



Thèse

2012

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Déterminants de l'immunité au vaccin de l'Hépatite A dans la cohorte suisse d'enfants infectés par le Virus d'Immunodéficience Humaine

Crisinel, Pierre-Alex

How to cite

CRISINEL, Pierre-Alex. Déterminants de l'immunité au vaccin de l'Hépatite A dans la cohorte suisse d'enfants infectés par le Virus d'Immunodéficience Humaine. Doctoral Thesis, 2012. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:27444

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:27444>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:27444](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:27444)

Section de *Médecine Clinique*
Département de Pédiatrie
Centre de vaccinologie et immunologie néonatale

Thèse préparée sous la direction du Professeur Claire-Anne Siegrist

"Déterminants de l'Immunité au Vaccin de l'Hépatite A dans la Cohorte Suisse d'Enfants Infectés par le Virus d'Immunodéficience Humaine"

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

Pierre Alex Crisinel
de

Denezy (VD)

Thèse n° _____

Genève
2012

THESE

Nom et Prénom : Crisinel Pierre Alex
Adresse : Chemin du Pontet 2, 1306 Daillens
Faculté : Faculté de Médecine
Département de Pathologie et d'Immunologie
Directeur de thèse : Professeur Claire-Anne Siegrist

Références bibliographiques :

Crisinel PA¹, Posfay-Barbe KM¹, Aebi C², Cheseaux JJ³, Kind C⁴, Rudin C⁵, Nadal D⁶, Siegrist CA¹, and the Swiss Mother and Child HIV Cohort Study of Switzerland (MoCHIV)

¹ University Hospitals of Geneva, Geneva; ² University of Bern, Bern; ³ University Hospital CHUV, Lausanne; ⁴ Ostschweizer Kinderspital, St-Gallen; ⁵ University Children's Hospital, Basel; ⁶ University Children's Hospital of Zurich, Zurich

En cours de soumission

Résumé :

L'objectif de cette étude était d'étudier prospectivement les déterminants de la réponse à la vaccination contre l'hépatite A chez les enfants VIH positifs faisant partie de la cohorte VIH suisse mère enfant. La vaccination a été proposée selon l'immunité au début de l'étude et l'anamnèse vaccinale. Une sérologie initiale a été effectuée chez 87 patients (âge médian 11 ans, extrêmes 3,4 – 21,2) entre juin 2006 et août 2007. Cinquante-cinq patients (51.7%) étaient séronégatifs pour l'hépatite A. Le taux de séroconversion s'élevait à 86% (25/29) après 1 dose et 97% (38/39) après 2 doses de vaccin (moyenne géométrique d'anticorps de 962 mIU/ml) . Le taux de lymphocytes T CD4 est le seul paramètre à influencer significativement la réponse secondaire. Le monitoring des concentrations d'anticorps devrait être effectué si les lymphocytes T CD4 sont diminués en dessous de 750/mm³ afin de déterminer si des doses de vaccin supplémentaires sont nécessaires.

Signature du doctorant :

Visa du directeur de thèse :

Résumé

L'objectif de cette étude était d'étudier prospectivement les déterminants de la réponse à la vaccination contre l'hépatite A chez les enfants VIH positifs faisant partie de la cohorte VIH suisse mère enfant. La vaccination a été proposée selon l'immunité au début de l'étude et l'anamnèse vaccinale. Une sérologie initiale a été effectuée chez 87 patients (âge médian 11 ans, extrêmes 3,4 – 21,2) entre juin 2006 et août 2007. Cinquante-cinq patients (51.7%) étaient séronégatifs pour l'hépatite A. Le taux de séroconversion s'élevait à 86% (25/29) après 1 dose et 97% (38/39) après 2 doses de vaccin (moyenne géométrique d'anticorps de 962 mIU/ml) . Le taux de lymphocytes T CD4 est le seul paramètre à influencer significativement la réponse secondaire. Le monitoring des concentrations d'anticorps devrait être effectué si les lymphocytes T CD4 sont diminués en dessous de 750/mm³ afin de déterminer si des doses de vaccin supplémentaires sont nécessaires.

Conclusion de l'étude

Notre étude indique que les taux d'anticorps induits chez les enfants VIH positifs par la vaccination contre l'hépatite A sont plus bas que chez l'enfant sain, même chez des patients bénéficiant majoritairement d'un traitement antirétroviral hautement efficace et ayant des taux de cellules CD4 modestement abaissés (<750/mm³). Cela peut laisser présager une période de protection plus courte que chez les enfants immunocompétents, mais il est difficile de prévoir celle-ci sur une base individuelle. La surveillance de routine des sérologies en l'absence d'exposition au virus de l'hépatite A n'est certainement pas nécessaire. Cependant, une sérologie devrait être faite avant une exposition attendue à ce virus, par exemple, avant de se rendre dans une zone fortement endémique. Des doses de rappel supplémentaires pourront s'avérer nécessaires, surtout s'il on est à distance de la dernière dose de vaccin.

Index

Remerciements	4
Introduction au travail.....	5
Abstract	11
Introduction	12
Methods.....	13
Population	13
Categorization of HAV vaccine response	13
Analysis of Vaccine-Induced Humoral Immunity	14
Statistical Analysis	14
Results	16
Population	16
HAV vaccine seroresponse.....	17
Discussion	18
References	24
Table and Figures.....	27
Table 1 : Biological and demographic characteristics of the study population	28
Figure 1: study population	29
Figure 2 : Anti-HAV antibody concentrations after priming and boosting vaccination	30
Figure 3 : Percent of patients with HAV antibody concentrations according to CD4 T cells count.....	31
Figure 4: Post-priming and boosting HAV concentrations.....	32

Remerciements

Je tiens à remercier la Professeure Claire-Anne Siegrist et la Doctoresse Klara Posfay-Barbe pour leur guidance et aide précieuses pour la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie également le Dr Mario Gehri et le Professeur Sergio Fanconi pour leur soutien sans faille de ma formation en infectiologie pédiatrique.

Je dédie enfin ce travail de thèse à ma femme Delphine et à ma fille Nayah.

Introduction au travail

Les patients infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) sont à risque de développer de nombreuses infections, souvent sévères. L'infection par ce virus est caractérisée par une diminution progressive du nombre et de la fonction des lymphocytes T CD4, associée à une altération de la fonction des monocytes et des macrophages, conduisant à un déficit de l'immunité cellulaire. Il existe également une évidence de dysfonction des lymphocytes B. En l'absence de traitement anti-rétroviral efficace, l'infection par le VIH résulte en une capacité amoindrie de développer une réponse immune à des nouveaux stimuli antigéniques, en la perte de l'immunité préalable et en l'augmentation du risque de complications infectieuses(1).

Les enfants VIH positifs sont particulièrement à risque de développer des infections qui sont susceptibles d'être prévenues par la vaccination. Avant l'introduction de traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART), de nombreux rapports ont montré la faible réponse des patients VIH positifs à la vaccination de même que leur incapacité à maintenir des niveaux d'anticorps protecteurs(2). Le niveau de production était souvent inversement proportionnel aux taux de lymphocytes T CD4 et les taux d'anticorps produits par la vaccination avaient tendance à diminuer beaucoup plus fréquemment et rapidement chez les patients VIH positifs que chez les patients sains(3). Ainsi, il a été montré que les enfants sous HAART ont des niveaux bas d'immunité contre les maladies pour lesquelles ils ont été vaccinés avant le traitement anti-rétroviral(4). La majorité des enfants sous HAART répondent cependant à une revaccination, quoique la reconstitution immunitaire n'apparaît pas suffisante pour assurer une immunité à long terme chez certains d'entre eux. Cela suggère la nécessité de contrôler l'évolution de

l'immunité vaccinale, certains enfants nécessitant alors des doses supplémentaires de vaccin afin de maintenir le niveau de protection souhaité(4).

Des recommandations spécifiques de vaccination existent pour les patients VIH positifs. Myers et Collègues, dans une étude prospective multicentrique, ont cependant montré que la couverture vaccinale des enfants de la cohorte VIH suisse mère enfant était même moins bonne que dans la population générale. De nombreux patients ne possédaient pas les anticorps nécessaires à la lutte contre des maladies importantes telles que la rougeole, la varicelle, ou encore l'hépatite B. Cependant, la présence d'une vaccination à jour représentait l'élément le plus significatif de la présence d'anticorps protecteurs(2).

L'hépatite A est une infection virale responsable d'hépatite aiguë. Elle se transmet par voie fécale-orale de personne à personne, mais également par la nourriture ou par l'eau contaminée. Alors qu'elle est peu symptomatique chez le jeune enfant, elle peut être responsable d'hépatite fulminante chez l'enfant plus âgé ou l'adulte(5). Environ 100'000 cas et 500 décès sont annoncés annuellement dans la région Europe de l'OMS, mais ces chiffres sont probablement sous-estimés. En comparaison, des zones de grande endémicité (Asie centrale) pourraient avoir jusqu'à 1000 fois plus de cas(6). Chez le patient VIH positif, la symptomatologie ne diffère pas de la personne immunocompétente. Ainsi, l'infection par le VIH ne fait pas partie des recommandations suisses de vaccination contre l'hépatite A. Cependant, il a été démontré que l'hépatite A peut perturber transitoirement le contrôle de l'infection VIH, principalement du fait de résistances suite à l'arrêt du traitement antirétroviral(7-9). De plus, les patients souffrant d'une pathologie hépatique chronique, sont particulièrement à risque de développer une hépatite A sévère ou fulminante (6). Et les maladies hépatiques font partie des 3 causes primaires de décès non liés au SIDA chez les patients VIH positifs, en

raison de co-infections virales hépatotropiques, de la toxicité hépatique des traitements antirétroviraux et de maladies hépatiques émergentes telles que l'hyperplasie nodulaire régénérative(10). Ces problèmes sont rarissimes chez l'enfant. On peut cependant envisager un bénéfice de la vaccination contre l'hépatite A dans une vision à plus long terme, quand nos patients auront atteint l'âge adulte. De plus, une majorité de nos patients étant originaires de pays de moyenne et haute endémicité et pouvant retourner dans leur pays pour des séjours temporaires, ils remplissent les critères suisses de la vaccination contre l'hépatite A.

Le vaccin Havrix® et le vaccin Twinrix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium), disponibles en Suisse, permettent, par un schéma à 2 ou 3 doses, de prévenir efficacement l'hépatite A (et l'hépatite B pour le Twinrix®), chez les personnes de plus d'un an. Un autre vaccin contre l'hépatite A existe en Suisse. Il s'agit du vaccin virosomal Epaxal® (Berna-Biotech, Berne, Suisse). Plusieurs rapports chez les personnes immunocompétentes ont montré que l'administration de Twinrix® permettait d'obtenir des moyennes géométriques d'anticorps contre l'hépatite A plus élevés qu'avec le Havrix®(11-13). Cependant, il est peu probable que cette différence soit cliniquement significative. Les études effectuées ont montré que ces vaccins sont sûrs, cliniquement bien tolérés et hautement immunogéniques chez la personne immunocompétente(14). Plusieurs conditions conduisent cependant à une efficacité moindre. Il s'agit essentiellement d'un statut VIH positif, d'une hépatopathie chronique et d'un âge avancé (15). Alors que le taux de séroconversion de l'adulte sain après 2 doses de Havrix® est de 98-100% (14), les études effectuées chez les patients VIH positifs ont montré des résultats significativement moins bons avec un taux de séroconversion de 48.5 à 94%(16-22). Les études effectuées chez l'enfant VIH positifs sont rares. Cependant, les données existantes suggèrent une bien meilleure réponse immune que chez l'adulte avec

un taux de séroconversion de 84.5 à 100%(23-28). On peut remarquer que ces résultats ont une grande variabilité. En effet, dans une méta-analyse récente, Shire et Collègues ont noté une hétérogénéité significative entre les études que ce soit au niveau de la population étudiée, de la dose et du timing de la vaccination ou encore du timing, de la méthode et du seuil des sérologies de l'hépatite A(29). Cette hétérogénéité peut expliquer les grandes variations des données rapportées et ainsi rendre compliquée la comparaison entre les études et la généralisation des résultats. On peut cependant noter le rôle déterminant relevé dans plusieurs études du nombre de cellules CD4 sur la réponse vaccinale, que ce soit chez des patients adultes(16, 17, 19, 21, 22) ou pédiatriques(24-26). Ainsi, les meilleurs résultats de la vaccination sont obtenus dans certaines populations, dont les enfants, avec un profil immun favorable. Dans une population de patients pédiatriques (âge médian de 5.5 ans) sans symptômes ou d'immunosuppression sévères (tous avec CD4 > 15%), Gouvea et Collègues ont montré un taux de séroconversion de 100%(23). Dans une population adulte (âge médian de 32 ans), Wallace et Collègues ont aussi décrit un taux de séroconversion de 100% chez des patients ayant plus de 300 CD4/mm³ alors que celui-ci n'était que de 87% chez des patients avec des CD4 inférieurs à 300/mm³(21). La charge virale a également été décrite comme un déterminant de la réponse à la vaccination contre l'hépatite A dans une étude adulte(18) et une étude pédiatrique(26). D'autres facteurs ont été identifiés comme déterminants de la réponse vaccinale dans des études isolées. Ce sont le sexe masculin(18), le sexe féminin(25), le tabac(30) et un âge inférieur à 12 ans(25).

Un point important a été peu étudié dans les populations de patients VIH positifs. Il s'agit de la persistance des anticorps après la vaccination contre l'hépatite A. On sait actuellement que celle-ci est estimée à plus de 20 ans chez les patients immunocompétents(31). Des titres d'anticorps post-vaccinaux beaucoup plus bas chez

les patients VIH positifs laissent présager d'une durée de protection beaucoup plus courte. Ainsi, dans 2 études pédiatriques, Gouvea et Collègues ont mesurés des moyennes géométriques des titres d'anticorps à 2180 mIU/ml (95% CI 1226.5-3875.5)(23) et Sudjaritruk et Collègues des moyennes géométriques à 520.95(25). Ceci est significativement moins bon que les résultats obtenus chez les enfants en bonne santé, chez qui les moyennes géométriques s'élèvent au-dessus de 5000 dans plusieurs études(32-34). La cinétique de chute des anticorps chez les patients VIH positifs a été étudiée dans quelques études. Dans une étude pédiatrique Weinberg et Collègues ont montré que la séroprotection contre l'hépatite A chez les enfants VIH positifs chutait de 97% 2 mois après la deuxième dose de vaccin à 90% 20 mois après cette même deuxième dose(26). Launay et Collègues ont suivi l'évolution temporelle des taux d'anticorps d'adultes HIV positifs(30). A 48 semaines après la dernière dose de vaccins, les moyennes géométriques de titres d'anticorps étaient équivalentes à 40 et 48% de celles mesurées un mois après la dernière dose d'un schéma à 3 doses (0-4-25 semaines) et d'un schéma à 2 doses (0-24 semaines), respectivement. Ces résultats semblent comparables à ce qui a été décrit chez les patients immunocompétents par Van Herck et Van Damme(31). Ils ont mesuré, 12 mois après un schéma vaccinal à 2 doses, des moyennes géométriques des titres d'anticorps correspondant à 31% de celles mesurées 1 mois après la deuxième dose de vaccin. Dans cette même étude, la chute annuelle des titres d'anticorps, à partir de 1 an après la dernière dose de vaccin, était estimée à 15%. Une étude récente effectuée dans une population d'adultes VIH positifs tend à démontrer une cinétique de chute des anticorps similaires chez les patients ayant initialement répondu à la vaccination (89%)(35). Cependant, une moyenne géométrique des titres d'anticorps plus basse initialement conduit à une perte d'immunité beaucoup plus rapide que dans la population immunocompétente mais permet tout de même de

garder une protection vaccinale contre l'hépatite A chez 85% des répondeurs initiaux 6-10 ans après la vaccination.

Les enfants VIH positifs inclus dans la Cohorte VIH Mère-Enfants (Swiss Mother and Child HIV Cohort – MoCHIV, disponible ici : http://www.shcs.ch/html/shcs_enter.htm) sont suivis prospectivement. Cette cohorte enrôle les enfants infectés par le VIH qui sont suivis dans les 5 Hôpitaux Universitaires et un hôpital régional (St-Gall) et enregistre les données biologiques et cliniques de chaque patient inclus, deux fois par année. La base de données MoCHIV fournit également des informations sur les données démographiques, l'histoire de la maladie VIH, la charge virale au moment de l'enrôlement dans l'étude, l'évolution du statut immunitaire (dont le Nadir des CD4), et l'histoire du traitement antirétroviral. Dans le cadre du travail effectué par Myers et Collègues(2), au cours duquel l'immunité vaccinale des enfants de la cohorte MoCHIV a été testée, ceux-ci ont pu bénéficier d'une vaccination contre l'hépatite A selon le résultat de la sérologie et leur anamnèse vaccinale. Le but de cette étude est donc de déterminer l'immunité contre l'hépatite A et ses déterminants parmi la cohorte suisse des enfants infectés par le VIH.

Abstract

Background Vaccination in HIV-positive children is often less effective. The goal of this study was to assess vaccine responses to hepatitis A virus (HAV) in HIV-infected children.

Methods Children of the Swiss Mother and Child Cohort Study, were enrolled prospectively. Recommendations for initial / catch-up / additional HAV immunization were based upon baseline antibody concentrations and vaccine history. HAV IgG were assessed by ELISA with a protective cut-off value defined ≥ 10 mIU/ml.

Results Eighty-seven patients were included (median age 11 years, range 3.4 – 21.2). Forty-five (51.7%) patients were seronegative for HAV. Vaccine responses were assessed after the priming dose in 29/35 naïve patients, and after the booster dose in 33/39 children. Seroconversion was 86% after 1 dose and 97% after 2 doses, with a post-booster geometric mean concentration of 962 mIU/ml. Baseline CD4 T cells count < 750 cells/mm³ significantly reduced booster response ($P=0.005$).

Conclusions Despite a high rate of seroconversion, patients with CD4 counts < 750 /mm³ had lower anti-HAV antibody concentrations, which may translate into a shorter protection time. Monitoring humoral immunity to provide supplementary doses as needed may be necessary.

Introduction

Liver diseases are among the three primary causes of non-AIDS-related deaths in patients with HIV through hepatotropic viral co-infection, liver toxicity of antiretroviral therapy, and emerging liver diseases such as nodular regenerative hyperplasia(10). It has been shown that HIV infection does not alter the clinical course of hepatitis A(36); however, this infection can have adverse effects in patients with liver disease. Thus, it appears essential to offer the best protection against hepatitis A virus (HAV) in HIV-positive patients.

Studies have demonstrated that HAV vaccine is safe, clinically well-tolerated, and highly immunogenic in all age groups(14). While seroconversion reaches 98-100% in healthy individuals after 2 doses of Havrix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)(14), studies in adult HIV-positive patients showed significantly lower results (48.5-94%)(16-22). The length of protection, currently estimated to be more than 20 years in healthy individuals(34), also seems to be shorter in HIV-positive patients(21). Studies in HIV-positive children are scarce and heterogeneous. Nevertheless, available data suggest a much better immune response than in adults(23-26). We present here the results of a prospective cohort study whose primary objective was to determine the parameters influencing the response to vaccination against HAV in HIV-infected children.

Methods

Population

Patients enrolled in this study had been prospectively included in the Swiss Mother and Child HIV Cohort (MoCHIV, available at: http://www.shcs.ch/html/shcs_enter.htm), which enrolls children diagnosed with HIV infection and records clinical and biologic data biannually for each included patient. The MoCHIV database also provides information concerning patient demographics, history of HIV disease, viral load upon enrolment in this study, evolution of immunologic status -including CD4 nadir-, and antiretroviral treatment history (introduction of highly active antiretroviral treatment (HAART), defined by at least 3 antiretroviral drugs including either a protease inhibitor or a non-nucleoside reverse transcription inhibitor). Patients were recruited in all five Swiss University Hospitals and in one regional hospital, which altogether follow most HIV-infected children in Switzerland. There were no exclusion criteria, including for age, apart from refusal to participate. Patients older than 18 years but still treated in HIV paediatric clinics were also included. Informed consent was obtained from the child and/or his legal guardian according to age, and the local institutional ethics committee accepted the study. Vaccination history was retrieved from vaccination cards and/or medical records, as already described(2).

Categorization of HAV vaccine response

Our study population was divided into two groups of HAV-positive and -negative patients, according to baseline serologic status (Figure 1). Recommendations for initial / catch-up / additional HAV immunization (Havrix® 720 ELISA units (< 19 year-old) or 1440 ELISA units ($\geq$ 19 year-old), GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)) were based upon baseline antibody concentrations and vaccine history: two doses were

recommended to naïve children, one catch-up dose to primed children (one previous immunization, even if seropositive at baseline), and one additional booster dose to fully immunized but seronegative patients. Twinrix® (720 ELISA units of inactivated hepatitis A virus and 20 µg recombinant HBsAg protein) was used instead of Havrix® if catch-up or full immunization was also necessary for hepatitis B. Havrix® 720 was used in patients younger than 19 years and Havrix® 1440 in older patients. This allowed the constitution of 3 subgroups called naïve, primed and fully immunized children (Figure 1).

Analysis of Vaccine-Induced Humoral Immunity

HAV IgG antibodies were assessed in the Laboratory of Vaccinology (HUG) by ELISA (Enzygnost® Anti-HAV, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany), according to the manufacturer's instructions. We used a seroconversion value anti-HAV antibody concentration of ≥ 10 mIU/mL which has been considered protective against HAV(15). Results below the assay's cut-off were arbitrarily given half the cut-off value to allow computation of mean geometric concentration (GMC).

Statistical Analysis

Demographics and biological variables such as gender, ethnicity, age, baseline CD4 count, nadir of CD4 count, HIV viral load, HAART treatment, and previously received HAV vaccine doses were compared between HAV positive and negative children using Student T-test or Mann-Whitney-U test for continuous variables and chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables. All variables with a P-value <0.25 were then included in a multivariate logistic regression model for which adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated. The same variables were then evaluated individually as potential determinant of HAV vaccine responses, using linear regression for continuous variables and chi-square test or Fisher's exact test for

categorical variables, as appropriate. After this, all the variables with a P-value < 0.25 were included in a multivariate linear regression model. All tests were 2-tailed and a P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Sample size was not calculated as all HIV-infected children of Switzerland and part of the MoCHIV cohort were offered to participate in the study. Statistical analyses were computed using SPSS 16.0 statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

Population

Eighty-seven patients were included in the study (median age 11 years, range 3.4 – 21.2 years) between June, 2006 and August, 2007. Only 4 were older than 18 years (18.1-21.2 years) at enrolment. Forty-five patients were seronegative (51.7%) and 42 seropositive for HAV (Figure 1). Genders were similarly distributed in both groups (Table 1). Most patients were on HAART, with a median CD4 T cells count of 756/mm³ (> 50% with CD4 $\geq$ 15%) and mostly undetectable HIV-1 RNA.

Among HAV-seronegative patients, 36 (80%) patients were naïve, 5 (11.1%) primed, and 4 (8.9%) fully vaccinated. Among seropositive patients, 17 (40.5%) had no records of past HAV immunization and were considered to have immunity post-natural infection, 7 (16.7%) were primed, and 18 (42.8%) fully vaccinated. HAV positive patients were significantly older (median age 12.2 vs 10 years), had lower baseline (median of 686 vs 887 cells/mm³) and nadir (median of 253 vs 407 cells/mm³) CD4 T cells count, and higher HIV viral loads (median of 1.9 vs 1.3 log₁₀ copies/ml; Table 1). More HAV positive patients had received HAV immunizations (59.5% were known as partially or fully immunized) than negative patient (20% known as partially or fully immunized). Thus, a history of HAV immunization ($\geq$ 1 dose of vaccine) was a reliable predictor of HAV immunity (OR:5.1, 95% CI 1.8-14.4). This fact remained statistically significant in a multivariate analysis (P=0.02). The median time between inclusion and the last dose of vaccine received was 1.7 years (IQR 1.2-3.7 years). All four fully immunized but HAV seronegative patients had their last vaccine dose 3.5 years or more before enrolment.

HAV vaccine seroresponse

Vaccine seroresponses were assessed after the priming dose in 29/35 naïve patients (6 Havrix® and 23 Twinrix®). Age, gender, baseline CD4⁺ T cells count, HAART and viral load were similar between assessed and non-assessed patients. Seroconversion occurred in 24/29 (86%), with a slight trend toward higher GMCs with Twinrix® compared to Havrix® (58 mIU/ml, 95% CI 34-98 vs 51, 95% CI 29-91) (Figure 2). Responses to the booster dose were assessed in 33/39 children (10 Havrix® (priming dose: 6 with Havrix® 4 with Twinrix®); 23 Twinrix® (priming dose: 3 with Havrix® and 20 with Twinrix®) (Figure 1). Significant differences were not identified between assessed and non-assessed patients. All but 1 (97%) patients seroconverted after boosting, with a GMC of 962 (95% CI 503-1838) (Figure 2). Again, responses to Twinrix® were slightly but not significantly higher compared to Havrix® (983, 95% CI 488-1981 vs 912, 95% CI 509-1636). This difference was higher following 2 doses of Twinrix® (1247 mIU/ml, 95% CI 829-1878) compared to 2 doses of Havrix® or mixed regimen) (644, 95% CI 316-1312) but did not reach statistical significance. The minimum interval between priming and boosting was 4 months (range 4-128). The time between vaccination and serology was 3 months (IQR 2-3.3 months) for post-priming serology and 3.2 months (IQR 2.5-3.6 months) for post-boosting serology, with no significant influence on antibody concentrations (not shown).

In a post-priming analysis, none of the tested variables significantly influenced anti-HAV GMCs. Baseline CD4 T cells count significantly influenced post-booster responses in univariate analyses ($P<0.001$) and this influence remained significant in a multivariate model ($P=0.005$) including baseline viral load, nadir CD4 T cells count and HAART treatment in the model. Using the median baseline CD4 T cells count (750/mm³) as a cut-off, we found that only about 60% of patient with CD4 T cells counts below

750/mm³ had anti-HAV antibody concentrations higher than 250 mIU/ml compared to 100% of children with CD4 T cells count of 750/mm³ or more (Figure 3). An increase of more than 1.5 log in anti-HAV antibody concentration between priming and boosting was observed in 8/23 patients with available data and was also associated with a higher CD4 T cells count (median (IQR) of 1212 cells/mm³ (908-1653) vs 807 (634-1018), $p=0.04$, Figure 4).

Discussion

Contrary to what is observed in immunocompetent children and adults with nearly 100% seroconversion(14), vaccination against HAV is less immunogenic in patients with HIV.

In a recent meta-analysis, Shire et al. noted a significant heterogeneity between studies either among study population, dose and timing of vaccination, or among timing, method and cut-off of HAV serology following immunization(29). This heterogeneity may explain the wide variations in reported results and prevent meaningful comparisons. In adults, the seroconversion rates range from 48.5 to 94%(16-22) and in children from 84.5 to 100%(23-28). The best results are clearly found in certain populations, including children, with a favorable immune profile. In a population of pediatric patients (median age of 5.5 years) without severe symptoms or immunosuppression (all with CD4 > 15%), Gouvea et al. showed 100% seroconversion (23). In an adult population (median age of 32 years), Wallace et al. also described a 100% seroconversion in patients with more than 300 CD4 cells/mm³ whereas it was only 87% in patients with < 300 CD4 cells/mm³(21). In our study, we found similar results with 97% seroconversion after the second dose of vaccine. The immune profile of our essentially HAART-treated patients was also favorable with a median CD4 T cells count of 756/mm³ (> 50% with CD4 $\geq$ 15%) and mostly undetectable HIV-1 RNA.

In our study, the only determinant of the antibody response was the CD4 T cells count. The age of our patients could have had an impact on our results. But, only 4 out of 29 children that had post-priming analyses and only 2 out of 33 children who had post-boosting analyses were below 5 years of age. Thus, their physiologically higher lymphocyte and CD4⁺ T cells count were quite unlikely to have influenced our results. CD4⁺ T cells role has already been demonstrated in several adult^{13, 14, 16, 18, 19} and pediatric⁽²⁴⁻²⁸⁾ studies. Weinberg et al, in a pediatric population, and Overton et al. in an adult population, also identified the viral load as a determinant of response to vaccination^(18, 26). Over 50% of the population of Weinberg et al. were viremic (cut-off of 400 copies/ml)⁽²⁶⁾ while 73% of our population was aviremic (cut-off of 40 copies/ml). This difference may explain why viral load does not appear as a significant factor of vaccine response in our population. Other determinants such as male gender⁽¹⁸⁾ and tobacco⁽³⁰⁾ in adult populations and female gender and age < 12 years^(25, 28) in pediatric populations were identified by others but did not play a role in our study.

Although the CD4⁺ T cells count was a significant determinant of booster vaccine response, its influence on primary antibody concentrations was not statistically significant. This may be essentially due to a smaller sample size, or highlight the need for sufficient CD4⁺ T cells to elicit and maintain immune memory⁽³⁷⁾. Few studies reported an association of CD4⁺ T cells counts with primary response after HAV vaccination^(16, 27). Saksawad et al. showed, in a pediatric population quite similar to ours in term of sample size (38) and immunological profile (mean CD4⁺ T cells count of 749 cell/mm³), that CD4⁺ T cells count was a significant predictor of seroprotection after the first dose of an HAV vaccine, but the used vaccine was virosomal, which can explain the difference of results⁽²⁷⁾. The influence of the CD4⁺ T cells count on the magnitude of the post-

booster GMC increase suggests that they are important for the induction and reactivation of memory response. In another study, CD4⁺ T cells count measured at different times after primary vaccination did not impact the quality of booster responses(38). During primary vaccination with T-dependant vaccines, the extrafollicular reaction precedes the development of germinal centers. Production of antibodies at this stage is limited, until B cells expressing the CXCR5 receptor migrate towards CXCL13 (CXCR5 ligand) produced by follicular dendritic cells and initiate the germinal center reaction with class switch, somatic hypermutation, and affinity maturation(39). In an adult HIV-positive population, CD4⁺ T cells counts of less than 350/mm³ were associated with a diminution of expression of CXCR5 on naïve and memory B cells as well as on pre-plasma cells(40). This impacted migration patterns of B cells and may limit germinal center reactions. Weinberg et al demonstrated recently the role of B cells per se in HAV vaccine responses(38). They showed that the booster response of HIV-infected children on HAART relies mainly on viral load and percentage of B cells, and only secondarily on the percentage of CD4⁺ T cells. Their results suggested that bidirectional cooperation between B and T cells play a major role in the response to HAV vaccination. Thus, B cell paucity and dysfunction and defective CD4⁺ T cells helper function at priming prevent HIV-infected patients from effectively generating memory B cells and thus an effective boosting response. Our results are in accordance with this understanding, despite the lack of association of HIV-1 viral load and anti-HAV responses.

If the rate of seroconversion may approach or even equal the one of healthy populations in certain HIV-infected populations, the anti-HAV GMCs remain significantly lower. In our study, the GMC was 962 (95% CI 503-1838) and only about 60% of patients with CD4⁺ T cells count below 750 cells/mm³ had anti-HAV antibody concentrations above

250 mIU/ml, a concentration which is virtually always exceeded in all healthy persons(26). In two pediatric studies, Gouvea et al. measured a GMC of 2180 (95% CI 1226.5-3875.5)(23) and Sudjaritruk et al. a GMC of 520.95(25). This is significantly lower than in healthy children whose GMCs rise above 5000 in several studies(32-34). The issue raised here is the persistence of antibodies and thus long-term protection. It is currently estimated to be more than 20 years in healthy children and adults(34). Weinberg et al. showed that the seroprotection against HAV in HIV-infected children dropped from 97% two months after the second dose of vaccine to 90% 20 months after the second dose of vaccine(26). In our study, although a history of previous HAV immunization reliably predicted seropositivity, 44.5% of fully immunized patients who had received their last dose of vaccine 3.5 years or more before enrollment were seronegative for HAV. Launay et al. followed the temporal evolution of antibody levels in HIV-infected adults(30). At 48 weeks after the last dose of vaccine, the GMCs were equivalent to about 40% and 38% of GMCs measured one month after the last dose of a 3-dose (0-4-24 weeks) and a 2-dose schedule (0-24 weeks), respectively. This is comparable to what was shown in immunocompetent patients by Van Herck and Van Damme(31). They measured, at 12 months after a 2-dose regimen, GMCs corresponding to 31% of those measured 1 month after the second dose of vaccine. In the same study, the annual waning of antibodies after the second dose of vaccine was estimated to be 15%. Recently, Crum-Cianflone et al. reported data about the long-term immunity to HAV among 130 HIV-infected adults(35). After an initial seroconversion of 89%, 90% (104 of 116; 95% CI, 83%–95%) of responders remained seropositive at 3 years and 85% (63 of 74; 95% CI, 75%–92%) at 6-10 years. GMCs were 154, 111 and 64 mIU/ml at 1, 3 and 6-10 years. This corresponds to an annual fall of 12-15%, which is similar to what has been described in healthy adults. Higher GMCs over time were associated with lower viral load. As pediatric HIV-infected populations have comparatively higher GMCs,

we can expect that the average persistence of antibody may even be better. However, prediction on an individual basis may not be possible, as was underscored in the conclusion of the review of Sutcliffe and Moss(4) in which they establish whether HIV-infected children on HAART have protective immunity to vaccine-preventable diseases and how to assess short-term and long-term immune responses to vaccination. These authors conclude that most children respond to vaccination, although immune reconstitution was not sufficient to ensure long-term immunity for some children, but that some children need additional vaccine doses to maintain protective immunity.

Our field study has several limitations. First, serological analyses could only be performed in 29 and 33 of 87 HIV-infected children for post-priming and for post-boosting analyses, respectively. This may have prevented us from identifying other determinants of HAV vaccine responses. However, the conclusions of our study are in accordance with previously published work. Second, we didn't include analysis of the CD19 cell count which was recently shown to impact HAV vaccine response. Third, either Havrix® or Twinrix® vaccines were used, depending upon the need for hepatitis B immunization. Several reports in healthy populations showed that Twinrix® immunization results in higher GMCs(11-13) and this could have positively influenced our results. Finally, the results of our study – like others – may not be readily transposed to other settings and populations with distinct baseline characteristics.

In conclusion, our study indicated that antibody responses elicited by the most immunogenic HAV vaccine are lower even in essentially HAART-treated HIV-infected children with modestly lower ($< 750/\text{mm}^3$) CD4^+ T cells counts. As this may predict a shorter period of protection than in immunocompetent children but is difficult to predict on an individual basis. Routine serology monitoring in the absence of exposure to HAV might not be necessary. However, a serology should be done before a known

exposure to HAV, for example, before traveling to a high endemic area. Additional booster doses may become necessary as time elapses since the last HAV immunization, regardless of immunization history.

References

1. Moir S, Connors M, Fauci AS. The immunology of Human Immunodeficiency Virus Infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed: Elsevier; 2010.
2. Myers C, Posfay-Barbe KM, Aebi C, et al. Determinants of vaccine immunity in the cohort of human immunodeficiency virus-infected children living in Switzerland. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Nov 1;28(11):996-1001.
3. Moss WJ, Halsey NA. Vaccination of Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*: Saunders Elsevier; 2008.
4. Sutcliffe CG, Moss WJ. Do children infected with HIV receiving HAART need to be revaccinated? *Lancet Infect Dis*. 2010 Sep 1;10(9):630-42.
5. Bell BP, Fiore AE. Hepatitis A Virus. In: Long SS, editor. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*: Churchill Livingstone; 2008. p. 1-13.
6. FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, et al. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine*; 2010 Feb 08. 2010. p. 583-8.
7. Wallace MR, Hill HE, Tasker SA, et al. Hepatitis A in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 1998 Sep 1;27(3):651-3.
8. Ishida T, Nakamura T, Ajisawa A, et al. Outbreak of hepatitis A virus infection among HIV-1 seropositive men who had sex with men. *Jpn J Infect Dis*. 1999 Jul;52(3):131-2.
9. Ridolfo AL, Rusconi S, Antinori S, et al. Persisting HIV-1 replication triggered by acute hepatitis A virus infection. *Antivir Ther. (Lond.)*. [Case Report]. 2000 Apr;5(1):15-7.
10. Mallet V, Vallet-Pichard A, Pol S. The impact of human immunodeficiency virus on viral hepatitis. *Liver Int*. 2011 Jan 1;31 Suppl 1:135-9.
11. Joines RW, Blatter M, Abraham B, et al. A prospective, randomized, comparative US trial of a combination hepatitis A and B vaccine (Twinrix) with corresponding monovalent vaccines (Havrix and Engerix-B) in adults. *Vaccine*. [Clinical Trial]. 2001 Sep 14;19(32):4710-9.
12. Czeschinski PA, Binding N, Witting U. Hepatitis A and hepatitis B vaccinations: immunogenicity of combined vaccine and of simultaneously or separately applied single vaccines. *Vaccine*. [Clinical Trial]. 2000 Feb 06;18(11-12):1074-80.
13. González-Huezo MS, Sánchez-Avila F, García Mayol M, et al. [Comparison of two different vaccination schemes against Hepatitis A and B in Mexican children and adolescents]. *Rev Gastroenterol de Mex*. [Clinical Trial]. 2003 Sep;68(4):271-6.
14. Clemens R, Safary A, Hepburn A, et al. Clinical experience with an inactivated hepatitis A vaccine. *J Infect Dis*. 1995 Mar 1;171 Suppl 1:S44-9.
15. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Fiore AE, Wasley A, et al. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006 May 19;55(RR-7):1-23.
16. Kemper CA, Haubrich R, Frank I, et al. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in human immunodeficiency virus-infected patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*. 2003 Apr 15;187(8):1327-31.
17. Neilsen GA, Bodsworth NJ, Watts N. Response to hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected homosexual men. *J Infect Dis*. 1997 Oct 1;176(4):1064-7.

18. Overton ET, Nurutdinova D, Sungkanuparph S, et al. Predictors of immunity after hepatitis A vaccination in HIV-infected persons. *J Viral Hepat.* 2007 Mar 1;14(3):189-93.
19. Rimland D, Guest JL. Response to hepatitis A vaccine in HIV patients in the HAART era. *AIDS.* 2005 Oct 14;19(15):1702-4.
20. Tilzey AJ, Palmer SJ, Harrington C, et al. Hepatitis A vaccine responses in HIV-positive persons with haemophilia. *Vaccine.* 1996 Aug 1;14(11):1039-41.
21. Wallace MR, Brandt CJ, Earhart KC, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine among HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis.* 2004 Oct 15;39(8):1207-13.
22. Weissman S, Feucht C, Moore BA. Response to hepatitis A vaccine in HIV-positive patients. *J Viral Hepat.* 2006 Feb 1;13(2):81-6.
23. Gouvea AFTB, De Moraes-Pinto MI, Ono E, et al. Immunogenicity and tolerability of hepatitis A vaccine in HIV-infected children. *Clin Infect Dis.* 2005 Aug 15;41(4):544-8.
24. Siberry GK, Coller RJ, Henkle E, et al. Antibody response to hepatitis A immunization among human immunodeficiency virus-infected children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 May 1;27(5):465-8.
25. Sudjaritruk T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Antibody Responses to Hepatitis A Virus Vaccination in Thai HIV-infected Children With Immune Recovery After Antiretroviral Therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Sep 17.
26. Weinberg A, Gona P, Nachman SA, et al. Antibody responses to hepatitis A virus vaccine in HIV-infected children with evidence of immunologic reconstitution while receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2006 Jan 15;193(2):302-11.
27. Saksawad R, Likitnukul S, Warachit B, et al. Immunogenicity and safety of a pediatric dose virosomal hepatitis A vaccine in Thai HIV-infected children. *Vaccine.* 2011 Jul 24;29(29-30):4735-8.
28. Sudjaritruk T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Antibody responses to hepatitis A virus vaccination in thai hiv-infected children with immune recovery after antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Apr;30(3):256-9.
29. Shire NJ, Welge JA, Sherman KE. Efficacy of inactivated hepatitis A vaccine in HIV-infected patients: a hierarchical bayesian meta-analysis. *Vaccine.* 2006 Jan 16;24(3):272-9.
30. Launay O, Grabar S, Gordien E, et al. Immunological efficacy of a three-dose schedule of hepatitis A vaccine in HIV-infected adults: HEPAVAC study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008 Nov 1;49(3):272-5.
31. Van Herck K, Van Damme P. Inactivated hepatitis A vaccine-induced antibodies: follow-up and estimates of long-term persistence. *J Med Virol.* 2001 Jan 1;63(1):1-7.
32. Abarca K, Ibáñez I, Perret C, et al. Immunogenicity, safety, and interchangeability of two inactivated hepatitis A vaccines in Chilean children. *Int J Infect Dis.* 2008 May 1;12(3):270-7.
33. López EL, Del Carmen Xifró M, Torrado LE, et al. Safety and immunogenicity of a pediatric formulation of inactivated hepatitis A vaccine in Argentinean children. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Jan 1;20(1):48-52.
34. Hammitt LL, Bulkow L, Hennessy TW, et al. Persistence of antibody to hepatitis A virus 10 years after vaccination among children and adults. *J Infect Dis.* 2008 Dec 15;198(12):1776-82.
35. Crum-Cianflone NF, Wilkins K, Lee AW, et al. Long-term Durability of Immune Responses After Hepatitis A Vaccination Among HIV-Infected Adults. *J Infect Dis.* 2011 Jul;203(12):1815-23.
36. Fonquernie L, Meynard JL, Charrois A, et al. Occurrence of acute hepatitis A in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2001 Jan 15;32(2):297-9.

37. Amanna IJ, Slifka MK. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans. *Virology*. [Review]. 2011 Apr 15;411(2):206-15.
38. Weinberg A, Huang S, Fenton T, et al. Virologic and immunologic correlates with the magnitude of antibody responses to the hepatitis A vaccine in HIV-infected children on highly active antiretroviral treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Sep 1;52(1):17-24.
39. Siegrist C-A. Vaccine immunology. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines*: Saunders Elsevier; 2008. p. 1-20.
40. Cagigi A, Mowafi F, Phuong Dang LV, et al. Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood*. 2008 Dec 01;112(12):4401-10.

Table and Figures

Table 1 : Biological and demographic characteristics of the study population

Characteristic	All subjects (n=87)	HAV seronegative at baseline (n=45)	HAV seropositive at baseline (n=42)	p
Female gender, n (%)	46 (53)	24 (53)	22 (52)	NS
Age, median years (range)	11 (3.4-21.2)	10 (3.4-18.8)	12.2 (4.3-21.2)	0.01
Baseline CD4 ⁺ T cells (%)				
Mean (SD)	30.9 (9.5)	33.1 (9.4)	28.5 (9.2)	0.02
< 15%, n (%)	6 (7)	2 (4.4)	4 (10)	NS
15-24% n (%)	15 (17)	6 (13.3)	9 (21)	
> 24%, n (%)	66 (76)	37 (82)	29 (61)	
Baseline CD4 ⁺ T cells count, median (IQR), cells/mm ³	756 (564-1083)	887 (623-1316)	686 (523-941)	0.02
Nadir CD4 ⁺ T cells (%)				
Median (IQR)	15 (6-22)	17 (8-24)	10 (5-20)	NS
< 15%, n (%)	40 (46)	19 (42.2)	21 (50)	NS
15-24%, n (%)	25 (28.7)	15 (33.3)	10 (23.8)	
> 24%, n (%)	22 (25.3)	11 (24.5)	11 (26.2)	
Nadir CD4 ⁺ T cells count, median (IQR), cells/mm ³	331 (129-573)	407 (201-714)	253 (93-390)	<0.01
Baseline HIV RNA level				
Median, log10 copies/mL (IQR)	1.3 (1.3-3)	1.3 (1.3-2.3)	1.9 (1.3-3.3)	0.02
<40 copies/mL, n (%)	52 (59.8)	33 (73)	19 (45)	0.03
40 to <1000 copies/mL, n (%)	8 (9.2)	1 (2)	7 (17)	
1000 to <10'000 copies/mL, n (%)	12 (13.8)	5 (11)	7 (17)	
≥ 10,000 copies/mL, n (%)	15 (17.2)	6 (14)	9 (21)	
Vaccine doses previously received, n (%)				< 0.001
Naive (0 dose)	53 (60.9)	36 (80)	17 (40.5)	
Primed (1 dose)	12 (13.8)	5 (11.1)	7 (16.7)	
Immunized (≥ 2 doses)	22 (25.3)	4 (8.9)	18 (42.8)	
HAART treatment at enrollment, n (%)	69 (79.3)	38 (84.4)	31 (73.8)	NS

Table legend: HAV, Hepatitis A virus. SD, standard deviation. IQR, interquartile range.

HAART: highly active anti-retroviral treatment

Figure 1 : study population

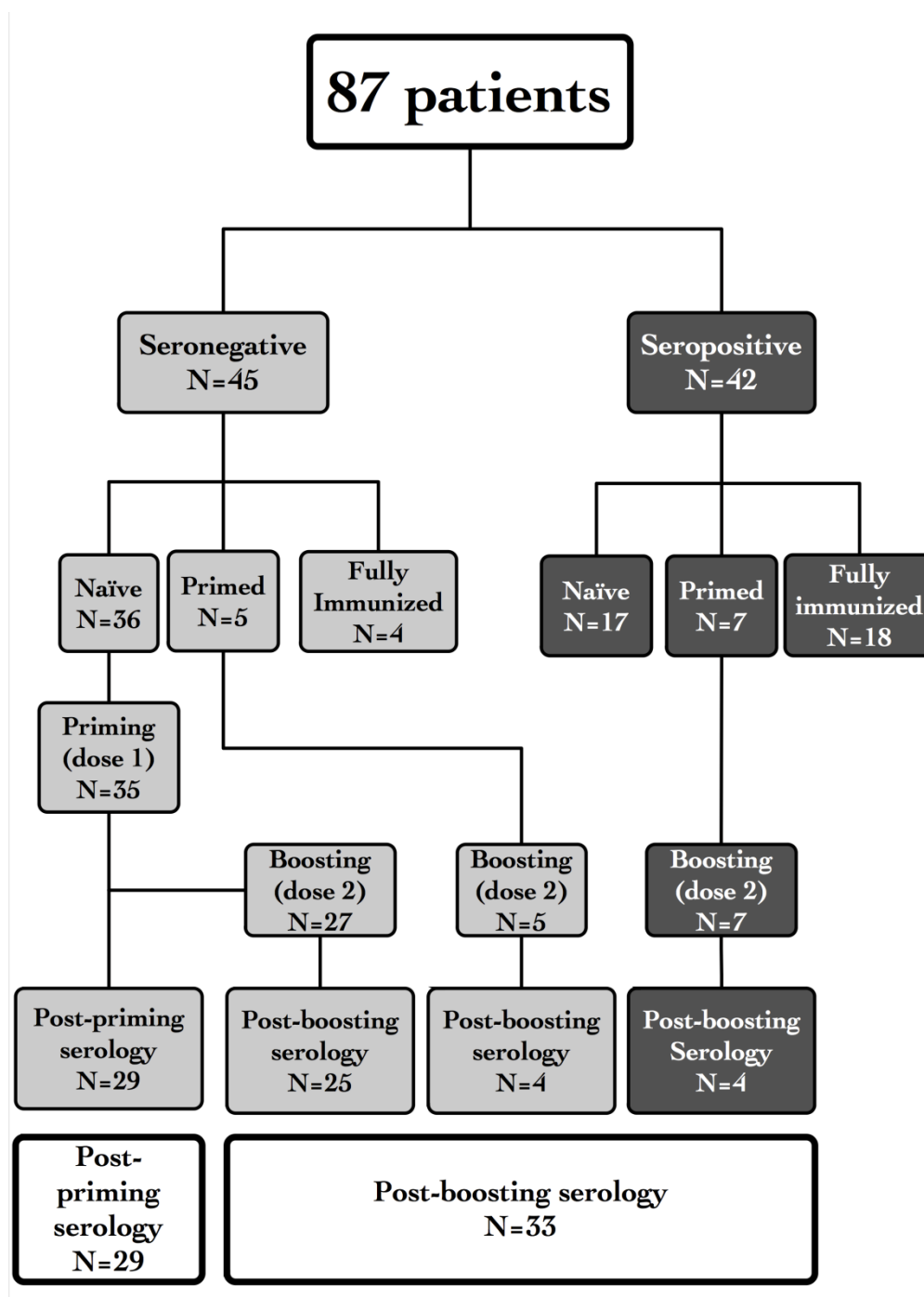


Figure legend : HAV, hepatitis A virus; Seronegative: negative HAV serology; Seropositive: positive HAV serology; Naïve: no previous HAV immunization; Primed: one previous dose of HAV vaccine; Fully immunized: ≥ 2 previous doses of HAV vaccine.

Figure 2 : Anti-HAV antibody concentrations after priming and boosting vaccination

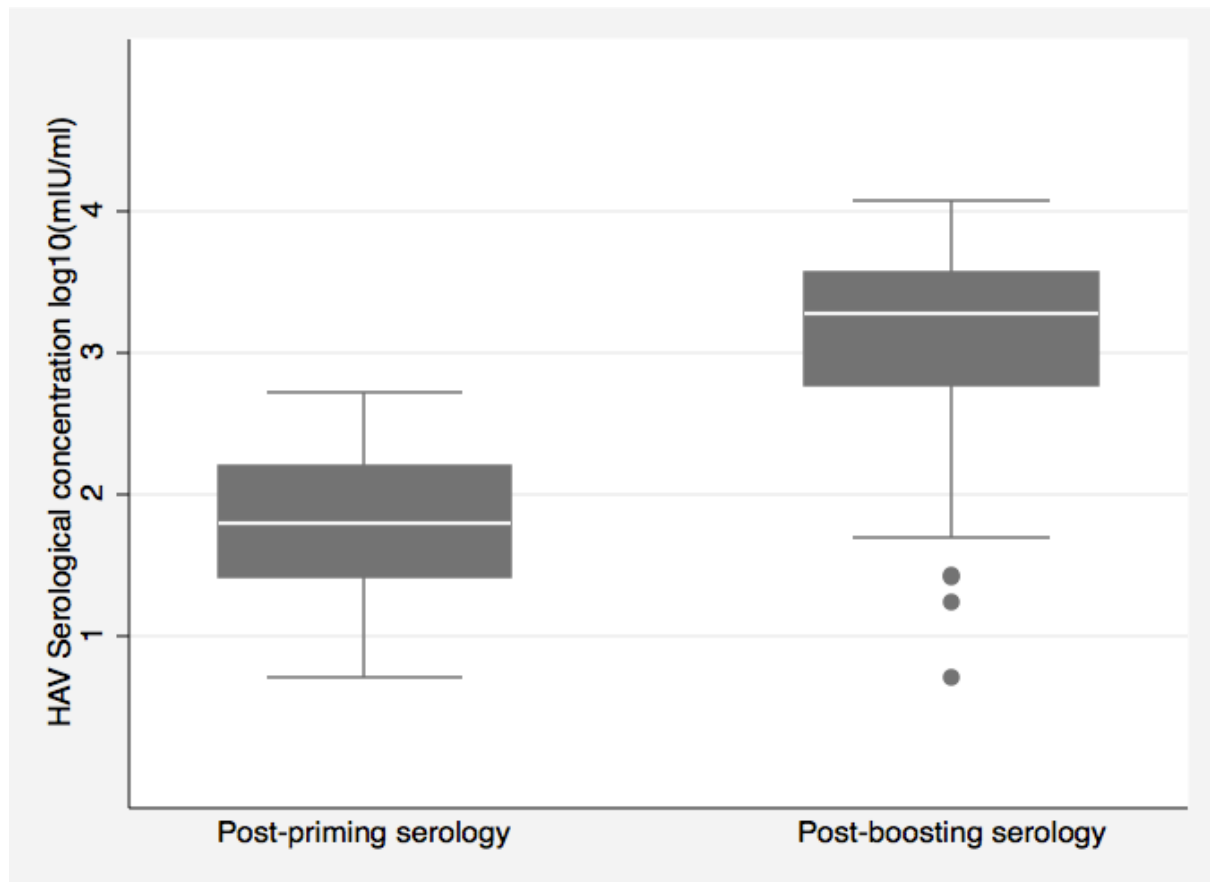


Figure legend : HAV, hepatitis A virus

Figure 3 : Percent of patients with HAV antibody concentrations according to CD4⁺ T cells count

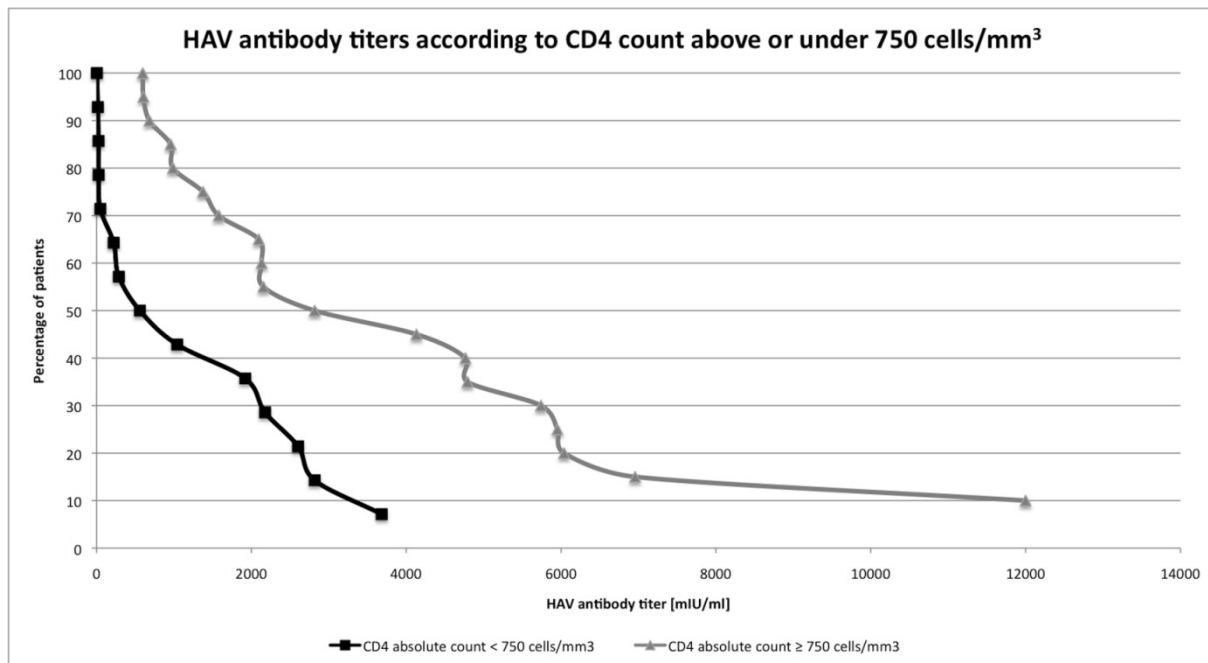


Figure legend : HAV, hepatitis A virus

Figure 4 : Post-priming and -boosting antibody concentrations

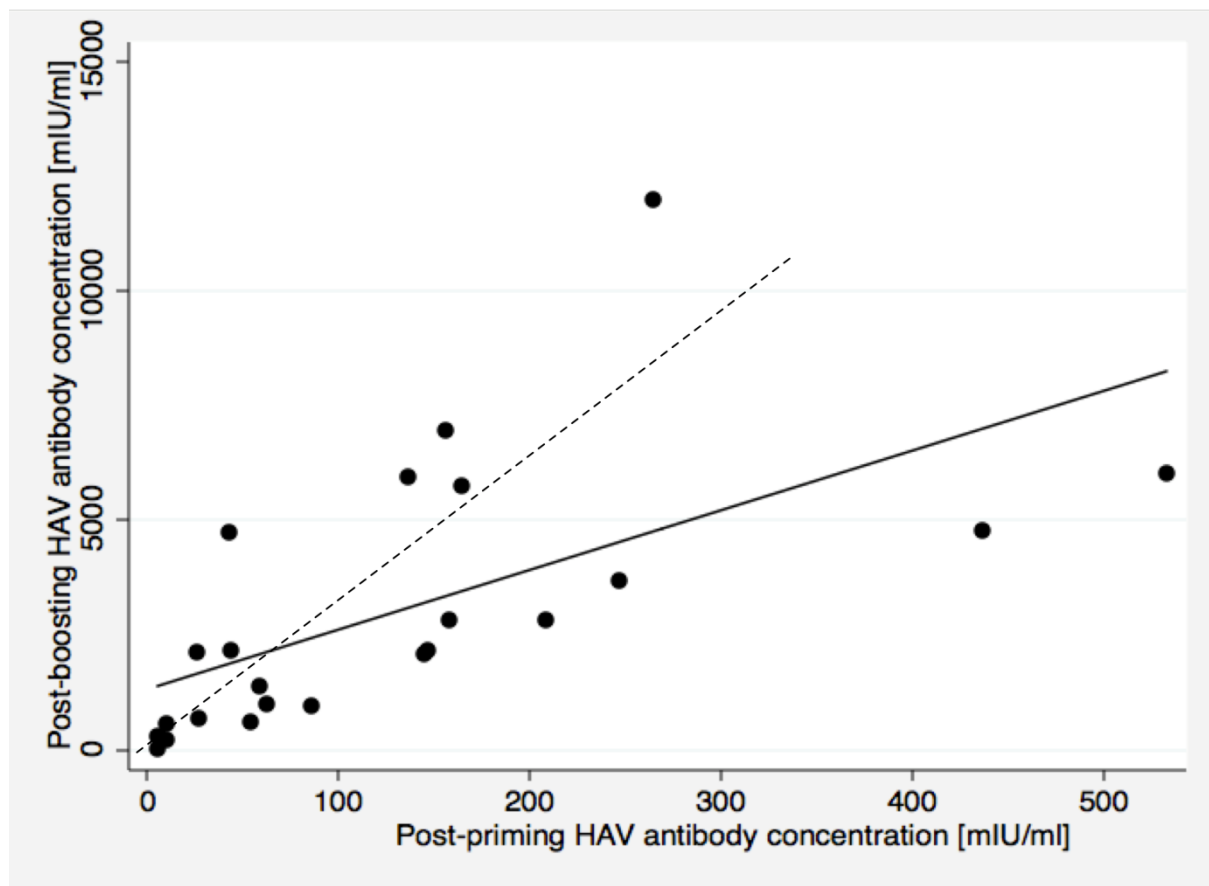


Figure legend : continuous line: linear correlation fit line; dashed line: separation between patients (8/23) with a ≥ 1.5 log increase in antibody concentration between priming and boosting.