Déterminants des réponses aux vaccins oraux dans les pays en développement

David A. Sack^a Firdausi Qadri^b Ann-Mari Svennerholm^c

^aDépartement de Santé Internationale, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Md., États-Unis;

^bLaboratory Science Division, International Centre for Diarrhoeal Disease Research Bangladesh, Dacca, Bangladesh;

^cDépartement de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Gothembourg, Gothembourg, Suède

Mots-clés

Vaccins oraux • Choléra • Rotavirus • Typhoïde • Poliomyélite • Shigellose • Réponse immunitaire • Malnutrition • Zinc • Vitamine A • Allaitement au sein

et vitamines, un arrêt de l'allaitement maternel avant la vaccination, des médicaments contre les parasites intestinaux ou d'autres mesures afin d'obtenir leur bénéfice complet.

Copyright © 2008 Nestec Ltd., Vevey/S. Karger AG, Basel

Résumé

Les vaccins oraux conçus pour une utilisation globale n'induisent pas nécessairement les mêmes réponses immunitaires chez tous les enfants du monde entier. En effet, plusieurs vaccins induisent souvent des réponses anticorps moyennes moins fréquentes et moins intenses chez les enfants des pays en développement, suggérant qu'ils pourraient moins les protéger. Les causes de cette différence ne sont pas totalement élucidées, mais il apparaît que des facteurs liés à la nutrition, dont une malnutrition tant en protéines et en calories qu'en micronutriments, sont importants pour expliquer ce problème. Des domaines voisins dont l'allaitement maternel, l'interférence d'anticorps placentaires maternels, des infections parasitaires intestinales, des lésions de la muqueuse intestinale et, peut-être, une malnutrition maternelle au cours de la grossesse paraissent également importants. Les vaccins conçus pour la voie orale doivent être adaptés à ces problèmes potentiels afin d'optimiser leurs bénéfices pour tous les enfants. Les vaccins oraux administrés aux enfants des pays en développement peuvent nécessiter une dose plus élevée, des doses de rappel, une supplémentation en calories, micronutriments

Introduction

La vaccination est l'une des stratégies préventives les plus puissantes pour l'amélioration de la santé des populations du monde entier. Les enfants de la plupart des pays en développement sont particulièrement vulnérables aux maladies infectieuses, comme le démontrent des taux élevés de mortalité chez les nourrissons et les enfants, les pneumococcies et les affections diarrhéiques étant les plus importantes de ces infections potentiellement fatales. Des vaccins deviennent disponibles pour un grand nombre de ces infections. En sus de l'ensemble standard de vaccins contre la diphtérie, la coqueluche, le tétanos, la poliomyélite, la rougeole et la tuberculose, des vaccins plus récents contre l'hépatite B, et *Haemophilus influenzae* de type B sont aujourd'hui communément inclus dans le programme élargi de vaccination (PEV). Des vaccins, y compris récents contre *Streptococcus pneumoniae* et les rotavirus, entrent en utilisation de routine dans certains pays en développement et d'autres contre la typhoïde et le choléra seront probablement utilisés dans certains pays. Parmi ceux-ci, plusieurs vaccins sont admi-

nistrés par voie orale dont les vaccins contre la poliomyélite (OPV), le rotavirus et le choléra et certains vaccins contre la typhoïde. De plus, de nouveaux vaccins sont développés pour la prévention des infections à *Escherichia coli* entérotoxigène (ECET) et des shigelloses, et seront sans doute également administrés par voie orale.

L'expérience acquise avec plusieurs vaccins oraux a montré que les réponses immunitaires pouvaient ne pas être aussi fortes ou constantes chez les enfants des pays en développement que chez ceux des pays industrialisés. Parmi ces vaccins, ceux dirigés contre des infections bactériennes (choléra, ECET, typhoïde, shigellose) seront sans doute uniquement administrés à des enfants des pays en développement ou à des voyageurs, car il s'agit de personnes à risque. Le vaccin antipoliomyélitique est administré en routine au plan mondial, mais la quasi-totalité des pays industrialisés utilise aujourd'hui un vaccin injectable et non l'OPV. Les nouveaux vaccins anti-rotavirus sont administrés par voie orale et, s'agissant d'une infection survenant dans toutes les régions géographiques, la même formulation sera utilisée partout.

Le présent article analyse des études ayant évalué des vaccins oraux dans des pays en développement, particulièrement chez des enfants, et les facteurs nutritionnels et autres pouvant expliquer l'immunogénicité et l'efficacité protectrice plus faibles souvent enregistrées chez les enfants des pays en développement comparativement à ceux des pays industrialisés. Nous incluons également des études ayant examiné différentes variables qui pourraient améliorer un vaccin particulier pour utilisation dans les pays en développement.

Cet article est centré sur les vaccins oraux et non sur les vaccins injectables, car la plupart des évaluations de ces derniers ont indiqué que les enfants des pays en développement et industrialisés répondaient de façon similaire. Les réponses aux vaccins injectables ne sont affaiblies que chez des enfants atteints de malnutrition extrêmement sévère [1]. Les vaccins oraux présentent toutefois des problèmes particuliers quant au statut nutritionnel.

Afin de réaliser cette analyse, nous avons mené une recherche dans PubMed pour les termes suivants (en anglais): OPV, vaccin anti-rotavirus, vaccin contre la typhoïde, vaccin anticholérique et vaccin anti-*Shigella*, et nous avons restreint notre recherche aux articles ayant trait à l'immunogénicité ou décrivant des études de l'efficacité dans des pays en développement, particulièrement en relation avec des facteurs nutritionnels. Plusieurs vaccins possédant des noms spécifiques, nous les avons inclus dans notre recherche, par exemple CVD103-HgR

et Peru-15 cholera vaccine, Ty21a typhoid vaccine, SC602 *Shigella* vaccine, RIX4414, RotaRix®, RotaTeq® et RotaShield®, vaccins anti-rotavirus. Dans certains cas, des données non publiées et des résultats d'études de ce type ont été inclus quand approprié.

Vaccin antipoliomyélitique oral

La formulation de l'OPV, s'agissant d'un vaccin trivalent, est ajustée de telle façon que chacune des souches sérotypiques vaccinales offre une probabilité élevée d'induction de réponses immunitaires protectrices contre chacun des trois sérotypes à la suite de trois doses de vaccin. Les réponses immunitaires sont mesurées au moyen des titres d'anticorps neutralisants en utilisant un dosage sur culture cellulaire, et un titre $\geq 1/8$ est considéré comme protecteur. Des études menées dans des pays industrialisés ont montré qu'une vaccination par trois doses d'OPV trivalent induisait des titres protecteurs d'anticorps chez plus de 95% des enfants [2]. Les réponses anticorps à ce vaccin ont été cependant plus basses et moins fiables chez des enfants de pays en développement, particulièrement pour ce qui est du sérotype 3 [3–7].

Les causes des réponses moins constantes chez les enfants des pays en développement sont mal élucidées, mais la plupart des études ont été centrées sur le rôle potentiel d'infections concomitantes par des virus entériques pouvant interférer dans l'intestin avec l'infection par le virus vaccinal et sur la possibilité d'une neutralisation du virus vaccinal par des anticorps du lait maternel. Certaines études ont également évalué le rôle du statut nutritionnel, par exemple l'effet d'une supplémentation en vitamine A sur l'immunogénicité de l'OPV.

Les données concernant une interférence par d'autres virus entériques sont contradictoires, certaines études ayant observé une association [7, 8] tandis qu'une autre n'a pu la confirmer, mais a enregistré des réponses médiocres même chez des enfants non atteints d'une autre infection à entérovirus [5]. L'étude de Triki et coll. [7] a également montré une association entre les réponses les plus médiocres et les statuts socio-économiques les plus bas et, pendant la saison d'été, ce dernier facteur était probablement un marqueur indirect d'autres infections à entérovirus.

De solides données montrent que les anticorps du lait maternel peuvent interférer avec l'OPV en neutralisant le virus vaccinal et en s'opposant à une infection de la muqueuse intestinale [9]. Cette observation a été confortée par des études menées en Ouganda [10] et par des travaux

expérimentaux au cours desquels une formule lactée contenant des anticorps neutralisants, administrée à divers moments avant ou après la vaccination, a interféré avec la réponse vaccinale [11]. La formule contenant des anticorps, administrée dans les 2 heures de la vaccination, a inhibé la réponse à celle-ci, mais cet effet n'a pas été observé quand l'administration de la formule et la vaccination avaient été séparées de 6 heures. Un intervalle de 6 heures entre l'allaitement et la vaccination ne peut pas être pratique dans de nombreux pays en développement, et une étude menée en Inde n'a montré aucune association entre l'allaitement maternel et l'immunogénicité du vaccin [12].

Une étude menée au Bangladesh a montré une diminution de la réponse immunitaire à l'OPV quand le vaccin était administré au cours d'un épisode diarrhéique de l'enfant [13]. Cette observation a suggéré que le transit rapide dû à une diarrhée aboutissait à une moindre colonisation par le virus vaccinal vivant. D'autres facteurs perturbants, par exemple une mauvaise nutrition de l'enfant diarrhéique, ne peuvent être cependant exclus.

Les stratégies destinées à améliorer la réponse immunitaire à l'OPV ont été généralement centrées sur l'accroissement du nombre de doses vaccinales [14, 15], bien que cette solution n'ait pas toujours été efficace [6]. Un vaccin antipoliomyélitique injectable s'est avéré efficace lors d'une étude où un plus grand nombre de doses n'avait pas amélioré l'immunogénicité de l'OPV [6]. Une étude menée en Inde a montré qu'une supplémentation des mères en vitamine A peu après l'accouchement, ainsi que des nouveau-nés lors de visites dans le cadre du programme élargi de vaccination, accroissait les titres d'anticorps anti-sérotype 1 à la suite de l'OPV, mais n'influencait pas la réponse à d'autres sérotypes [16]. D'un point de vue pratique, des programmes nationaux ont tenté d'administrer plusieurs doses additionnelles d'OPV, souvent en association à une supplémentation en vitamine A, lors de journées nationales de vaccination qui ont été efficaces pour l'éradication de la poliomyélite dans la quasi-totalité des pays.

La réduction de l'immunogénicité de l'OPV dans les pays en développement est bien connue, et l'expérience obtenue avec ce vaccin est pertinente pour les autres vaccins oraux. Il semble que d'autres vaccins oraux puissent être également moins immunogènes quand ils sont administrés aux enfants des pays en développement, et que les leçons apprises avec l'OPV peuvent également s'appliquer. Tandis que le nombre des vaccins oraux augmente, d'autres facteurs sont en cours d'examen, particulièrement ceux ayant trait à la nutrition.

Vaccins anti-rotavirus

Plusieurs vaccins anti-rotavirus oraux vivants ont été évalués dans des pays en développement et industrialisés, dont le vaccin bovin RIT, un WC3 monovalent bovin, le vaccin rotavirus rhésus tétravalent (RRV-TV ou RotaShield), un vaccin humain atténué, RIX4414 (RotaRix) et un vaccin réassortant pentavalent WC3 (RotaTeq). Le RIT et le WC3 monovalent faisaient partie des premiers vaccins et paraissaient prometteurs mais n'ont pas été suffisamment protecteurs lors de leur utilisation dans des pays en développement [17–20]. Le RRV-TV a été efficace en Europe, aux États-Unis et au Venezuela mais a paru moins protecteur dans d'autres pays en développement [21–25]. Une réanalyse des résultats des essais menés au Pérou et au Brésil a suggéré que l'efficacité du vaccin était en fait plus élevée qu'initialement appréciée quand il était restreint aux sujets qui avaient présenté les diarrhées les plus sévères [26]. Les motifs de la moindre efficacité dans les pays en développement n'ont pas été élucidés, mais il a semblé que ces vaccins anti-rotavirus étaient généralement moins efficaces lorsqu'ils étaient évalués dans des pays en développement.

À la suite du retrait de RotaShield du marché américain, des vaccins anti-rotavirus plus récents, RotaRix et RotaTeq, ont été développés et se sont avérés sûrs et efficaces dans des pays industrialisés et/ou à revenus moyens ainsi qu'aux États-Unis, en Europe, en Amérique Latine et en Asie [27, 28]. Ils n'ont toutefois pas été testés dans des pays très pauvres et des études ont donc été mises en place afin de déterminer leur sécurité d'emploi, leur immunogénicité et leur efficacité dans des pays de ce type en Asie et en Afrique, qui étaient éligibles pour un financement par la GAVI (Global Alliance for Vaccines and Immunization). RotaRix s'est avéré sûr et immunogène chez des enfants vivant en Afrique du Sud et au Bangladesh, mais son immunogénicité peut être quelque peu plus basse que chez des enfants d'autres pays [D. Steele et K. Zaman, communication personnelle].

Les causes du taux de séroconversion un peu plus bas avec les vaccins anti-rotavirus dans les pays en développement ne sont pas expliquées. Des hypothèses ont été émises, comprenant l'interférence d'anticorps du lait maternel, qui peuvent avoir neutralisé le virus vaccinal, ou des taux élevés d'anticorps transplacentaires maternels qui pourraient avoir affaibli la réponse de la même façon. Une des premières méta-analyses a ainsi montré que le taux de séroconversion après RRV (sérotype 3) était significativement plus bas chez des nourrissons allaités au sein que chez d'autres alimentés par formules (48 contre

70%; $p < 0,005$) [29]. Des études menées par la suite aux États-Unis n'ont cependant pas conforté ces résultats [30]. Une hypothèse a également inclus le rôle non spécifique de la malnutrition ou d'une carence en un micronutriments spécifique. Lors de l'évaluation de l'efficacité protectrice du vaccin RRV-TV en fonction du statut nutritionnel chez des nourrissons participant à un essai de phase III au Pérou, une efficacité plus élevée a ainsi été observée chez les enfants atteignant un score Z de poids pour l'âge supérieur à -1 et un score Z de taille pour l'âge supérieur à -1 comparativement aux enfants présentant de plus bas scores [31]. Une récente publication provenant de différents pays d'Amérique latine a cependant indiqué que l'efficacité du vaccin anti-rotavirus humain RIX4414 avait été similaire chez des nourrissons correctement nourris ou malnutris [32]. Une étude menée au Bangladesh a démontré qu'une supplémentation en zinc avait accru la moyenne géométrique des titres chez des nourrissons vaccinés par RotaShield [A. Baqui, communication personnelle].

Vaccins antityphoïdiques

Il existe 2 vaccins antityphoïdiques agréés fréquemment utilisés: un vaccin bactérien oral atténué et vivant, Ty21a (Vivotif®) et un vaccin polysaccharidique injectable Vi (Typhim Vi®). Le Vi est administré aux enfants âgés de plus de 2 ans et aux adultes, mais non aux enfants plus jeunes et aux nourrissons car ce type d'antigène polysaccharidique n'est pas immunogène dans les tranches d'âge les plus jeunes. Un vaccin antityphoïdique Vi conjugué a été plus immunogène et protecteur lors d'une étude menée au Vietnam [33]. Ce vaccin conjugué n'est malheureusement pas encore disponible.

Le Ty21a est agréé chez les enfants à partir de l'âge de 5 ans, mais n'a pas été intensivement évalué chez les enfants plus jeunes. Une étude menée dans un petit groupe d'enfants ($n = 18$) âgés de moins de 24 mois a indiqué que le vaccin était sûr, mais aucune réponse immunitaire n'a été mesurable chez ces enfants [34]. Une étude distincte plus importante menée en Thaïlande chez 634 enfants âgés de 2–6 ans a montré que le vaccin était sûr et immunogène avec des taux similaires d'immunisation à tous les âges, sans diminution significative chez les enfants les plus jeunes [35]. Des études seront bientôt mises en place afin de déterminer l'immunogénicité d'une formulation liquide de ce vaccin chez des enfants âgés de 2–5 ans vivant au Bangladesh, afin de corréliser les réponses immunitaires au statut nutritionnel et de déterminer le béné-

fice éventuel d'une supplémentation en zinc. L'efficacité de ce vaccin oral n'a pas été déterminée dans les tranches d'âge les plus jeunes (<5 ans), ce qui est regrettable, particulièrement en vue de l'incidence élevée de la maladie chez les jeunes enfants dans certains pays d'Asie du Sud.

Vaccin anticholériques oraux vivants

Il existe actuellement 2 vaccins anticholériques oraux atténués, CVD103-HgR (Orochol®) et Peru-15 (Cholera-Garde®), qui ont été intensivement testés chez des sujets vivant dans des pays en développement ou industrialisés. Le CVD103-HgR possède une autorisation de mise sur le marché, mais le Peru-15 est encore en cours de développement [36].

Le CVD103-HgR a été normalement administré à la dose de 10^8 organismes par dose avec une solution tampon contenant du bicarbonate de sodium et de l'acide ascorbique et destinée à protéger les bactéries vivantes contre l'acidité gastrique. Cette formulation s'est avérée immunogène, sûre et protectrice chez des volontaires vivant en Amérique du Nord. Il a été moins immunogène que prévu chez des résidents du Chili et de l'Indonésie et la dose a donc été augmentée de 1 log afin d'améliorer l'immunogénicité [37–40], mais cette dose plus élevée n'a malheureusement pas exercé un effet protecteur lors du seul essai contrôlé sur le terrain mené en Indonésie [40]. Le contraste entre l'efficacité élevée observée lors d'études chez des volontaires en Amérique du Nord et la faible efficacité observée en Indonésie est mal élucidé mais pourrait être lié à une immunité naturelle préexistante contre le choléra et donc à une diminution de la «prise» du vaccin vivant. De plus, les taux de choléra ont été inhabituellement bas au cours des phases précoces de l'essai, et l'efficacité à court terme n'a donc pas pu être déterminée.

Les facteurs supplémentaires ayant pu réduire l'immunogénicité du CVD103-HgR en Indonésie sont une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle, des parasitoses intestinales et une sous-nutrition. Une étude a ainsi démontré qu'une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle, détectée par un test respiratoire à l'hydrogène, était associée à une certaine diminution de la réponse au CVD103-HgR au Chili [41]. Cette observation suggère que des anomalies de la muqueuse intestinale (entéropathie tropicale) communément associées à une pullulation dans l'intestin grêle peuvent être partiellement responsables d'une réponse moins forte chez ces sujets. Une autre étude a examiné le rôle potentiel d'une infestation par *Ascaris lumbricoides* et a observé que le traitement de cette parasitose

avant une vaccination améliorait la réponse à médiation cellulaire à celle-ci [36]. L'effet du traitement par albendazole et secnidazole sur le taux de réussite du vaccin antityphoïdique oral vivant ou anticholérique oral tué doit être étudié chez des enfants âgés d'environ 3 ans atteints de parasitose et vivant au Bangladesh.

L'autre vaccin anticholérique oral vivant, Peru-15, s'est avéré sûr, immunogène et protecteur à la dose de 2×10^8 chez des volontaires aux États-Unis [42–44]. Cette dose a été testée chez des adultes et enfants vivant au Bangladesh. Le taux de succès à cette dose a été élevé au Bangladesh dans toutes les tranches d'âge, mais la moyenne géométrique des titres chez les sujets les plus jeunes (9–23 mois) a été plus basse que chez les sujets plus âgés, et une dose moindre de $1 \log$ a été nettement moins immunogène [45]. Le vaccin n'a pas été évalué chez des enfants aux États-Unis pour comparaison et il n'est donc pas possible de déterminer si la moindre réponse observée chez les enfants les plus jeunes au Bangladesh a été liée à l'âge ou à d'autres facteurs.

Il est intéressant de noter que le Peru-15 est habituellement administré avec un tampon se composant de bicarbonate de sodium et d'acide ascorbique, similaire à celui utilisé pour le CVD103-HgR. Lors d'une étude menée chez des volontaires américains, la moyenne géométrique des titres d'anticorps après administration du vaccin a été plus élevée avec un tampon se composant de sirop de riz, de bicarbonates et de citrates qu'avec le tampon standard, suggérant que des facteurs autres que la dose de vaccin pourraient être importants [46]. Dans cette étude comparant différents tampons, le groupe témoin recevant le vaccin sans tampon (sérum physiologique uniquement) a présenté une réponse anticorps très médiocre, indiquant que la neutralisation par l'acidité gastrique était critique pour l'immunogénicité de ce vaccin oral vivant sensible à l'acide.

Des études sont prévues afin d'évaluer le Peru-15 administré simultanément avec un vaccin antimorbilleux afin d'exclure des interférences possibles entre les vaccins contre le choléra et la rougeole chez les nourrissons âgés de <1 an. Ce type d'étude est nécessaire, car il est probablement nécessaire d'administrer les deux vaccins à environ le même âge.

Vaccins anticholériques oraux tués

Il existe deux vaccins anticholériques oraux tués. Un vaccin à cellules entières avec sous-unité B de la toxine cholérique recombinante (WC/rCTB; Dukoral®) est

agréé dans plus de 50 pays [47, 48], et un autre vaccin similaire à cellules entières mais sans sous-unité B est agréé au Vietnam [49] et est actuellement testé en Inde. Le composant à cellules entières de ce vaccin résiste à l'acidité, et un tampon n'est donc pas nécessaire afin de le protéger contre l'acidité gastrique. La sous-unité B est cependant labile en milieu acide et nécessite un tampon. Le Dukoral est sûr, immunogène et protecteur, comme l'ont montré des études menées au Bangladesh, au Pérou et au Mozambique [50–54]. L'étude menée au Bangladesh illustre son bénéfice protecteur dans une zone où les taux de malnutrition sont élevés et l'étude réalisée au Mozambique confirme ce bénéfice dans une zone où les taux d'infection à VIH sont importants.

Le vaccin a été protecteur dans ces différentes zones géographiques, mais la réponse antibactérienne (vibriocide) a été moins fréquente chez les jeunes enfants (2–5 ans) que chez les enfants plus âgés et les adultes [55], et un plus grand nombre de doses a été nécessaire afin d'obtenir un taux plus élevé d'immunisation [56]. De même, la réponse antitoxine a été plus faible chez les sujets âgés de 2–5 ans que dans les groupes plus âgés [57]. Une comparaison de la réponse immunitaire au vaccin anticholérique à cellules entières et contenant la toxine B (CTB WCV) entre des enfants d'âges correspondants (en descendant jusqu'à l'âge d'un an) en Suède et au Nicaragua au moyen de techniques sérologiques étalonnées a indiqué que, bien que les enfants suédois aient présenté des titres plus bas avant immunisation, leur réponse antitoxine ainsi qu'anticorps vibriocides au vaccin avait été plus importante [58]. On ne sait cependant pas si ces différences sont liées à la nutrition ou à d'autres facteurs tels qu'une exposition précédente à ces antigènes cholériques.

L'association entre une sous-nutrition et une colonisation par *Vibrio cholerae* et la réponse sérologique au CTB administré par voie orale a été étudiée au cours des années 1980 chez des enfants vivant au Bangladesh [59]. Ces études ont révélé l'absence de corrélation entre une sous-nutrition (définie comme un poids <70% de celui de référence pour l'âge), d'une part, et une colonisation, une maladie ou la durée ou la sévérité du choléra, d'autre part. De plus, la réponse sérologique à une colonisation, à une maladie ou au CTB administré par voie orale n'était pas différente entre les enfants sous-nutris ou correctement nourris. Les auteurs ont conclu que la bonne réponse à la composante CTB chez les enfants sous-nutris était d'un intérêt particulier lorsqu'il s'agit d'envisager l'utilisation des vaccins anticholériques oraux dans des zones où la sous-nutrition est fréquente. De récentes analyses

d'études précédentes menées au Bangladesh et ayant comporté l'administration de Dukoral chez des enfants présentant une malnutrition sévère ont cependant montré que les augmentations de ≥ 4 fois des réponses immunitaires vibriocides étaient significativement moins fréquentes chez les enfants malnutris (score Z de la taille pour l'âge inférieur à -2 écarts types) que chez des enfants mieux nourris [Ahmed et coll., non publié]. Un immunogène très puissant tel le CTB pourrait donc être moins affecté par l'état nutritionnel de l'enfant que les antigènes bactériens, principalement les lipopolysaccharides, qui induisent des réponses immunitaires vibriocides.

Lors de certaines études, une amélioration de l'immunogénicité du vaccin WC/rCTB tué a été tentée par l'administration de micronutriments, dans l'hypothèse que certains enfants ne pourraient pas répondre de façon optimale en raison d'un déficit en micronutriments. Les résultats de ces études sont contradictoires. Lors d'une étude, les enfants ont reçu une supplémentation en vitamine A et/ou en zinc. Les enfants supplémentés en zinc ont présenté des taux de séroconversion vibriocides plus élevés que ceux des autres enfants mais, de façon étrange, leurs taux de réponse antitoxines ont été plus faibles [60, 61]. En revanche, la vitamine A n'a pas modifié l'une ou l'autre de ces réponses sérologiques. Des études plus récentes ont permis d'observer un effet hautement significatif sur la réponse immunitaire vibriocide à Dukoral chez des enfants de 9–18 mois vivant au Bangladesh et ayant reçu une supplémentation en zinc pendant 42 jours (20 mg/jour), en commençant 3 semaines avant le début de la vaccination [Ahmed et coll., article soumis]. Soixante dix-sept pour cent des enfants ayant reçu la supplémentation ont présenté une réponse anticorps sérique vibriocide multipliée par 4 ou plus, contre 56% seulement des enfants n'ayant pas reçu la supplémentation. Les bénéfices positifs du zinc n'ont pas été observés pour la réponse immunitaire antitoxine, qui a été similaire entre les enfants ayant reçu ou non la supplémentation. Aucune différence n'a été observée entre les réponses (vibriocide ou antitoxine) chez les nourrissons âgés de 6 à 9 mois, qui n'étaient probablement pas carencés en zinc. Les études décrites de l'immunogénicité n'ont pas inclus d'enfants présentant une malnutrition sévère (score Z du poids pour l'âge <3), mais un grand nombre des enfants présentaient une malnutrition légère ou modérée (score Z du poids pour l'âge $<1-3$).

De récentes études sur la réponse vaccinale à Dukoral chez des enfants du Bangladesh ont également révélé que

l'allaitement maternel pouvait interférer avec l'effet d'immunisation du vaccin. Des enfants qui n'avaient plus été allaités depuis 3 heures avant l'administration orale du vaccin ont présenté des réponses immunitaires vibriocides plus fréquemment que ceux dont l'allaitement avait été uniquement arrêté une heure avant la vaccination [Ahmed et coll., article soumis]. Il faut cependant nettement reconnaître que l'allaitement maternel en soi a été fortement associé à une réduction substantielle du choléra sévère. Des études menées au cours des années 80 ont ainsi montré que les enfants allaités au sein bénéficiaient d'une réduction de 70% du risque de choléra sévère et que, bien que ce risque diminue avec l'âge, il était manifeste chez ces enfants jusqu'à l'âge de 30 mois [62].

Le vaccin anticholérique à cellules entières tué produit et utilisé au Vietnam est similaire à Dukoral, à l'exception de l'inclusion de cellules du sérotype O139 *V. cholerae*, mais ne contient pas la sous-unité B [49]. Une analyse d'un essai de ce vaccin a montré des taux similaires d'efficacité entre des enfants et des adultes, bien que la période de risque de choléra ait été limitée à 10 mois car l'épidémie de cette maladie n'avait pas persisté. Le vaccin à cellules entières apparaît aussi immunogène chez les enfants que chez les adultes [63].

Vaccins oraux anti-ECET

Le seul vaccin anti-ECET qui ait été évalué de façon intensive dans différentes tranches d'âge, y compris des jeunes enfants et des nourrissons dans des pays en développement, se compose d'une association de rCTB et de bactéries ECET inactivées par le formol exprimant les facteurs de colonisation les plus prévalents des ECET porteurs de fimbriæ ainsi que certains des antigènes O les plus prévalents [64]. Des essais de phase I et II de ce vaccin rCTB-CF ECET oral chez des volontaires adultes en Suède, au Bangladesh et en Egypte ont montré qu'il était bien toléré et suscitait des réponses immunitaires muqueuses similaires dans l'intestin (liquide de lavage intestinal) ou des réponses immunitaires dérivées de l'intestin contre les différents antigènes vaccinaux chez une majorité de vaccinés dans les divers contextes. Des essais cliniques analogues de la tolérance et de l'immunogénicité du vaccin rCTB-CF ECET chez des enfants plus âgés (2–9 ans) dans des pays en développement ont montré qu'il était tout aussi immunogène que chez les adultes et également bien toléré, sauf chez les nourrissons et les enfants les plus jeunes. La réponse immunitaire a été légèrement

plus basse dans ce dernier groupe que chez les enfants plus âgés [64–67].

L'efficacité protectrice du vaccin rCTB-CF ECET a été évaluée contre placebo lors d'essais de phase III chez des voyageurs américains allant au Mexique et au Guatemala. Lors de la première étude menée chez près de 700 volontaires, le vaccin a conféré une protection significative (efficacité protectrice: 77%; $p = 0,039$) contre des épisodes diarrhéiques modérés à sévères dus à ECET, définis comme des symptômes ayant interféré avec les activités quotidiennes du voyageur ou comme l'émission de plus de 5 selles molles par jour, mais n'a pas significativement protégé contre les diarrhées moins sévères à ECET [68]. Un essai clinique consécutif mené sur un effectif similaire dans le même contexte a également révélé que le vaccin avait protégé contre des troubles plus sévères chez les vaccinés chez lesquels l'effet immunisant du vaccin avait pu être documenté [A.L. Bourgeois, communication personnelle]. Un essai contrôlé en double insu contre placebo évaluant l'efficacité du vaccin rCTB-CF ECET chez des enfants âgés de 6 à 18 mois en Égypte rurale n'a cependant pas détecté de protection [S.J. Savarino, communication personnelle].

Afin de déterminer si les plus faibles réponses au vaccin observées chez des nourrissons d'Égypte et du Bangladesh pouvaient s'expliquer par un mauvais état nutritionnel, des carences en micronutriments ou d'autres facteurs, des études sont prévues au Bangladesh afin d'évaluer une influence possible de ces différents facteurs sur les réponses immunitaires. Ces études seront spécialement centrées sur les réponses immunitaires muqueuses à la suite de l'administration de vaccins oraux modèles (Dukoral et Vivotif) avec une supplémentation en zinc. Le zinc influence les réponses immunitaires innées et adaptatives (tant humorales que cellulaires) chez les enfants atteints de diarrhée à ECET. Des enfants âgés de 6–24 mois atteints de diarrhée de ce type et recevant 20 mg de zinc pendant 10 jours ont présenté un taux sérique significativement plus élevé de la fraction C3 du complément, une activité plus élevée des cellules phagocytaires et des réponses à lymphocytes T plus importantes comparativement à des enfants d'âge correspondant n'ayant pas reçu la supplémentation. Ces résultats suggèrent qu'une supplémentation en zinc pourrait être utile pour l'amélioration du taux d'immunisation par les vaccins spécifiques anti-ECET et pour la diminution de la morbidité due à la maladie [Larson et Qadri, communication personnelle].

Vaccins oraux anti-shigelloses

Seul un vaccin oral vivant atténué anti-shigellose a été évalué dans un pays en développement. Le SC602 était une souche de *Shigella flexneri* 2a moins virulente en raison de délétions du gène plasmidique de virulence icsA (médiante la dissémination intra- et intercellulaire) et du locus chromosomique iuc (codant pour l'aérobactine) [69]. Une étude menée chez des volontaires aux États-Unis a indiqué que ce vaccin était sûr, immunogène, protecteur et excrété quand il était administré à une dose de 10^4 . Il a cependant provoqué des cas de dysenterie après son administration à des doses plus élevées (10^6 ou 10^8) [69]. Le vaccin a été testé chez des enfants du Bangladesh à des doses de 4, 5 et 6 logs. À ces doses, aucun effet indésirable n'a été observé et aucune réponse sérologique ou excrétion n'a été détectable [70]. En raison des effets indésirables observés à des doses plus élevées aux États-Unis, la dose n'a pas été augmentée chez ces enfants du Bangladesh.

Les différences d'immunogénicité observées entre les volontaires des États-Unis et les enfants du Bangladesh ne sont pas nettement élucidées mais les besoins élevés en fer liés à la délétion du gène de l'aérobactine suggèrent une explication possible. Quand elle est cultivée in vitro, la souche nécessite un ajout de fer au milieu, mais ne prolifère pas si la concentration du fer est basse. Il semble possible que la concentration du fer dans les voies intestinales des volontaires des États-Unis et des enfants du Bangladesh puisse être très différente, car ces enfants ont un régime alimentaire très pauvre en fer, tandis que les adultes des États-Unis consomment régulièrement de la viande contenant du fer originaire de l'hème. Il semble probable que des vaccins bactériens oraux vivants nécessitant une colonisation et une multiplication, particulièrement ceux administrés à une dose relativement faible, mais nécessitant également une concentration élevée de fer pour la multiplication des bactéries qu'ils contiennent, puissent nécessiter des tampons contenant ce micronutriment. Il pourrait en être particulièrement ainsi pour les vaccins destinés à des sujets dont l'alimentation est carencée en fer. Aucune étude n'a déterminé si un apport supplémentaire d'une certaine quantité de fer pouvait améliorer l'immunogénicité de la souche vaccinale. L'importance du fer pour les infections bactériennes est bien établie et l'infection par une souche vaccinale n'est probablement pas différente à cet égard des autres types d'infections bactériennes. En raison de la mutation génétique spécifique chez cette souche vaccinale, celle-ci est probablement encore plus dépendante du fer. Il n'est pas pos-

sible d'exclure que d'autres carences nutritionnelles de l'hôte, ainsi que l'allaitement maternel au moment de la vaccination, aient pu jouer un rôle dans le faible taux d'immunisation, mais cette hypothèse devra être testée lors de futures études contrôlées des candidats vaccins oraux vivants anti-shigelloses.

Une autre possibilité pourrait être que les enfants dans ce contexte aient déjà été immunisés jusqu'à un certain point envers les antigènes spécifiques de *Shigella flexneri* 2a à la suite d'une infection naturelle qui a pu les protéger contre les faibles doses de souches vaccinales utilisées. Cette protection pourrait être abolie par une augmentation de la dose de vaccin, mais cette stratégie pourrait être également risquée pour les enfants dépourvus d'une immunité préexistante si le vaccin pouvait susciter des réactions.

Un vaccin injectable anti-shigellose utilisant un polysaccharide O conjugué à une protéine a été immunogène et efficace chez de jeunes adultes en Israël [71]. Ce vaccin n'est cependant pas envisagé dans la présente analyse car il n'est pas administré par voie orale et parce qu'aucune donnée n'est disponible quant à son utilisation chez des enfants de pays en développement.

Facteurs influençant les réponses immunitaires aux vaccins oraux dans les pays en développement

Comme souligné plus haut, de nombreuses études ont montré que les vaccins oraux contre la poliomyélite, les infections à rotavirus, le choléra, l'ECET et les shigelloses ne peuvent pas être aussi immunogènes ou protecteurs lorsqu'ils sont administrés à des sujets vivant dans des pays en développement. Les données suggèrent que plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette plus faible immunogénicité, notamment: 1) la sous-nutrition, 2) une carence en micronutriments, et en particulier en zinc, fer ou vitamine A, 3) l'interférence avec les anticorps du lait maternel ou les anticorps transplacentaires maternels, 4) les interférences dues à une helminthiase, une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle avec pathologie muqueuse intestinale associée et 5) les interférences dues à des infections intestinales par entérovirus. À ce jour, le rôle potentiel d'une malnutrition maternelle affectant le nourrisson a fait l'objet de peu d'hypothèses mais il est possible qu'une malnutrition maternelle en macro ou micronutriments puisse réduire l'aptitude du système immunitaire du nourrisson à répondre correctement aux antigènes vaccinaux [72, 73].

Si l'on tente de classer par ordre d'importance ces facteurs pouvant entraîner une réduction de l'immunogénicité, l'âge semble une variable capitale. Des facteurs importants pour le nouveau-né ou le très jeune nourrisson, par exemple les anticorps du lait maternel ou d'origine transplacentaire, ne peuvent pas être pertinents chez un enfant de 2 ans. Chez les enfants plus âgés, les réponses vaccinales sont probablement réduites par une sous-nutrition, qui est habituellement plus prononcée au-delà de l'âge d'un an, souvent liée à des épisodes diarrhéiques réitérés au cours de la petite enfance, à une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle, à une pathologie de la muqueuse, à une helminthiase ou à une carence en micronutriments.

De nombreuses études ont observé une moindre immunogénicité chez des enfants de pays en développement mais, malheureusement, il n'existe aucun profil net indiquant comment améliorer ces réponses. Par exemple, l'arrêt de l'allaitement maternel plusieurs heures avant les vaccinations peut efficacement améliorer certaines réponses vaccinales, mais cette recommandation ne peut pas être facile à mettre en œuvre dans des programmes à large échelle. L'administration d'un vermifuge peut également quelque peu améliorer les réponses, ce qui semblerait être une stratégie pratique, particulièrement si elle pouvait être incorporée dans des programmes de vaccination des enfants un peu plus âgés. Une supplémentation en zinc est aujourd'hui recommandée chez les enfants au cours d'épisodes de diarrhée [74] et pourrait être également bénéfique pour la réponse vaccinale; il sera nécessaire cependant de le démontrer dans le cadre de programmes de santé publique. Une supplémentation systématique en vitamine A est aujourd'hui une importante composante des interventions de routine de santé publique, mais les données de la plupart des études de vaccins suggèrent que cette supplémentation n'accroît probablement pas les réponses vaccinales.

Des vaccins bactériens atténués vivants peuvent bénéficier de leur administration avec des tampons conçus pour faciliter une colonisation intestinale temporaire par les souches qu'ils contiennent. Par exemple, un vaccin bactérien obtenu par génie génétique pourrait avoir des exigences spécifiques en nutriments ou en minéraux (par exemple fer), qui pourraient être inclus dans le tampon dans lequel le vaccin est administré.

Il est important de noter que des informations supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les conditions présentes au cours de la croissance foetale susceptibles d'amplifier ou d'inhiber le système immunitaire du nourrisson et d'affecter la réponse à des vaccins administrés à un âge précoce. Certains micronutriments, par

exemple le zinc, administrés aux femmes enceintes pourraient améliorer l'immunogénicité vaccinale chez le nourrisson.

En résumé, il est impossible d'admettre a priori que les performances des vaccins oraux seront tout aussi satisfai-

santes chez les enfants des pays en développement que chez ceux des pays industrialisés. Ces vaccins doivent être évalués et optimisés pour ces derniers afin d'offrir leur bénéfice maximal.

Bibliographie

- Moore SE, Goldblatt D, Bates CJ, Prentice AM: Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr* 2003;92:170-176.
- Faden H: Results of a clinical study of polio vaccine: the Buffalo experience. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:973-975.
- Agarwal A, Sharma D, Kumari S, Khare S: Antibody response to three doses of standard and double dose of trivalent oral polio vaccine. *Indian Pediatr* 1991;28:1141-1145.
- Sabin AB: Vaccination against poliomyelitis in economically underdeveloped countries. *Bull World Health Organ* 1980;58:141-157.
- John TJ, Jayabal P: Oral polio vaccination of children in the tropics. I. The poor seroconversion rates and the absence of viral interference. *Am J Epidemiol* 1972;96:263-269.
- Sutter RW, Suleiman AJ, Malankar P, et al: Trial of a supplemental dose of four poliovirus vaccines. *N Engl J Med* 2000;343:767-773.
- Triki H, Abdallah MV, Ben AR, et al: Influence of host related factors on the antibody response to trivalent oral polio vaccine in Tunisian infants. *Vaccine* 1997;15:1123-1129.
- Swartz TA, Skalska P, Gerichter CG, Cockburn WC: Routine administration of oral polio vaccine in a subtropical area. Factors possibly influencing seroconversion rates. *J Hyg (Lond)* 1972;70:719-726.
- Lepow ML, Warren RJ, Gray N, et al: Effect of Sabin type 1 poliomyelitis vaccine administered by mouth to newborn infants. *N Engl J Med* 1961;264:1071-1078.
- Plotkin SA, Katz M, Brown RE, Pagano JS: Oral poliovirus vaccination in newborn African infants. The inhibitory effect of breast feeding. *Am J Dis Child* 1966;111:27-30.
- Katz M, Plotkin SA: Oral polio immunization of the newborn infant; a possible method for overcoming interference by ingested antibodies. *J Pediatr* 1968;73:267-270.
- John TJ, Devarajan LV, Luther L, Vijayarathnam P: Effect of breast-feeding on seroresponse of infants to oral poliovirus vaccination. *Pediatrics* 1976;57:47-53.
- Myaux JA, Unicomb L, Besser RE, et al: Effect of diarrhea on the humoral response to oral polio vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:204-209.
- Bhaskaram P, Nair KM, Hemalatha P, et al: Systemic and mucosal immune response to polio vaccination with additional dose in newborn period. *J Trop Pediatr* 1997;43:232-234.
- Chopra K, Kundu S, Chowdhury DS: Antibody response of infants in tropics to five doses of oral polio vaccine. *J Trop Pediatr* 1989;35:19-23.
- Bahl R, Bhandari N, Wahed MA, et al: Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. *J Nutr* 2002;132:3243-3248.
- Vesikari T, Isolauri E, d'Hondt E, et al: Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1984;i:977-981.
- Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, et al: Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet* 1987;i:1342-1345.
- Georges-Courbot MC, Monges J, Siopathis MR, et al: Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Res Virol* 1991;142:405-411.
- De Mol P, Zissis G, Butzler JP, et al: Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* 1986;ii:108.
- Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T: Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997;350:1205-1209.
- Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, et al: Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines - report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* 1996;97:7-13.
- Lanata CF, Midthun K, Black RE, et al: Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *J Infect Dis* 1996;174:268-275.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, et al: Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bull World Health Organ* 1996;74:491-500.
- Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, et al: Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997;337:1181-1187.
- Linhares AC, Lanata CF, Hausdorff WP, et al: Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:1001-1006.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, et al: Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11-22.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al: Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006;354:23-33.
- Pichichero ME: Effect of breast-feeding on oral rhesus rotavirus vaccine seroconversion: a metaanalysis. *J Infect Dis* 1990;162:753-755.
- Rennels MB, Wasserman SS, Glass RI, Keane VA: Comparison of immunogenicity and efficacy of rhesus rotavirus reassortant vaccines in breastfed and nonbreastfed children. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* 1995;96:1132-1136.
- Linhares AC, Carmo KB, Oliveira KK, et al: Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belem, Para state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:13-16.
- Perez-Schael I, Salinas B, Tomat M, et al: Efficacy of the human rotavirus vaccine RIX4414 in malnourished children. *J Infect Dis* 2007;196:537-540.
- Lin FY, Ho VA, Khiem HB, et al: The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 2001;344:1263-1269.
- Murphy JR, Grez L, Schlesinger L, et al: Immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine for young children. *Infect Immun* 1991;59:4291-4293.
- Cryz SJ Jr, Vanprapar N, Thisyakorn U, et al: Safety and immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect Immun* 1993;61:1149-1151.

- 36 Cooper PJ, Chico M, Sandoval C, et al: Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* 2001;69:1574–1580.
- 37 Lagos R, Avendano A, Horwitz I, et al: Tolerance and immunogenicity of an oral dose of CVD 103-HgR, a live attenuated *Vibrio cholerae* O1 strain: a double-blind study of Chilean adults. *Rev Med Chil* 1993;121:857–863.
- 38 Simanjuntak CH, O'Hanley P, Punjabi NH, et al: Safety, immunogenicity, and transmissibility of single-dose live oral cholera vaccine strain CVD 103-HgR in 24- to 59-month-old Indonesian children. *J Infect Dis* 1993;168:1169–1176.
- 39 Suharyono, Simanjuntak C, Witham N, et al: Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in 5–9-year-old Indonesian children. *Lancet* 1992;340:689–694.
- 40 Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, et al: Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000;18:2399–2410.
- 41 Lagos R, Fasano A, Wasserman SS, et al: Effect of small bowel bacterial overgrowth on the immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 1999;180:1709–1712.
- 42 Sack DA, Sack RB, Shimko J, et al: Evaluation of Peru-15, a new live oral vaccine for cholera, in volunteers. *J Infect Dis* 1997;176:201–205.
- 43 Cohen MB, Giannella RA, Bean J, et al: Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* 2002;70:1965–1970.
- 44 Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, et al: Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 1995;172:1126–1129.
- 45 Qadri F, Chowdhury MI, Faruque SM, et al: Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine, is safe and immunogenic in Bangladeshi toddlers and infants. *Vaccine* 2007;25:231–238.
- 46 Sack DA, Shimko J, Sack RB, et al: Comparison of alternative buffers for use with a new live oral cholera vaccine, Peru-15, in outpatient volunteers. *Infect Immun* 1997;65:2107–2111.
- 47 Clemens JD, Sack DA, Harris JR, et al: Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. *Lancet* 1986;ii:124–127.
- 48 Holmgren J, Clemens J, Sack DA, Svennerholm AM: New cholera vaccines. *Vaccine* 1989;7:94–96.
- 49 Trach DD, Clemens JD, Ke NT, et al: Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 1997;349:231–235.
- 50 Clemens JD, Sack DA, Harris JR, et al: Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from three-year follow-up. *Lancet* 1990;335:270–273.
- 51 Concha A, Giraldo A, Castaneda E, et al: Safety and immunogenicity of oral killed whole cell recombinant B subunit cholera vaccine in Barranquilla, Colombia. *Bull Pan Am Health Organ* 1995;29:312–321.
- 52 Sanchez JL, Vasquez B, Begue RE, et al: Protective efficacy of oral whole-cell/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994;344:1273–1276.
- 53 Taylor DN, Cardenas V, Sanchez JL, et al: Two-year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholera vaccine in Peru. *J Infect Dis* 2000;181:1667–1673.
- 54 Lucas ME, Deen JL, von Seidlein L, et al: Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med* 2005;352:757–767.
- 55 Taylor DN, Cardenas V, Perez J, et al: Safety, immunogenicity, and lot stability of the whole cell/recombinant B subunit (WC/rCTB) cholera vaccine in Peruvian adults and children. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:869–873.
- 56 Clemens JD, Stanton BF, Chakraborty J, et al: B subunit whole-cell and whole-cell only oral vaccines against cholera: studies on reactogenicity and immunogenicity. *J Infect Dis* 1987;155:79–85.
- 57 Sack DA, Clemens JD, Huda S, et al: Antibody responses after immunization with killed oral cholera vaccines during the 1985 vaccine field trial in Bangladesh. *J Infect Dis* 1991;164:407–411.
- 58 Hallander HO, Paniagua M, Espinoza F, et al: Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. *Vaccine* 2002;21:138–145.
- 59 Glass RI, Svennerholm AM, Stoll BJ, et al: Effects of undernutrition on infection with *Vibrio cholerae* O1 and on response to oral cholera vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:105–109.
- 60 Albert MJ, Qadri F, Wahed MA, et al: Supplementation with zinc, but not vitamin A, improves seroconversion to vibriocidal antibody in children given an oral cholera vaccine. *J Infect Dis* 2003;187:909–913.
- 61 Qadri F, Ahmed T, Wahed MA, et al: Suppressive effect of zinc on antibody response to cholera toxin in children given the killed, B subunit-whole cell, oral cholera vaccine. *Vaccine* 2004;22:416–421.
- 62 Glass RI, Stoll BJ: The protective effect of human milk against diarrhea. A review of studies from Bangladesh. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;351:131–136.
- 63 Trach DD, Cam PD, Ke NT, et al: Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bull World Health Organ* 2002;80:2–8.
- 64 Svennerholm AM, Steele D: Microbial-gut interactions in health and disease. *Progress in enteric vaccine development. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:421–445.
- 65 Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, et al: Introductory evaluation of an oral, killed whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:322–330.
- 66 Qadri F, Ahmed T, Ahmed F, et al: Reduced doses of oral killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine is safe and immunogenic in Bangladeshi infants 6–17 months of age: dosing studies in different age groups. *Vaccine* 2006;24:1726–1733.
- 67 Walker RI, Steele D, Aguado T: Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 2007;25:2545–2566.
- 68 Sack DA, Shimko J, Torres O, et al: Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. *Vaccine* 2007;25:4392–4400.
- 69 Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, et al: Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect Immun* 1999;67:3437–3443.
- 70 Anonymous: Future needs and directions for Shigella vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81:51–58.
- 71 Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, et al: Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997;349:155–159.
- 72 Wellinghausen N: Immunobiology of gestational zinc deficiency. *Br J Nutr* 2001;85(suppl 2):S81–S86.
- 73 Golden MH, Jackson AA, Golden BE: Effect of zinc on thymus of recently malnourished children. *Lancet* 1977;ii:1057–1059.
- 74 Walker CF, Black RE: Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr* 2004;24:255–275.