

Résultats d'une enquête sérologique réalisée au Cambodge lors d'une vaccination antitétanique des adultes.

M. Schlumberger (1), B. Yvonnet (2), Huong Vu Thi Que (3), Dy Bun Chhem (4), P. Saliou (5),
Le Thi Cam Tu (1) & P. Glaziou (6)

(1) Unité INSERM U618 (protéases et vectorisation pulmonaires), Équipe vecteurs, virus et vaccins, Faculté de pharmacie Philippe-Maupas, 31 avenue Gaspard-Monge, 37200 Tours, France. E-mail : mschlumberger@wanadoo.fr

(2) Laboratoire de microbiologie-immunologie-bioépidémiologie, Faculté de pharmacie Philippe-Maupas, 31 avenue Gaspard-Monge, 37200 Tours, France.

(3) Institut Pasteur du Vietnam, 167 rue Pasteur, quartier N° 3, Hô-Chi-Minh ville, Vietnam.

(4) Direction provinciale de la santé publique, Siem Reap, Cambodge.

(5) Société de pathologie exotique, 28 rue du Docteur-Roux, 75015, Paris, France.

(6) Institut Pasteur du Cambodge, 5 boulevard Monivong, Phnom Penh, Cambodge.

Manuscrit n° 3033. "Santé publique". Reçu le 28 octobre 2006. Accepté le 3 avril 2007.

Summary: Serological study carried out in Cambodia during a tetanus vaccination in adults.

In 1997, the Ministry of Health tested the feasibility and serological activity of a two-dose vaccine at one year interval within a catch-up tetanus immunization programme in a rural population.

In the district of Angkor Thom in the Siem Reap province (15,000 inhabitants), a team of nurses and administrative clerks travelling by motorcycle, conducted between February 1998 and February 1999 an EPI and tetanus immunization of the whole population gathered in meeting points. In 132 child-bearing age female volunteers, 49 following a two-dose schedule at one year interval, and 70 following a WHO three-dose schedule, with two doses at one month interval and a booster dose one year later, tetanus antibodies have been measured before vaccination, one year after the first dose or the two first doses, and six months after the second or third dose of vaccine. 129 male volunteers of the same age were also recruited in the serological study following only the two-dose schedule. The titration was done first with monoantigen ELISA, then with mouse seroneutralisation, the reference method for measuring tetanus seroprotection.

Only 148 (57%) volunteers completely attended the serological study. Compared to seroneutralisation, sensitivity for seroprotection with ELISA was 89% (CI_{95%}: 85%-94%) and specificity 84% (CI_{95%}: 81%-89%). The coverage of the general population vaccinated with two doses, in both sexes and in all age-groups, increased on average from 5% to 70%. The three-dose schedule gave significantly more protection than the two-dose schedule in women tested with seroneutralisation. On a first sample in those with no protective antibodies and testifying they had not been vaccinated before, 51% of these volunteers after one dose and 93% after two doses acquired protective antibodies. On first sample, 52% of female volunteers had protective antibodies in seroneutralisation, against 11.7% in men. 14% of subjects tested in ELISA and 6.8% tested in seroneutralisation showed in a second sample a decrease in titres, although they had received a tetanus vaccine. For unprotected volunteers on first sample and testifying they had not been vaccinated before, neither age nor past chronic cutaneous lesions or cows living around their houses, two possible sources of contact with Cl. tetani, increased significantly seroconversion. Only female volunteers were significantly more seroconverting (81%) compared to men of same age (51%) (RR: 1.60, CI_{95%}: 1.17-2.18) suggesting a memory bias in women supposed to be vaccinated by EPI. 30% of volunteers in ELISA and 14% in seroneutralisation showed spontaneous protecting antibodies in the first sample without having any document or memory of a past tetanus vaccination. Tested by seroneutralisation, no relation was to be found for having spontaneous antibodies with past chronic cutaneous lesions and cows living around their houses. Only the eldest (35-45 y.o.) female volunteers showed significantly more spontaneous antibodies (RR: 3.83, CI_{95%}: 1.74-8.2) than men in the same age-group. A memory bias may be found also in this female age-group.

Good serological response should encourage implementation of a catch-up tetanus vaccination in this country considering the large number of unprotected adults, mainly male adults.

Due to problems with notification and recalling past vaccinations, only a prospective study in an unimmunized large cohort, studying all possible factors of tetanus toxin neutralisation, could confirm the existence and cause of spontaneous antibodies. Excluding vaccination in at-risk population for such a study would be however ethically unacceptable.

**tetanus
collective vaccination
ELISA
seroneutralisation
spontaneous antibody
Angkor Thom
Siem Reap
Cambodia
Eastern South Asia**

Résumé:

En 1997, le Ministère de la santé a testé la faisabilité en milieu rural d'une vaccination collective antitétanique de rattrapage en deux doses espacées d'une année, en vérifiant la séroconversion post-vaccinale chez l'adulte.

Dans le district d'Angkor Thom de la province de Siem Reap (15 000 habitants), une équipe d'infirmiers et de secrétaires a conduit, entre février 1998 et février 1999, une vaccination PEV et tétanos de toute la population infantile, scolaire et adulte. Chez 132 femmes en âge de procréer, 49 suivant un calendrier à deux doses et 70 suivant un calendrier à trois doses type OMS, les anticorps antitétaniques ont été mesurés avant vaccination, un an après la première dose ou les deux premières doses et six mois après la deuxième ou troisième dose de vaccin. 129 volontaires masculins de même âge ont aussi été recrutés en suivant uniquement le calendrier à deux doses. Le titrage a d'abord été fait en ELISA monoantigène, ensuite en séroneutralisation sur souris, méthode de référence pour le tétanos.

Seulement 148 (57 %) volontaires ont suivi complètement le protocole d'étude. En comparaison avec la séroneutralisation, la sensibilité de l'ELISA était de 89 % (IC_{95%} : 85 % - 94 %) et la spécificité de 84 % (IC_{95%} : 81 % - 89 %). Le pourcentage de la population couverte par deux doses de vaccin est passé de 5 % à 70 % et le calendrier à trois doses était statistiquement plus efficace que le calendrier à deux doses. Pour les sujets non protégés et se disant non vaccinés auparavant, 51 % après une dose et 93 % après deux doses ont obtenu des titres protecteurs. Au premier prélèvement, en séroneutralisation et avant vaccination, 52 % des femmes, contre 11,7 % des hommes, avaient des anticorps protecteurs. Pour les sujets se disant non vaccinés auparavant, les taux de séroconversion n'étaient augmentés en fonction ni de l'âge, ni de la présence de plaie chronique ou de bovins, sources de contact avec *C. tetani*. Seul le sexe féminin était corrélé significativement à une meilleure séroconversion (81 %) par rapport aux hommes (51 %) (RR : 1,60; IC_{95%} : 1,17 - 2,18; p = 0,014), faisant penser à un biais de mémorisation de vaccinations passées pour les femmes souvent vaccinées par le PEV. 30 % des volontaires en ELISA, et 14 % en séroneutralisation, présentaient des taux d'anticorps protecteurs spontanés au premier prélèvement, sans avoir de document ou sans avoir le souvenir d'avoir été vaccinés. En séroneutralisation, il n'y avait pas de relation entre la présence de ces anticorps spontanés et le fait d'avoir eu une plaie chronique cutanée ou d'avoir vécu près de bovins. Seules les femmes volontaires les plus âgées (35-45 ans) étaient de façon significative plus souvent porteuses d'anticorps protecteurs spontanés que les hommes du même âge (RR : 3,83; IC_{95%} : 1,74-8,39; p : 0,002). On peut évoquer là aussi un biais de mémorisation pour expliquer cette différence.

Le taux élevé de séroconversion post-vaccinale devrait inciter à généraliser la vaccination tétanos de rattrapage dans ce pays, vu le grand nombre d'adultes, surtout masculins, non protégés. Dans une population mal vaccinée, à cause des problèmes de notification et de mémorisation, seule une étude sérologique prospective, étudiant tous les facteurs possibles de neutralisation de la toxine, pourrait affirmer et expliquer la présence d'anticorps spontanés. Soustraire de la vaccination une population à risque pour déterminer les facteurs de neutralisation serait cependant éthiquement inacceptable.

tétanos
vaccination collective
ELISA
séroneutralisation
anticorps spontané
Angkor Thom
Siem Reap
Cambodge
Asie du sud oriental

Introduction

Treize ans après le rétablissement de la paix au Cambodge (1991-2004) et la reprise progressive des activités vaccinales, le Cambodge, pays du Sud Est asiatique de 13 000 000 d'habitants, a enregistré une augmentation des cas de tétanos recensés (figure 1). Ceci traduit la faible protection de la population contre les spores de *Clostridium tetani*, ubiquitaires au Cambodge. Le Ministère de la santé du Cambodge, en 1996, a décidé de couvrir la population générale « en rattrapage » par une vaccination antitétanique (VAT) en deux doses espacées d'un an et incluant le PEV pour les enfants de moins de deux ans (15).

Il a choisi un petit district rural de la région de Siem Reap, Angkor Thom (15 217 habitants en 1998), pour tester cette stratégie en vaccinant et en l'évaluant entre 1997 et 1999.

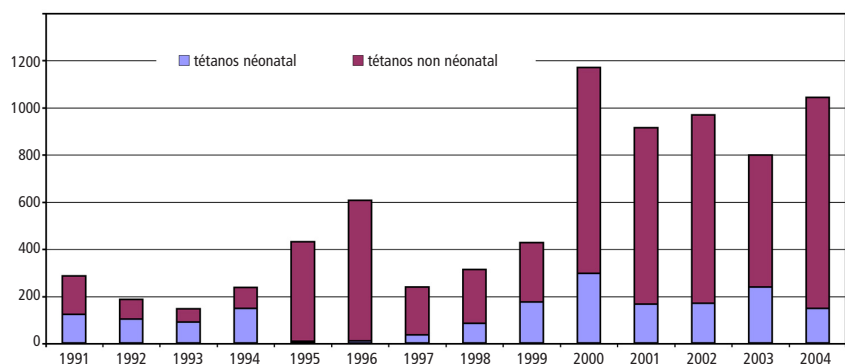
Lors de cette vaccination, comme demandé par le Ministère de la santé et validé par le comité d'éthique national, un contrôle sérologique ELISA de la séroconversion a été effectué chez 255 volontaires adultes du district (133 femmes et 122 hommes). Des sujets jamais vaccinés présentaient, avant toute injection d'anatoxine tétanique, des anticorps qui paraissaient spontanés, comme décrit par VERONESI (31). Ces anticorps

spontanés disparaissaient parfois après une injection de vaccin (9), contrairement à ce qui est classiquement décrit, si des vaccinations anciennes ont été oubliées (23). Sachant qu'à de faibles titres la technique ELISA peut donner des « faux positifs » (6) et alors qu'on disposait d'une importante collection de sérums, en nombre et en volume, couplés aussi à de nombreuses données épidémiologiques, il a été décidé de reprendre ces titrages par la technique de référence en matière de séroprotection tétanos : le titrage par séroneutralisation (SN) sur souris.

Ce sont les résultats de ce titrage, leur comparaison aux titres ELISA et la description de ces sujets avec anticorps antitétaniques spontanés, qui sont exposés dans cet article.

Figure 1.

Nombre de cas de tétanos déclarés au Cambodge entre 1991 et 2004 (source : OMS)
WHO notification of tetanus cases in Cambodia (1991-2004).



Type d'étude, population et méthodes

Le Ministère de la santé du Cambodge et la Direction de la santé de la province de Siem Reap ont initié cette étude avec quatre partenaires : SOS-Cambodge (SOS-C), une ONG travaillant depuis 1992 dans la province sur la formation du personnel infirmier, l'Agence de médecine préventive (AMP), avec son expérience en vaccination de rattrapage du tétanos en Afrique, Sanofi-Pasteur (SP), producteur de vaccins, et l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC).

Ils avaient élaboré ensemble cette étude prospective de vaccination, avec l'objectif de mesurer la couverture et la protection sérologique obtenues après avoir vacciné les deux sexes et toutes les tranches d'âges : 0-23 mois pour le PEV, 2-14 ans, 15-49 ans, plus de 50 ans, pour le VAT.

Vaccinations

Il s'agissait d'une vaccination par stratégie avancée (17), avec session vaccinale journalière pour une population d'environ 400 personnes d'un même village, regroupée dans un même lieu et visitée par une équipe de cinq infirmiers et cinq secrétaires se déplaçant en motocyclettes et transportant tout leur matériel. Pour estimer la couverture, on a calculé la population vaccinée dans chaque village par les fiches de pointage remplies lors des séances. La population des villages a été estimée grâce au recensement effectué en 1992 par l'Autorité provisoire des Nations Unies au Cambodge (1) pour les premières élections et corrigée de l'augmentation connue de la population entre 1992 et 1997. Le VAT, fourni par SP, administré en intramusculaire à l'épaule, était le vaccin Tetavax® (30 Lf/ml, 70 UI/dose), conditionné en flacons multi-doses de 20 doses (10 ml).

Étude sérologique

Population étudiée et vaccinations

Les 255 volontaires, âgés de 18 à 50 ans, en bonne santé, ont pu être recrutés dans 12 villages situés près du centre de santé du district. Après explication des objectifs de l'étude, ils ont signé un accord de consentement éclairé.

Deux calendriers vaccinaux ont été comparés chez les femmes en âge de procréer (FAP) : un calendrier régulier (R) OMS (16), à trois doses, donnant théoriquement 95 % de protection, et un calendrier simplifié (S), donnant 80 % de protection (tableau I).

Avec un risque α de 0,05 % et un risque β de 0,20 % et en estimant que le calendrier S est 15 % moins immunogène que le calendrier R, 65 volontaires féminins dans chaque groupe, avec 10 % de perdus de vue, ont été estimés suffisants pour mettre en évidence une différence significative entre les deux calendriers (24).

Les FAP suivant le calendrier S ont été en majorité recrutées dans cinq villages situés à l'ouest du centre de santé (commune de Svay Chek) et qui n'avaient pas encore été visités par l'équipe PEV de district en stratégie avancée, alors que

les femmes suivant le calendrier R ont été surtout recrutées dans sept villages de la commune de Leang Day, à l'est du centre de santé et déjà visités par l'équipe du centre de santé en stratégie avancée. Les 122 volontaires masculins, non couverts par le PEV, ont tous suivi le calendrier S et ont été recrutés dans les deux mêmes communes, afin de comparer le statut sérologique des deux sexes.

Les volontaires devaient fournir à l'inclusion tous les documents de vaccination en leur possession, et leur passé vaccinal a été aussi étudié par un interrogatoire poussé. Les registres du centre de santé ont été aussi consultés.

Ils étaient aussi interrogés, pour expliquer la présence d'anticorps non vaccinaux éventuels, sur la survenue, avant vaccination, de plaies chroniques pouvant être une porte d'entrée pour *Cl. tetani*, aussi sur la présence éventuelle de bovins logeant sous leur habitation, comme c'est souvent le cas en milieu rural au Cambodge.

L'importance de ces plaies a été chiffrée par un index :

- plaie de la largeur de 1 ongle pendant 1 mois : index 1 ;
- plaie de la largeur de 2 ongles pendant 1 mois : index 2 ;
- plaie plus grave en durée ou en taille : index 3.

L'intensité du contact des volontaires avec les excréments de bovins a été chiffrée ainsi :

- bovins séjournant aux alentours du domicile, mais pas sous sa maison : index 1 ;
- 1 ou 2 bovins passant la nuit sous la maison : index 2 ;
- 3 bovins passant la nuit sous la maison : index 3 ;
- plus de 3 bovins stationnant la nuit sous la maison : index 4.

Les prélèvements sériques

Trois prélèvements sanguins de 5-10 ml ont été effectués : un pour tester les anticorps avant la vaccination collective du district, un pour tester, juste avant le rappel, donc un an après, les anticorps après la première dose de vaccin, ou la deuxième dose pour les FAP qui suivaient le schéma R. Un troisième prélèvement a été effectué 6 mois après l'administration de la dernière dose de vaccin pour apprécier la protection finale. Les sérums ont été centrifugés, congelés et numérotés à Siem Reap par SOS-C, avant d'être stockés à l'IPC, re-numérotés pour que le titrage ELISA soit effectué en aveugle, et envoyés en France pour les titrages ELISA et SN.

ELISA

Le titrage ELISA a été effectué par SP au Val-de-Reuil (France). Il a été réalisé selon une technique « sandwich » classique monoantigène. Les sérums ont été incubés en plaques ELISA recouvertes d'anatoxine tétanique pouvant fixer les anticorps antitétaniques IgG. Après lavage, les complexes ont été reconnus par des anticorps anti-IgG auxquels était fixée de la peroxydase révélée par l'ajout d'orthophenyldiamine et d' H^2O_2 , donnant une réaction colorée mesurable.

SN

La technique SN a été d'abord remise au point à la Faculté de pharmacie de Tours, France, en profitant des dernières améliorations en équipement de laboratoire. Des réserves ont été cependant émises par le comité d'éthique animale de la région Centre (Orléans). Il estimait qu'il n'était pas éthique, afin de tester la toxine et tous les sérums disponibles, de soumettre 2 900 souris à un risque de décès par tétanos, maladie qui a presque disparu en France. Tous les sérums ont donc été re-acheminés sur l'Institut Pasteur d'Hô-Chi-Minh ville, Vietnam, pour faire ou refaire tous les titrages en SN.

Tableau I.

Protection conférée aux femmes en âge de procréer par la vaccination antitétanique, administrée selon le calendrier recommandé par l'OMS (OMS, 1988).
Protection given to child-bearing age women by WHO tetanus immunization schedule (WHO, 1988).

nb de doses	intervalle minimum	% de sujets protégés	durée attendue de la protection
VAT1	-	0 %	0
VAT2	1 mois	80 %	3 ans
VAT3	6 mois	95 %	5 ans
VAT4	1 an	99 %	10 ans
VAT5	1 an	99 %	35 ans

Mode de préparation des solutions injectées

La technique par SN était la technique d'Ipsen (11), effectuée sur des souris de race *Swiss* de 16 à 20 G injectées en intraveineux (veine de la queue) et immobilisées grâce à un cadre spécial conçu à Tours (Thierry PAPIN). Les dilutions de toxine et de sérum ont été préparées à pH constant, en utilisant une solution tampon PBS (pH : 7,60), la toxine étant aussi diluée avec 0,5 % de peptone (Pastone®) pour la stabiliser lorsqu'elle est mélangée dans le sérum.

Le mélange était mixé par agitateur électrique et laissé à température ambiante pendant une heure pour que toxine et anticorps se combinent complètement avant l'injection.

Calibrage de la toxine

Pour calibrer la toxine, les souris ont reçu en intraveineux un mélange, sous 0,5 ml, d'anticorps de référence et de toxine tétanique purifiée (fournie par SP) diluée pour tuer en cinq jours la moitié des souris (10). Pour s'assurer qu'on arrivait juste à dépasser la neutralisation de la toxine par la dose d'anticorps calibrés, on avait mélangé à part égale toxine-test et sérum de référence (1/200^e d'UI/ml de sérum antitétanique OMS) (22) avant l'injection.

Seule une toxine régulièrement calibrée par le sérum de référence permet d'avoir un dosage exact des anticorps neutralisants contenus dans les sérums testés.

Dosage des sérums

0,30 ml de cette toxine, calibrée donc à 1/200 d'UI/ml, a ensuite été mélangée à 0,30 ml de sérum non dilué, testant pour la plage de sérum (M1) autour de 0,020 UI/ml, puis à trois dilutions de sérums testant pour les plages (M2, M3 et M4) autour de 0,125, 0,80 et 5 UI/ml (11).

Le titre (A) en UI du sérum à tester était précisément défini en observant, après injection du mélange, la durée (T) de survie en heures de quatre animaux testés pour les quatre plages (M1, M2, M3 et M4) de titres. Dans l'équation ci-dessous 0,19 est le facteur T pour 120 heures (5 jours) de survie, et M (1, 2, 3 ou 4), la plage d'anticorps correspondant à la dilution du sérum mélangé avec la même dose-test de toxine.

$$\text{Log A} = \text{Log M} + \{1/\beta [F(T) + 0.19]\}$$

Dans cette équation, seul le coefficient β n'est pas *a priori* connu, car il est fonction de la plage d'anticorps M du titre final. Il est facilement déterminé sur une table par l'ordre de la plage M entraînant le premier décès de souris. Le titre protecteur est défini comme $\geq 0,01$ UI/ml (2).

Le titre en anticorps est toujours défini sur la moyenne de temps de survie des quatre souris sur les quatre plages M, pour diminuer l'éventuelle susceptibilité individuelle d'une souris. On appelle « séronégativité », une diminution, par rapport au premier prélèvement, des titres d'anticorps au deuxième prélèvement, bien que les sujets aient reçu une vaccination. C'est ce phénomène qui avait conduit au re-titrage en SN des sérums initialement titrés en ELISA (9).

On a noté aussi les sujets répondant à la définition de sujet « porteur d'anticorps spontanés » : sujet se disant jamais vacciné, sans document vaccinal, et porteur d'anticorps en SN $\geq 0,01$ UI/ml.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Stata 8.0 (26).

Résultats

Couvertures vaccinales

Le tableau II montre la couverture pour les adultes (15-50 ans). Il permet de comparer, en population générale, la couverture vaccinale des populations féminine et masculine.

Tableau II.

Couverture vaccinale antitétanique des adultes, 15-50 ans d'âge, par sexe, avant 1997 et après 1999, pour deux vaccinations collectives antitétaniques, district d'Angkor Thom, Cambodge.

Adults (15-50 y.o.) vaccine coverage, according to sex, with two doses of tetanus vaccines, before 1997 and after 1999 for two collective tetanus immunizations, Angkor Thom district, Cambodia.

année et sexe	pas de VAT	1 VAT	2 VAT	> 2 VAT
1997 femmes	95 %	1 %	0 %	4 %
1997 hommes	100 %	0 %	0 %	0 %
1999 femmes	16 %	4 %	70 %	10 %
1999 hommes	25 %	10 %	65 %	0 %

Tableau III.

Taux de séroconversion après une dose de VAT chez les sujets séronégatifs. Séroconversion rate after one tetanus dose in seronegative volunteers.

caractéristiques	total	taux de séroconversion nb	%	RR	p
sexe					
homme	71	36	50,7 %	1	
femme	21	17	80,9 %	1,60	0,014
				(IC _{95%} : 1-1,7-2,18)	
âge					
18 - 25 ans	7	4	57,1 %	1	-
25 - 35 ans	31	20	64,5 %	1,12	0,59
35 - 45 ans	54	29	53,7 %	1,05	0,47
lieu de résidence					
Leang Day	33	21	63,6 %	1	-
Svey Chek	59	32	54,2 %	0,85	0,38
présence de plaies					
type 0	89	52	58,4 %	1	-
type 1	0	0	0	0	-
type 2	1	1	100 %	1,26	0,72
type 3	2	0	0	0	-
présence de bovins					
type 0	21	12	57,1 %	1	-
type 1	10	3	30,0 %	0,53	0,16
type 2	14	10	71,4 %	1,3	0,39
type 3	15	13	86,7 %	1,52	0,06
type 4	31	15	48,4 %	0,85	0,53
profession					
paysan	82	47	57,3 %	1	-
autres	10	6	60,0 %	1,05	0,87

Tableau IV.

Nombre, moyenne et fourchette des titres d'anticorps antitétaniques spontanés au premier prélèvement : comparaison avec les titres des autres groupes de volontaires.

Number, average and range of spontaneous tetanus antibodies titres at first sample: comparison with other groups of volunteers

groupe de sujets	nb	moyenne et fourchette des titres
présence d'anticorps protecteurs spontanés sans vaccination	35 (14 %)	0,0016 < 0,095 < 0,94
absence d'anticorps protecteurs sans vaccination	159 (66 %)	0,0020 < 0,0026 < 0,0090
1 vaccination avant 1 ^{er} prélèvement	5 (2 %)	0,0023 < 0,018 < 0,056
2 vaccinations avant 1 ^{er} prélèvement	20 (8 %)	0,002 < 11,95 < 45,46
3 vaccinations avant 1 ^{er} prélèvement	22 (9 %)	0,203 < 33,78 < 200

La séroconversion

En SN, le schéma R s'est montré de façon significative plus immunogène que le schéma S chez les FAP non vaccinées avant l'étude ($p < 0,0001$), sans qu'il y ait de différence, selon le schéma S, entre les hommes et les femmes ($p = 0,19$). La séroconversion après une dose de VAT chez les sujets séronégatifs est présentée tableau III.

Séronégativité

Sur 149 des sérums des volontaires, 25 (14 %) ont présenté une séronégativité en technique ELISA et 12/176 (6,8 %) une séronégativité en technique SN.

Les anticorps spontanés

Sur 248 volontaires, en principe jamais vaccinés et testés en SN, 35 (14 %) ont répondu à la définition de « sujets porteurs d'anticorps spontanés ».

Tableau V.

Analyse des facteurs de risque pour la présence d'anticorps spontanés tétanos testés par séroneutralisation.

Risk Factors for carrying spontaneous tetanus antibodies tested by seroneutralisation.

facteurs de risque étudiés	total	anticorps spontanés nb	%	RR	p
plaies chroniques	194	35	18 %		
oui	27	6	22 %	1	-
non	167	29	13 %	1,28	0,54
contact avec bovins	194	33	17 %		
oui	35	7	20 %		
non	159	26	16 %	1,09	0,83
groupes d'âge	194	35	18 %		
18-25 ans	23	1	4 %	1	-
25-35 ans	68	10	15 %	3,4	0,17
35-45 ans	103	24	23 %	5,36	0,043
				(0,76 < RR < 37,60)	
sexe	194	35	18 %		
femme	81	23	28 %	1	-
homme	113	12	11 %	0,37	0,0015
				(0,20 < RR < 0,71)	
profession	194	35	18 %		
paysan	179	33	19 %	1	-
fonctionnaire ou autre	15	2	13 %	0,72	0,88
commune	194	35	18 %		
Leang Day	100	21	21 %	1	-
Svay Chek	94	14	15 %	0,76	0,26

Tableau VI.

Analyse des statuts âge et sexe pour la présence d'anticorps spontanés tétanos.

Analysis of both sex and age status for carrying tetanus spontaneous antibodies.

facteurs de risque étudiés : âge	total	anticorps spontanés nb	%	test	p
âge 18-25 ans	23	1	4 %		
femme	17	1	6 %	F = 0,3	0,7
homme	6	0	0 %		
âge 25-35 ans	68	10	15 %		
femme	24	5	21 %	RR = 0,55 (IC _{95%} : 0,18-1,70)	0,29
homme	44	5	11 %		
âge 35-45 ans	103	34	34 %		
femme	63	7	11 %	RR = 3,83 (IC _{95%} : 1,74-8,39)	0,0002
homme	40	17	42 %		

Tableau VII.

Estimation de la sensibilité et de la spécificité du test ELISA par rapport à la séroneutralisation, test de référence.

Estimation of ELISA sensitivity and specificity according to seroneutralisation, reference test

	SN > 0,01 UI/ml	SN < 0,01 UI/ml
ELISA > 0,01 ml	321	35
ELISA < 0,01 ml	37	195
total	358	230
sensibilité	321/358 = 89 % (IC _{95%} : 85%-94%)	
spécificité		195/230 = 84 % (IC _{95%} : 81%-89%)

Les moyennes des titres des sujets présentant des anticorps spontanés, par tranche d'âge et par sexe, sont présentées au tableau IV. Les caractéristiques des sujets porteurs d'anticorps spontanés (tableau V) ont été comparées, selon l'âge et le sexe, aux sujets non vaccinés et non porteurs d'anticorps protecteurs au premier prélèvement (21).

À noter que quatre sujets porteurs d'anticorps spontanés ont aussi présenté une séronégativité en termes de séroprotection, c'est-à-dire, au deuxième prélèvement, un taux d'anticorps en SN < 0,01 UI. Un sujet cependant n'avait pas été vacciné.

Pour les femmes, la présence d'anticorps spontanés n'était pas corrélée au nombre d'enfants qu'elles avaient eu ($\chi^2 = 14,7$, d.d.l. = 10, $p = 0,14$) (tableau VI).

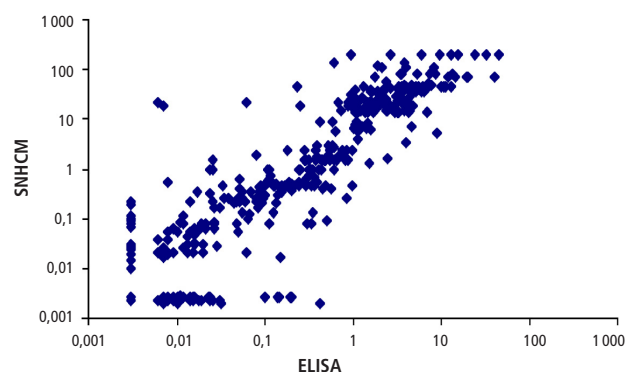
Comparaison des titres en ELISA et en SN

Si on prend comme test de référence le test SN, on peut constater, comme présenté dans le tableau VII, que le test ELISA a une sensibilité de 89 % et une spécificité de 84 %.

Figure 2.

Courbe de corrélation entre titres ELISA et titres en séroneutralisation testés à Hô-Chi-Minh ville (Vietnam), en coordonnées logarithmiques.

Correlation curve between ELISA and seroneutralisation titres tested in Ho Chi Minh City (Vietnam) with log scales.



Le coefficient r de Pearson pour estimer la corrélation entre ELISA et SN est de 0,034 ($p < 0,05$).

La corrélation, en coordonnées logarithmiques, entre titres ELISA et titres SN, est présentée figure 2.

Discussion

Méthodes

ELISA

L'ELISA monoantigène, par rapport à la SN, présente des faux-positifs et des faux-négatifs, comme cela avait déjà été montré en Europe, surtout aux faibles titres (5, 23), donc, dans les pays à couverture vaccinale encore faible pour les adultes âgés, comme la Turquie (6). Les défauts de la méthode ELISA monoantigène ont été confirmés aussi chez l'animal, lorsqu'il sert aux études de validation de lots vaccinaux (10).

Une technique à doubles antigènes a été montrée récemment plus fiable chez l'animal (20) et cette technique a été utilisée dans les études d'estimation de la séroprotection chez l'homme (12), en particulier chez la FAP en Afrique (8).

Séroneutralisation

La technique d'Ipsen a été utilisée quand on disposait de faibles quantités de sérum (0,5 ml). Elle a été souvent utilisée (5, 18, 23), car elle est aussi plus économique en souris : 4 souris par sérum contre au minimum 16 dans la technique classique (19) qui ne prend pas en compte le temps de survie, comme la technique d'Ipsen. La méthode d'Ipsen a cependant l'inconvénient d'exiger une surveillance minutieuse des souris, cinq jours après l'injection, pour la détermination du titre.

La technique d'Ipsen a été mieux suivie au Vietnam qu'à Tours, surtout avec l'entraînement qu'a pu développer l'équipe technique sur place. La technique d'injection en intraveineux a été facilitée par l'appareil de contention développé à Tours. L'utilisation au Vietnam de seringues à insuline, plus précises dans leurs graduations, munies d'aiguilles 30 G, plus fines et plus souples d'utilisation, a permis de faire des injections intraveineuses parfaites. Administrer le mélange strictement en intraveineux permet à la toxine non complexée d'agir plus facilement sur les centres nerveux, car les complexes antigènes-anticorps sont alors plus labiles (3) et donc donnent des titres apparemment plus faibles. Tous les calculs d'Ipsen ont été validés avec une technique intraveineuse parfaite, les injections en intramusculaire donnant au dosage des variations de titre plus importantes (11). L'existence à l'Institut Pasteur d'Hô-Chi-Minh ville d'un élevage de souris a aussi facilité l'approvisionnement en souris *Swiss* d'un poids

adéquat, répondant donc mieux aux exigences de la technique, que des souris venant d'un centre d'élevage, comme à Tours, qu'il faut garder en observation à l'animalerie avant l'injection.

Enfin, avec les règles d'éthique animale qui se précisent en Europe, ce type d'étude, qui exige le décès de l'animal comme critère de décision, ne sera plus possible à conduire dans les pays soumis à ces nouvelles règles.

Le Vietnam pourrait alors, peut-être, temporairement, servir de centre de référence pour comparer la sensibilité et la spécificité des nombreux tests rapides tétanos qui existent sur le marché (27).

Résultats

Couverture vaccinale

La couverture obtenue n'a pas été de 100 %, même si 50 % des volontaires ont affirmé avoir vu un cas de tétanos dans leur entourage. Les résultats de l'enquête complète de couverture montrent qu'une partie de la population refuse de se faire vacciner, comme le prescrivaient les responsables khmers rouges, pendant longtemps au pouvoir dans la région. La population du Cambodge souffre d'un retard en éducation sanitaire qui l'empêche souvent de comprendre l'utilité des vaccins et de la prévention. C'est en milieu scolaire que la couverture vaccinale était la meilleure.

Séroconversion

La protection sérologique lors de l'inclusion dans l'étude, chez les femmes, était supérieure à celle définie à l'interrogatoire, comme cela a déjà été montré en Afrique, chez les FAP testées en ELISA (8).

La population du Cambodge répond bien à l'anatoxine tétanique, les hommes comme les femmes. La protection masculine, très inférieure, risque de changer avec la stratégie actuelle de couvrir en vaccination toute la population des zones difficiles d'accès, comme le milieu rural (32). Deux vaccinations du district ont été menées par SOS-C en 2002 et 2003, en même temps que sur le district voisin de Banteay Srei (45 900 habitants). Une vaccination collective a aussi été menée en 2006-2007 sur le district de Prasath Bakong (63 600 habitants) par l'Ordre de Malte (France).

Anticorps spontanés

L'existence d'anticorps spontanés a été posée, avant la découverte des vaccins tétanos, par TENBROECK qui utilisait à cette époque une technique de SN sur cobayes. Il avait montré, en 1920, avant l'invention du vaccin, que 30 % des sujets chinois vivant autour de son équipe de recherche présentaient ces anticorps spontanés (28). Il pensait que ces anticorps étaient dus à des lésions intestinales de sprue, puisque ces sujets présentaient des spores de *Cl. tetani* dans leurs selles (29). Les anticorps spontanés ont fait l'objet de nombreuses publications (7, 14) avec comme hypothèse, pour VERONESI, qu'il s'agissait d'infections inapparentes par *Cl. tetani* qu'on trouve en abondance dans les fèces des bovins, alors qu'ils sont rares au niveau des porcins (30). S'il est vrai qu'au Cambodge les habitations sont sur pilotis en milieu rural et abritent des bovins couchant sous les maisons, que les plaies chroniques, du fait du manque d'hygiène, sont fréquentes, on n'a pas trouvé de relation entre anticorps spontanés, plaies chroniques et présence de bovins près des habitations.

Le fait que ces anticorps spontanés se retrouvent de façon significative plus souvent chez les volontaires féminins dans la tranche d'âge la plus élevée plaiderait en faveur d'une stimulation antigénique continue dans ce sexe, comme des vaccinations répétées avant les accouchements. On n'a cependant pas

trouvé de relation entre la présence d'anticorps spontanés et le nombre d'enfants. Retrouvant plus facilement ces anticorps spontanés chez les femmes, on peut penser à l'effet d'un biais de mémorisation avec oubli d'une vaccination passée. Ces anticorps pouvaient aussi diminuer comme si on avait observé un pic d'anticorps après une stimulation d'origine inconnue. Avec les évènements qui ont secoué le pays et l'absence de carnet de santé dans la population adulte, les archives vaccinales ont été de peu d'aide dans la détermination du statut vaccinal. L'idéal aurait été de conduire un interrogatoire beaucoup plus large sur le mode de vie de la population féminine et leur environnement, pour rechercher d'autres causes possibles de survenue de ces anticorps spontanés.

Séronégativation

On n'a pas vraiment d'explication, sauf l'écart entre les deux prises de sang, et la possibilité de l'influence d'anticorps spontanés labiles.

Sensibilité et spécificité de l'ELISA

Les faux positifs en ELISA étaient certes déjà connus avec cette technique, surtout lorsque des sujets étaient hospitalisés pour tétanos (4). Enfin, la possibilité de faux négatifs en ELISA était soupçonnée, mais non démontrée.

Conclusion

La vaccination antitétanique doit concerner la population masculine et la population âgée, si on veut mieux protéger la population rurale en Asie (13). L'impact de cette vaccination sur le tétanos sera toujours proportionnel à la couverture obtenue puisque le tétanos n'est pas une maladie contagieuse. Un effort de sensibilisation est important, vu l'augmentation des risques de tétanos avec l'augmentation des traumatismes, en trafic routier par exemple. Les anticorps spontanés sont présents chez 30 % des sujets de cette cohorte de volontaires analysée rétrospectivement en ELISA. Ils sont moins fréquents (14 %) lorsqu'ils sont analysés en SN. À cause des problèmes de mémorisation et de bonne conservation des registres et documents individuels vaccinaux, une étude rétrospective ne peut garantir leur présence et leur origine. Seule une étude prospective dans une population non vaccinée étudiant tous les facteurs possibles intervenant dans la neutralisation de la toxine tétanique (facteurs immunologiques, métaboliques, nutritionnels) pourrait apporter une réponse à leur possible existence et à leur cause. Ceci serait cependant non éthique, puisqu'il faudrait ne pas vacciner cette population à risque. Ces anticorps spontanés n'apportent pas une protection efficace et pérenne contre le tétanos, qui exige une vaccination universelle.

Références bibliographiques

1. APRONUC – *Données du Recensement National par village*. Phnom Penh, 1992.
2. BARILE M, HARDEGREE M & PITTMAN N – Immunization against neonatal tetanus in New-Guinea. 3. The toxin-neutralisation test and the response of guinea-pigs to the toxoids as used in immunization schedules in New-Guinea. *Bull WHO*, 1970, **43**, 453-459.
3. BRADEN BC & POLJAK RJ – Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J*, 1995, **9**, 9-16.
4. CHAPELLE (de La) A, LAVABRE O, PINSARD M, DELAMONICA J & RELYVELD EH – Tetanus in a renal transplant recipient exhibiting the presence of circulating antitetanus antibodies.

- ies determined by ELISA. *Biomed Pharmacother*, 2002, **56**, 208-210.
5. CHRISTIANSEN G – Quantification of tetanus antitoxin by toxin neutralisation test in mice. A comparison between lethal and paralytic techniques. *J Biol Stand*, 1981, **9**, 453-460.
 6. COPLU N, ESEN B, GOZALAN A, MIYAMURA K, YOSHIDA I et al. – Tetanus antibody assay combining in-house ELISA and particle agglutination test and its serosurvey application in a province in Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 2004, **57**, 97-102.
 7. DATSUR F, AWATRAMANI V & DIXIT S – Response to a single dose of tetanus in subjects with naturally acquired tetanus antitoxin. *Lancet*, 1981, **2**, 219-222.
 8. DEMING M, ROUNGOU JB, KRISTIANSEN M, HERON I, YANGO A et al. – Tetanus toxoid coverage as an indicator of serological protection against neonatal tetanus. *Bull WHO*, 2002, **80**, 696-703.
 9. GLAZIOU P – *Analyse des titres sérologiques tétanos ELISA, district d'Angkor Thom*. Etude clinique HDP23497, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, 2000.
 10. GUPTA R, MAHESHWARI S & SINGH H – The titration of tetanus antitoxin in vivo. Studies on the sensitivity and reproducibility of the toxin neutralisation test. *J Biol Stand*, 1985, **13**, 143-149.
 11. IPSEN J – Experimentelle und zufällige Fehlerquellen bei Messung kleiner Antitoxinmengen I tetanus-antitoxin. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*, 1942-1943, **102**, 347-368.
 12. KRISTIANSEN M, AGGERBECK H & HERON I – Improved ELISA for determination of antidiphtheria and/or tetanus antitoxin antibodies in sera. *APMIS*, 1997, **105**, 843-853.
 13. LAU L, KONG K & CHEW P – A ten-year retrospective study of tetanus at a general hospital in Malaysia. *Singapore Med J*, 2001, **42**, 346-350.
 14. MATZKIN H & REGEV S – Naturally acquired immunity on tetanus in an isolated community. *Infect Immun*, 1985, **48**, 267-268.
 15. MINISTÈRE DE LA SANTÉ DU CAMBODGE – *Protocole de vaccination PEV et tétanos de la population du district d'Angkor Thom*, Phnom Penh, Royaume du Cambodge, 1997.
 16. OMS – *Vaccinez toutes les Femmes en Age de Procréer*. OMS/PEV/GEN 88.1, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1988.
 17. OMS – *Stratégies pour mener les activités vaccinales. Formation du personnel de santé de niveau intermédiaire*. OMS/PEV/MLM 91.7, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1991.
 18. RAMSHORS (van) J – Titration of diphtheria and tetanus antitoxins in sera of low titers. *Bull OMS*, 1971, **45**, 213-218.
 19. RELYVELD E – Titration *in vivo* des anticorps antidiphthériques et antitétaniques à plusieurs niveaux. *J Biol Stand*, 1977, **5**, 45-53.
 20. ROSSKOPF U, NOESKE K & WERNER E – Efficacy demonstration of tetanus vaccines by double antigen ELISA. *Pharmeuropa Bio*, 2005, **1**, 31-52.
 21. SCHLUMBERGER M – Recherche par séroneutralisation des anticorps antitétaniques spontanés chez l'adulte lors d'une vaccination de rattrapage au Cambodge. Thèse 3^e cycle, Université de Tours, 2007.
 22. SESARDIC D, WONG MY, GAINES D & CORBEL MJ – The first international standard for antitetanus immunoglobulin, human: pharmaceutical evaluation and international collaborative study. *Biologicals*, 1993, **21**, 67-75.
 23. SIMONSEN O, KJELDSEN K & HERON I – Immunity against tetanus and effect of revaccination 25-30 years after primary vaccination. *Lancet*, 1984, **2**, 1240-1242.
 24. SIMONSEN O, SCHOUC C & HERON I – Modification of the ELISA for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand*, 1987, **15**, 143-157.
 25. SNEDECOR G & COCHRAN W – *Statistical methods*, 8th edition, Ames, Iowa University Press, 1986.
 26. STATA, Chicago, USA, 1990.
 27. STUBBE M, SWINNEN R, CRUSIAUX A, MASCART F & LHEUREUX PE – Seroprotection against tetanus in patients attending an emergency department in Belgium and evaluation of a bedside immunotest. *Eur J Emerg Med*, 2007, **14**, 14-24.
 28. TENBROEK C & BAUER JH – The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man. *J Exp Med*, 1922, **37**, 261-272.
 29. TENBROEK C & BAUER JH – Studies on the relation of tetanus in the digestive tract to tetanus antitoxin in the blood. *J Exp Med*, 1923, **37**, 479-489.
 30. VERONESI R – Why don't the Brazilian Amerindians in the Amazon have tetanus? *J Int Amer Med*, 1978, **3**, 4-16.
 31. VERONESI R – Naturally acquired tetanus immunity: still a controversial theme? In: NISTICO G, MASTROENI P & PITZURA M (Eds), *Seventh International Conference on Tetanus*, Gangemi Publ. Co, Roma, 1985, 365-372.
 32. WHO – Children's Vaccine Initiative (CVI) and WHO's Global Programme for Vaccines and Immunization (GPV). Recommendations from the Scientific Advisory Group of Experts (SAGE), Part 1. *Wkly Epidemiol Rec*, 1998, **73**, 281-288.