system, with a large number of suspected and confirmed cases of infection determined by other techniques, including the use of a large number of vaccinated patients. Also, serologic testing was performed in the same laboratory, according to standard procedures, and was blind to vaccination status. External quality assurance was performed through an international collaborative initiative, and our results fit well with those of the reference laboratory (7). Therefore, these results provide some insight into the high

proportion of decreases in antibodies in paired sera to PT and/or FHA. These decreases were observed over a wide span of time between the onset of cough and when the acute-phase sample was obtained, but with a marked positive trend over time of acute-phase sampling, associated with an inverse trend for increases in paired sera. These decreases were observed in children with pertussis confirmed by other laboratory-based methods or with typical clinical whooping cough. Furthermore, this observation is in agreement with that of a study reported recently from Sweden (5), in which the authors recommended considering decreases in antibodies for the diagnosis of pertussis. They stressed the importance of the timing of blood sampling with respect to the onset of cough, which may be insidious and reported late by parents. However, while this is also observed in our study, another important independent factor is the different kinetics of titer rises observed between vaccinated and unvaccinated children.

TABLE 5. Influence of interpretation of serological results on vaccine efficacy in children with 21 days of paroxysmal cough

Confirmation criteria <sup>a</sup>	Result for vaccine group:									Relative risk of pertussis in AC vs WC vaccine group
	No dose		AC			WC				
	No. of children	Incidence density	No. of children	Incidence density	AVE (%) <sup>b</sup>	No. of children	Incidence density	AVE (%)		
B+ or E+ or Si+ (WHO) <sup>c</sup>	15	0.039	41	0.013	67	16	0.005	87	2.6	
B+ or E+ or Si+ or Sd+	15	0.039	47	0.015	62	16	0.005	87	2.9	
B+ or Si+	13	0.033	23	0.007	78	10	0.003	90	2.4	
B+ or Si+ or Sd+	14	0.036	35	0.011	69	13	0.004	89	2.7	

<sup>a</sup> B+, bacteriology positive; E+, epidemiological link with a culture-confirmed case of infection; Si+, serologic increase; Sd+, serologic decrease.

<sup>b</sup> AVE, absolute vaccine efficacy.

<sup>c</sup> WHO recommended confirmation criteria.

Those results were observed in a rural population of a developing country, and they could be thought to express a particular antibody response due to such factors as low nutritional status, high general infectious background, and intense exposure to the diseases. This might well be true. However, study vaccines have been found to induce immunogenicity comparable to that in other settings (12), and a recent comprehensive study of the same population failed to show an impaired immune response among children (10). Decreases have also been observed in vaccine failures for measles (14). Thus, it is likely that our observation strengthened earlier ones (9, 13) and has general relevance.

These results suggest that decreases as well as increases might be taken as serologically positive diagnoses. This could have a major impact, since, in the present study, depending on whether or not decreases were taken into consideration for positive pertussis diagnoses for either PT or FHA (Table 1), the final positive results rose from 157 (34%) to 266 (58%) cases of infection.

In recent vaccine trials, judgments were based on cases of infection including not only bacteriology but also serology and epidemiological contact with a culture-confirmed case. Vaccine efficacy may be biased if the antibody response differs between vaccinated and unvaccinated children. Even when preacute-phase sera are available in specific settings or as part of research protocols in vaccine trials (2), this bias can be observed because of the rapid decline in the antibody response in vaccinated children. Thus, nonuse of decreases when absolute efficacy is being measured (i.e., when unvaccinated children are part of a trial) will cause an underestimation of cases of infection among vaccinated children and an overestimation of vaccine efficacy. Similarly, if two vaccines are to be compared, the relative vaccine efficacy could also be biased if the serologic responses between vaccine groups are not similar. This is not supported by our results for the vaccines under study. The magnitude of the bias depended on and was minimized by the proportion of cases confirmed by bacteriology or by epidemiological contact.

Our data suggest that vaccinated children have an earlier, lower, and briefer antibody response when the disease occurs. If the response to exposure among unvaccinated children is considered a primary immune response and the response among vaccinated children is considered a secondary immune response, the lower and briefer antibody response observed among vaccinated children is atypical. Comparable observations were reported for tetanus (4) and leishmaniasis (6). This "negative phase" may be related to an increase in the avidity of the antitoxin produced during maturation of the immune response. It may also reflect less-severe disease among vaccinated children, rather than temporary immunodeficiency associated with vaccine failure, and deserves further investigation.

In conclusion, this study supports an earlier recommendation that a significant decrease in PT or FHA should be added

to the diagnostic criteria. A differential antibody response in vaccinated and unvaccinated children was established, which should be considered in vaccine efficacy studies so as to avoid an overestimation of absolute vaccine efficacy.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Cadoz, Agnès Hoffenbach, Stanley Plotkin, and Jean-Loup Lemesre for help in reviewing the study.

The main study was funded by grant 728 from Pasteur Merieux Serums et Vaccins and by UR Maladies Infectieuses et Parasitaires, French Institute for Scientific Research for Development in Cooperation (ORSTOM). The Pasteur Institute contributed personnel and supplies.

#### REFERENCES

1. Granström, G., B. Wretling, C.-R. Salenstedt, and M. Granström. 1988. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1818-1823.
2. Gustafsson, L., H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter. 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* **334**:349-355.
3. Hallander, H. O., J. Storsaeter, and R. Möllby. 1991. Evaluation of serology and nasopharyngeal cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. *J. Infect. Dis.* **163**:1046-1054.
4. Ipsen, J. 1961. Changes in immunity and antitoxin level immediately after secondary stimulus with tetanus toxoid in rabbits. *J. Immunol.* **86**:50-54.
5. Isacson, J., B. Trollfors, G. Hedvall, J. Taranger, and G. Zackrisson. 1995. Response and decline of serum IgG antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and pertactin in children with pertussis. *Scand. J. Infect. Dis.* **27**:273-277.
6. Lemesre, J. L. Personal communication.
7. Lynn, F., G. F. Reed, and B. D. Meade. 1996. Collaborative study for the evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays used to measure human antibodies to *Bordetella pertussis* antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**:689-700.
8. Meade, B. D., G. Mink, and C. R. Manclark. 1990. Serodiagnosis of pertussis, p. 322-329. *In* Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis. Food and Drug Administration, Bethesda, Md.
9. Mertsola, J., O. Ruuskanen, T. Kuronen, and M. Viljanen. 1983. Serologic diagnosis of pertussis: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial agglutination. *J. Infect. Dis.* **147**:252-257.
10. Samb, B., H. Whittle, P. Aaby, A. M. Coll Seck, J. Bennett, L. Markowitz, P. Tamba Ngom, H. Zeller, K. F. Michaelsen, and F. Simondon. 1995. No evidence of long-term immunosuppression after high-titer Edmonston-Zagreb measles vaccination in Senegal. *J. Infect. Dis.* **171**:506-508.
11. Simondon, F., M. P. Preziosi, A. Yam, C. Toure Kane, L. Cbairand, I. Itehan, G. Sanden, S. Mboup, A. Hoffenbach, K. Knudsen, N. Guiso, S. Wassilak, and M. Cadoz. 1997. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* **15**:1606-1612.
12. Simondon, F., A. Yam, J. Y. Gagnepain, S. Wassilak, B. Danve, and M. Cadoz. 1996. Comparative study of the safety and immunogenicity of a DT-acellular pertussis and a DT-whole-cell pertussis vaccine in Senegalese infants. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:927-932.
13. Storsaeter, J., H. Hallander, C. P. Farrington, P. Olin, R. Möllby, and E. Miller. 1990. Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* **8**:457-461.
14. Whittle, H. Personal communication.
15. World Health Organization. 1991. WHO meeting on case definition of pertussis: Geneva, 10-11 January 1991. Issue no. MIN/EPI/PERT/91.1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

## 2.4 Influence de l'aspect composite du critère de jugement

**Article correspondant:** Simondon F, Khodja, H Capture-Recapture Method for Estimating Misclassification Errors : Application to the Measure of Vaccine Efficacy in Randomized Controlled Trials. *à paraître*.

**Introduction.** Nous avons vu dans la première partie en 1.2.3.3 la grande dépendance de l'estimation de l'efficacité vaccinale à un défaut de sensibilité et surtout de spécificité du critère de jugement. Les résultats d'efficacité sont, en matière de vaccins au moins, presque toujours interprétés comme si le critère de jugement avait une sensibilité et une spécificité de 100%. L'effort est entrepris au niveau de la conception du critère de jugement, pour que la définition des cas soit spécifique. Dans le cas de la coqueluche, la définition est une association entre un syndrome clinique, la toux quotidienne d'au moins 21 jours, et un critère de confirmation biologique, visant à garantir la spécificité. Pour les besoins des essais vaccinaux, la définition dite de l'OMS (OMS, 1991) a été retenue. Cette définition considère 3 critères de confirmation : la bactériologie, la sérologie, et le contact épidémiologique (le diagnostic par PCR, à cette date, n'était pas disponible). Nous avons renseigné systématiquement et indépendamment ces trois critères pour tous les enfants de l'étude ayant été des cas suspects (8 jours de toux au moins). Il devenait alors possible d'étudier les discordances entre ces critères, pour interpréter l'estimation donnée de l'efficacité vaccinale par rapport aux erreurs de classification possibles du critère de jugement. Nous avons proposé pour cette analyse la méthode dite de capture-recapture, en posant comme analogie que les trois différents critères de confirmation sont trois « listes » ou « sources » indépendantes. Le modèle log-linéaire a été utilisé.

**Résultats.** Le choix du modèle, qui est un élément important, a porté sur le modèle le plus simple ayant une bonne adéquation aux données. Il s'agit d'un modèle comprenant chacune des trois sources (bactériologie, sérologie, et contact épidémiologique), et un terme d'interaction

entre la bactériologie et le contact épidémiologique. Il a été estimé qu'au total 22% des cas ont été omis (92/412), cette proportion étant de 25% dans le groupe d'enfants ayant reçu le vaccin à germes entiers, et de 21% dans le groupe ayant reçu le vaccin acellulaire. Les résultats issus du modèle sont plausibles, en particulier le nombre corrigé de cas est inférieur au nombre de cas suspects détectés par la surveillance. Le risque relatif (l'efficacité relative) corrigé selon cette estimation est de 1,5, restant assez proche du risque brut de 1,59. Dans notre exemple, le même modèle est retenu pour chaque groupe de vaccins, ce qui suggère qu'il n'y a pas de biais différentiel de diagnostic entre les groupes vaccinaux.

La sensibilité des tests diagnostiques a pu être calculée par rapport à l'estimation issue du modèle de capture recapture. Par exemple pour la sérologie, cette sensibilité est basse, estimée à 21,6%.

Les études de type capture-recapture sont critiquées pour leur difficulté d'interprétation (Papoz *et al.*, 1995). Il nous semble que pour une part importante, ces critiques sont associées à la nature rétrospective des études conduites. Dans le cas particulier d'un essai clinique randomisé avec critère de jugement composite, les conditions d'application peuvent être satisfaites. Mais il est recommandé que lorsque c'est possible, ce type d'analyse de vérification soit prévu lors de la préparation de l'étude, sans restriction aux essais vaccinaux.

# Capture-Recapture Method for Estimating Misclassification Errors : Application to the Measure of Vaccine Efficacy in Randomized Controlled Trials.

FRANCOIS SIMONDON\* and HAYET KHODJA

Infectious Diseases Research Unit, Montpellier, France

**Background.** The measure of efficacy is optimally performed by randomized controlled trials. However, low specificity of the judgment criteria is known to bias toward lower estimation, while low sensitivity increases the required sample size. A common technique for ensuring good specificity without a drop in sensitivity is to use several diagnostic tests in parallel, with each of them being specific. This approach is similar to the more general situation of case counting from multiple data sources, and this paper explores the application of the capture-recapture method for the analysis of the estimates of efficacy.

**Method.** An illustration of this application is derived from a study on the efficacy of pertussis vaccines, where the outcome was based on 21 days of cough or more confirmed by at least one of three criteria performed independently for each subject : bacteriology, serology, or epidemiological link. Log-linear methods were applied to these data considered as three sources of information.

**Results.** The best model considered the three simple effects and an interaction term between bacteriology and epidemiological linkage. Among the 801 children experiencing at least 21 days of cough, it was estimated that 92 cases were missed, leading to a corrected total of 412 confirmed cases. The relative vaccine efficacy estimated from the same model was 1.50 (95 percent CI 1.24-1.82), similar to the crude estimate of 1.59 and confirming better protection afforded by one of the two vaccines.

**Conclusion.** This methods permits to perform supporting analysis to interpret primary estimates of vaccine efficacy with respect to misclassification.

**Key-words :** efficacy ; misclassification ; capture-recapture ; log linear models ; pertussis ; vaccine.

Randomized Controlled Trial (RCT) have been acknowledged as the methodology of reference for measuring the efficacy of a treatment or of an intervention.<sup>1</sup> The experimental structure allows for the comparability of the study groups, the unbiased measure of the outcome and pre-determined power, and thus for causal interpretation. The exposure factor (the treatment) is usually well defined and the investigator can determine to which group the subject belongs. Classification errors are therefore

minimized, or are known, as in intent-to-treat analysis.<sup>2</sup> However, the diagnostic bias - misclassification of the judgment criteria- is related to the quality of the case definition. It is well known<sup>3-5</sup> that low sensitivity increases the required sample size, while low specificity of the judgment criteria tends to bias toward lower estimation of the efficacy of the treatment. These so-called « dilution effects » may be of particular importance in equivalence studies, leading to

false conclusions of equivalence of treatments.<sup>6</sup>

Although use of a single judgment criteria has been recommended<sup>7</sup>, a common method for minimizing misclassification of the disease status is to repeat the test, or more often to simultaneously consider different markers of the disease, thus using a composite judgment criteria.<sup>8</sup> The basic idea is to obtain information on different diagnostic tests from the same subject for the same disease, with each of the tests being specific, thus improving sensitivity while at the same time preserving specificity.

This approach is similar to the more general situation of case-counting from multiple and incomplete data. The objective of the present study was to discuss the application of the capture-recapture method for interpreting estimates derived from such RCT, where the different components of diagnostic criteria are considered as multiple sources of information. An illustration is given by the application of this method to data from the Senegal Pertussis Trial.

## MATERIALS AND METHODS

### The Senegal pertussis trial

The development of acellular pertussis vaccines (AC) has followed concern about the safety and the efficacy of currently used whole-cell pertussis vaccines (WC). The aim of the trial in Senegal was to assess the relative safety and protective efficacy of an AC vaccine with reference to the WC vaccine routinely used in Senegal, and widely used in other Developing and European countries. Our study began in 1990 in Niakhar, a rural area of Senegal under demographic and epidemiological surveillance. The methodology and results of the study have been described elsewhere.<sup>9</sup> Briefly, the study population was comprised of eligible infants, ie, those born between February 1990 and April 1994, to mothers residing in the study area, and whose parents gave

their consent for participation. Inclusion criteria consisted of no previous history of pertussis, no previous pertussis vaccination and no severe or chronic disease.

The two vaccines were compared for equivalence according to the classical approach of the double blind randomized trial. A total of 3,619 children received either the AC (1,847) or the WC (1,772) vaccine at two, four and six months of age. Surveillance for the detection of suspected pertussis was performed by field workers on weekly visits to each compound in the study area. Each suspected case (7 days of daily cough) was visited by a physician and sampled for bacteriology and serology.

Bacteriological confirmation was based on identification of colonies by morphology, Gram staining, oxidase and urease reactions and direct immunofluorescence. Serologic confirmation was based on a two fold rise in antibody titers between acute and convalescent serum by enzyme-linked immunosorbent assay.

The protocol case definition of pertussis included all children with at least 21 days of cough and confirmed by either a positive bacteriologic result, a positive serologic result or epidemiological linkage (Epilink). Epilink was defined as a child who had been in contact, within a compound, with another culture-confirmed child, and who started coughing within 28 days before or after the onset of illness in the culture-confirmed child.

This case definition was very similar to the pertussis case definition for vaccine trials endorsed by the World Health Organization after the trial had begun.<sup>10</sup> The difference concerned the type of cough, which was restricted to paroxysmal cough in the latter definition. 320 pertussis cases were identified by the protocol definition case, 197 in the AC group and 123 in the WC one.

The crude relative efficacy, based on the ratio of pertussis incidence density of the AC group compared to the WC group ( $RR_{AC/WC}$ ) was 1.59 (95 percent CI 1.27-1.99), indicating lower protection provided by the acellular vaccine.

#### Capture-Recapture methodology

The capture-recapture method, derived from its original application in the field of animal ecology, has been proposed and used in epidemiology to evaluate the completeness of registries or to correct case counting. It is based on the analysis of multiple and incomplete data sources.<sup>11-12</sup> Four distinct conditions of application are usually found as 1) the sources should be independent ; 2) the population is closed, so the probability of identification is constant during the study ; 3) the probability of identification within any source is equal for all individuals; 4) all identified individuals belong to the study population. The introduction of log-linear methods allowed to adjust for source dependencies when data are available from three or more sources.<sup>13</sup> However, these conditions are still very restrictive and limit the application of this method.<sup>14</sup>

In our proposed application, where the different components of the diagnostic criteria were considered as multiple sources of information, conditions were met. The independence of the sources, which is the major practical condition, was expected, since the diagnostic tests were systematically and independently performed for each suspected case. The analysis was based on the use of the log linear model<sup>13</sup> with BMDP 4F.<sup>15</sup> The goodness-of-fit of the log linear model was tested by the likelihood ratio statistic ( $G^2$ ) and the Pearson goodness of fit chi square statistic ( $\chi^2$ ). For a particular log linear model, if the p values were higher than the level of significance, then the model was considered to satisfactorily fit the data. Finally, the model

selected was the simplest among those with satisfactory fit.<sup>12</sup> A stepwise method was used to confirm the choice.

The estimates of CI for the number of missed cases were based on the likelihood ratio statistic with application of iterative processes.<sup>12,16</sup> CI for the corrected  $RR_{AC/WC}$  was calculated under the assumption that person-years at risk were unchanged. Also, the additional variance introduced by the use of log-linear models in the estimates of pertussis cases was not considered, and it is acknowledged that the estimated CI may be too narrow.<sup>17</sup>

## RESULTS

Results are first presented concerning all participating children, and thereafter by vaccine group.

Among the 801 children experiencing at least 21 days of cough, 320 were defined as confirmed pertussis cases (8.8% of the population). They were confirmed by the combination of the three different sources (Table 1). Not all cases were detected in each of the three sources.

The choice of the model seemed unambiguous (Table 2) : only three models had satisfactory fit at the 0.05 level of significance (S, BE ; BS, BE ; SE, BS, BE). The simplest one was the S, BE model with the three simple effects : bacteriology, serology, epilink, and an interaction term between bacteriology and epilink. Using this model, 92 infants were missed, leading to a corrected total of 412 affected children (95 percent CI 375-465). Subsequently, the corrected proportion of affected infants, calculated from the size of total vaccinated infants (Table 3), increased to 11.3% (95 percent CI 10.3%-12.8%).

It was also possible to compute the sensitivity of the diagnostic tests against the capture-recapture corrected estimate. As an example, the sensitivity of the bacteriological test against



serology was 28.3% and against epilink it was 26.5%. It decreased to 21.6% against the capture-recapture estimate.

#### Comparison of vaccines

For each vaccine group, the same S, BE model was the best fitting one, with corresponding estimates (Table 3). Corrected relative efficacy  $RR_{AC/WC}$  was 1.50 (95 percent CI 1.24-1.82), close to the crude estimate of 1.59 from the primary analysis.

## DISCUSSION

Several attempts at correcting estimates for misclassification effects based on different methodologies have been reported.<sup>18-21</sup> As far as we know, the capture-recapture method has not been previously applied. The conditions of application of this method were satisfied in relation to the experimental design of RCT. Each of the three tests was performed independently for every suspect case. However, the interaction term between bacteriology and epilink retained in the best fitted model express some degree of dependency between these two sources in the population, and account for it. The selection of the best model is a major question and in our example, the use of the Akaike information criteria, which has been shown to be preferable<sup>22</sup>, has been tested and led to similar results.

A substantial number of missed cases (n=92) was ascertained by the capture-recapture method, leading to a total of 412 confirmed cases. This estimate is still lower than the potential number of cases found by the surveillance (n=801). These missed cases are not identifiable, and consequently they cannot be included for subsequent analysis, such as adjustment for confounding. This under-ascertainment is biologically plausible, particularly among vaccinated children. Culture of the organism lack sensitivity<sup>10</sup>, as well as serology<sup>23</sup> and epilink, which depends on bacteriology of vaccinated contacts.

An implicit assumption was that each of the diagnostic tests was 100% specific. This may not necessarily be true. However this assumption also belongs to the classical analysis and to other correction attempts.<sup>24</sup>

The sensitivity of each of the sources can be computed against the capture-recapture estimate. It can be shown that derived sensitivity, as based on the assumption of 100% specificity, is underestimated.<sup>24</sup>

The point estimate of relative efficacy was nearly unchanged. This is not surprising, as the same model fit best in both vaccine groups. This suggests that there is no differential diagnostic bias between vaccine groups, and is an important finding per se. If the best fit was to be found for two different models for two treatments groups, this might suggest a differential diagnosis bias, and might correct it. This may be observed in studies of absolute vaccine efficacy, where the serological test was found to behave differently in unvaccinated and vaccinated children.<sup>23</sup>

The application of the capture-recapture method can be recommended as supporting analysis to interpret primary estimates of vaccine efficacy with respect to misclassification. When relevant, it should be taken into account in the preparation of trials, in order to ensure that several diagnostic tests are performed systematically and independently for the same subject.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to L. Papoz and K. Simondon, who commented on our paper before submission

## REFERENCES

- 1-Last JM. A dictionary of epidemiology. New York : Oxford University Press, 1995.
- 2-Mc Mahon B, Pugh TF. Epidemiology, Principles and Methods. Boston : Little, Brown and Company, 1970.
- 3-Rothman KJ. Modern epidemiology. Boston : Little, Brown and Company, 1986.

- 4-Radhakrishna S, Nair NGK., Jayabal P. Implications of misdiagnosis in field trials of vaccines. India J Med Res 1984;80:711-20.
- 5-Fine PEM, Clarkson JA. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. Rev Infect Dis 1987; 866-83.
- 6-Biostatistical methodology in clinical trials in applications for marketing authorizations for medicinal products. CPMP Working Party on Efficacy of Medicinal Products. Statistics in medicine 1995;14 :1659-82.
- 7-Meinert CL. Clinical trials, Design, Conduct, and Analysis. New York : Oxford University press, 1986.
- 8-Walter SD, Irwig LM. Estimation of test errors rates disease prevalence and relative risk from misclassified data : a review. J Clin Epidemiol 1988;41 :923-37.
- 9-Simondon F, Preziosi M, Yam A et al. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. Vaccine, 1997 : 15, 1606-12.
- 10-WHO meeting on case definition of pertussis : Geneva,10-11 January 1991. Geneva ; World Health Organization, 1991 :4-5.
- 11-McCarty DJ, Tull ES, Moy CS, Kwoh CK, Laporte RE. Ascertainment Corrected Rates : Applications of Capture-Recapture Methods. Int J Epidemiol 1983;22 :559-65.
- 12-Hook EB., Regal RR. Capture-Recapture Methods in Epidemiology : Methods and Limitations. Epidemiologic Reviews 1995;17 :243-63.
- 13-Fienberg SE. The multiple recapture census for closed populations and incomplete  $2^k$  contingency tables. Biometrika 1972;59 :591-603.
- 14-Papoz L, Balkau B, Lellouch J. Case Counting in Epidemiology : Limitations of Methods Based on Multiple Data Sources. Int J Epidemiol 1996;25:474-78.
- 15-Dixon WJ. BMDP Statistical Software Manual. University of California Press, 1992:293-328.
- 16-Regal RR., Hook EB. Goodness-of-fit based confidence intervals for estimates of the size of a closed population. Statistics In Medicine 1984;3:287-91.
- 17-Hilden J. Ascertainment Corrected Rates : Applications of Capture-Recapture Methods. Int J Epidemiol 1994 ;23 :865-66.
- 18-Wacholder S, Armstrong B, Hartge P. Validation Studies using an Alloyed Gold Standard. Am J Epidemiol 1993 ;137 :1251-58.
- 19-Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian Estimation of Disease Prevalence and the Parameters of Diagnostic Tests in the Absence of a Gold Standard. Am J Epidemiol 1995,141 :263-71.
- 20-Bertrand P, Benichou J, Chastang C . Estimation par la méthode de Hui et Walter de la sensibilité et la spécificité d'un test diagnostique en l'absence d'un test de référence : résultats d'une étude de simulation. Rev Epidém et Santé Publ 1994;42 :502-11.
- 21-Begg CB, Greenes RA. Assessment of Diagnostic Tests When Disease Verification is Subject to Selection Bias. Biometrics 1983;39 :207-15.
- 22-Hook EB., Regal RR. Validity of Methods for Model Selection, Weighting for Model Uncertainty, and Small Sample Adjustment in Capture-Recapture Estimation. Am J Epidemiol 1997 ;145 :1138-44.
- 23-Simondon F, Iteaman I, Preziosi MP, Yam A, Guiso N. Evaluation of an Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Diagnoses of Pertussis in Senegal. Clin Diag Lab Immun. 1998 ;5 in Press
- 24-Goldberg JD. The effects of misclassification on the bias in the difference between two proportions and the relative odds in the fourfold table. Am Stat Assoc 1975;70 :561-67.

TABLE 1. Results of three different tests (+ denotes positive response, - denotes negative response) for 320 infants

<u>Epilink</u>	<u>Bacteriology</u>	<u>Serology</u>	<u>Number of infants</u>
+	+	+	26
+	+	-	46
+	-	+	44
+	-	-	155
-	+	+	4
-	+	-	13
-	-	+	32
-	-	-	?

TABLE 2. Choice of the three-way log linear model in which indices are Bacteriology (B), Serology (S) and Epilink (E)

Model	df*	G <sup>2</sup> †	p †	χ <sup>2</sup> †	p †
B.	5	158.66	0.0000	164.25	0.0000
S.	5	196.53	0.0000	186.64	0.0000
E.	5	159	0.0000	178.42	0.0000
B, S.	4	46.78	0.0000	49.19	0.0000
S, E.	4	109.20	0.0000	118.05	0.0000
E, B.	4	77.15	0.0000	71.76	0.0000
B, S, E.	3	13.54	0.0000	13.62	0.0035
BS.	3	39.50	0.0000	36.49	0.0000
BE.	3	76.25	0.0000	72.23	0.0000
SE.	3	91.89	0.0000	85.52	0.0000
B, SE. <sup>§</sup>	2	9.91	0.0071	9.74	0.0077
S, BE. <sup>§</sup>	2	5.23	0.0733	5.47	0.0648
E, BS. <sup>§</sup>	2	11.49	0.0032	11.11	0.0039
BS, BE. <sup>§</sup>	1	1.02	0.3121	0.97	0.3236
BE, SE. <sup>§</sup>	1	5.18	0.0228	5.41	0.0200
SE, BS. <sup>§</sup>	1	8.83	0.0030	7.94	0.0048
SE, BS, BE. <sup>§</sup>	0	0.00	1.0000	0.00	1.0000

\* df, degree of freedom ; † G<sup>2</sup>, likelihood ratio statistic ; p, p-value,

† χ<sup>2</sup>, Pearson chi-square statistic, p, p-value

<sup>§</sup> The higher order effect of the hierarchical model contains all lower-order effects that are included in the higher effect.

TABLE 3. Estimates of the missed infants for the total population and for each group. Derived estimates of the percent failure rates of vaccines

	Total population	Whole Cell	Acellular
Subjects affected	320	123	197
Subjects missed	92	41	52
95% IC	55-146	18-85	27-92
Total affected subjects	412	164	249
95% IC	375-465	141-208	224-289
% Failure rates	11.3	9.2	13.4
95% IC	10.3-12.8	7.9-11.7	12.1-15.6

## 2.5 Aspects pratiques du consentement informé pour la participation

**Article correspondant:** Preziosi M.P., Wassilak S., Yam A., Ndiaye M., Simaga A., and Simondon F. Practical experience in obtaining informed consent for a vaccine trial in rural Africa. *New England Journal of Medicine*, 1997, 336,5,370-373

**Introduction.** Les études rapportées ci-dessus, pour leur étape de terrain, se sont déroulées de 1989 à 1995. Pendant cette période, il y a eu une évolution constante des recommandations et de la législation en matière d'éthique de la recherche biomédicale, et des bonnes pratiques cliniques. En France, la législation a changé, avec le vote de la loi Huriet, et la mise en place des Comités Consultatifs pour la Protection des personnes se livrant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB). Les recherches menées par des français à l'étranger n'étaient pas prises en compte. En 1991, l'avis N° 41 du Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE) a laissé espérer la mise en place rapide d'un CCPPRB spécialisé dans les recherches menées dans les pays en développement. Ceci ne s'est toujours pas réalisé et a pu contribuer au blocage de certaines initiatives institutionnelles. Les recommandations européennes aussi évoluent, comme les recommandations internationales, vers plus de précision et d'internationalisation. Pour le domaine précis des recherches menées dans les pays en développement, il est stipulé que les protocoles de recherches parrainées de l'extérieur, où menées par des investigateurs venant de pays industrialisés, doivent satisfaire aux exigences du pays d'origine. Dans notre cas, il s'agissait donc de la France, sans possibilité de recours officiel à un CCPPRB. Cependant, les institutions françaises ayant leur activités de recherche principalement en France, comme l'INSERM ou les universités, et étant en rapport avec le CCPPRB régional pour d'autres études, ont pu aussi bénéficier d'un avis pour les recherches menées hors de France. Cela a été le cas, et est la règle, pour les études sur le Sida réalisées sous les auspices de l'ANRS (Dabis, communication personnelle, Delaporte, communication personnelle). Pour les études réalisées

par l'ORSTOM, dont les protocoles de recherche clinique ou épidémiologiques se déroulent exclusivement dans les Pays en Développement, il n'y a pas eu ce recours, et il a été fait appel à des comités étrangers (CDC, NIH, ou MRC pour la rougeole). Un point particulier a fait l'objet de discussions animées, qui est celui du consentement informé. Les recommandations internationales stipulaient que le consentement informé pouvait dans certains pays en développement être obtenu au niveau des groupes, lorsque traditionnellement la prise de décision se faisait au niveau de la société. Dans sa révision de 1993, le Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) recommande que tous les efforts soient faits pour que le consentement informé soit obtenu au niveau individuel. Les contraintes des co-investigateurs de pays différents tendaient aussi à instaurer cette pratique, même si la littérature sur le sujet était controversée, entre les universalistes et les tenants du respect des coutumes sociales. Devant cette situation, nous avons fait évoluer de manière progressive le mode d'information de la population, juxtaposant information collective et information individuelle, pour parvenir à la mise en place d'un consentement individuel pour la participation. Cet aspect est rapporté dans l'article ci-joint.

**Résultat.** Nous avons acquis la conviction que la pratique du consentement individuel pour la participation était réalisable, qu'elle nécessite un réel investissement, en particulier pour l'information, et qu'elle est acceptée par la population. Les refus de participation aux essais existent. Il nous a semblé qu'une bonne information s'accompagnait d'une bonne participation. Enfin, nous avons perçu une différence culturelle par rapport à la perception des risques. En milieu européen, la décision de l'acceptation de la participation à une étude sur un vaccin prend en compte un risque lié à la nouveauté du produit, et est un acte de « solidarité général ». Dans le milieu rural africain, où chaque mère a encore l'expérience d'un décès par rougeole ou par

coqueluche d'un de ses propres enfants ou d'un membre proche de la famille, le risque lié à la maladie prévaut sur le risque lié à la nouveauté.

**Discussion.** Cet aspect du consentement informé nous a intéressé car il a nécessité une réflexion particulière, liée à des facteurs géographiques et temporels. Au niveau géographique, l'étude a été menée dans un milieu rural africain, par une équipe de culture et de nationalités différentes (Sénégal, France, USA, Danemark), relevant d'institutions différentes (cf. article), donc de réglementations ou de législations différentes. Au niveau temporel, l'étude ayant été très longue, ces législations ou réglementations ont changé. L'accord entre ces diversités se fait sur les principes généraux, universels, comme la déclaration d'Helsinki par exemple. Il nécessite un travail concret d'information, de documentation, de réflexion, qui ne se limite pas à l'aspect du consentement informé relaté ici. Les problèmes éthiques posés par le choix du groupe de référence, et les implications de la déclaration d'Helsinki sur le caractère universel du meilleur traitement de référence ont été récemment discutés (Angell, 1997 ; Lurie et Wolfe, 1997 ; Varmus et Satcher, 1997 ; Aaby *et al.*, 1997) et avaient été discutés pour les différentes études sur les vaccins acellulaires contre la coqueluche à propos des différents groupes de référence utilisés (cf. infra). En 1991, il avait été proposé à l'équipe d'investigateurs du Sénégal de substituer au vaccin de référence retenu, et déjà utilisé, le vaccin à germes entiers utilisé en routine aux USA et retenu pour des études en Suède et en Italie. Ce changement n'a pas été retenu, notamment du fait de la réflexion éthique en cours au niveau de l'équipe, et malgré le gain évident de comparabilité possible avec ces études majeures. Cet aspect sera repris au niveau de la discussion.



## PRACTICAL EXPERIENCES IN OBTAINING INFORMED CONSENT FOR A VACCINE TRIAL IN RURAL AFRICA

THE Helsinki Declaration outlines clear ethical principles, including the basic concepts of informed consent, for physicians conducting biomedical research. There are guidelines for applying those principles specifically in research conducted in developing countries.<sup>1-4</sup> One guideline allows a community-based approach to enrollment, according to which the decision whether or not to participate can be elicited through an intermediary, such as a trusted community leader, who helps convey information about the research to the people in the community.<sup>1</sup>

There is considerable debate about the appropriateness of obtaining individual informed consent in non-Western cultures.<sup>5-8</sup> In the process of conducting a study of a new pertussis vaccine in a rural community in Senegal, we sought to evaluate the incorporation of clear procedures for obtaining individual informed consent from parents. In this part of Senegal, consent for all previous research with human subjects had been obtained from community leaders on behalf of all eligible members of the community. Individuals could subsequently decline to participate.

### METHODS

Since 1983, the Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) had conducted a longitudinal follow-up of Niakhar, a farming area in Senegal that had 26,045 residents in January 1992. Extended families live grouped in 1800 compounds, each under the authority of an elder. Compounds are grouped in 30 villages, led by elected chiefs. In this stable and ethnically homogenous Sereer (a Senegalese ethnic group) community, composed almost exclusively of millet and peanut farmers and their families, responsibility for the health of children is generally delegated to the mothers. The average per capita annual income is equivalent to \$100. The literacy rates are 30 percent for men and 10 percent for women. The fertility rate is 7.8 children per woman 15 to 45 years of age; infant mortality is 80 per 1000.

When the Expanded Programme of Immunization (EPI) was launched in Senegal in 1987, ORSTOM began a clinical trial of measles vaccine in Niakhar that lasted until 1989.<sup>9</sup> Since 1987, ORSTOM, on behalf of EPI, has held a vaccination session each month in three community clinics. Field workers visit all compounds in advance to request that all children eligible for a given vaccine dose attend. Transportation to the clinics is provided.

Pertussis is highly endemic in Niakhar. Questions about the safety and efficacy of the whole-cell pertussis vaccines that are currently used led us to evaluate a safer, acellular, vaccine in Niakhar. From May 1990 through September 1995, we conducted a randomized, double-blind controlled trial of the relative efficacy of a diphtheria-tetanus-acellular-pertussis vaccine (glutaraldehyde-detoxified pertussis toxin and native filamentous hemagglutinin)

and a whole-cell diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccine after studying the safety and immunogenicity of both vaccines.<sup>10</sup> Infants were randomly assigned to receive three doses of one of the vaccines at two, four, and six months of age. The study showed that both vaccines were highly efficacious. The whole-cell vaccine was more efficacious (96 percent) than the acellular vaccine (86 percent), but the acellular vaccine was safer.<sup>11</sup> The collaborative study was reviewed initially and then annually by the Human Subjects Institutional Review Board of the Centers for Disease Control and Prevention; such boards did not exist in Senegal and France in 1990. Before the trial began, village chiefs were informed of the study by a field physician. In 1992, an information campaign was launched and individual consent procedures initiated, after a reconsideration of the issue based on the recommendations of the institutional review board, an increase in staff, and debate on this topic in the medical literature.

Between April and September 1992, meetings were held by the field staff and physicians in each village to provide information and obtain consensus. All residents were invited. Presentations were given simultaneously in Sereer and in French translated to Sereer; the Sereer text had previously been verified by back-translation. Each presentation included a review of the activities of ORSTOM in the study area, information about vaccination, and a description of the study, as required by French law.<sup>12,13</sup> To illustrate the principle of randomization and the possibility that one of the vaccines might fail, the presenters used a familiar agricultural example: the evaluation of fertilizers or of seed varieties on randomized plots, a procedure familiar to farmers in the area.

In August 1992, we began to inform the mothers further and to give them a distinct opportunity to refuse to participate. During one vaccination session, a pilot evaluation of the feasibility of obtaining individual oral informed consent was conducted. Subsequently, a physician fluent in Sereer routinely presented the information at each monthly vaccination session and recorded the mothers' answers as witnessed by the vaccination nurse. From that point until the last vaccination in the study, the mother of each child eligible for inclusion in the vaccine study was asked whether she had been informed about it and if so how. If she had not, the study was explained to her fully as described above. The mother then decided whether or not to participate. Throughout the study, whole-cell DTP-poliovirus vaccine was available for the infants of mothers who declined to be included in the study or to have subsequent doses administered. The interventions were evaluated through August 1994 to determine the feasibility and validity of seeking individual informed consent.

### RESULTS

#### Group Meetings

Of 13,555 residents 15 years of age or older, 2607 (19.2 percent) attended at least 1 of the 30 meetings (Table 1). Of the 1800 compounds in which the residents lived, 1053 (58.5 percent) were represented. Participation was lowest in three of the largest villages (those with more than 600 residents). At the meetings, both male and female attendees emphasized the need for research to bring about changes and made comparisons with the evolution of agriculture. They discussed the lack of such consensus meetings before the study began. The residents' questions indicated their difficulty in understanding the concept of a double-blind study: participants wanted to choose one of the vaccines for their children or at least to know which vaccine was given in order to be able to make their own judgments about both vaccines.

OCCASIONAL NOTES

**TABLE 1. NUMBERS OF RESIDENTS 15 YEARS OF AGE OR OLDER WHO ATTENDED VILLAGE MEETINGS ABOUT A VACCINE STUDY IN NIAKHAR, SENEGAL, 1992.**

	WOMEN	MEN	TOTAL	COMPOUNDS
Total no.	7091	6464	13,555	1800
No. attending	1480	1127	2,607	1053
Proportion (%)				
Mean	20.9	17.4	19.2	58.5
Range among villages	4.7-69.2	4.4-64.0	5.0-60.0	23.7-100

**TABLE 2. KNOWLEDGE ABOUT THE VACCINE STUDY AMONG MOTHERS BRINGING THEIR CHILDREN FOR VACCINATION IN NIAKHAR, SENEGAL, AUGUST 1992 THROUGH AUGUST 1994.**

MOTHERS	TOTAL	INFORMED	INFORMED	NOT
		AT A GROUP MEETING	BY A THIRD PERSON	PREVIOUSLY INFORMED
number (percent)				
In the study	2071*	479 (23.1)	191 (9.2)	1401 (67.6)
Agreeing to participate	2040	471 (23.1)	188 (9.2)	1381 (67.7)†
Declining to participate	31	8 (25.8)	3 (9.7)	20 (64.5)
Monthly proportion (range)		10.9-32.6%	0-27.0%	48.0-82.4%

\*The 2071 mothers included 22 who were offered a choice more than once — 12 with twins and 10 with a second child who was born during the time period of the study.

†Two mothers deferred consent until they had obtained the father's opinion.

Summary comments reflected agreement in principle to vaccination and to the participation of children in the study. Community members reiterated their trust in the research team; several noted that refusals to participate would always occur. In one village, attendees unsuccessfully offered to participate in exchange for milk and butter.

**Individual Informed Consent**

During the pilot test of obtaining individual informed consent for their children's participation, some women said they were confused by being asked to give their consent, which they believed they had already done during the meeting. Many mothers asked which pertussis vaccine their children were to receive and why the study was blinded. Of 55 women in the pilot session, 50 consented to the inclusion of their children in the study, stating as primary reasons that they trusted the research team or wished to do as others did; 4 women declined to have their children included, and 1 woman waited to see whether her husband would give his consent (he did).

After informed-consent procedures became routine, no further concern was voiced about the indi-

vidual requests for consent. The majority of the mothers who attended the monthly vaccination sessions indicated that they did not know the details of the study (Table 2). The predominant reason for not participating remained the same — a preference that children receive the routine whole-cell DTP vaccine. In general, the mothers expressed more concern about the overall side effects of the study vaccines than about their efficacy. They noted that pertussis, when it occurs, has been less severe since the initiation of DTP vaccination; it now appears as a "prolonged cold" with shorter paroxysms of coughing and is rarely associated with vomiting.

Participation in the vaccination study before the implementation of individual informed consent (May 1990 to July 1992) was compared with that in the period after the policy change (August 1992 to August 1994). In the former period, when 2343 mothers were approached, refusal of vaccination, which consisted of not taking one's child to the clinic for vaccination, averaged 7.4 percent (46 of 620 eligible children) during 1990 (monthly range, 3.8 to 10.9 percent) and 4.5 percent (78 of 1723) thereafter (monthly range, 1.0 to 8.2 percent). In the period after routine individual informed consent was introduced, 2163 mothers were approached and the overall rate of refusal of the first vaccine dose was 4.9 percent (107 of 2163 eligible children; monthly range, 1.0 to 10.7 percent); 3.5 percent (76 of 2163) were "no-shows." Among the mothers of children attending the clinic sessions, the rate of refusal was 1.5 percent (31 of 2071). Of the 2071 mothers, 85 (4.1 percent) were under the age of 18 years; their consent was considered valid on behalf of their children. In each village, there were mothers who brought their children to the clinics but declined enrollment in the study. However, a high frequency of "no-shows" was limited to a few specific villages. Of the children whose mothers declined participation in the study, 93.5 percent (29 of 31) were subsequently fully vaccinated with EPI vaccines, as compared with 6.0 percent of the "no-shows" (12 of 200) since the beginning of the study.

Among the mothers who gave their consent, there were no instances of later refusal to continue participation in the study. However, there was a stable rate of "no-shows" for the second and third doses of any DTP vaccine — an average of 1.3 percent of the eligible children (56 of 4276). Most such children lived in the same villages as those who did not appear for the first DTP dose. Only 28.6 percent of these children (16 of 56) received a DTP dose elsewhere afterward, and fewer than half completed their immunizations.

**DISCUSSION**

Is it appropriate to obtain informed consent individually from mothers of children eligible for studies

in cultures where such choices are uncommon? Some members of our study team who are native residents of rural and urban Senegal were resistant to the idea; our discussions echoed the divergent conclusions reached in the medical literature.<sup>5,6</sup>

Our experiences indicate that the parents understood the study sufficiently to make informed choices. During the meetings, comments by community residents emphasized their understanding of the principles of the vaccine study after these principles were illustrated with better-known examples drawn from agriculture. Informed refusals occurred at both the group consensus meetings and during the individual-consent process. Mothers often declined to include their children because they had "chosen" the well-known EPI vaccines. An "informed refusal" has been considered a sign of full understanding that there is a choice.<sup>14</sup> At the community level, refusal to attend the clinics for immunization was partly replaced, after the group meetings, by refusal to be included in the study. This increased acceptance of vaccination overall suggests an effect of the informational sessions, which included observation by parents of the reduced frequency and severity of clinical pertussis in children who have been vaccinated.

Communicating information about a choice and its implications can be difficult and time-consuming, but it allows valid, informed decisions.<sup>5</sup> We found that widespread illiteracy is not a barrier to comprehension, especially since informed consent is more an interactive process than one that depends on reading.<sup>6</sup> Nonetheless, understanding abstract scientific concepts, such as double-blinding, can be difficult.

Mothers knew of deaths among children due to measles or pertussis, and people in general saw vaccination as providing a benefit that was much greater than the associated risk. The perception of the risk associated with the disease might offset the perception of the risk associated with a new vaccine.<sup>15</sup> Further sociological studies as performed in other settings could allow a better evaluation of the information received and its use in decision making.<sup>16-19</sup>

Information about a study should be provided before individual consent is sought.<sup>20</sup> Within the Niakhar community, general information circulated widely after the consensus meetings and allowed the study to be described more easily to individual mothers, despite the low percentage of well-informed mothers at the time of the first vaccination. Such communication allows decision making to take place over time.<sup>21</sup> In addition, the meetings provided each mother an opportunity to make an individual choice for her child within the context of community consensus, which is consistent with the social organization in Niakhar. Furthermore, the community discussions indicated a common concern about health problems and a perception of research as an element

of progress and of social benefit that people wished to have access to. Similar sentiments have been expressed in other settings.<sup>22</sup>

Of necessity, our protocol was reviewed by only one ethics committee, located outside the country. A local ethical review by persons not associated with the study is still necessary.<sup>7,23</sup> Biomedical research in developing countries is best served by a system of ethical review that is shared by both local and sponsoring committees.<sup>22</sup> Subsequent research in Niakhar has been conducted after review of the protocols by locally constituted ad hoc committees.

Address reprint requests to Dr. Préziosi at Projet Niakhar, ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Senegal.

This trial was cofinanced by the Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Paris, and by Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, Marnes la Coquette, France. The institutions of co-investigators — Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal; the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta; and the Pasteur Institute, Paris — contributed personnel and supplies.

*We are indebted to the members of the team of the Niakhar Project for their determined participation in this work, and to Dr. Michel Cadoz (Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, Marnes la Coquette, France) and Dr. Carlton Meschievitz (Connaught Laboratories Inc., Swiftwater, Pa.) for their advice.*

MARIE-PIERRE PRÉZIOSI, M.D.

ABLAYE YAM, M.D.

MALICK NDIAYE, M.D.

AMINATA SIMAGA, M.D.

FRANÇOIS SIMONDON, M.D.

Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération  
Dakar, Senegal

STEVEN G.F. WASSILAK, M.D.

Centers for Disease Control and Prevention  
Atlanta, GA 30333

## REFERENCES

1. Proposed international guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva: World Health Organization and the Council for International Organizations of Medical Sciences, 1982.
2. International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva: World Health Organization and the Council for International Organizations of Medical Sciences, 1993.
3. Division of Drug Management and Policies. WHO guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products. Geneva: World Health Organization, 1993.
4. La coopération dans le domaine de la recherche biomédicale entre équipes françaises et équipes de pays en voie de développement économique. No. 41. Paris: Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé, December 18, 1993.
5. Ijsselmuiden CB, Faden RR. Research and informed consent in Africa — another look. *N Engl J Med* 1992;326:830-4.
6. Levine RJ. Informed consent: some challenges to the universal validity of the Western model. *Law Med Health Care* 1991;19:207-13.
7. Angell M. Ethical imperialism? Ethics in international collaborative clinical research. *N Engl J Med* 1988;319:1081-3.
8. Barry M. Ethical considerations of human investigation in developing countries — the AIDS dilemma. *N Engl J Med* 1988;319:1083-6.
9. Aaby P, Samb B, Simondon F, et al. Divergent mortality for male and female recipients of low-titer and high-titer measles vaccines in rural Senegal. *Am J Epidemiol* 1993;138:746-55.
10. Simondon F, Yam A, Gagnepain JY, et al. Pilot study of the safety and

immunogenicity of a 2 component acellular DTP (aDTP) and a whole cell DTP (wDTP) vaccine in Senegalese infants in preparation of a comparative efficacy trial. In: Program and abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Orlando, Fla., October 4-7, 1994. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994:188.

11. International Symposium on Pertussis Vaccine Trials, Rome, October 30-November 1, 1995: trial synopses. Rome: Istituto Superiore di Sanità, 1995.

12. Loi no. 88-1138 du 20 Décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales. Art. L.209-9 (modified). Book II bis. Journal Officiel de la République Française: Lois et Décrets. December 22, 1988.

13. Art. L.209-9 (modified). Codes de la Santé Publique de la Famille et de l'Aide Sociale. Paris: Dalloz, 1991:105.

14. Spaeth GL. Informed choice, not informed consent. Ophthalmic Surg 1992;23:648-9.

15. Freeman TR, Bass MJ. Determinants of maternal tolerance of vaccine-related risks. Fam Pract 1992;9:36-41.

16. Lynöe N, Sandlund M, Dahlqvist G, Jacobsson L. Informed consent: study of quality of information given to participants in a clinical trial. BMJ 1991;303:610-3.

17. Simel DL, Feussner JR. A randomized controlled trial comparing quantitative informed consent formats. J Clin Epidemiol 1991;44:771-7.

18. Hoffmaster B. Can ethnography save the life of medical ethics? Soc Sci Med 1992;35:1421-31.

19. Singer PA, Siegler M, Pellegrino ED. Research in clinical ethics. J Clin Ethics 1990;1(2):95-9.

20. Dickens BM. Issues in preparing ethical guidelines for epidemiological studies. Law Med Health Care 1991;19:175-83.

21. Meisel A. Informed consent. Arthritis Rheum 1992;35:1264-6.

22. Miller J. Ethical standards for human subject research in developing countries. IRB 1992;14:7-8.

23. Brandon S. Ethics, economics and science. J R Soc Med 1991;84:575-7.

©1997, Massachusetts Medical Society.

©Copyright, 1997, by the Massachusetts Medical Society  
Printed in the U.S.A.

#### The Americas:

*The New England Journal of Medicine*

Publishing Division of the Massachusetts Medical Society

1440 Main Street, Waltham, MA 02154-1600 USA

Tel: (1) 617 893 3800 x 1199, Fax: (1) 617 893 0413

E-mail: customer@nejm.massmed.org



#### All Other Countries:

*The New England Journal of Medicine*

c/o European Magazine Distribution (EMD) GmbH,

Knesebeckstrasse 96, 10623 Berlin, GERMANY

Tel: (49) 30 3123883, Fax: (49) 30 3132032

The New England Journal of Medicine (ISSN 0028-4793) is published weekly in the English language by the Massachusetts Medical Society (Waltham, MA, USA). Material printed in The NEJM is covered by copyright. All rights reserved. No part of this reprint may be reproduced, displayed, or transmitted in any form or by any means (electronic, digital, or mechanical, including photocopying or by any information storage or retrieval system), without prior written permission from the Massachusetts Medical Society. For further information, please contact the Department of Rights, Permissions, Licensing & Reprints at the USA address above, or via fax: 617 893 8103. Queries regarding bulk reprints may also be sent to: reprints@mms.org.

## **Troisième partie**

### **Discussion**

## Introduction

A la suite de l'expérience japonaise et d'un premier essai suédois (Kallings *et al.*, 1988), d'autres études contemporaines de celle menée au Sénégal ont été organisées. En 1995, les résultats concernant ces différentes études ont été disponibles dans leur majorité, faisant l'objet de publications (Schmitt *et al.*, 1996 ; Trollfors *et al.*, 1995 ; Gustaffson *et al.*, 1996 ; Greco *et al.*, 1996). Les résultats d'une autre étude suédoise ont été disponibles en 1997 (Olin *et al.*, 1997a). Des revues et interprétations générales ont été publiées (Edwards et Dekker, 1996 ; Plotkin et Cadoz 1997 ; Olin 1997b ; Lopez et Blumberg, 1997). Des sessions spéciales dans les congrès (Monterey 1995 ; Hong Kong 1996 ; Paris, 1997), ou de congrès spéciaux (Rome, 1995 ; Washington, 1996, Barcelone, 1996 ; Funchal 1997) ont été organisés. Au total 8 études différentes ont été disponibles, apportant des résultats pour 13 vaccins différents contre la coqueluche, dont 8 vaccins acellulaires. Très rapidement, certains de ces vaccins acellulaires ont bénéficié d'autorisations de mise sur le marché en Europe (Italie, Allemagne, Suède, Danemark), au Canada et aux USA. Dans d'autres pays, l'utilisation du vaccin à germes entiers pour la primo vaccination était maintenue, comme au Sénégal, en France, en Angleterre, en Espagne et au Portugal. Certaines indications étaient limitées au rappel.

La disponibilité simultanée des résultats des différentes études a favorisé une tentative d'interprétation globale basée essentiellement sur deux critères, l'innocuité et l'efficacité. D'autres critères, comme celui du coût, ont été mentionnés, mais peu discutés car il n'y avait pas de données précises, les producteurs réservant cette information dépendante de leur stratégie commerciale.

Pour l'innocuité, il y a eu un consensus rapide pour admettre que les vaccins acellulaires étaient mieux tolérés que les vaccins à germes entiers, même si des interrogations concernaient la survenue d'états de choc aussi après administration de vaccins acellulaires

(Olin, 1997c). Cet aspect de l'innocuité n'était pas au premier plan. En fait, les résultats de l'étude nationale anglaise sur les encéphalopathies de l'enfance (Miller *et al.*, 1982) ayant écarté la responsabilité des vaccins à germes entiers dans les réactions neurologiques graves, l'argumentation initiale du développement des vaccins acellulaires - meilleure tolérance pour une efficacité équivalente - avait évolué. Initialement, le gain en tolérance concernait les effets graves et était le premier objectif, et une efficacité protectrice éventuellement inférieure aurait été acceptée. En matière de tolérance, les essais cliniques réalisés ne pouvaient d'ailleurs répondre qu'aux événements indésirables fréquents, les événements graves, très rares, ne pouvant être surveillés qu'en utilisation en routine. Cette question reste donc non résolue à l'heure actuelle (Chen, 1997). En conséquence, le critère de discussion très important, pratiquement unique pour la discrimination entre les vaccins est devenu celui de l'efficacité vaccinale.

L'efficacité vaccinale a été discutée principalement pour essayer de répondre à deux questions:

- 1) Faut-il changer de vaccin et substituer un vaccin acellulaire au vaccin à germes entiers ?
- 2) Si oui, par quel vaccin acellulaire ?

1) La réponse à la première question, pour les pays ne pratiquant pas en routine la vaccination contre la coqueluche, ou ayant des taux de couverture très faibles, était facile, par l'affirmative. Ce sont en général les pays où ont eu lieu les études (Suède, Allemagne, Italie). Les vaccins licenciés ont été les vaccins étudiés, à l'exception d'un vaccin ayant été moins protecteur en Suède. Pour les USA, dont un des vaccins à germes entiers utilisé comme référence en Suède et en Italie a donné de mauvais résultats d'efficacité, et où le coût de l'intolérance sociale est élevé et est répercuté sur le prix de chaque dose de vaccin, le même type de changement est observé. Il en est de même au Canada. Il est probable d'ailleurs dans

ces deux dernières situations que l'augmentation de coût lié au changement de vaccin, les vaccins acellulaires étant plus chers que les vaccins à germes entiers, sera compensée ou inférieure au coût actuel de la vaccination, du fait des compensations financières pour effets secondaires.

Pour les pays pratiquant la vaccination en routine avec des vaccins à germes entiers, et ayant une bonne couverture vaccinale associée à une bonne tolérance sociale, la réponse est plutôt non, et l'introduction des vaccins acellulaires est surtout envisagée pour les rappels tardifs, sans d'ailleurs que cette utilisation soit entrée en vigueur. Il s'agit par exemple de la France, de l'Espagne, et paradoxalement de l'Angleterre, qui après avoir été à la pointe du mouvement contre les vaccins à germes entiers, avec la survenue consécutive d'épidémies importantes, défend maintenant avec fermeté sa politique de vaccination avec le vaccin à germes entiers (Miller et Gay, 1997). Un résultat objet de controverse, et qui pourtant nous semble marquant, est qu'en dehors du vaccin à germes entiers produit aux USA et inclus dans l'essai italien et un des essais suédois, les vaccins à germes entiers européens ont toujours induit une efficacité protectrice supérieure au vaccin acellulaire auquel ils étaient comparés (Plotkin et Cadoz, 1997). Récemment, les résultats de la dernière étude suédoise (Olin *et al.*, 1997d) ont indiqué une protection équivalente entre le vaccin à germes entiers utilisé en Angleterre, et l'un des vaccins acellulaires. Mais ceci a été observé avec un calendrier vaccinal de type scandinave, comprenant 3 doses délivrées à 3, 5 et 12 mois d'âge. Ce calendrier est plus immunogénique que les calendriers courts, c'est à dire lorsque les vaccins sont administrés à 2, 3 et 4 mois d'âge ou à 2, 4 et 6 mois (Olin *et al.*, 1997). Dans cette dernière étude, il y a d'ailleurs eu une partie de l'échantillon qui a reçu les vaccins à 2, 4 et 6 mois d'âge. Les données d'efficacité pour ce schéma, non publiées mais disponibles dans le rapport général de l'étude (Olin *et al.*, 1997), montrent alors une efficacité plus faible du



meilleur des vaccins acellulaires étudiés par rapport au vaccin à germes entiers. Il est probable que la moins bonne efficacité des vaccins acellulaires observée en schéma court ne serait plus observée avec un schéma long, dont la troisième dose semble agir comme un rappel, comme le suggère les bons résultats du vaccin monovalent étudié en Suède (Trollfors *et al.*, 1995).

Il apparaît donc que la décision du choix de changement ou non n'est pas basée uniquement sur des critères d'efficacité, et que d'autres notions interviennent. L'inquiétude rémanente des populations et des médecins concernant les effets potentiellement graves des vaccins à germes entiers, pourtant écartés, est un facteur important qui conditionne la réussite d'un programme de contrôle. Probablement aussi, l'importance des investissements des compagnies productrices de vaccins pour le développement de ces nouveaux vaccins favorise-t-il le changement en faveur de leur utilisation.

2) Lequel des nouveaux vaccins est le meilleur et doit être utilisé? Cette question est souvent traduite par la question suivante : Quels sont les composants nécessaires pour une bonne protection ? Cette question a suscité, et suscite encore, de vives discussions. On retrouve en particulier la dichotomie entre les tenants de la théorie de la « maladie toxique », pour lesquels un seul composant, la PT, est nécessaire et suffisante (Schneerson *et al.*, 1997), et ceux pour lesquels le vaccin le plus complet est celui qui comporte le plus de composants (5 composants) (Olin, 1997). Notre interprétation est que ces avis opposés, qui sont basés sur des idées établies à priori (par rapport aux essais vaccinaux), et issues du domaine des études physiopathologiques, ne pouvaient être documentées que par des études à visée explicative (Schwartz *et al.*, 1970), mais à un stade qui se situe encore en amont de l'expérimentation humaine, c'est à dire sur l'animal. Dans notre description de la physiopathologie, nous avons cherché à préciser cette limite, pour mettre en évidence que des études chez l'animal auraient été possibles, en particulier chez le primate, et qu'elles restent d'ailleurs nécessaires. Les

essais qui ont été conduits, de nature plus pragmatique, ne permettent pas de répondre à cette question. C'est cet aspect que nous allons discuter, car il peut servir d'exemple. Nous ne détaillerons donc pas les aspects de variation de l'estimation de l'efficacité relatifs à la méthodologie des études, certaines suivant la méthodologie des essais cliniques randomisés, d'autres étant de type cas-contact, ou cas-témoin. Une analyse de l'interprétation en fonction des méthodes a déjà été présentée (Fine, 1997b).

**3.1 Standardisation.** Nous avons montré que les estimations d'efficacité vaccinale étaient très sensibles à un certain nombre de facteurs. Le type d'analyse, les caractéristiques de sensibilité et surtout de spécificité de la définition des cas, la durée d'observation, la sévérité de la maladie et le calendrier vaccinal ont été illustrés et discutés. Même s'il y a eu des efforts de standardisation entre les études, comme la définition des cas OMS (WHO, 1991), en pratique la standardisation a porté surtout sur certains aspects du laboratoire (milieu de culture pour la bactériologie, technique sérologique), et il n'y a pas eu de standardisation pour la sévérité de la maladie (Wassilak et Fine, 1997). Il n'y a donc pas de comparabilité des chiffres d'efficacité vaccinale obtenus dans les différentes études. Ceci précise bien la nature pragmatique de cette mesure de l'effet qu'est la formule de l'efficacité vaccinale, comme souligné initialement par Greenwood et Yule, et trop oubliée dans les discussions actuelles.

**3.2 Vaccin de référence.** L'introduction d'une référence, d'un étalon, a précisément pour but de permettre une comparabilité des résultats entre différentes études. Nous nous sommes demandé pourquoi il n'y avait pas eu un vaccin de référence unique dans ces différentes études, alors qu'un tel vaccin existe.

A l'issue des larges essais conduits dans les années 50 en Angleterre par le Medical Research Council (MRC reports 1951, 1956, 1959), il y a eu la qualification d'un vaccin de référence anglais, qui a été choisi car il induisait une efficacité protectrice de 80% (Cameron, 1988). Ce

niveau a été choisi car des vaccins induisant une efficacité supérieure entraînaient plus de réactions secondaires. En 1964, l'OMS a choisi un vaccin standard international. Un second standard international de l'OMS a été choisi en 1980 et est gardé au Statens Seruminstitut à Copenhague. Le matériel est congelé séché dans des ampoules de 46 unités protectrices. Ce vaccin est utilisé pour standardiser des vaccins de référence nationaux, servant au contrôle de fabrication (Griffiths, 1988).

Les vaccins de référence utilisés dans les études récentes sont présentés dans le tableau V. Dans ces études, l'hétérogénéité apparente des choix du ou des vaccins de référence peut être réduite si l'on admet que les différents vaccins de référence utilisés résultent du choix d'une référence locale, c'est à dire traduisant ce qui se fait dans le pays considéré en terme de santé publique. Mais du contexte local dépendent des modalités différentes.

### **3.2.1 Les différents types de référence locale**

- Il peut s'agir d'un placebo, comme en Suède, correspondant à l'absence de vaccination de routine contre la coqueluche ;

- Il peut s'agir d'un vaccin à germes entiers, s'il est utilisé en routine, comme au Sénégal, et dans une certaine mesure en Allemagne pour deux études sur trois (dans l'étude de Mainz, selon un protocole cas-contact, et l'étude de Munich, selon un protocole cas-témoin) ;

- Il peut s'agir d'une référence locale que l'on peut qualifier de virtuelle ou de délocalisée, que nous proposons de désigner par l'expression « par pays porteur », par analogie avec l'expression de « mère porteuse ». Il s'agit des vaccins à germes entiers américains, qui ont été implantés en Suède et en Italie pour l'un, et en Allemagne (Erlangen), pour l'autre. Dans ce type de situation, le produit de l'étude servira avant tout au pays où le vaccin de référence est utilisé (ou au producteur), et qui ont d'ailleurs souvent financé ces études. Du point de vue du « pays porteur », il est plus difficile de caractériser ce type de choix. Il peut s'agir d'une

**Tableau V. Choix du groupe de référence. Effectifs à l'inclusion et nombre de cas de coqueluche pendant le suivi principal. \***

Pays	Etude	Placebo		Vaccin de référence (Germes entiers)			Vaccin acellulaire †		
		n	(cas)	Pays, fabricant	n	(cas)	nb. de composants, (composants)	n	(cas)
Suède	(Kallings <i>et al.</i> , 1988)	954	(65)	-	-	-	1 (PT)	1428	(67)
	(Gustaffson <i>et al.</i> , 1996)	2574	(371)	USA, Connaught	2102	(148)	2 (PT+FHA)	1419	(53)
	(Olin <i>et al.</i> , 1997)	-	-	GB, Medeva	20720	(27)	2 (PT+FHA)	2566	(159)
	(Trollfors <i>et al.</i> , 1995)	1726	(240)	-	-	-	5 (PT+FHA+Pertactine+AGG+LPS)	2587	(59)
Allemagne	(Belohradsky, 1997)	2095	(202)	D, Behring	1823	(4)	2 (PT+FHA)	20697	(16)
	(Schmitt <i>et al.</i> , 1996)‡			D, Behring		(1)	3 (PT+FHA+Pertactine)	20728	(68)
	(Stehr et Cherry, 1997)¥	1739	(89)	USA, Lederlé	4259	(16)	5 (PT+FHA+Pertactine+AGG+LPS)	20747	(40)
Italie	(Greco <i>et al.</i> , 1996)	1470	(74)	USA, Connaught	4348	(141)	1 (PT)	1724	(72)
							2 (PT+FHA)	12514	(29)
Sénégal	(Simondon <i>et al.</i> , 1997)	-	-	F, Pasteur Mérieux	1772	(123)	3 (PT+FHA+Pertactine)	22505	(112)
							4 (PT+FHA+AGG+LPS)	4273	(34)

\* Ces chiffres ne sont pas comparables entre eux pour des calculs d'efficacité vaccinale.

† Les différents types de vaccin acellulaire ne sont pas comparables entre eux, même si leurs composants sont identiques. Ils peuvent différer par leur dosage, le mode de préparation, de détoxification, le calendrier vaccinal utilisé, les combinaisons vaccinales.

‡ Pour Schmitt *et al.*, la méthodologie est de type cas contact, l'efficacité est comparée par rapport à des enfants non vaccinés.

¥ Pour Stehr *et al.*, le calcul est basé sur une durée de suivi moyen de 21 mois.

contrainte acceptée ou d'un mauvais choix de référence. Les rapports d'étude auxquels nous avons eu accès (Suède et Italie) ne sont pas explicites sur ce sujet. Dans le rapport suédois, où un paragraphe complet essaye d'expliquer ce choix, il est rappelé qu'un premier choix avait porté sur un autre vaccin à germes entiers américain, produit par le laboratoire Lederlé, sur la base d'une étude d'immunogénicité (Edwards, 1993) qui avait comparé plusieurs vaccins acellulaires (de différents producteurs) et plusieurs vaccins à germes entiers (tous produits aux USA). Le producteur de ce vaccin ayant subitement refusé son inclusion comme référence en Suède (il le sera par la suite en Allemagne), l'essai a démarré avec le second vaccin à germes entiers le plus utilisé aux USA, le vaccin Connaught. Il y avait des doutes sur son efficacité, du fait d'une moins bonne immunogénicité de ce vaccin. L'argumentation pour l'utilisation de ce vaccin est précisée dans une lettre du Dr. La Montagne, du National Institute of Health des USA, et reproduite dans le rapport technique de l'étude suédoise: « *Even though I believe that the Connaught-USA whole cell vaccine is as safe and effective as any other whole cell pertussis vaccine, I think that the issues of vaccine efficacy...can be appropriately considered within the context of the trial...The clinical trial give us the opportunity to answer that question, particularly with the inclusion of the Connaught-USA whole cell vaccine* ». Il est précisé dans le rapport (mais pas dans le protocole initial) que d'autres vaccins ont été considérés après le refus du laboratoire Lederlé, dont le vaccin utilisé en Angleterre (Evans medical), et d'autres vaccins européens. Mais il avait été jugé irréalisable de collecter et analyser la documentation de ces autres vaccins potentiels quant à leur mode de production, les caractéristiques et l'expérience clinique de ces préparations, dans un délai raisonnable. Ceci est étonnant, puisque l'étude la plus récente (1988) effectuée en Suède par certains des mêmes investigateurs sur l'efficacité d'un vaccin à germes entiers a porté sur le vaccin produit en Angleterre (Evans, auparavant Wellcome). Son

efficacité avait été bonne, estimée à 80% (Blennow *et al.* 1988). Ce même vaccin sera finalement utilisé comme vaccin de référence dans la dernière étude suédoise. Par ailleurs, le seul vaccin à germes entiers bénéficiant d'une autorisation d'utilisation en Suède était le vaccin à germes entiers Pasteur Mérieux produit en France (Fritzell, communication personnelle). Il semble donc certain que le choix du vaccin de référence en Suède entre bien dans le cadre de la référence locale par pays porteur, avec d'ailleurs le souci de vérifier la valeur protectrice de la référence.

Pour ce qui concerne l'Italie, le but mentionné dans le rapport est d'assurer la meilleure validité externe des résultats de l'étude. Le vaccin à germes entiers utilisé en routine dans ce pays, bien qu'avec une couverture vaccinale relativement faible, n'a pas été considéré comme pouvant être un vaccin de référence.

On peut donc considérer qu'il y a toujours eu recours à la logique de la référence locale, selon les différents aspects décrits ci-dessus, ce qui traduit bien la conception pragmatique, évoquée plus haut, des recherches. La question à laquelle il est tenté de répondre est ainsi : *le nouveau vaccin protégera-t-il aussi bien que le vaccin utilisé en routine ?*

### **3.2.2 Problèmes posés par le choix d'une référence locale**

L'attitude décrite ci-dessus pose un certain nombre de problèmes :

- Des problèmes d'extrapolation des résultats de la recherche, du fait de l'absence de référence commune entre les différentes études ;

- Lorsqu'il y a un doute sur l'efficacité du traitement de routine, pour vérifier le niveau d'efficacité, l'attitude a été d'introduire un groupe d'enfants recevant un placebo. Mais ceci n'étend pas la portée des résultats vers une généralisation. Nous l'avons précisé de façon générale dans la première partie et sur l'exemple du Sénégal en deuxième partie. La généralisation des résultats d'une étude est rendue difficile par la difficulté de standardiser, et

du fait de la sensibilité de l'estimation de l'efficacité vaccinale aux caractéristiques des critères de jugement et à la sévérité de la maladie. Le contexte épidémiologique lui-même peut influencer les estimations d'efficacité (Fine et Zell, 1994).

L'introduction d'un groupe placebo pose aussi des problèmes éthiques, dont la perception n'est d'ailleurs pas nouvelle. Déjà lors d'une étude sur l'efficacité de la sérothérapie contre la diphtérie, citée plus haut comme le premier exemple d'attribution alternée des traitements, les derniers malades ont systématiquement reçu la sérothérapie du fait de l'efficacité apparente de la méthode (Fibiger, 1898) . Plus précisément dans le domaine de la coqueluche, la seconde série d'essais menés par le MRC au cours des années 50 a été influencée par les résultats des essais antérieurs : « *The previous trials (MRC, 1951) were made on a strictly controlled basis to investigate whether pertussis vaccines were of any value in protecting against the disease... This procedure could not be continued after it was known that each of five different batches of vaccine used gave substantial protection, and it was decided that in all subsequent trials every child should be given pertussis vaccine, and that the results with one batch of vaccine should be compared with those with other batches at the same time in the same area* » (MRC, 1956). En France à la même époque, cette perception était partagée : « *Les nourrissons non vaccinés n'ont pas été tirés au sort, comme on le fait parfois au cours des expertises cliniques... et nous ne nous sommes pas crus moralement autorisés à exposer délibérément et longtemps au risque de coqueluche des nourrissons dont les parents réclamaient la vaccination* » (Zourbas, 1965). Il y a dans cette expression une part d'explication : les parents à cette époque réclamaient la vaccination, comme aujourd'hui encore dans notre expérience du Sénégal, et cet aspect a été perçu lors de la réalisation du consentement informé pour la participation. Cependant, l'introduction d'un groupe contre placebo en Italie a suscité des interrogations (Greenberg, 1994) et des protestations (Cagliano et Traversa, 1995) en écho à la

publication contemporaine d'un travail de synthèse sur cette question (Rothman et Michels, 1994). Les arguments du choix d'un placebo sont décrits et critiqués dans ce travail, et mentionnent en particulier la responsabilité des autorités d'enregistrement. Cet aspect concerne probablement aussi les études décrites ici. Un autre aspect est aussi que l'introduction d'un placebo réoriente une étude d'une attitude pragmatique vers une attitude explicative, plus proche de l'expérimentation pour la connaissance, ce qui, ici, est traduit par la recherche du nombre d'antigènes nécessaires à obtenir une bonne protection. Les études ayant un groupe placebo avaient plusieurs vaccins acellulaires à comparer.

**3.2.3 Choix d'une référence internationale** Le choix d'une référence internationale, qui aurait été celui du vaccin à germes entiers assurant la meilleure protection contre la coqueluche, aurait permis de concilier les aspects pragmatiques, pour les objectifs de santé publique, de satisfaire les conditions éthiques, en particulier en référence à la déclaration d'Helsinki, et n'aurait pas limité l'aspect explicatif des études entreprises. Au contraire, en permettant une comparaison entre études, la référence internationale aurait étendu cet aspect explicatif en permettant de situer les vaccins acellulaires les uns par rapport aux autres.

Il est difficile d'ordonner les raisons qui ont empêché la réalisation d'une telle standardisation des résultats. La difficulté du choix d'un vaccin particulier est réelle, et la référence internationale existante n'est pas utilisée en protection clinique. Mais, même arbitraire, le choix d'un vaccin protecteur et commun aux différentes études était possible. Une autre raison est surtout l'absence de volonté de standardisation du traitement de référence. L'absence d'implication réelle d'instances internationales sur le sujet précis des vaccins contre la coqueluche depuis de nombreuses années et en particulier durant les 20 dernières années sur le développement des vaccins acellulaires, est certainement une raison importante, associée à un défaut de culture du traitement de référence en matière de thérapeutique ou d'évaluation



clinique. Réminiscence de l'aspect subjectif de l'art médical, indépendance des états souverains et de leurs autorités de santé, influence des producteurs, personnalité des investigateurs sont autant de raisons contre les efforts de normalisation. Ces difficultés sont d'ailleurs bien connues dans d'autres domaines, pourtant plus simples en apparence pour le profane, comme le système international des poids et mesures, et les difficultés de mise en application du système métrique (Giacomo, communication personnelle). La difficulté supplémentaire dans le domaine de la référence thérapeutique est que pour les études sur l'homme, elle doit aussi être le meilleur des traitements, pour des raisons éthiques. En 1994, l'association internationale de standardisation biologique a créé un groupe de travail sur les vaccins, dont le but est de favoriser la communication entre les producteurs de vaccins, les scientifiques et les autorités d'enregistrement concernant le contrôle de qualité, la standardisation et l'efficacité des vaccins et des combinaisons vaccinales, et l'échange d'information sur de nouveaux vaccins améliorés. Un des objectifs majeurs de ce groupe de travail est l'organisation de conférences et la promotion de publications de qualité sur les vaccins dans les journaux de l'association. La réunion organisée à Rome en 1995 sur les vaccins acellulaires en est un exemple. Mais le pas vers la définition d'un standard thérapeutique ou préventif est-il amorcé ?

**3.3 Limites des essais cliniques randomisés (ECR).** Les études récentes sur les vaccins acellulaires ont utilisé différentes méthodes et comparé différents nouveaux vaccins à différentes références. Les ECR contre placebo ont été paradoxalement considérés comme les plus rigoureux, les plus informatifs, et donc comme apportant les informations essentielles (Edwards et Dekker, 1996, Fine, 1997), les autres études contribuant de façon indicative. Les « *trials* » ont ainsi été séparés des « *studies* ». Cependant, l'expérience japonaise d'utilisation de vaccins acellulaires en santé publique depuis le début des années 80, donc depuis presque

20 ans, contraste avec le bilan actuel qui peut être fait des récents essais et études. Pour certains, « *The trials described above prove beyond any doubt that acellular vaccines can prevent pertussis and give fewer reactions than whole-cell vaccines. However, despite profusion of trials and the important new information that they have provided, a number of questions remain partially unanswered. Several confounding factors impede the unequivocal analysis of the data* » (Plotkin et Cadoz, 1987), « *Ideally, a definitive prospective, double-blind, controlled, multicentre study should be designed to examine immunogenicity, efficacy, and reactogenicity among single batches of candidate multicomponent acellular and whole-cell vaccines. Strict case-definitions, active case-ascertainment, intramuscular administration of vaccine, appropriate combinations of US and European vaccine administration schedules, and a regimen of more than three doses with long-term follow-up should be incorporated. Although such a study is expensive and labour intensive, it is unavoidable for resolving this debate and answering the remaining questions* » (Poland, 1997). Pour d'autres : « *the best acellular vaccines are multicomponent* » (Olin, 1997).

Les avis divergents sont suscités par une difficulté d'interprétation, qui, plutôt que de recommander de nouvelles études de type ECR, doit en faire préciser les limites, dans le sens de leur place dans l'évaluation thérapeutique ou préventive, ce qui a été décrit en termes de « phase ». Mais en amont, précède une phase d'acquisition de connaissances indispensables, et en aval, une phase d'accumulation d'expérience, comme déjà souligné par Galien (cf. supra).

**3.3.1 Limite supérieure.** Lors de la revue de la physiopathologie, et des différents facteurs pouvant participer à un vaccin, nous avons pu percevoir la difficulté résiduelle de compréhension, et les difficultés liées à l'absence de bon modèle animal. Cependant, il s'agit peut être plus d'un choix, car des modèles animaux existent, mais ont été disqualifiés « *For*

*some years attempts have been made using animals to develop a respiratory model for human pertussis. Laboratory-induced infections in some primates appear to mimic pertussis in humans, but for reasons such as cost and logistics further exploration of this approach as a surrogate measure for assessing vaccine potency and efficacy in humans does not appear warranted* » (Mortimer, 1994). Ce choix de ne pas utiliser de modèle animal et de multiplier les études sur l'enfant se traduit pas le fait qu'au cours de 6 des 9 études récentes, il y a eu plus de 10 000 enfants inclus dans un groupe placebo, et plus de 1000 de ces enfants ont eu une coqueluche. N'y a-t-il pas là un coût ? Bien que non envisageable sur le plan moral chez l'enfant, mais prévu chez l'adulte, une étude expérimentale de challenge artificiel, comme cela a déjà eu lieu dans le passé (MacDonald et Macdonald, 1933), aurait permis d'étudier tous les différents vaccins, de les comparer entre eux, sur un plus petit nombre de sujets. Les enfants devenant des cas auraient eu de meilleures garanties de prise en charge que lors des « challenges naturels » qui ont eu lieu, le traitement antibiotique pouvant être instauré rapidement. La réponse sur l'efficacité du vaccin aurait été beaucoup plus rapide, permettant l'instauration d'une vaccination systématique plus précoce, comme au Japon, et donc un nombre de cas évités considérable. Il conviendrait d'approfondir les aspects éthiques des études contre placebo, et en quoi elles diffèrent, de ce point de vue, du challenge artificiel. Le fait que l'acte d'exposition soit différé, aléatoire, « dilue » la responsabilité, de l'individu concret à un échantillon issu du groupe, plus abstrait. Mais le principe en est-il différent ? Nous n'en sommes pas convaincu. L'importance de ces chiffres indique que le problème n'est ni un problème de coût absolu, ni un problème logistique. Il s'agit plus d'études dont la méthodologie est orientée vers des autorisations de mise sur le marché, de façon non coordonnée, et souvent compétitive. Il est probable que le faible recours aux modèles animaux est aussi lié aux modifications induites au début des années 60 par le désastre de la

thalidomide (Pocock, 1983), mais ces modifications devraient en toute rigueur porter sur les études d'innocuité, et non sur les études d'efficacité. Ceci peut caractériser une dérive des procédures de financement et de régulation de l'évaluation des thérapeutiques, et montre toute l'importance de l'utilisation de modèles animaux, qui restent une étape indispensable. Une instance de coordination internationale aurait été utile pour imposer un vaccin de référence, et favoriser la recherche en amont des essais cliniques.

**3.3.2 Limite inférieure.** Malgré l'importance des moyens globaux mis en œuvre, il n'y a pas d'interprétation simple qui permette de décider d'une stratégie de santé publique définitive. L'essai clinique randomisé ne produit qu'imparfaitement les connaissances nécessaires souhaitées, que sont l'efficience et le rendement, plus que l'efficacité. La liaison entre l'apport des ECR et l'utilisation du traitement en aval reste l'objet de discussions (Fayers et Hand, 1997 ; Kernick, 1997 ; Thompson et Barber, 1997). Plus spécifiquement dans le cadre de l'évaluation des vaccins contre la coqueluche, le besoin de données de surveillance concernant l'utilisation en routine des vaccins acellulaires a été clairement affirmé pour le suivi de leur efficacité (Decker, 1996 ; Edwards et Decker, 1996 ; Miller et Gay, 1997), mais aussi de leur innocuité (Chen, 1997). Les données de surveillance sont aussi nécessaires pour détecter et comprendre des variations d'efficacité de vaccins à germes entiers comme cela a été le cas récemment en Hollande et en Australie (cf. supra en 1.1.5.5). Pour répondre à ce besoin d'information lors de l'utilisation en routine de ces nouveaux vaccins, il a été suggéré que lors des autorisations de mise sur le marché, il y ait un engagement du producteur à contribuer et à collaborer à un système de surveillance (Decker, 1996). Ce principe pourrait permettre de passer plus rapidement des essais cliniques randomisés à un stade opérationnel. L'exemple extrême du Japon, avec passage direct de l'expérimentation animale à l'utilisation en santé publique, est en faveur de cette évolution. De même, la disparition des cas de méningite à

*Haemophilus influenzae* type b en Finlande est un argument majeur du succès de l'utilisation de ces vaccins (Peltola *et al.*, 1992). Ceci favoriserait les recherches sur l'amélioration des systèmes de surveillance. Leurs faiblesses inhérentes (Chen et Orenstein, 1996, Orenstein *et al.*, 1988, Orenstein *et al.*, 1985) pourraient aussi être réduites si la surveillance est planifiée. L'estimation du nombre de cas peut être rendue plus précise, et son biais éventuel connu, si les sources sont multiples (Desenclos et Hubert, 1994). La connaissance du statut vaccinal des cas peut être facilitée par la standardisation des étiquetages entre producteurs, leur lecture automatique par code-barre, et la systématisation des fichiers de vaccination, comme en Angleterre (Salisbury, 1997). Des informations sur les risques d'exposition, et leur relation éventuelle avec le statut vaccinal peuvent être systématiquement collectées. Il peut s'agir d'une diminution du risque chez les vaccinés, par effet de protection de groupe, ou au contraire d'une augmentation soit réelle par conduite à risque (les collectivités), soit relative, par des mesures d'isolement dans les familles ne pratiquant pas les vaccinations. Les schémas possibles d'études en population de l'efficacité des vaccins ont été discutés récemment (Halloran *et al.*, 1997).

En conclusion, la phase récente de développement des vaccins acellulaires contre la coqueluche témoigne du succès de l'efficacité de vaccins mieux tolérés, et de composition plus simple que les vaccins à germes entiers. Mais leur place dans le contrôle actuel et futur de la coqueluche reste difficile à apprécier. Nous suggérons que les efforts ont été trop concentrés sur des essais cliniques randomisés et que 'le pendule est décroché' : « *Any belief that the controlled trial is the only way (to study therapeutic efficacy) would mean not only that the pendulum had swung too far but that it had come right off its hook* » (Hill, 1966).

Comme indiqué en introduction à ce travail, cette phase présente la particularité d'être centrée sur l'amélioration de vaccins existants, dans une situation où il n'y a pas d'équivalent de protection. En cela, elle est nouvelle. Les informations issues de ces études ne se substituent pas aux indispensables études explicatives en amont, et on peut regretter le peu d'investissement dans l'expérimentation animale et la recherche de corrélats de protection. De même, cette méthodologie ne répond pas au besoin d'information sur l'efficacité des programmes de santé publique, qui nécessite la mise en place d'une surveillance. La coordination insuffisante entre les études, illustrée par l'absence d'utilisation d'une référence commune, a affaibli la portée des résultats obtenus. Si les étapes de développement initiales le permettent, le choix du nouveau vaccin ou traitement à étudier doit rester libre. Mais le choix du traitement de référence est une responsabilité de nature différente, qui n'appartient ni aux investigateurs, ni aux promoteurs, ni même peut-être aux autorités nationales. Mais pour y parvenir, peut-être une autre révolution (Deforge, 1994) est-elle nécessaire?

Enfin, l'essai d'approche quantitative de la mesure de l'effet, malgré les difficultés d'interprétation soulignées, ne devrait-il pas être étendu à l'évaluation des actions de santé dans leur ensemble, au delà du champ limité des vaccins et de la prévention? Il pourrait en résulter un bénéfice dans les autres domaines de l'évaluation thérapeutique, par exemple pour les traitements curatifs, puis aussi en retour dans le domaine des vaccins.

## Références

- Aaby, P. *et al.* Trial of high-dose Edmonston-Zagreb measles vaccine in Guinea-Bissau : protective efficacy. *Lancet* 2:809-811, 1988.
- Aaby, P. *et al.* Ethics of HIV trials. *Lancet* 350:1546, 1997.
- Adams, J.M., Kimball, A.C., Adams, F.H. Early immunization against pertussis. *Am J Dis Child* 74:10-18, 1947.
- Aicardi, J., Chevrie, J.J. Accidents neurologiques consécutifs à la vaccination contre la coqueluche. *Arch Fr Pediatr* 32:309-318, 1975.
- Angell, M. The ethics of clinical research in the third world. *N Engl J Med* 337:847-849, 1997.
- Arai, H., Sato, Y. Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis promoting factor from *Bordetella pertussis*. *Biochem Biophys Acta* 444:765-782, 1976.
- Armitage, P., Gehan, E.A. Statistical methods for the identification and use of prognostic factors. *Int J Cancer* 136:16-36, 1974.
- Banker, D.D. Modern practice in immunization. Pertussis immunization. *Indian J Med Sci* 22:649-658, 1968.
- Barysh, N. Use of the pertussis agglutigen skin test in a well baby clinic. *Pediatrics* 7:48-52, 1951.
- Begue, P., Grimprel, E., Roure, C., Guiso, N. La coqueluche en France. Nécessité de mise en place d'une surveillance. *Bull Epidemiol Hebdo* 48:227-228, 1992.
- Bell, J.A. Pertussis prophylaxis with two doses of alum-precipitated vaccine. *Public Health Rep* 56:1535-1546, 1941.
- Benenson, A.S. Control of communicable diseases manual. Washington, DC:Am Public Health Ass, 1995. 6<sup>ème</sup> Ed. pp. 1-577.
- Berridge, M. Les molécules de la communication dans la cellule. *Pour La Science* 98:134-146, 1985.
- Betsou, F. Thèse. Analyse structurale et fonctionnelle de l'adénocyclase-hémolysine de *Bordetella pertussis* : propriétés cytotoxiques, immunogénicité et intérêt diagnostique. Faculté de Médecine Cochin, 1996. pp. 1-194.

Biritwum, R.B., Isomura, S., Ofori-Amaah, S., Sato, Y. Clinical and Serological Reactions after Immunization of Children in Ghana, West Africa, with the Japanese Acellular Pertussis Vaccine. In: Dev in Biol Stand. Proceedings of the 4th International Symposium on Pertussis. Edité par Int Ass of Biol Stand, 1984, p. 539-543.

Blache, J. Coqueluche. In: Dictionnaire de la conversation et de la lecture. Edité par Didot, F. Paris: F.Didot frères, fils et Cie, 1868.

Blackwelder, W.C. Acellular Pertussis Vaccine Efficacy Determined from Clinical Criteria. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis, 1990, p. 295-298.

Blennow, M., Olin, P., Granström, M., Bernier, R.H. Protective efficacy of a whole cell pertussis vaccine. Br Med J 296:1570-1572, 1988.

Bollet, A.J. Pierre Louis: the numerical method and foundation of quantitative medicine. Am J Med Sci 266:93-101, 1973.

Bordet, J., Gengou, O. Le microbe de la coqueluche. Annales de l'Institut Pasteur 20:731-741, 1906.

Bordet, J., Gengou, O. Le microbe de la coqueluche. Annales de l'Institut Pasteur 733-738, 1907.

Bordet, J., Gengou, O. L'endotoxine coquelucheuse. Annales de l'Institut Pasteur 23:415-419, 1909.

Bordet, J., Sleswyk. Sérodiagnostic et variabilité des microbes suivant le milieu de culture. Annales de l'Institut Pasteur 24:476-494, 1910.

Boulard, P., De Lauture, H. Vaccination contre la coqueluche. Rev Praticien 18:967-976, 1968.

Bouvenot, G., Vray, M. Essais cliniques : théorie, pratique et critique. Paris:Flammarion Médecine-Sciences, 1996. 2<sup>nd</sup> Ed. pp. 1-409.

Bouyer, J., Hémon, D., Cordier, S., Derriennic, F., Stücker, I., Stengel, B., Clavel, J. Epidémiologie. Principes et méthodes quantitatives. Paris:Les Editions INSERM, 1993. pp. 1-498.

Bricaire, F., Leport, C. Coqueluche. Paris, France:Encyclopédie Médico-Chirurgical, 1984. pp. 1-6.

Brown, F., Greco, D., Mastrantonio, P., Salmoso, S., Wassilak, S.G. Pertussis vaccine trials, Basel:Dev Biol Stand. S.Karger AG, 1997. pp. 1-407.

Bull, J.P. The Historical development of clinical therapeutic trials. J Chron Dis 10:218-248, 1959.



- Cagliano, S., Traversa, G. The use of placebo controls. *N Engl J Med* 332:60, 1995.
- Cameron, J. Evolution of Control Testing of Pertussis Vaccines. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 419-450.
- Cantrelle, P. Etude démographique dans la région du Siné-Saloum (Sénégal) : état civil et observation démographique 1963-1965, Paris:Travaux et Documents de l'ORSTOM, 1969. pp. 1-121.
- Caulin, C., Chastang, C., Dahan, R. Méthodologie de l'évaluation thérapeutique. Paris:Masson, 1993. pp. 1-340.
- Chaby, R., Caroff, M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* Endotoxin. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 247-271.
- Chen, R.T. Safety of Acellular Pertussis Vaccine: Follow-Up Studies. In: *Pertussis Vaccine Trials*. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 373-375.
- Chen, R.T., Orenstein, W.A. Epidemiologic methods in immunization programs. *Epidemiol Rev* 18:99-117, 1996.
- Chen, R.T., Weierbach, R., Bisoffi, Z., Cutts, F.T., Rhodes, P., Ramarosan, S., Ntembagara, C., Bizimana, F. A 'Post-Honeymoon Period' Measles Outbreak in Muyinga Sector, Burundi. *Int J Epidemiol* 23:185-193, 1994.
- Cherry, J.D. The Epidemiology of Pertussis and pertussis Immunization in the United Kingdoms and the United States : A comparative study. Year Book Medical Publishers, 1984. pp. 1-78.
- Chick, H., Dalyell, E.J. Observations on the influence of foods rich in accessory factors in stimulating development in backward children. *Br Med J* 2:1061-1066, 1921.
- Chievitz, I., Meyer, A.H. Recherches sur la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur* 10:504-524, 1916.
- Cockburn, W.C. The early history of typhoid vaccination. *J R Army Med Corps* 101:171-185, 1955.
- Cohen, P.C., Scadron, S.J. The effects of active immunization of the mother upon the offspring. *J Pediatr* 29:609-613, 1946.
- Comstock, G.W. Uncontrolled ruminations on modern controlled trials. *Am J Epidemiol* 108:81-84, 1978.
- Comstock, G.W. Vaccine evaluation by case-control or prospective studies. *Am J Epidemiol* 131:205-207, 1990.

- Connor, J.D. Evidence for an etiologic role of adenoviral infection in pertussis syndrome. *N Engl J Med* 283:390-394, 1970.
- Coste, J., Spira, A. La proportion de cas attribuables en santé publique. Définition(s), estimation(s) et interprétation. *Resp-Info* 39:399-411, 1991.
- Cravitz, L., Cauley, J.H. Pertussis immunization program of the Boston health department. *JAMA* 129:539-541, 1945.
- Cutts, F.T., Smith, P.G., Mann, G., Colombo, S., Ascherio, A., Soares, A.C. Field evaluation of measles vaccine efficacy in Mozambique. *Am J Epidemiol* 131:349, 1990.
- Dabis, F., Drucker, J., Moren, A. Evaluation de la couverture vaccinale. In: *Epidémiologie d'intervention*. Paris: Arnette, 1992, p. 449-463.
- Darenberg. Guillaume de Baillou. In: *Dictionnaire général de biographie, d'histoire, de mythologie, de géographie ancienne et moderne*. Edité par Dezobry, C., Bachdet, T. Paris: Dezobry, E. Magdeleine et Cie., 1861.
- De Melker, H.E., Conyn Van Spaendonck, M.A., Rümke, H.C., Van Wijngaarden, J.K., Mooi, F.R., Schellekens, J.F. Pertussis in the Netherlands : an Outbreak Despite High Levels of Immunization with Whole-Cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 3:175-178, 1997.
- Debré, R. Prévention de la coqueluche par l'injection de sérum de coquelucheux prélevé à la quatrième semaine de la maladie. *Bull Acad Natl Med* 89:348-351, 1923.
- Debré, R., Marie, J., Pretet, H. Les races de Bacilles de Bordet-Gengou isolées à Paris. *CR Soc Biol et Filiales* 98:761-62, 1928.
- Deforge, Y. L'un et le multiple. In: *La mesure : instruments et philosophies*. Edité par Beaune, J.C. Seyssel: Champ Vallon, 1994, p. 271-276.
- Department of Health and Human Services. Proceedings of the 6th international symposium on pertussis. September 26-28, 1990, Bethesda, Maryland:Department of health and human services, 1990. pp. 1-408.
- Desenclos, J.C., Hubert, H. Limitations to the universal use of capture-recapture methods. *Int J Epidemiol* 23:1322-1323, 1994.
- Doll, R. Sir Austin Bradford Hill, 1897-1991. *Stat Med* 12:795-806, 1993.
- Edwards, K.M. Acellular Pertussis Vaccines - A solution to the Pertussis Problem ? *J Infect Dis* 168:15-20, 1993.
- Edwards, K.M., Decker, M.D. Acellular pertussis vaccines for infants. *N Engl J Med* 334:391-392, 1996.

Edwards, K.M., Karzon, D.T. Pertussis vaccines. In: The Pediatric Clinics of North America. Edité par Bellanti, J.A. Philadelphia: W.D. Saunders Company, 1990, p. 549-566.

Eldering, G., Kendrick, P.L. Incidence of parapertussis in the Grand Rapids area as indicated by 16 years experience with diagnostic cultures. *Am J Public Health* 42:27, 1952.

Eriksson, M., Granström, G., Wretling, B., Granström, M., Askelöf, P. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Activity in Nasopharyngeal Aspirates for Rapid Diagnosis of Whooping Cough in Relation to Culture and Serology. *Scand J Infect Dis* 23:731-735, 1991.

Evans, D.G. The failure of whooping-cough and adult sera to neutralise pertussis toxin. *J Path Bacteriol* 59:341-342, 1947.

Fayers, P.M., Hand, D.J. Generalisation from phase III clinical trials : survival, quality of life, and health economics. *Lancet* 350:1025-1027, 1997.

Felton, H.M., Verwey, W.F. The epidemiological evaluation of a non-cellular pertussis antigen. *Pediatrics* 16:637-651, 1955.

Fibiger, J. Bakteriologiske studier over Diphtheri. *Hospitalstidende* 1895.

Fibiger, J. Om Serumbehandling af Difteri. *Hospitalstidende* 308-351, 1898.

Fine, P.E. Can Pertussis be Eradicated? In: The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine. 5th International Symposium on Pertussis. Edité par Kimura, M., Manclark, C.R., 1988a, p. 129-131.

Fine, P.E. Epidemiological Considerations for Whooping Cough Eradication. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988b, p. 451-467.

Fine, P.E. Adult Pertussis: A Salesman's Dream - and an Epidemiologist's nightmare. *Biologicals* 25:195-198, 1997a.

Fine, P.E. Implications of Different Study Designs for the Evaluation of Acellular Pertussis Vaccines. In: Pertussis Vaccine Trials. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997b, p. 123-133.

Fine, P.E., Clarkson, A. Reflexions on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 9:866, 1987.

Fine, P.E., Clarkson, J.A. The recurrence of whooping cough : possible implications for assessment of vaccine efficacy. *Lancet* 1:666-669, 1982.

Fine, P.E., Zell, E.R. Outbreaks in highly vaccinated populations : implications for studies of vaccine performance. *Am J Epidemiol* 139:77-90, 1994.

Fishel, C.W., Cronholm, L.S., Keller, K.F. The influence of *B. pertussis* on the adenylyl cyclase and phosphodiesterase enzymes of mouse tissue. In: International Symposium on Pertussis. Edité par Van Hemert, P.A., Van Ramshorst, J.D., Regamey, R.H. New York: S. Karger, Basel, 1970, p. 190-197.

Francis, T. Symposium on controlled vaccine. Field trials : poliomyelitis. Am J Public Health 47:283-287, 1957.

Francis, T., Korns, R.F., Voight, R.B., Boisen, M., Hemphill, F.N., Napier, J.A., Tolchinsky, E. An evaluation of the 1954 poliomyelitis vaccine trials. Summary report. Am J Public Health 45:1-63, 1955.

Galazka, A.M. Control of pertussis in the world. World Health Stat Q 45:238-247, 1992.

Gangarosa, E.J., Galazka, A.M., Wolfe, C.R., Phillips, L.M., Gangarosa, R.E., Miller, E., Chen, R.T. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control : the untold story. Lancet 351:356-361, 1998.

Gardner, A.D., Leslie, P.H. Early diagnosis of whooping-cough by the cough droplet method. Lancet 9-12, 1932.

Garenne, M., Cantrelle, P. Three decades of research on population and health : the ORSTOM experience in rural Senegal : 1962-1991. In: Socio-cultural determinants of morbidity and mortality in developing countries : the role of longitudinal studies. Liège, Belgique: IUSSP, 1991, pp. 43.

Goldman, W.E. Tracheal Cytotoxin of *Bordetella pertussis*. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 231-246.

Gordon, J.E., Hood, R.I. Whooping cough and its epidemiological anomalies. Am J Med Sci 222:333-361, 1951.

Goupil, J.M. Thèse pour le doctorat en médecine. L'histoire de la coqueluche. Faculté de Médecine de Caen, 1976. pp. 1-59.

Granoff, D.M., Rappuoli, R. Are Serological Responses to Acellular Pertussis Antigens Sufficient Criteria to Ensure that New Combination Vaccines are Effective for Prevention of Disease? In: Pertussis Vaccine Trials. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 379-389.

Granström, M., Olinder-Nielsen, A.M., Holmblad, P., Mark, A., Hanngren, K. Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. Lancet 338:1230-1233, 1991.

Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A.E., Anemona, A., Degli Atti, L.C., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W.C., Klein, D.L., Wassilak, S.G. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. N Engl J Med 334:341-348, 1996.

Greenberg, D.S. Dubious ethics in NIH's foreign vaccine trials. *Sci Gov Rep* 24:1-6, 1994.

Greenland, S., Frerichs, R.R. On measures and models for the effectiveness of vaccines and vaccination programmes. *Int J Epidemiol* 17:456-463, 1988.

Greenwood, B.M., Yule, G.U. The statistics of anti-typhoid and anti-cholera inoculations, and the interpretation of such statistics in general. *Section Epidemiol State Med* 113-194, 1915.

Griffiths, E. Efficacy of Whole-Cell Pertussis Vaccine. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 353-374.

Grimprel, E. La coqueluche : contributions à l'amélioration du diagnostic, à l'analyse épidémiologique et à la prévention vaccinale. Paris:Université Paris V, Faculté de médecine Necker enfants malades, 1996. pp. 1-119.

Grmek, M.D. Les premières étapes de la vaccination. Mythe et Histoire. In: *L'aventure de la vaccination*. Edité par Moulin, A.M. Fayard, 1996, p. 41-56.

Gueirard, P. Thèse. Infection respiratoire à *Bordetella bronchiseptica* : facteurs impliqués, réponses immunes, conséquences vaccinales. Faculté de Médecine Cochin, 1995. pp. 1-235.

Guiso, N. Isolation, Identification and Characterization of *Bordetella pertussis*. In: *Pertussis Vaccine Trials*. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997a, p. 233-238.

Guiso, N., Itean, I., Preziosi, M.P., Kane, C., M'Boup, S., Simondon, F. Analysis of *Bordetella pertussis* isolates collected during a pertussis vaccine trial in Senegal. *Congress of International Workshop on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Pathogenic microorganisms*, 1997b.

Guiso, N., Szatanik, M., Rocancourt, M. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase : A Protective Antigen against Lethality and Bacterial Colonization in Murine Respiratory and Intracerebral Models. In: *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis*, 1990, p. 207-211.

Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E., Storsaeter, J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 334:349-355, 1996.

Halloran, E.M., Haber, M., Ira, M., Longini, J.R., Struchiner, C.J. Direct and indirect effects in vaccine efficacy and effectiveness. *Am J Epidemiol* 133:323-331, 1991.

Halloran, E.M., Struchiner, C.J., Longini, I.M. Study designs for evaluating different efficacy and effectiveness aspects of vaccines. *Am J Epidemiol* 146:789-803, 1997.

Harrisson, W.T. Some observations on the use of alum-precipitated diphtheria toxoid. *Am J Public Health* 35:298-300, 1935.

- Harrison, W.T., Franklin, J.P., Bell, J.A. Prophylactic value of a single dose of precipitated pertussis vaccine. *Public Health Rep* 53:793-796, 1938.
- Heiberg, P. Studier over den statistiske Undersogelsesmetode som Hjaelpemiddel ved terapeutiske undersogelser, 1897. pp. 1-40.
- Hewlett, E.L. *Bordetella* species. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Edité par Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. Churchill Livingstone, 1990, p. 1756-1762.
- Hewlett, E.L., Cherry, J.D. New and Improved Vaccines Against Pertussis. In: New generation vaccines. Edité par Levine, M.M., Woodrow, G.C., Kaper, J.B., Cobon, G.S. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, p. 387-416.
- Hill, A.B. Medical ethics and controlled trials. *Br Med J* 1:1043-9, 1963.
- Hill, A.B. Reflexions on the controlled trial. *Ann Rheum Dis* 25:107-13, 1966.
- Hogarth, J. Vocabulaire de la Santé publique. W.H.O., 1977.
- Hoppe, J.E. Methods for Isolation of *Bordetella pertussis* from Patients with Whooping Cough. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:616-620, 1988.
- Howson, C.P., Howe, C.J., Fineberg, H.V. Adverse effects of pertussis and rubella vaccines. Washington, DC:Institute of Medicine. National Academy Press, 1991. pp. 1-367.
- Iber, F.L., Riley, W.A., Murray, P.J. Conducting Clinical Trials. New York:Plenum Publishing Corporation, 1987. pp. 1-353.
- Ira, M., Longini, J.R., Halloran, E.M. A frailty mixture model for estimating vaccine efficacy. *Appl Stat* 45:165-173, 1996.
- Irons, L.I., Ashworth, L.A., Robinson, A. Release and Purification of Fimbriae from *Bordetella pertussis*. In: Dev Biol Stand. Proceedings of the 4th International Symposium on Pertussis. Edité par Int Ass Biol Stand, 1984, p. 153-163.
- Ivanoff, B., Robertson, S.E. Pertussis : A Worlwide Problem. In: Pertussis Vaccine Trial. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 3-13.
- Jacques, J.M. La méthode de Galien pharmacologue dans les deux traités sur les médicaments composés. In: Galen on Pharmacology. Philosophy, History and Medicine. Proceedings of the 5th International Galen Colloquium, Lille, 16-18 March 1995. Edité par Debru, A. Brill, 1997, p. 103-129.
- Jenicek, M., Cléroux, R. Epidémiologie. Principes, Techniques, Applications. St. Hyacinthe, Qué:Edisem, Inc., 1982. pp. 1-454.
- Jenicek, M., Cléroux, R. Epidémiologie clinique, clinimétrie. Edisem Maloine, 1985. pp. 1-254.

Joseph, R., Lépine, P., Maurin, J., Job, J.C., Chany, C. Infection simultanée par *Haemophilus pertussis* et par un adénovirus type 5 chez une fillette atteinte de coqueluche avec accidents cérébraux. *Press Med* 69:1550-1551, 1958.

Kallings, L.O., Olin, P., Storsaeter, J. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in sweden-protective efficacy and adverse events. *Lancet* 955-960, 1988.

Karlsson, J.O., Andersson, R.G., Askelöf, P., Elwing, H., Granström, M., Grundström, N., Lundström, I., Öhman, L. The melanophore aggregating response of isolated fish scales : a very rapid and sensitive diagnosis of whooping cough. *Fed Eur Microbiol Soc* 82:169-176, 1991.

Kendrick, P.L. *J Pediatr* 9:117, 1936.

Kendrick, P.L., Eldering, G. A study in active immunization against pertussis. *Am J Hyg* 29:133-139, 1939.

Kendrick, P.L., Eldering, G., Dixar, M.K. Mouse protection test in the study of pertussis vaccine : a comparative series using intracerebral route for challenge. *Am J Public Health* 37:803-810, 1947.

Kendrick, P.L., Thompson, M., Eldering, G. Immunity response of mothers and babies to injections of pertussis vaccine during pregnancy. *Am J Dis Child* 70:25-30, 1945.

Kernick, D.P. From efficacy to cost-effectiveness. *Lancet* 350:1781, 1997.

Kimura, M., Manclark, C.R. Proceedings of 5th international symposium on pertussis. Copenhagen, Denmark. September 22-23, 1988, Tokyo, Japan:Tokai J. Exp. Clin. Med. Tokai University Press, 1989. pp. 1-278.

Kleinbaum, D.G., Kupper, L.L., Morgenstern, H. *Epidemiologic Research. Principles and quantitative methods.* New York:Van Nostrand Reinhold, 1982. pp. 1-529.

Klenk, E.L., Gaultney, J.V., Bass, J.W. Bacteriologically Proved Pertussis and Adenovirus Infection Possible association. *Am J Dis Child* 124:203-207, 1972.

Kloos, W.E., Mohapatra, N., Dobrogasz, W.J. *et al.* Desoxyribonucleide sequence relationships among *Bordetella* species. *Int J Syst Bacteriol* 31:173-176, 1981.

Knudsen, K., Aaby, P., Whittle, H.C., Rowe, M., Samb, B., Simondon, F., Steine, J., Fine, P.E. Child mortality following low, median, and high titre measles vaccination in West Africa. *Int J Epidemiol* 25:665-73, 1996.

Kristensen, K.H., Lautrop, H. En familieepidemi forarsaget af kighostebakterien *Bordetella bronchiseptica*. *Ugeskr Laeger* 124:303-308, 1962.

130. Kristensen, M. Recherches sérologiques sur le Bacille de la coqueluche. *CR Soc Biol et Filiales* 96:355-57, 1927.

- Krumwiede, C., Mishulow, L., Oldenbusch, C. The existence of more than one immunologic type of *B. pertussis*. *J Infect Dis* 32:22-32, 1923.
- Lapin, J.H. Whooping cough. Springfield ill.:Springfield, 1943.
- Laplanche, A., Com-Noughé, C., Flamant, R. Méthodes statistiques appliquées à la recherche clinique. Paris:Médecine-Sciences Flammarion, 1987. pp. 1-168.
- Last, J.M. A dictionary of epidemiology. New York:Oxford University Press, 1995. 3<sup>ème</sup> Ed. pp. 1-180.
- Leclerc, A., Papoz, L., Bréart, G., Lellouch, J. Dictionnaire d'épidémiologie. Paris:Frison-Roche, 1990. pp. 1-125.
- Lemoine, G. Coqueluche. In: Grande encyclopédie. Paris: Lamirault et Cie, 1832,
- Leslie, P.H., Gardner, A.D. The phases of *Haemophilus pertussis*. *J Hyg* 31:432-34, 1931.
- Lewis, J.A., Jones, D.R., Röhmel, J. Biostatistical methodology in clinical trials - An European guideline. *Stat Med* 14:1655-1657, 1995.
- Lichty, J.A., Slavin, B., Bradford, W.L. An attempt to increase resistance to pertussis in newborn infants by immunizing their mothers during pregnancy. *J Clin Invest* 17:613-621, 1938.
- Lilienfeld, A.M., Lilienfeld, D.E. Foundations of Epidemiology. New York:Oxford University Press, 1980. 2<sup>nd</sup> Ed. pp. 1-375.
- Lilienfeld, D.E., Stolley, P.D. Foundations of Epidemiology. New York:Oxford University Press, 1994. 3<sup>ème</sup> Ed. pp. 1-371.
- Lopez, A.L., Blumberg, D.A. An overview of the status of acellular pertussis vaccines in practice. *Drugs* 54:189-196, 1997.
- Lurie, P., Wolfe, S.M. Unethical trials of interventions to reduce perinatal transmission of the human immunodeficiency virus in developing countries. *N Engl J Med* 337:853-856, 1997.
- Lynn, F., Reed, G.F., Meade, B.D. A Comparison of Enzyme Immuno-Assays Used to Measure Serum Antibodies to Components of *Bordetella pertussis*. In: Pertussis Vaccine Trials. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 197-204.
- MacDonald, H., MacDonald, E.J. Experimental pertussis. *J Infect Dis* 53:328-330, 1933.
- MacMahon, B.J., Pugh, T.F. Epidemiology. Principles and Methods. Boston:Little, Brown and Company, 1970. pp. 1-376.
- Madsen, T. Vaccination against whooping cough. *JAMA* 101:187-188, 1933.



Manclark, C.R., Hennessen, W. Proceedings of the 4th international symposium on pertussis, Switzerland:S. Karger AG, 1985. pp. 1-594.

Meinert, C.L. Clinical trials : designs, conduct, and analysis. New York:Oxford University Press, 1986. pp. 1-469.

Miettinen, O.S. Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. *Am J Epidemiol* 99:325-332, 1974.

Miller, D.L., Alderslade, R., Ross, E.M. Whooping cough and whooping cough vaccine : the risks and benefits debate. *Epidemiol Rev* 4:1-24, 1982.

Miller, E., Gay, N.J. Epidemiological Determinants of Pertussis. In: *Pertussis Vaccine Trial*. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 15-23.

Miller, J.J. A controlled study in pertussis immunization. *J Pediatr* 13:290-291, 1938.

Miller, J.J., Ryan, M.L., Havard, E. The pertussis agglutinin skin test. *Am J Dis Child* 877:886, 1948.

Morley, D. Pédiatrie dans les pays en développement : problèmes prioritaires. Paris:Flammarion Médecine-Sciences., 1977. pp. 1-406.

Morley, D., Woodland, M., Martin, W.J. Whooping cough in Nigerian children. *Trop Geogr Med* 18:169-182, 1966.

Mortimer, E.A. Pertussis and its prevention : a family affair. *J Infect Dis* 161:473-479, 1990.

Mortimer, E.A. Pertussis vaccine. In: *Vaccines*. Edité par Plotkin, S.A., Mortimer, E.A. W.B. Saunders company, 1994, p. 91-135.

Mortimer, E.A., Cherry, J.D. Pertussis Immunizations : Science and the Public. In: *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 5th International Symposium on Pertussis. Edité par Kimura, M., Manclark.C.R. 1988, p. 177-179.

MRC. The prevention of whooping-cough by vaccination. A medical research council investigation. *Br Med J* 1463-1471, 1951.

MRC. Vaccination against whooping-cough. Relation between protection in children and results of laboratory tests. *Br Med J* 454-462, 1956.

MRC. Vaccination against whooping-cough. *Br Med J* 994-1000, 1959.

Muller, A.S., Leeuwenburg, J. Epidémiologie et endiguement de la coqueluche. W.H.O. pp.1-29, 1985.

Muller, A.S., Leeuwenburg, J., Voorhoeve, A.M. Pertussis in a rural area of Kenya : epidemiology and results of a vaccine trial. *Bull WHO* 62:899-908, 1984.

Nakase, Y., Endoh, M. Heat-Labile Toxin of *Bordetella pertussis*. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 211-229.

Nakase, Y., Takatsu, K., Tateishi, M. *et al.* Heat-labile toxin of *Bordetella pertussis* purified by preparative acrylamide gel electrophoresis. Jpn J Microbiol 13:359-366, 1969.

National Institute of Health Pertussis Conference. Acellular Pertussis Vaccine Trials : Results and Impact on U.S. Public Health. June 3-5, 1996, Washington, DC:Omni Shoream, 1996.

Novotny, P., Chubb, A.P., Cownley, K., Martaraz, J.A. Adenylate cyclase activity of a 68,000 molecular weight-protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchisystica*. Infect Immun 50:199-206, 1985.

Olin, P., Gustafsson, L., Hallander, H.O., Heijbel, H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Lancet 350:1569-77, 1997a.

Olin, P. Commentary : the best acellular pertussis vaccines are multicomponent. Pediatr Infect Dis J 16:517-519, 1997b.

Olin, P., Rasmussen, F., Gottfarb, P. Schedules and protection, simultaneous vaccination and safety : experiences from recent controlled trials. Int J Infect Dis 1:143-147, 1997c.

Olin, P., Gustafsson, L., Rasmussen, F., Hallander, H.O., Heijbel, H., Gottfarb, P. Efficacy trial of acellular pertussis vaccines. Technical report trial II with preplanned analysis of efficacy, immunogenicity and safety, Stockholm:SMI-tryck, 1997d. pp. 1-70.

Olson, L.C. Pertussis. Medicine 54:427-469, 1975.

Orenstein, W.A., Bernier, R.H., Dondero, T.J., Hinman, A.R., Marks, J.S., Bart, K.J., Sirotkin, B. Field evaluation of vaccine efficacy. Bull WHO 63:1055-1068, 1985.

Orenstein, W.A., Bernier, R.H., Hinman, A.R. Assessing vaccine efficacy in the field further observations. Epidemiol Rev 10:212-241, 1988.

Papoz, L. Qualité des critères de jugement. In: Essais cliniques : théorie, pratique et critique. Edité par Bouvenot, G., Vray, M. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 1996, p. 25-38.

Papoz, L., Balkau, B., Lellouch, J. Case Counting in Epidemiology: Discussion of Methods Based on Multiple Data Sources. Int J Epidemiol 1-18, 1995.

Paul, J. A history of poliomyelitis, New Haven, CN:Yale University Press, 1971.

Pearson, K. Antityphoid inoculation. Br Med J 2:1667-1668, 1904a.

Pearson, K. Antityphoid inoculation. Br Med J 2:1432, 1904b.

- Pearson, K. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1542, 1904c.
- Pearson, K. Report on certain enteric fever inoculation statistics. *Br Med J* 2:1243-1246, 1904d.
- Pearson, K. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1775-1776, 1904e.
- Peltola, H., Kilpi, T., Anttila, M. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine childhood immunisation conjugate vaccines. *Lancet* 340:592-594, 1992.
- PIDS et ESPID. First international pediatric infectious disease conference. September 21-22, 1995, Monterey, California: PIDS; ESPID, 1995. pp. 1-157.
- Pilly, E. *Maladies infectieuses*. Montmorency: APPIT, 2M2, 1996. pp. 1-543.
- Pittman, M. Pertussis toxin : the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis* 1:401-412, 1979.
- Pittman, M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis J* 3:467-486, 1984.
- Pittman, M. History of the development of pertussis vaccine. *Dev Biol Stand* 73:13-29, 1991.
- Plotkin, S.A., Cadoz, M. The acellular pertussis vaccine trials : an interpretation. *Pediatr Infect Dis J* 16:508-17, 1997.
- Pocock, S.J. *Clinical trials. A practical approach*. John Wiley & sons Ltd., 1983. pp. 1-266.
- Poland, G.A. Still more questions on pertussis vaccines. *Lancet* 350:1564-1565, 1997.
- Preston, N.W. Pertussis Today. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 1-18.
- Preziosi, M.P. DEA : Epidemiologie de la coqueluche en Afrique. 1996. (Non publié)
- Promed. Pertussis-Australia. *The Canberra Times* 1997.
- Radhakrishna, S., Nair, N.G., Jayabal, P. Implications of misdiagnostic in field trials of vaccines. *Indian J Med Res* 80:711-720, 1984.
- Reizenstein, E. Diagnostic Polymerase Chain Reaction. In: *Pertussis Vaccine Trials*. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 247-254.
- Relyveld, E., Huet, M. Une histoire des anatoxines. In: *L'aventure de la vaccination*. Edité par Moulin, A.M. Fayard, 1996, p. 248-264.
- Rothman, K.J. *Modern epidemiology*. Edité par Rothman, K.J., 1986. pp. 1-358.

Rothman, K.J., Michels, K.B. Sounding board. The continuing unethical use of placebo controls. *N Engl J Med* 331:394-398, 1994.

Rumeau-Rouquette, C., Blondel, B., Kaminski, M., Bréart, G. *Epidémiologie. Méthodes et pratique*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 1993. pp. 1-312.

Salisbury, D.M. Evolution of Pertussis Vaccination in Europe. International symposium on pertussis vaccination and its influence on the immunization schedule. Funchal, 13-16 Nov, 1997.

Sargent, C.A., Merrell, M. Method of Measuring the Effectiveness of Preventive Treatment in Reducing Morbidity. *Am J Public Health* 30:1431-1435, 1940.

Sato, H. Japanese Experience with 60 Million Doses of Acellular Pertussis Vaccines. In: *Pertussis Vaccine Trials*. Edité par Brown, F. Basel: Int Ass Biol Stand, 1997, p. 327-329.

Sato, Y., Kimura, M., Fukumi, H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* i:122-126, 1984.

Sato, Y., Sato, H. Animal Models of Pertussis. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 309-325.

Sauer, L.W. Whooping cough. New phases of the work on immunization and prophylaxis. *JAMA* 112:305-308, 1939.

Schmitt, H.J. Efficacy of Acellular Pertussis Vaccine in Early Childhood After Household Exposure. *JAMA* 275:37-41, 1996.

Schmitt-Grohé S., Cherry, J.D., Heininger, U. *et al.* Pertussis in German adults. *Clin Infect Dis* 27:860-866, 1995.

Schneerson, R., Robbins, J.B., Taranger, J., Trollfors, B., Lagergard, T. Toxoid vaccine for pertussis. *Lancet* 349:137-138, 1997.

Schwartz, D., Flamant, R., Lellouch, J. *L'essai thérapeutique chez l'homme*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1981. 2<sup>nd</sup> Ed. pp. 1-297.

Sédallian, P. Coqueluche. In: *Traité d'hygiène*. Edité par Rochaix, A., Sédallian, P., Sohier, R. Massar, 1946, p. 1255-1258.

Shapiro, S.H., Louis, T.A. *Clinical trials. Issues and Approaches*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1983. pp. 1-209.

Singer-Brooks, C.H. A controlled study of pertussis prophylaxis. *J Pediatr* 13:292-297, 1938.

Smith, P.G. Retrospective assessment of the effectiveness of BCG vaccination against tuberculosis using the case-control method. *Tubercle* 62:23-35, 1982.

Smith, P.G. Evaluating Interventions against Tropical Diseases. *Int J Epidemiol* 16:159-166, 1987.

Smith, P.G., Rodrigues, L.C., Fine, P.E. Assessment of the Protective Efficacy of Vaccines against Common Disease Using Case-Control and Cohort Studies. *Int J Epidemiol* 13:87-93, 1984.

Spriet, A., Simon, P. *Méthodologie des essais cliniques des médicaments*. Laboratoire Hoechst, 1986. pp. 1-231.

Standfast, A.F. The comparison between field trials and mouse protection tests against intranasal and intracerebral challenges with *Bordetella pertussis*. *Immunology* 2:135-143, 1958.

Sticker, G. Whooping cough. In: Variola, Vaccination, Varicella, Cholera, Erysipelas, Whooping cough, Hay fever. Edited par Moore, J.W. Philadelphia : W.B. Saunders Co., 1906, p. 539-620.

Storsaeter, J., Hallander, H.O., Farrington, C.P. Evaluation of Laboratory Methods Used for the Diagnosis of Pertussis Infection and Disease in the Swedish Efficacy Trial. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis, 1990a, p. 291-294.

Storsaeter, J., Hallander, H.O., Farrington, C.P., Olin, P., Möllby, R., Miller, E. Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 8:457-461, 1990b.

Ström, J. Is universal vaccination against pertussis always justified? *Br Med J* 1184-1186, 1960.

Susser, M. Judgement and causal inference : criteria in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 105:1-15, 1977.

Thompson, S., Barber, J. From efficacy to cost-effectiveness. *Lancet* 350:1781-1782, 1997.

Trollfors, B., Taranger, J., Lagergard, T., Lind, L., Sundii, V., Zackrisson, G., Lowe, C.U., Blackwelder, W.C., Robbins, J.B. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med* 333:1045-1050, 1995.

Tuomanen, E. *Bordetella pertussis* Adhesins. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edited par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 75-94.

Ui, M. The Multiple Biological Activities of Pertussis Toxin. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edited par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988, p. 121-145.

Van Savage, J., Decker, M.D., Edwards, K.M. *et al.* Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on the vaccine response. *J Infect Dis* 161:487-492, 1990.

Varmus, H., Satcher, D. Ethical complexities of conducting research in developing countries. *N Engl J Med* 337:1003-1005, 1997.

Wanscher, O. Om Diphtheritis og Croup, 1877. pp. 1-167.

Wardlaw, A.C., Parton, R. The Host-Parasite Relationship in Pertussis. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Edité par Wardlaw, A.C., Parton, R. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1988a, p. 327-352.

Wardlaw, A.C., Parton, R. Pathogenesis and immunity in Pertussis, John Wiley & Sons, 1988b.

Wassilak, S.G., Fine, P.E. Rapporteurs's Summary. In: Pertussis Vaccine Trials. Edité par Brown, F., Greco, D., Mastrantonio, P., Salmaso, S., Wassilak, S. Basel: Dev Biol Stand. Karger, 1997, p. 187-193.

Weiss, A.A., Hewlett, E.L. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Ann Rev Microbiol* 40:661-86, 1986.

Weiss, E.S., Kendrick, P.L. The effectiveness of pertussis vaccine : An application of Sargent and Merrell's method of measurement. *Am J Dis Child* 306-309, 1943.

Whittle, H.C., Mann, G., Eccles, M. *et al.* Effects of dose and strain of vaccine on success of measles vaccination of infants aged 4-5 months. *Lancet* 1:963-6, 1988.

W.H.O. Vaccinations antidiphthérique et anticoquelucheuse. WHO Tech Rep Ser 61:1-96, 1953.

W.H.O. Report of the meeting on case definition of pertussis. Geneva, 10-11 january, 1991, Geneva:W.H.O., 1991. pp. 1-11.

Wilson, G.S., Bradley, W.H., Carmichael, E.A. *et al.* Poliomyelitis and prophylactic inoculation against diphtheria, whooping-cough, and smallpox. *Lancet* 1223-1231, 1956.

Wolff, J., Cook, G.H. Activation of thyroid membrane adenylate cyclase increases cyclic AMP and hormone release in pituitary tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136:463-469, 1973.

Woods, D.E., Franklin, R., Cryz, S.J. *et al.* Development of a rat model for respiratory infection with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 57:1018-1024, 1989.

Wright, A.E. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1489-1491, 1904a.

Wright, A.E. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1343-1345, 1904b.

Wright, A.E. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1614, 1904c.

Wright, A.E. Antityphoid inoculation. *Br Med J* 2:1727, 1904d.

Wyatt, J. L'histoire de la poliomyélite dans le tiers-monde. In: L'aventure de la vaccination. Edité par Moulin, A.M. Fayard, 1996, p. 329-338.

Zourbas, J. Etude critique de la vaccination anti-coquelucheuse dans les crèches de la région parisienne et en pratique de ville. Bull Acad Natl Med 149:377-394, 1965.

## Abbreviations

A/B Subunit	Proteine de type .A/B
AC-Hly	Adenyl Cyclase hemolysine
AE	Aerosol (test murin d'inhalation en chambre)
ANRS	Agence Nationale de Recherche contre le SIDA
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. Avium</i>	<i>Bordetella avium</i>
<i>B. Bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>B. Parapertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>
CCNE	Comité Consultatif National d'Ethique
CCPPRB	Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se livrant à la Recherche Biomédicale
CDC	Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia USA
CIOMS	Conseil des Organisations Internationales des Sciences Médicales
CT	Toxine cholérique
DT	Toxine diphtérique
DTaP	Vaccin Diphtérie, Tétanos et Coqueluche acellulaire
DTwP	Vaccin Diphtérie, Tétanos et coqueluche à germes entiers
ECR	Essai clinique randomisé
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV	Efficacité vaccinale
EVa	Efficacité vaccinale absolue
FHA	(Filamentous Haemmagglutinin) hémagglutinine filamenteuse
FIM	Agglutinigènes
HLT (ou DNT)	(Heat Labil Toxin) toxine dermo nécrotique
IC	Intra Cerebral (test murin d'inoculation ou test de Kendrick)
IgG	Immunoglobuline de type G
IPV	(Inactivated Polio Vaccine) Vaccin anti poliomyélitique inactivé
ID	Intradermique
IM	Intra musculaire
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IV	Intra veineux
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MRC	Medical Research Council
<i>N. Gonorrhoea</i>	<i>Neisseria Gonorrhoea</i>
nb.	Nombre
NIH	National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
NO	Oxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORSTOM	Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération)
PRN	Pertactine
RCT	(Randomized Controlled Trials). Essais cliniques randomisés
p	Page
PEV	Programme Elargi de Vaccinations
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PT	(Pertussis Toxin) pertussinogène
RGD	Séquence Arginine-Glycine-Asparagine indiquant une fonction d'adhésion
TAV	Taux d'attaque chez les vaccinés
TANV	Taux d'attaque chez les non-vaccinés
TCT	(Tracheal Cytotoxin) : cytotoxine trachéale
TT	Toxine tétanique
<i>V. Cholerae</i>	<i>Vibrio Cholerae</i>



## Table des matières

Introduction.....	8
1. Le problème du contrôle de la coqueluche et son contexte méthodologique.....	12
1.1 La coqueluche et sa prévention.....	12
Introduction.....	13
1.1.1 Etiologie.....	16
1.1.2 Pathogénie.....	17
1.1.2.1 Différents antigènes.....	18
1.1.2.2 Différentes méthodes d'étude de la pathogénicité.....	22
1.1.2.3 Modèles animaux.....	28
1.1.2.4 Différents scénarios physiopathologiques.....	29
1.1.3 Clinique.....	31
1.1.4 Diagnostic.....	35
1.1.4.1 Diagnostic différentiel clinique.....	35
1.1.4.2 Diagnostic de laboratoire.....	36
1.1.5 Epidémiologie.. ..	39
1.1.5.1 Caractéristiques temporelles.....	40
1.1.5.2 Caractéristiques spatiales.....	40
1.1.5.3 Caractéristiques individuelles.....	41
1.1.5.4 Modifications épidémiologiques liées à la vaccination.....	42
1.1.5.5 Données actuelles.....	44
1.1.6 Traitement.....	46
1.1.7 Prévention par la vaccination.....	47
1.1.7.1 Efficacité.....	47
1.1.7.2 Tolérance.....	53
1.2 Mesure de l'efficacité des vaccins.....	55
Introduction.....	56
1.2.1 Evolution de la mesure de l'effet.....	57
1.2.1.1 Méthodes d'étude.....	57
1.2.1.2 Analyse et interprétation.....	66
1.2.2 Etat actuel de la mesure de l'effet.....	69
1.2.3 Caractéristiques de l'efficacité vaccinale.....	74
1.2.3.1 Nature.....	75
1.2.3.2 Signification.....	75
1.2.3.3 Facteurs de variation.....	79

2. Evaluation épidémiologique des vaccins contre la coqueluche au Sénégal .....	85
Introduction .....	86
2.1 Etude d'immunogénicité .....	89
Introduction .....	89
Résultats .....	90
Discussion .....	91
2.2 Etude d'efficacité .....	92
Introduction .....	92
Résultats .....	93
2.3 Interprétation des résultats sérologiques .....	96
Introduction .....	96
Résultats .....	96
2.4 Influence de l'aspect composite du critère de jugement .....	98
Introduction .....	98
Résultats .....	98
2.5 Aspects pratiques du consentement informé pour la participation .....	100
Introduction .....	100
Résultats .....	101
3. Discussion .....	103
Introduction .....	104
3.1 Standardisation .....	108
3.2 Vaccin de référence .....	108
3.2.1 Les différents types de référence locale .....	109
3.2.2 Problèmes posés par le choix d'une référence locale .....	112
3.2.3 Choix d'une référence internationale .....	114
3.3 Limites des essais cliniques randomisés .....	115
3.3.1 Limite supérieure .....	116
3.3.2 Limite inférieure .....	118
Références .....	121
Table des matières .....	139
Résumé	

## Résumé :

Durant ces 20 dernières années, des études sur l'amélioration des vaccins contre la coqueluche ont été menées. Au delà des résultats spécifiques au domaine de la coqueluche, encore discutés, un enseignement de portée plus générale, applicable à d'autres situations, pourrait être dégagé. Le but de ce travail est de contribuer à initier cette démarche, en faisant porter l'accent sur les aspects méthodologiques des études de protection clinique, et leur relation avec les connaissances physiopathologiques.

Dans une première partie, la nécessité actuelle d'améliorer les vaccins contre la coqueluche pour des raisons de tolérance individuelle et surtout sociale, mais aussi d'efficacité protectrice, est décrite dans le contexte général de cette maladie, de sa physiopathologie, des difficultés d'expérimentation animale liées en partie à l'absence de modèle adéquat, et dans le contexte du développement des vaccins spécifiques. Puis les aspects méthodologiques généraux de l'évaluation épidémiologique des vaccins sont précisés, dans leur structuration vers le standard de l'essai clinique randomisé en double aveugle.

Une deuxième partie décrit le déroulement de l'évaluation clinique d'un vaccin acellulaire contre la coqueluche, en référence à un vaccin classique à germes entiers, au Sénégal. Une première étude d'immunogénicité et de tolérance a permis de montrer que les deux vaccins étaient immunogènes dans cet environnement, et bien tolérés, le vaccin acellulaire étant cependant mieux toléré. Ces résultats ont permis le démarrage de l'étude principale d'efficacité protectrice, qui s'est déroulée sur 5 ans. Le vaccin acellulaire a montré une efficacité protectrice inférieure à celle du vaccin classique, et probablement plus brève. Son utilisation nécessiterait une dose supplémentaire de rappel précoce. Des aspects méthodologiques « intra-essais » sont illustrés à partir de cette étude, dans le but de souligner les limites d'interprétation des valeurs d'efficacité vaccinale. Ces points portent sur la difficulté de la mesure du critère de jugement, à l'exemple des risques d'erreur de classification différentielle dans le cas de la sérologie, et de tentatives pour y remédier, par la méthode d'analyse en capture-recapture. Un travail spécifique sur les aspects éthiques des expérimentations cliniques a porté sur la pratique du consentement informé pour la participation. Il pose le problème de la dimension géographique de l'application des principes, auquel est lié aussi le choix du traitement de référence. La troisième partie discute les difficultés d'interprétation de l'ensemble des résultats issus de la série d'études réalisées dans les dix dernières années. Ces difficultés d'interprétation sont liées au manque de standardisation au niveau des traitements (calendriers vaccinaux), ainsi qu'au niveau des critères de jugement (définition des cas, durée de suivi, type de détection). Ces difficultés auraient été en partie résolues par l'inclusion d'un groupe vaccinal de référence commun à toutes les études, or un groupe placebo ne peut pas être un tel groupe. Des raisons pour l'absence d'un tel groupe de référence commun sont avancées. Enfin, la place des essais cliniques randomisés est discutée par rapport aux études en amont, en particulier sur animal, qui restent indispensables et peut-être négligées, et en aval, par rapport aux études d'effectivité en santé publique, qui apportent un type d'informations complémentaires indispensables, et qui pourraient être initiées plus tôt.

Mots-clés. Coqueluche, Effectivité, Efficacité vaccinale, Essai clinique randomisé, Référence, Standardisation.