



Institut Pasteur
de Saint-Pétersbourg

RAPPORT

D'ACTIVITES

20¹⁷
18

RAPPORT D'ACTIVITES
2017-2018

Institut Pasteur de Saint-Pétersbourg

Rue Mira, 14, Saint-Pétersbourg, 197101, Russie

Téléphone: +7 (812) 233-20-92

Téléfax: +7 (812) 232-92-17

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Internet: <http://pasteurorg.ru>

Directeur de l'Institut – Areg TOTOLIAN

Directeur adjoint pour la science – Vladimir DEDKOV

Directeur adjoint pour les travaux innovants – Alexander SEMENOV

Coordinateur scientifique – Galina TRIFONOVA

Coordinateur des affaires étrangères – Kseniia SMIRNOVA

Actuellement, il est un des plus grands instituts d'épidémiologie et de microbiologie en Russie, notamment dans la région Nord-Ouest de la Russie.

L'Institut dispose d'une base matérielle moderne et d'un personnel scientifique de qualité pour les recherches qui sont unies dans les cinq départements:

- Département de microbiologie;
- Département de virologie;
- Département d'épidémiologie;
- Département d'immunologie;
- Département de nouvelles technologies.

A l'Institut fonctionnent:

- Centre scientifique et méthodologique de surveillance des agents pathogènes des maladies infectieuses et parasitaires de II-IV groupes de pathogénicité dans le district fédéral Nord-Ouest de la Russie;
- Centre de district Nord-Ouest pour la prévention et la lutte contre le SIDA;
- Centre régional pour la surveillance épidémiologique de la poliomyélite;
- Centre régional pour la surveillance épidémiologique de la rougeole et de la rubéole.

Deux centres de référence de la Fédération de Russie se sont implantés à l'Institut:

- Centre fédéral de la surveillance de la fièvre typhoïde;
- Centre fédéral de la surveillance des Yersinioses.

Collaboration avec l'OMS:

- Laboratoire subnational de l'OMS pour la poliomyélite (Global Polio Laboratory Network);
 - Laboratoire subnational de l'OMS pour la rougeole et de la rubéole (European Measles Laboratory Network).
-

Table des matières

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE	4
Laboratoire des infections intestinales	4
Laboratoire de bactériologie médicale	9
Laboratoire des zoonoses	12
DÉPARTEMENT DE VIROLOGIE	17
Laboratoire d'étiologie et de contrôle des infections virales	17
Laboratoire de virologie expérimentale	26
DÉPARTEMENT D'IMMUNOLOGIE	45
Laboratoire d'identification des pathogènes	45
Laboratoire d'immunologie moléculaire (du Pôle d'usage collectif)	48
DÉPARTEMENT D'ÉPIDÉMIOLOGIE	53
Laboratoire d'épidémiologie des maladies infectieuses et non infectieuses	53
Laboratoire des hépatites virales	58
Laboratoire d'épidémiologie moléculaire et de génétique évolutive	61
CENTRE RÉGIONAL DU DISTRICT FÉDÉRAL NORD-OUEST POUR LA PRÉVENTION ET LA LUTTE CONTRE LE SIDA	71
Laboratoire d'immunologie et virologie de l'infection par le VIH	71
DÉPARTEMENT DES NOUVELLES TECHNOLOGIES	77
LE CENTRE DE TEST DE LABORATOIRE	80

LABORATOIRE DES INFECTIONS INTESTINALES

Chef du laboratoire: Lidia Kaftyreva

Chercheurs permanents: Z. Matveeva, E. Voitenkova, A. Zabrovskaya, M. Makarova, S. Egorova, L. Suzhaeva

Caractéristique génétique des souches *Escherichia coli* des groupes sérologiques O26, O55 et O111

Les infections intestinales aiguës avec manifestations de la colite hémorragique (CH) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU), appelées *Escherichia coli* productrice de shigatoxines (ang. STEC), sont propagées dans plusieurs pays du monde et enregistrées sous forme de cas séparés ou éclosions sporadiques. Parmi les souches *E. coli* un rôle particulier revient aux souches pathogènes productrices de vérotoxines (toxines similaires à shigella). *E. coli* O157 H7 est le sérotype le plus souvent associé aux éclosions et aux issues cliniques graves des maladies, considéré aujourd'hui sérotype à toxines similaires à shigella le plus répandu dans le monde. Néanmoins, les sérogroupes, qui ne font pas partie de O157, notamment O26, O55, O103, O111 et O145, sont également connus pour leur potentiel pathogène et composent le «top cinq» des sérogroupes pathogènes pour l'homme tout en n'étant pas O157 similaire à shigella.

Matériels et méthodes. Ont été étudiées 76 souches *E. coli* isolées chez les enfants, dont 53 souches de O26, 17 souches de O111 et 7 souches de O55. L'appartenance sérotypique (O- et H-antigènes), les gènes des facteurs de virulence (produits des STX (*stx1/stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2/stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*), de α -hémolysine (*hlyA*), d'entérohémolysine (*ehxA*), du facteur d'adhésion de la protéine intimine (*eae*) et des gènes codant pour les pili (*bfp*), de même que de régulation de transcription des *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC) — *aggR*, ont été déterminés au moyen de la méthode PCR.

Les résultats de l'étude des souches sont présentés au Tabl. 1. Le sérotypage a permis de classer les souches étudiées en six variantes sérologiques: O26:H11 (53 souches), O55:H6 (5 souches), O55:H7 (1 souche), O55:H21 (1 souche), O111:H2 (12 souches) et O111:H8 (5 souches).

Selon nos données le groupe STEC a été composé de: 19 souches *E. coli* O26:H11, 5 souches *E. coli* O111:H8 et 1 souche *E. coli* O55:H7. Elles se caractérisaient toutes par la présence des gènes *stx1/stx1a*, *eae*, *ehxA*. 34 souches *E. coli* O26:H11, 5 souches *E. coli* O55:H6 et 12 souches *E. coli* O111:H2

possédaient les gènes de virulence *eae*, *bfp* et *hlyA*, faisant partie, selon cette caractéristique, du groupe des *E. coli* entéro-pathogènes (ang. EPEC). Une souche *E. coli* O55:H21 ne possédait pas les gènes de virulence STEC et EPEC, ayant en même temps les gènes typiques pour le groupe EAEC.

Conclusions. La population des souches *E. coli* des groupes sérologiques O26, O111 et O55, isolées chez les enfants, est hétérogène selon l'appartenance sérotypique et la présence des gènes codant les facteurs de pathogénicité EPEC, STEC et EAEC. Les données obtenues témoignent de la nécessité d'une étude approfondie de la diversité intraspécifique de *E. coli*, de la définition des facteurs de pathogénicité ou de leurs déterminants génétiques parallèlement au sérotypage pour une identification définitive de *E. coli* en tant qu'agents des infections intestinales aiguës.

Caractéristique phylogénétique de la population de l'agent de la fièvre entérique isolé en Fédération de Russie en 2005–2018

S. Typhi est un agent relativement jeune qui se caractérise par une bonne conservation du génome et la faculté de clonage de la population. Pour évaluer la proximité phylogénétique des agents, qui se caractérisent par une forte clonabilité, on utilise la méthode de génotypage basée sur la détection de l'éventail complet des variations orthologiques mononucléotidiques (de l'angl. single nucleotide variations, SNV) localisées dans les zones aussi bien codants que non codants du génome dans l'éventail des génomes comparés. Le principe de SNV-typage des souches de *S. Typhi* est utilisé afin d'étudier la variété génétique, évaluer la structure de la population de l'agent et définir le degré de parenté entre les souches unitaires ou entre les groupes de souches.

Le séquençage complet du génome des souches *S. Typhi* a été effectué sur l'appareil MiSeq (Illumina, Etats-Unis) avec l'ensemble de réactifs MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, Etats-Unis). L'ADN génomique a été isolé avec utilisation de l'ensemble DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Les bibliothèques génomiques ADN ont été préparées en utilisant

Tableau 1. Caractéristique moléculaire génétique de *E. coli* O26, O55, O111, isolées chez les enfants atteints du syndrome diarrhéique à Saint-Petersbourg

Sérotype <i>E. coli</i>	Nombre de souches	Gènes de virulence						
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>aggR</i>	<i>hlyA</i>	<i>ehxA</i>
O26:H11	19	<i>stx1a</i>	–	+	–	–	–	+
O26:H11	34	–	–	+	+	–	+	–
O55:H6	5	–	–	+	+	–	+	–
O55:H7	1	<i>stx1a</i>	–	+	–	–	–	–
O55:H21	1	–	–	–	–	+	–	–
O111:H2	12	–	–	+	+	–	+	–
O111:H8	5	<i>stx1a</i>	–	+	–	–	–	+

l'ensemble de réactifs MiSeq Nextera XT (Illumina, Etats-Unis). L'assemblage et l'analyse génomique ont été effectués avec CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, Etats-Unis).

Pour reconstruire l'arbre phylogénétique au cours de l'étude on a analysé une sélection de 1683 souches *S. Typhi* composée de 92 souches d'origine russe, de même que les souches provenant des séquençages précédents. Ainsi la sélection se caractérisait par une vaste période d'isolement (de 1905 à 2013) et par son étendue géographique (63 pays sur 6 continents: Asie, Afrique, Amérique du Nord et du Sud, Europe, Australie et Océanie). La recherche des SNV orthologiques a été effectuée avec utilisation de l'algorithme d'analyse de données élaboré antérieurement (Kuleshov K.V. et al., Infect. Genet. Evol., 2016). A titre de génome de référence a été utilisée la séquence nucléotide de la souche *S. Typhi* CT18 (AL513382). La matrice obtenue des SNV orthologiques a été utilisée pour la reconstruction phylogénétique au programme RAXML. A titre de modèle des substitutions nucléotidiques a été utilisé celui de GTR+I. L'analyse utilisant la méthode de bootstrap a été effectuée avec le nombre de redoublements 1000. La visualisation de l'arbre phylogénétique a été réalisée à l'aide du programme Figtree v1.3.1. D'une manière complémentaire les isolats russes ont été analysés avec utilisation du programme Genotyphi (<https://github.com/katholt/genotyphi>) conformément aux consignes du concepteur.

Sur l'arbre phylogénétique les souches russes *S. Typhi* constituaient les groupes phylogénétiques particuliers, la plupart des souches appartenant aux représentants de la branche dominante H58 (Fig. 1).

La ligne phylogénétique de la branche H58 s'est avérée hétérogène: les souches étudiées se sont réunies en trois groupes phylogénétiques (G1, G2 et G3) cinq autres souches se caractérisant par les génotypes individuels (S1-S5). 60,0% de souches de la branche H58 faisaient partie du groupe phylogénétique G3 se caractérisant par un même

phénotype et un mécanisme d'antibiorésistance: faible résistance aux fluoroquinolones due à la substitution mononucléotidique *gyrA* Asp87Asn.

Le groupe phylogénétique G1 (11,2%) a été composé des souches à forte résistance aux fluoroquinolones due à trois substitutions mononucléotidiques dans les gènes: *gyrA* (Ser83Phe, Asp87Asn) et *parC* (Ser80Ile). Les souches du groupe phylogénétique G2 (7,8%) se caractérisaient par un même mécanisme de résistance aux fluoroquinolones (faible résistance due à la mutation de *gyrA* Asp87Asn), mais deux souches possédaient une résistance complémentaire multiple due au plasmide IncHI1B. Cinq souches *S. Typhi* de la branche H58 avec les génotypes individuels (S1-S5) se caractérisaient par la sensibilité aux antibiotiques ou par une substitution mononucléotidique *gyrA* Ser83Tyr (faible résistance aux fluoroquinolones) qui ne se rencontrait pas dans les souches d'autres groupes.

Les groupes phylogénétiques de la branche H58 ont été composés des souches isolées sur divers territoires aux années différentes. Les souches isolées dans le cadre d'une éclosion ont été réunies en un seul groupe phylogénétique. L'analyse épidémiologique a démontré que les souches isolées dans une éclosion/foyer (Saint-Petersbourg 2006, Kaliningrad 2012, oblast de Moscou 2013, oblast d'Irkoutsk 2016) se caractérisaient par les profils identiques de leur antibiorésistance dus à des mutations identiques.

Dans le groupe des souches, ne faisant pas partie de la lignée phylogénétique de la branche H58 (15,6%), presque toutes les souches avaient en commun la sensibilité à tous les antibiotiques sauf une qui se caractérisait par une substitution mononucléotidique dans le gène *gyrA* Ser83Phe, qui n'a été détectée dans les souches d'autres groupes qu'en combinaison avec d'autres substitutions. Certaines souches formaient les groupes phylogénétiques (que nous avons désignés G4-G6), d'autres avaient des génotypes individuels (S6 et S7).

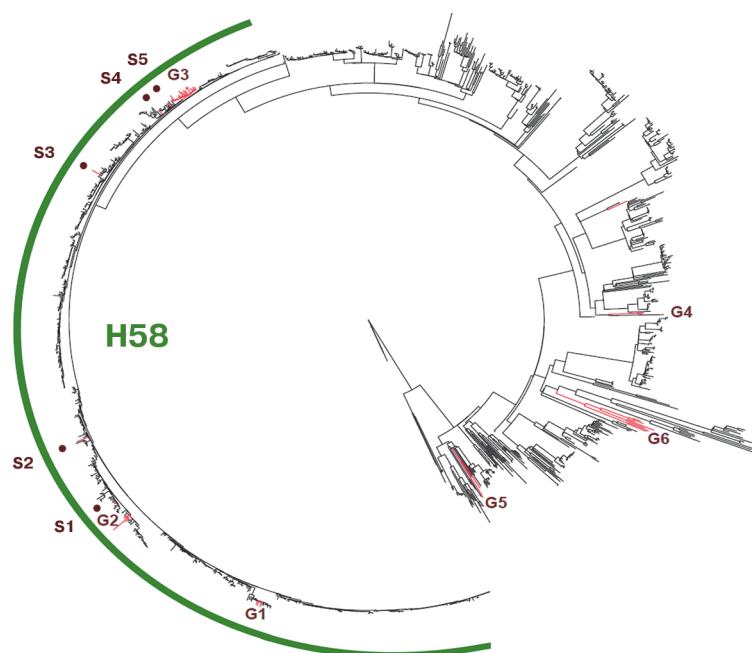


Figure 1. Arbre phylogénétique global construit sur la base des SNV orthologiques détectés parmi 1683 génomes *S. Typhi*. La reconstruction de l'arbre a été effectuée utilisant la méthode de probabilité maximum, réalisée au programme RaxML. Par la couleur verte est marquée la ligne phylogénétique du haplotype H58. Les branches de l'arbre portant les souches russes *S. Typhi* sont marquées par la couleur rouge. Au cas, où plusieurs isolats russes formaient un même cluster, ils étaient désignés comme phylogroupe «G», s'ils se présentaient individuellement, on les désignait comme phylogroupe «S»

L'analyse des génomes séquencés avec utilisation du programme Genotypi a démontré que la population russe de l'agent de la fièvre entérique est représentée par les souches faisant partie de tous les quatre clusters primaires dont le cluster 4 est le plus présent (83%) (Tabl. 2). À l'intérieur de ce cluster la plupart des souches (82,6%) faisaient partie de la sous-branche 4.3.1. Selon Wong et al. (2016) les représentants de cette sous-branche proviennent des pays du Sud-Est et du Sud Asiatique. Il convient de remarquer que toutes ces souches appartenaient à la lignée phylogé-

nétique de la branche H58 dominante dans la phylogénie globale. Par ailleurs à l'intérieur de la sous-branche 4.3.1. les souches russes se groupaient d'une manière complémentaire en deux lignées génétiques. La lignée 4.3.1.1 (68,5%) était représentée principalement par les souches à faible résistance aux fluorquinolones, due à la mutation dans le gène *gyrA* (Asp87Asn) et la lignée 4.3.1.2 (14,1%) — par les souches à faible résistance due à la substitution mononucléotidique atypique dans le gène *gyrA* (Ser83Tyr) et les souches à forte résistance conditionnée par trois substitu-

Tableau 2. Characteristics of *S. Typhi* strains isolated in Russia in 2005–2018 by the resistance mechanisms and phylogenetic analysis (n = 92)

Phylogroups		Resistance genotypes	Number of strains	Place and year of isolation	Geographic origin of isolates in reference set (microreact.org/project/styphi)
Wong et al., 2016	Global phylogeny				
1.2.1	nonH58_G6	WT	8	St. Petersburg 2009 and 2011; Leningrad region 2009; Moscow 2011; Tomsk 2015; Kyrgyzstan 2010; Kazakhstan 2012	Southeast Asia (100%) — Vietnam
2.0.2	nonH58	<i>gyrA</i> (Ser83Phe)	1	St. Petersburg 2017	North America (50%) — Mexico North Africa (50%) — Algeria, Tunisia
2.3.2	nonH58_G5	WT	2	Kemerovo 2012	West Africa (33%) — Nigeria, Mali South America (27%) — Argentina Southeast Asia (20%) — Vietnam, Thailand North America (13%) — Mexico West Asia (7%) — Turkey
	nonH58_S7	WT	1	Ulyanovsk 2010	
3.0.1	nonH58_G4	WT	2	St. Petersburg 2010 and 2011	North Africa (50%) — Morocco South Asia (50%) — Pakistan
3.0.2	nonH58_S6	<i>gyrA</i> (Ser83Phe)	1	St. Petersburg 2012	South Asia (100%) — India
4.1.1	nonH58	WT	1	Voronezh 2015	Southern Africa (78%) — Malawi South Africa (11%) West Africa (6%) — Mauritania Central Africa (6%) — Cameroon
4.3.1.1.	H58_G3	<i>gyrA</i> (Asp87Asn)	54	St. Petersburg 2006 (outbreak), 2007, 2010–2012, 2014 and 2017; Moscow 2011 and 2013 (outbreak); Kaliningrad 2011 and 2012; Khabarovsk 2012; Voronezh 2014; Irkutsk 2015	Southeast Asia (50%) — Vietnam, Laos, Cambodia South Asia (26%) — India, Bangladesh, Pakistan, Nepal, Sri Lanka, Afghanistan East Africa (10%) — Tanzania, Kenya Southern Africa (9%) — Malawi
	H58_G2	<i>gyrA</i> (Asp87Asn) <i>gyrA</i> (Asp87Asn) + p IncHI1B(R27)	5 2	St. Petersburg 2008; Khanty-Mansiysk 2009; Jewish Autonomous region 2011; Irkutsk 2017 St. Petersburg 2013 and 2015;	
	H58_S2	WT	1	Irkutsk 2012	
	H58_S4	WT	1	St. Petersburg 2011	
4.3.1.2	H58_G1	<i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile) <i>gyrA</i> (Ser83Phe+Asp87Asn) + <i>parC</i> (Ser80Ile) + p IncI	9 1	Kaliningrad 2011 and 2012; Smolensk 2011; Kirov 2015; Khanty-Mansiysk 2016; Voronezh 2017; Krasnoyarsk 2017; St. Petersburg 2018 Arkhangelsk 2015	
	H58_S1	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr) + p IncHI1B(R27)	1	St. Petersburg 2006	
	H58_S3	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr)	1	Arkhangelsk 2011	
	H58_S5	<i>gyrA</i> (Ser83Tyr)	1	St. Petersburg 2011	

WT — wild type, susceptible to fluoroquinolones and other antibiotics.

tions mononucléotidiques dans les gènes: *gyrA* (Ser83Phe, Asp87Asn) et *parC* (Ser80Ile). Au reste, dans le cluster 4 une souche *S. Typhi*, sensible aux antibiotiques, isolée en 2015 dans l'oblast de Voronezh, faisait partie de la sous-branche 4.1.1 et probablement était d'origine africaine.

La sous-branche 1.2.1 du cluster 1 comprenait 8 souches *S. Typhi* sensibles aux antibiotiques appartenant à un seul groupe phylogénétique G6. Il convient de remarquer que cette sous-branche comprenait aussi les souches sensibles *S. Typhi* de notre collection, isolées en Kirghizstan et Kazakhstan en 2010 et 2012. Selon les données de Wong et al. (2016), toutes les souches étudiées de la sous-branche 1.2.1 proviennent des pays du Sud-Est Asiatique.

Les clusters 2 et 3 et leurs sous-branches correspondantes ont été représentés dans notre étude par les souches unitaires *S. Typhi* sensibles aux antibiotiques ou à faible résistance aux fluorquinolones due à la mutation du gène *gyrA* (Ser83Phe), qui n'a pas été détectée comme seule substitution nucléotidique dans les souches d'autres clusters.

L'évaluation de la proximité phylogénétique des souches *S. Typhi*, importées en 2005–2018 sur les territoires administratifs de la Fédération de Russie, a démontré que plus de 80,0% de souches russes étaient dérivées du clone international asiatique bien réussi se rapportant au groupe génétique — «sous-branche 4.3.1» (selon le schéma Wong) ou aux représentants de la branche H58 provenant avec une

forte probabilité des pays du Sud-Est et du Sud Asiatique. Ce faisant en Fédération de Russie ce groupe génétique dominant a été représenté à plus de 60,0% par les souches identiques pour leur phénotype et le mécanisme de résistance aux germicides: faible résistance aux fluorquinolones due à la substitution mononucléotidique dans le gène *gyrA* Asp87Asn. Les souches à forte résistance aux fluorquinolones, due à trois substitutions dans les gènes *gyrA* et *parC* de même que les souches manifestant une résistance multiple aux antibiotiques (MDRST), faisaient partie de la sous-branche 4.3.1. Dans les différentes périodes les souches de cette sous-branche provoquaient les fièvres entériques sur tous les territoires de la Fédération de Russie. Il est authentiquement établi que dans certains cas les malades se sont trouvés contaminés pendant leurs voyages en Inde (il s'agit des touristes russes et les personnes d'origine indienne étudiant dans les universités de la Fédération de Russie). D'autres sous-branches (non 4.3.1) étaient composées des souches unitaires *S. Typhi* qui se distinguent de la population principale de l'agent de la fièvre entérique par leur sensibilité aux antibiotiques ou par les mutations atypiques pour la Fédération de Russie.

Les résultats de l'étude ont servi de fondement à la constitution d'une base de données russe de recensement des propriétés biologiques y compris la sensibilité aux antibiotiques et la caractéristique génétique des souches de l'agent de la fièvre entérique enregistré en Fédération de Russie.

Publications

1. Makarova M., Souzhaeva L., Kaftyreva L. Enfants en bas âge atteints de la dysbiose intestinale comme porteurs des *Escherichia coli* entéroaggrégatives // *Revue de microbiologie*. 2017; 4: 3–9. (En Russ.)
2. Kaftyreva L., Egorova S. Tendances épidémiologiques et microbiologiques globales de la fièvre entérique // *Infection, immunité et pharmacologie*. 2017; 2: 89–95. (En Russ.)
3. Pavelkovich A., Ivanova M., Sepp E., Ratnik K., Rööp T., Naaber P., Egorova S., Kaftyreva L., Miciuleviciene J., Balode A.O., Saule M., Tsetreteli D., Chakhunashvili G., Lysenko O., O Lis D., Wesołowska M., Titov L., Shyshporonok J., Lehmann S., Naaber P. Evaluation of rapid carbapenemases detection methods on *Klebsiella pneumoniae* isolates from 9 European countries // 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, 2017. URL: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=EPO378&id=2173&L=0&x=21&y=12 (En Angl.).
4. Kaftyreva L., Egorova S., Makarova M., Tulenev S., Trifonova G., Kalina O. Particularités de résistance de l'agent de la fièvre entérique, enregistré sur le territoire de la Fédération de Russie en 2005–2016, aux produits antimicrobiens // *Médecine préventive et clinique*. 2017; 2 (63): 14–19. (En Russ.)
5. Popova A., Kaftyreva L., Suzhaeva L., Voitenkova E., Zbrovskaja A., Egorova S., Makarova M., Matveeva Z., Zueva E., Porin A., Boiro Y., Konstantinov O., Totolian A. Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 375–382. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382 (En Russ.)
6. Kaftyreva L.A., Egorova S.A. Propriétés biologiques des souches de l'agent de la fièvre entérique *Salmonella Typhi*, isolées en Fédération de Russie en 2005–2017 // *Bactériologie*. 2017; 2 (2): 7–13. (En Russ.)
7. Voitenkova E., Matveeva Z., Makarova M., Egorova S., Zbrovskaja A., Suzhaeva L., Zueva E., Kaftyreva L. Isolement et particularités d'identification de *Comamonas kerstersii* au cours de l'étude du microbiote intestinal des habitants de Saint-Petersbourg et de la République de Guinée // *Infections d'actualité en République de Guinée: épidémiologie, diagnostic et immunité; sous la rédaction de Popova A.Yu. Saint-Petersbourg: Institut Pasteur*, 2017. pp. 204–209. (En Russ.)
8. Egorova S., Makarova M., Kaftyreva L., Suzhaeva L., Zbrovskaja A., Matveeva Z., Voitenkova E. Sensibilité des souches des entérobactéries isolées au cours de l'étude du microbiote intestinal des habitants de la République de Guinée et de Saint-Petersbourg aux produits antimicrobiens // *Infections d'actualité en République de Guinée: épidémiologie, diagnostic et immunité; sous la rédaction de Popova A.Yu. Saint-Petersbourg: Institut Pasteur*, 2017: 210–214. (En Russ.)
9. Voitenkova E., Matveeva Z., Makarova M., Egorova S., Zbrovskaja A., Suzhaeva L., Zueva E., Kaftyreva L. Difficulties in identification of *Comamonas kerstersii* strains isolated from intestinal microbiota of residents of Republic of Guinea and Russian Federation // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 164–168. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-163-168 (En Angl.)
10. Egorova S., Makarova M., Kaftyreva L., Suzhaeva L., Zbrovskaja A., Matveeva Z., Voitenkova E. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from intestinal microbiota of residents of the Republic of Guinea and Russia (Saint-Petersburg) // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (3): 349–354. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-349-354 (En Russ.)
11. Egorova S., Satosova N., Lubimova A., Kitzbabashvili R., Borukhovitch L., Potapova E., Khmeleva O., Voitenkova E., Suzhaeva L., Zbrovskaja A., Kaftyreva L. Structure étiologique des salmonelloses et caractéristiques de la sensibilité des agents isolés à partir des patients, qui obtenaient une aide médicale ambulatoire, aux produits antimicrobiens // *MediAl*. 2018; 2 (22): 43–47 (En Russ.)
12. Kaftyreva L., Egorova S. Tendances épidémiologiques de la fièvre entérique enregistrée en Fédération de Russie en 2006–2018 // *Courrier de l'Académie de Médecine Militaire de Russie*. 2018, Annexe 1; 4 (64): 81–84. (En Russ.)

13. Suborova T., Egorova S., Orlova E., Svistunov S. Agents de la bactériémie résistants aux carbapénèmes chez les patients de l'hôpital pluridisciplinaire // *Courrier de l'hématologie*. 2018, XIV (4): 10–13. (En Russ.)
14. Zbrovskaja A.V., Khakhaev I.A., Kuzmin V.A., Kaftyreva L.A. Analyse visuo-spatiale de données sur l'isolation et la sensibilité des souches de salmonella aux produits antimicrobiens // *Problèmes de Régulation Normative et Juridique en Médecine Vétérinaire*. 2018; 1: 43–45. (En Russ.)
15. Zbrovskaja A.V. Prévention d'apparition et de propagation des souches des microorganismes résistantes aux produits antimicrobiens // *Hyppologie et médecine vétérinaire*. 2018; 2: 64–70. (En Russ.)
16. Makarova M.A., Dmitriev A.V., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A. Caractéristique moléculaire et génétique des souches *Escherichia coli* du sérotype O26, provoquant des affections diarrhéiques chez les enfants // *Revue de Médecine Académique*. 2018; 18 (3): 85–90. (En Russ.)
17. Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. Propriétés biologiques des souches *E. coli* du sérotype O144, enregistrées à Saint-Petersbourg comme agents des infections intestinales aiguës // *Bactériologie*. 2018; 3 (4): 12–15. (En Russ.)

LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE MEDICALE

Chef du laboratoire: Liudmila Kraeva

Chercheurs permanents: E. Voskresenskaya, N. Kurova, G. Kokorina, E. Bogumilchik, G. Khamdulaeva, E. Kunilova, T. Saines, A. Panin, E. Lebedeva

Contamination des travailleurs migrants de l'Asie Centrale et des habitants permanents de Saint-Petersbourg par les agents de la diphtérie et la réceptivité à l'infection

Actualité de l'étude. D'importants phénomènes migratoires, caractérisant les métropoles, y compris Saint-Petersbourg, exigent une étude exhaustive de la contamination des travailleurs migrants arrivant avec les visas de travail. A Saint-Petersbourg la majorité des migrants sont des travailleurs venant d'Ouzbékistan et de Tadjikistan. Selon les données officielles les cas de diphtérie ne sont pas enregistrés dans ces pays. Pourtant les études de l'OMS ont établi que plus de la moitié de la population de Tadjikistan n'a aucune protection contre la diphtérie. Les données sur l'Ouzbékistan sont inexistantes. C'est pourquoi l'infection pouvait être importée des républiques de l'Asie Centrale, surtout celles frontalières des pays endémiques pour la diphtérie. Pour cette raison il est indispensable d'avoir les informations sur la contamination des travailleurs migrants et des habitants de Saint-Petersbourg par l'agent de la diphtérie et sur la protection contre cette infection.

Matériels et méthodes de l'étude. Les matières biologiques pour l'examen de laboratoire ont été prélevées aux 370 migrants, le groupe témoin étant composé de 320 représentants de la population adulte de Saint-Petersbourg. On a étudié les frottis du mésopharynx et du nasopharynx pour détecter la présence de *Corynebacterium diphtheriae*, et le sang — pour détecter la présence des anticorps antitoxiques contre la diphtérie. Les souches *C. diphtheriae* ont été identifiées au moyen des tests biochimiques et les méthodes génétique et phénotypique. La protection contre la diphtérie a été étudiée en définissant le niveau des anticorps antitoxiques au sérum sanguin par l'analyse immuno-enzymatique. Toutes les données obtenues ont été traitées par les méthodes adéquates de la statistique mathématique.

Résultats de l'étude. Chez les travailleurs migrants les souches *C. diphtheriae* ont été révélées dans 1,6% de cas. Dans le groupe-témoin composé des habitants de Saint-Petersbourg aucune souche n'a été révélée. Selon les données du service épidémiologique en ce même temps dans la population autochtone de Saint-Petersbourg les souches de *C. diphtheriae* ont été révélées dans 0,2% de cas, c'est-à-dire 80 fois moins souvent. Chez les travailleurs migrants d'Ouzbékistan ont été obtenues 83 souches de *C. diphtheriae* et encote 17% chez les migrants de Tadjikistan. Chez les petersbourgeois le biovar gravis a été révélé dans 25% de cas et chez les migrants — dans 83% de cas ($p < 0,001$) dont la majorité étaient de l'oblast de Samarkand. Le Elek-test phénotypique n'a pas révélé des propriétés toxigènes pour aucune souche isolée. Dans la réaction polymérasée en chaîne 17% de souches se sont avérées positives (c'est-à-dire ayant un gène «silencieux» de toxigénicité).

Les résultats de l'étude d'immunité antitoxique anti-diphtérique spécifique ont démontré que les habitants autochtones de Saint-Petersbourg sont protégés contre la diphtérie à 95% tandis que les travailleurs migrants arrivant dans la ville ne le sont qu'à 66% ($p < 0,001$). Leur taux moyen des anticorps antitoxiques globaux est de 0,56 ui/ml. Celui des habitants autochtones de Saint-Petersbourg est de 0,82 ui/ml. L'indice moyen d'avidité des anticorps antitoxiques antidiphtériques chez les travailleurs migrants est de 38% et celui des habitants autochtones de Saint-Petersbourg est de 56% ($p < 0,01$) tandis que l'indice protecteur de l'avidité est de 30%. La particularité des travailleurs migrants de tous les pays est que la moitié des personnes examinées (50%) possède le degré de protection des anticorps suffisant et l'autre moitié (50%) a le degré de protection de la diphtérie minime (7%) ou certain (43%). L'étude des degrés des anticorps n'a révélé aucune particularité due à l'âge.

Conclusion. La forte circulation des souches de *C. diphtheriae* parmi les travailleurs migrants, la prolifération de la variante biochimique gravis, l'existence des souches avec le gène «silencieux», la protection insuffisante des travailleurs migrants de la diphtérie, leur forte concentration dans les lieux de séjour temporaire, difficultés socio-économiques auxquelles ils se confrontent pendant le séjour, accessibilité insuffisante des services médicaux — autant de facteurs qui témoignent de la situation insatisfaisante autour de l'infection diphtérique dans le milieu des travailleurs migrants et qui exigent la mise en oeuvre de certaines manifestations visant à la prévention de l'instabilité épidémiologique à Saint-Petersbourg.

Suivi sérologique au cas de l'infection coquelucheuse

1. En Russie, comme dans plusieurs autres pays, la vaccination des nourissons contre la coqueluche dans les années 50 du XX-ème siècle a abouti à une forte baisse d'incidence de cette infection. Le calendrier de vaccination national en vigueur comprend une vaccination primaire des enfants de la première année de vie, composée de trois doses, et une revaccination un an après la fin de la série primaire. Pour la vaccination et la revaccination on utilise principalement les vaccins à cellules entières, plus rarement — les vaccins acellulaires. Les indices de morbidité restent élevés dans les grandes villes où tombent malades principalement les enfants de l'âge scolaire. L'objectif de l'étude était l'appréciation de la durée de protection contre la coqueluche des enfants, ayant obtenu le cours complet de vaccination, par la détection des indices sérologiques de l'infection coquelucheuse subie récemment.

Matériels et méthodes. Les échantillons du sérum sanguin obtenus de 395 enfants de Saint-Petersbourg de 3 à 13 ans compris, ayant reçu le cours complet de vaccination (4 doses), ont été étudiés au sujet de la présence des anticorps contre la toxine coquelucheuse (IgG, AgA). Le niveau IgG 40 ui/ml et plus a été estimé comme présentant

une infection coquelucheuse subie au cours de 12 derniers mois, y compris le niveau IgG 100 ui/ml et plus avec n'importe quelle valeur IgA, ou le niveau IgG de 40 à 100 ui/ml avec le niveau IgA 12 ui/ml et plus, — comme indice de la coqueluche subie au cours de 6 derniers mois.

Résultats. Les indices sérologiques de l'infection subie au cours de 12 derniers mois ont été révélés chez 10,6% d'enfants avec augmentation de la part des enfants séropositifs à partir de sept ans ($r^2 = 0,812$). Parmi eux les indices sérologiques de la coqueluche subie au cours de 6 derniers mois ont été révélés chez 4,3% d'enfants avec augmentation de leur part à partir de dix ans ($r^2 = 0,786$).

Conclusions. Les résultats obtenus témoignent de ce que l'immunité coquelucheuse post-vaccinale faiblit vers l'âge de scolarité, et les enfants deviennent réceptifs à l'infection, ce qui confirme la nécessité de la revaccination avant le commencement de la scolarité à l'âge de 6–7 ans.

2. La coqueluche est traditionnellement considérée comme une infection infantile. Ainsi de 2006 à 2015 à Saint-Petersbourg on enregistrait de 15 à 33 cas de coqueluche par an chez les adultes (indices de 0,39 à 0,84 par 100 000 habitants) et de 349 à 1394 cas chez les enfants de moins de 14 ans (indices de 64,96 à 241,9 par 100 000 habitants). Mais comme l'ont démontré les études effectuées dans plusieurs pays de l'Europe, au Japon et aux Etats-Unis, le niveau d'incidence des adultes de fait est supérieur de dizaines et même de centaines de fois celui annoncé par les statistiques officielles. Les personnes adultes (parents, autres membres de la famille, personnel médical), de même que les frères et soeurs aînés deviennent source de la coqueluche pour les enfants de la première année de vie. L'objectif de cette recherche est la définition du véritable niveau d'incidence de la coqueluche de la population adulte de Saint-Petersbourg utilisant comme marqueur de l'affection/«immunisation latente» le taux élevé d'anticorps anti-toxine coquelucheuse.

Matériels et méthodes. Ont été examinées 538 personnes adultes à l'âge de 18 à 82 ans (âge moyen 41,2 ans), dont 333 femmes et 206 hommes, qui ont sollicité des consultations au centre médical à propos de leurs affections extra-pulmonaires. Méthode de l'examen: IFA pour déterminer le taux d'anticorps anti-toxine coquelucheuse (IgG, IgA).

Résultats. Les anticorps anti-toxine coquelucheuse de la classe G ont été détectés chez 87 personnes (16,2% du nombre total des examinés), y compris chez 27 personnes (5,1%) qui manifestaient les marqueurs sérologiques de la coqueluche subie récemment. La part des personnes séropositives a été au maximum dans les catégories d'âge de 18–29 et de 30–39 ans (respectivement 21,4% et 19,9%) avec une diminution ultérieure jusqu'à 5,7% pour la catégorie de 50–59 ans. Parmi les examinés âgés de 60 et plus la part des personnes séropositives a cru encore jusqu'à 13,9%. La plus grande part des personnes examinées, manifestant les marqueurs de l'infection subie récemment, a été aussi détectée dans la catégorie d'âge de 18–29 ans (6,4%).

Conclusion. Les données obtenues témoignent d'une importante implication des personnes adultes au processus épidémique coquelucheux à Saint-Petersbourg. Les adultes de moins de 40 ans composent le groupe de risque. Le facteur inquiétant est l'augmentation de la part des personnes séropositives dans la catégorie de 60 ans et plus à cause du risque croissant d'une évolution plus sévère et compliquée de la maladie dans ce groupe.

Perfectionnement du suivi microbiologique de *Yersinia pseudotuberculosis* basé sur l'utilisation des nouvelles méthodes de génotypage

Les systèmes CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins) servent de mécanisme de défense adaptative des procaryotes du matériel génétique étranger. Les séquences espaceurs uniques des locus CRISPR détiennent les fragments d'ADN obtenus principalement des bactériophages et plasmides reflétant l'histoire évolutionniste de la cellule bactérienne. Ainsi les espaceurs des locus CRISPR servent de marqueur moléculaire informatif dans les études phylogénétiques et le typage intraspécifique pour les besoins du suivi microbiologique des souches circulantes. Grâce au polymorphisme intraspécifique accentué des séquences espaceurs le haut pouvoir de résolution du typage CRISPR est indiqué dans l'étude de *Y. pestis*.

Cette étude se donnait pour objectif l'élaboration d'un algorithme bio-informationnel de recherche et d'analyse des systèmes CRISPR/Cas *Y. pseudotuberculosis* avec utilisation de la base de données GenBank.

Matériels et méthodes. Pour la recherche des systèmes CRISPR/Cas ont été utilisées les séquences génomiques entières des souches *Y. pseudotuberculosis*, représentées dans la base de données NCBI. Ont été utilisés l'éditeur d'alignement de séquences biologiques BioEdit et les applications en ligne CRISPROne et CRISPRDetect. Pour le screening des phages et des plasmides dans les sites espaceurs on s'est servi de l'application en ligne CRISPR Target et de l'algorithme de recherche BLASTn. Les amorces pour détection des locus CRISPR ont été choisies avec utilisation de l'application en ligne Primer-BLAST.

Résultats. Le système CRISPR/Cas *Y. pseudotuberculosis* inclut de un à trois locus YP1, YP2 et YP3 et un ensemble de cas-gènes (système CRISPR/Cas de première classe, type I), composé du gène *cas1* universel pour les systèmes de tous les types et des gènes spécifiques pour les types *cas3f*, *cas8f*, *cas5f*, *cas7f* et *cas6f*. La séquence de leadership, à partir de laquelle commence la transcription du locus CRISPR, peut être située soit devant, soit après lui. Les locus CRISPR sont situés dans le génome à une certaine distance l'un de l'autre. La séquence unique des répétitions est composée de 28 nucléotides. Le nombre de répétitions et des espaces dans les locus est différent. Le locus YP1 est assez conservateur. Le locus CRISPR YP3 est le plus variable. On peut supposer que le système CRISPR/Cas *Y. pseudotuberculosis*, composé de deux-trois locus réciproquement éloignés, fonctionne en plus grande mesure à l'égard de ce locus, ajoutant d'autres séquences espaceurs à la suite d'une interaction avec les éléments génétiques étrangers transposables.

Les informations obtenues suite à l'application des méthodes bio-informationnelles programmables a permis d'élaborer un panel des amorces afin de révéler les locus CRISPR, spécifiques pour l'espèce *Y. pseudotuberculosis*, par la méthode PCR. Actuellement les amorces aux locus YP1 et YP3 sont utilisées pour l'étude de 34 souches de *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes O:1 et O:3 isolées dans plusieurs régions de Russie à partir de différentes sources. Il est démontré que 30 souches ont deux locus CRISPR — YP1 et YP3, 3 souches ont un seul locus YP1 et 1 souche a le locus YP3. On a effectué le séquençage des locus CRISPR YP1 et YP3

(taille jusqu'à 1000 paires de nucléotides) de cinq souches. A été révélée la variabilité des longueurs des locus et des séquences espaceurs. Les locus YP3 des trois souches se caractérisent par les séquences espaceurs identiques qu'on peut expliquer par la zone géographique commune d'isolement de ces souches. Deux autres souches ont des locus YP1 et YP3 individualisés. Les séquences des locus sont déposées dans la banque de données GenBank sous les numéros KX592595, KX592596, KX592597, KX592598, KX592599.

La recherche bio-informationnelle des phages et plasmides au moyen des séquences espaceurs a fourni les ré-

sultats indéniables à l'égard des prophages *Y. similis* str. 228, *Y. pseudotuberculosis* str. ATCC 6904; bactériophages *Salmonella*, *Shigella*; plasmides *E. coli* O157:H7 (pSS17, pEC4115), *Salmonella enterica* (pCFSAN), *Proteus vulgaris* (Rts1). Les recherches et l'analyse ultérieure des systèmes CRISPR/Cas de *Y. pseudotuberculosis* seront continuées.

Conclusions. A été élaboré l'algorithme bio-informationnel de recherche des systèmes CRISPR/Cas des souches de *Y. pseudotuberculosis*, représentées dans la base de données GenBank. A été démontrée la possibilité de CRISPR-typage pour le suivi des souches circulantes.

Publications

1. Kraeva L.A., Alekseeva E.A., Bessalova G.I. Comprehensive laboratory studies of diphtheria at the present time // *Bacteriology*. 2017; 2 (1): 20–24. (En Russ.)
2. Kraeva L.A., Kunilova E.S., Saynes E.V., Petrova I.S., Burgasova O.A., Bessalova G.I. Several tricks for reliable determining the etiological role «non-pathogenic» types of bacteria in the development of infectious processes respiratory tract // *Bacteriology*. 2017; 2 (3): 72–73. (En Russ.)
3. Afinogenova A.G., Kraeva L.A., Afinogenov G.E., Veretennikov V.V. Probiotic-based sanitation as alternatives to chemical disinfectants // *Russian Journal of Infection and immunity*. 2017; 7 (4): 419–424. (En Russ.)
4. Sitkov N.O., Solov'ev A.V., Zimina T.M., Kraeva L.A. Miniature sensor element based on electrical impedance integrated in the laboratory on a chip for evaluating antibiotic resistance of microorganisms // *Biotechnosphere*. 2017; 3 (51): 34–47. (En Russ.)
5. Ermolenko E.I., Bui T.L.A., Karaseva A.B., Kraeva L.A., Lavrenova N.S., Tran T.N., Bogumilchik E.A., Kotyleva M.P., Thanh N., Suvorov A.N. Characteristic of Enterococci isolated from intestines of the people with irritable bowel syndrome in Vietnam and Russia // *Gastroenterology of St. Petersburg*. 2017; 1: 119–119b. (En Russ.)
6. Afinogenova A.G., Kraeva L.A., Kunilova E.S., Afinogenov G.E., Maday D.Yu. The possibility of using probiotic-based cleaning products for surface treatment in medical institutions // *Disinfection case*. 2017; 4 (102): 52–52a. (En Russ.)
7. Sboychakov V.B., Moskalev A.V., Andreev V.A., Badikov V.D., Blokhina S.A., Bolekhan V.N., Boronina L.G., Volobuev S.V., Zhogolev K.D., Zachinyaeva A.V., Karapats M.M., Kaftyreva L.A., Kletsko L.I., Kozlova N.S., Kolotova L.A., Kraeva L.A., Malyshev V.V., Mikhaylov N.V., Panin A.L., Razumova D.V. Military medical Academy. S.M. Kirov. St. Petersburg, 2017: 415. (En Russ.)
8. Gur'ev A.S., Vasilenko I.A., Rusanova E.V., Rastopov S.F., Volkov A.Y., Kuznetsova O.Y., Kraeva L.A., Verbov V.N. Development of microbiological analyzer based on coherent fluctuation nephelometry // *Advances in Intelligent Systems and Computing*. 2018; 658: 198–206. (En Russ.)
9. Karapats M.M., Kraeva L.A. Disciples of Pasteur from Russia // *Russian Journal of Infection and immunity*. 2018; 8 (4): 418–424. (En Russ.)
10. Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrent'eva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Yu., Svarval' A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bessalova G.I. Infection of labour migrants from Central Asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (1): 61–70. (En Russ.)
11. Vlasov D.Yu., Kirtsideli I.Yu., Teshebaev Sh.B., Panin A.L., Kraeva L.A., Ryabusheva Yu.V. Conditionally pathogenic microorganisms in soils and soils in areas of polar settlements // *Advances in Medical Mycology*. 2018; 19: 83–86. (En Russ.)
12. Krasavin M., Lukin A., Vedekhina T., Manicheva O., Dogonadze M., Vinogradova T., Zabolotnykh N., Yablonsky P., Rogacheva E., Kraeva L. Conjugation of a 5-nitrofuranyl moiety to aminoalkylimidazoles produces non-toxic nitrofurans that are efficacious in vitro and in vivo against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Eur. J. Med. Chem.* 2018; 157: 1115–1126.
13. Krasavin M., Lukin A., Vedekhina T., Manicheva O., Dogonadze M., Vinogradova T., Zabolotnykh N., Rogacheva E., Kraeva L., Sharoyko V., Tennikova T.B., Dar'in D., Sokolovich E. Attachment of a 5-nitrofuranyl moiety to spirocyclic piperidines produces non-toxic nitrofurans that are efficacious in vitro against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Eur. J. Med. Chem.* 2019; 166: 125–135.
14. Kurova N., Timofeeva E.V., Guiso N., Macina D. A cross-sectional study of *Bordetella pertussis* seroprevalence and estimated duration of vaccine protection against pertussis in St. Petersburg, Russia // *Vaccine*. 2018; 36 (52): 7936–7942.
15. Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Voskresenskaya E.A., Paramonov A.I., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I. Bioinformatic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 CRISPR cas system // *East-Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 1 (5): 64–67. (En Russ.)
16. Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Paramonov A.I., Voskresenskaya E.A., Stepanenko L.A., Zelinskaya N.E., Kolbaseeva O.V., Shmidt N.V., Zlobin V.I. Bioinformatic search and screening of phages and plasmids by spacer sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII CRISPR/Cas system // *Siberian Medical Journal*. 2015; 138 (7): 63–68. (En Russ.)
17. Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Paramonov A.I., Voskresenskaya E.A., Stepanenko L.A., Zelinskaya N.E., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I. Bioinformatic search and screening of phages and plasmids via spacer sites of *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII CRISPR/Cas system. Munich, 2016: 43–44.
18. Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Borisenko A.Yu., Voskresenskaya E.A., Paramonov A.I., Stepanenko L.A., Zlobin V.I. The bioinformatic comparison of CRISPR/Cas system structure of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from different regions. Novosibirsk, 2016: 230.
19. Peretolchina N.P., Dzhioev Yu.P., Voskresenskaya E.A., Borisenko A.Yu., Totolian A.A., Zlobin V.I. Bioinformatic and molecular genetic search and analysis of *Y. pseudotuberculosis* CRISPR loci. Tbilisi, 2016: 52–53.

LABORATOIRE DES ZOOANTROPONOSE

Chef du laboratoire: Nikolai Tokarevitch

Chercheurs permanents: N. Stoianova, O. Freilikhman, Yu. Panferova, E. Susumova, O. Blinova

Les principaux axes de l'activité de laboratoire en 2017–2018 consistaient en perfectionnement des technologies du suivi et du contrôle épidémiologique des infections d'actualité sur le fondement des approches moléculaires génétiques et immunologiques. Dans le cadre de cette option a été effectué le travail visant aux objectifs suivants:

Optimisation de l'analyse plasmidique pour les besoins du typage rapide des souches et isolats de *Coxiella burnetii*

Les souches et les isolats de *C. burnetii* peuvent être porteurs d'une des quatre plasmides qui diffèrent selon leur composition génique. Certains auteurs supposent que le type de la plasmide peut s'associer avec le degré de virulence d'un isolat concret en vertu de la production génique spécifique qui participe en interaction avec la cellule hôte. Il a été proposé plusieurs schémas de typage plasmidique pour *C. burnetii*, mais il est nécessaire d'optimiser cette méthode pour le travail avec les isolats non-cultivés avec les petites accumulations de la masse bactérienne du pathogène.

Il a été effectuée une analyse de la séquence nucléotidique des plasmides QpH1, QpRS, QpDV et sélectionnés les amorces oligonucléotidiques assurant l'amplification des produits typo-spécifiques. La vérification de la spécificité a été faite en utilisant les souches, dont le type plasmidique était défini par la méthode d'analyse génomique complète.

On a étudié 9 souches de collection *C. burnetii* et trois isolats non-cultivés de ce pathogène qui n'ont pas passé le stade d'accumulation et qui étaient isolés sur le territoire de la partie européenne de la Russie.

Il a été établi pendant l'étude que le type plasmidique QpH1 (Tabl. 3) est caractériel pour la grande majorité des souches de collection *C. burnetii* isolées sur le territoire de la Russie. Le type QpRS a été observé pour les souches isolées dans les pays de l'Asie Centrale et les souches russes probablement importées de cette région avec les matières premières d'origine animale (laine).

Les études effectuées ont prouvé qu'elles font partie toutes du type plasmidique QpH1. On peut supposer que dans la partie européenne de Russie ce type est dominant dans les foyers naturels et anthropurgiques.

Analyse comparée des séquences génomiques entières des souches de *Coxiella burnetii* circulant sur le territoire de la Russie

Coxiella burnetii est l'agent pathogène particulièrement dangereux. La recherche et l'étude de ses marqueurs génétiques significatifs pour la différenciation et importants du point de vue épidémiologique de ses propriétés phénotypiques, associées notamment aux facteurs de la spécificité d'hôte et au rattachement géographique, sont d'une grande actualité. L'analyse des particularités génétiques des souches de la population de *C. burnetii*, circulant sur le territoire de Russie et dont l'information sur la structure du génome entier a été absente jusqu'au dernier moment, complète en partie la lacune informative sur les caractéristiques de cette population.

Afin d'analyser les génomes entiers a été réalisée une étude utilisant la méthode de séquençage nouvelle génération (séquençage haut débit, NGS) de quatre souches de *C. burnetii*, isolées sur le territoire de Russie à partir de deux types d'hôte (humain et anthropodes). Le séquençage a été effectué sur la base de la technique Illumina (Etats-Unis), technologie MiSeq, en utilisant la stratégie des paires de lecture et des code-barres.

L'analyse des génomes entiers des souches russes de *C. burnetii*, réalisée dans le cadre de ce groupe et en la comparant aux séquences génomiques entières de *C. burnetii*, accessibles dans la base de données NCBI, a confirmé la conception du pangénome fermé de l'espèce *C. burnetii* qui se caractérise par une faible variété génétique intraspécifique, y compris de la population circulant sur le territoire de Russie. Pourtant l'analyse de la partie variable du génome et de la composition des gènes uniques a révélé

Tableau 3. Type plasmidique des souches et isolats de *C. burnetii*

Name	Year of isolation	Place of isolation	Source	Plasmid type
Ixodes — 2 — Luga	1962	Luga district of Leningrad Region	<i>Ixodes persulcatus</i>	QpH1
Ixodes — 6 — Luga	1962	Luga district of Leningrad Region	<i>Ixodes persulcatus</i>	QpH1
Cimex — 1 — Luga	1959	Luga district of Leningrad Region	<i>Cimex lecturalis</i>	QpH1
Yellow-necked mouse — Luga	1959	Luga district of Leningrad Region	<i>Apodemus flavicollis</i>	QpH1
Vologda — 2	1987	Vologda	Blood of a patient with Q fever	QpH1
Cheredov	1955	Kazakhstan	Blood of a patient with Q fever	QpRS
Leningrad — 4	1957	Leningrad	Blood of a patient with Q fever	QpRS
Ufa — 1	1960	Ufa	Blood of a patient with Q fever	QpH1
Irkutsk — Dermacentor	1969	Irkutsk Region	<i>Dermacentor nuttalli</i>	QpH1
Sorex — 2008	2008	St. Petersburg	<i>Sorex araneus</i>	QpH1
Apodemus — 2008	2008	St. Petersburg	<i>Apodemus agrarius</i>	QpH1
AM — 2010	2010	St. Petersburg	Blood of a patient with Q fever	QpH1

la délétion de certains d'eux dans le groupe des souches russes, qui ne se trouve pas dans d'autres souches de la collection mondiale, ce qui permet de parler de leur type génomique unique.

Pendant l'analyse des éventuels mécanismes de patho-adaptation a été révélée une clastérisation exprimée dans le groupe des souches russes selon le type d'hôte, les différences des génomes à l'intérieur des clusters étant mineures. En comparant le nombre de cadres de lecture déléétés ouverts des génomes des souches isolées à partir des arthropodes et des humains, il a été établi que le génome des souches, obtenues des arthropodes, est sensiblement plus réduit malgré l'affirmation de plusieurs auteurs selon laquelle la réduction génomique des souches des arthropodes est insignifiante.

Ainsi les résultats obtenus permettent de caractériser les propriétés uniques des génomes des souches isolées sur le territoire de Russie et compléter les représentations sur la spécificité d'hôte des *Coxiella* encourageant les études ultérieures de ses mécanismes.

Contamination des tiques et des oiseaux migrants par l'agent de *Coxiella burnetii*

Dans le cadre de la recherche, assurée par la prime ACIP A-08-2010 de l'Institut Pasteur à Paris, a été effectuée une étude de contamination des oiseaux par la bactérie *C. burnetii* afin d'apprécier les possibilités de diffusion de *C. burnetii* par les oiseaux migrants et les tiques parasitant sur eux dans les différentes régions de l'Europe.

Dans le cadre de ce travail ont été étudiées les matières biologiques (sang, sérum sanguin et fèces) obtenues de 1970 spécimens d'oiseaux migrants de 53 espèces, attrapés sur le territoire de Russie (régions de la mer Baltique) et Bulgarie (régions d'Atanasovsko Lake et de Sofia), et de 888 tiques, trouvés sur les oiseaux et la végétation dans les sites de leur stationnement. La détection de *C. burnetii* a été menée en utilisant la réaction polymérisée en chaîne (PCR), les résultats positifs obtenus étant confirmés par séquençage des fragments ciblés du gène 16S rRNA avec la méthode Sanger. La présence des anticorps contre *C. burnetii* dans les sérums sanguins des oiseaux a été déterminée par la réaction de déviation du complément.

Suite à ces études il a été établi que 19% d'oiseaux migrants, attrapés dans la région de la mer Baltique, sont atteints par les *Ixodes ricinus* (L). Dans les rougets de ces tiques, enlevés de *Erithacus rubecula*, de même que dans les tiques des différentes espèces, trouvés sur la végétation dans les sites de stationnement des oiseaux migrants, ont été détectés les *C. burnetii* et dans les sérums sanguins — les anticorps contre ce pathogène. Les résultats de l'examen des oiseaux par la méthode PCR témoignent de leur contamination à 1,2% par l'agent de *C. burnetii*.

Les résultats obtenus permettent de suggérer que les sites de stationnement des oiseaux migrants dans les régions de la mer Baltique (Russie), d'Atanasovsko Lake et de Sofia (Bulgarie) sont des foyers naturels de l'infection à *C. burnetii*. Il est confirmé que les oiseaux migrants servent de réservoir naturel de ce pathogène et peuvent jouer un rôle important comme hôtes véhiculant les tiques contaminés par *C. burnetii*. On peut supposer que dans les sites de stationnement massif après de longs passages les oiseaux migrants obtiennent ou s'échangent des agents pathogènes. Ce faisant ces processus peuvent se dévelop-

per aussi bien pendant les migrations depuis l'Europe centrale ou occidentale (avec le plus grand nombre de sujets migrants — 43,4%), que pendant les migrations depuis l'Inde (6%) et depuis l'Afrique (39%) avec arrêts sur le territoire de la Bulgarie et continuation vers le nord-ouest de la Russie. Mais pour confirmer de telles hypothèses il faut effectuer les examens moléculaires génétiques complémentaires de l'agent provenant des régions indiquées.

Diagnostic moléculaire de la fièvre Q sur le territoire de la Russie

Etant donné la constitution relativement tardive des anticorps (plus de 10 jours après la contamination), le diagnostic moléculaire de l'agent de la fièvre Q dans le sang des patients fiévreux est d'une grande actualité dans le diagnostic de cette infection. Au moyen de l'amplification du fragment du gène, codant le superoxyde dismutase, ont été étudiés 86 échantillons de sang entier obtenus des malades avec suspicion de la fièvre Q. Les principales manifestations de l'infection ont été les différents types d'état grippal, la pneumonie communautaire ou la subfébrilité prolongée (au-delà d'un mois). Une PCR standard a été effectuée avec la vérification ultérieure des résultats par séquençage utilisant la méthode de Sanger. Parallèlement a été réalisée une réaction immuno-enzymatique pour détecter les anticorps contre *Coxiella burnetii* dans le sérum sanguin obtenu de ces mêmes patients.

Dans les échantillons étudiés les anticorps contre le pathogène n'ont pas été révélés. L'ADN du pathogène a été détecté dans trois échantillons (3,49%) par la PCR standard. L'analyse des fragments amplifiés de l'ADN a établi une homologie à 100% de la séquence nucléotide avec les souches de l'espèce *C. burnetii*, qui confirme la spécificité de cette analyse. Les résultats positifs de la PCR ont été observés dans deux cas de l'affection similitudineuse et dans un cas de la subfébrilité chronique. La détection de *C. burnetii* par les techniques moléculaires génétiques permet de diagnostiquer la fièvre Q à des stades précoces de la maladie et au cas d'absence de la réponse immunitaire, qui est un aspect important d'utilisation de cette méthode dans le diagnostic clinique de laboratoire.

Prévalence des infections transmises par les tiques dans la région Nord-Ouest de Russie

On a continué le travail dans le cadre du projet international commun réalisé ensemble avec l'Institut norvégien de la santé publique «Maladies à tiques dans la région de la mer de Barents et sur le littoral ouest de la Norvège» visant à l'étude de prévalence des pathogènes à tiques pour les besoins de surveillance des maladies à tiques avec définition des frontières de prévalence des agents des infections transmises par les tiques.

A été étudiée la contamination des tiques avec les agents de l'encéphalite et des borrelioses à tiques, de la fièvre Q et de l'anaplasmose granulocytaire de l'homme. Les tiques ont été ramassées pendant la période de printemps-été 2015-2016 à partir de la végétation sur le drap blanc sur les territoires de Saint-Petersbourg, des oblasts de Léningrad, Pskov, Arkhangelsk et la République Carélie.

Dans les zones endémiques de 5 régions de Russie 1499 tiques ont été ramassées et examinées par la méthode de

la PCR en temps réel. Il a été établi que dans la région Nord-Ouest la contamination moyenne des tiques par le virus de l'encéphalite à tiques *Borrelia burgdorferi* s.l. et *C. burnetii* a fait respectivement 2,6%, 15,4% et 9,2%. Le génotypage de *B. burgdorferi* s.l. a révélé dans les échantillons étudiés une égale proportion de génomes spécifiques *B. afzelii* (50%) et *B. garinii* (50%). Les données obtenues témoignent de la présence des foyers naturels des maladies transmises par les tiques sur les territoires étudiés.

Pendant la période de 1996 à 2016 ensemble avec le «Centre fédéral d'hygiène et d'épidémiologie» de Rospotrebnadzor et le département de la parasitologie du «Centre d'hygiène et d'épidémiologie de la ville de Saint-Petersbourg» a été effectuée une analyse de la situation écologique et épidémiologique de l'encéphalite à tiques sur le territoire de Saint-Petersbourg, qui est la mégapole la plus nordique de Russie où se conservent les foyers persistants de l'encéphalite à tiques.

- Il a été révélé que les tiques des espèces *Ixodes persulcatus* et *Ixodes ricinus* servent d'essentiels transporteurs du virus de l'encéphalite à tiques à Saint-Petersbourg (respectivement à 85% et 15%).
- Le nombre de demandes d'aide médicale au cas de morsure de tique à Saint-Petersbourg augmente, l'incidence globale ayant une tendance à la baisse mais moins rapide qu'en moyenne en Russie.
- Le principal groupe de risque d'affection par l'encéphalite à tiques à Saint-Petersbourg est composé des enfants de 3 à 14 ans qui est une particularité de Saint-Petersbourg comparé à d'autres régions de Russie. Pour cette raison il est recommandé d'adopter les principales mesures préventives dans cette catégorie d'âge.
- Le niveau d'immunisation de la population de Saint-Petersbourg contre l'encéphalite à tiques, tout en augmentant, reste encore insuffisant. Pourtant l'absence des cas de contamination de l'encéphalite à tique dans les groupes de population professionnellement exposés témoigne de l'efficacité de la prévention menée dans ces groupes.

Sous l'influence des activités humaines, par exemple, des coupes des forêts primaires et brûlages d'andains dans les zones périphériques de Saint-Petersbourg et dans l'oblast de Leningrad, augmente le nombre de tiques et se diffuse dans la population de ces régions le virus de l'encéphalite et les borrelioses à tiques. Nous avons effectué une détection du virus de l'encéphalite à tiques et des borrelioses de l'ensemble de *B. burgdorferi* sensu lato et de *Rickettsia* sp. dans les tiques enlevées des hommes à l'aide des méthodes moléculaires et génétiques.

La contamination par le virus de l'encéphalite à tiques a fait 1%. L'ADN des borrelioses a été détecté dans 9,8% d'échantillons. Lors de séquençage du gène *ospC* il a été établi que l'ADN de *Borrelia afzelii* est présent dans tous les

échantillons. Dans les tiques saturées les rickettsies n'ont pas été détectées. On a effectué l'analyse de la prévalence des pathogènes comparée aux données des auteurs nationaux et étrangers. Les données obtenues peuvent servir de base de perfectionnement du schéma des manifestations anti-épidémiques dans les régions contrôlées. Les résultats du travail justifient la nécessité du suivi ultérieur de l'encéphalite à tiques au nord de la partie européenne de la Russie afin d'assurer la protection de la santé de la population contre ces infections compte tenu de leur diffusion sur les territoires du nord.

Etude de contamination des travailleurs migrants, occupés sur le territoire de Saint-Petersbourg, par les agents des infections zoonoses

Afin de détecter la contamination par les agents des infections zoonoses (brucellose, fièvre Q, leptospirose) ont été étudiés les sérums sanguins obtenus de 142 travailleurs migrants d'Ouzbekistan et de Tadjikistan, dont 85% d'hommes et 15% de femmes. Leur structure d'âge a été pratiquement toujours la même: 97% de travailleurs migrants examinés avaient moins de 50 ans. Le groupe témoin a été composé de 320 habitants de Saint-Petersbourg, pratiquement en bonne santé. Leur composition sexospécifique et la distribution d'âge étaient similaires à celles du groupe des travailleurs migrants étudié.

L'examen des sérums sanguins des travailleurs migrants au sujet des infections zoonoses a permis de détecter les anticorps contre tous les trois agents (Tabl. 4).

Les distinctions substantielles dans la contamination des travailleurs migrants par les *Brucella* et les *Coxiella* comparés aux habitants autochtones de Saint-Petersbourg permettent de suggérer de manière certaine que la contagion a eu lieu en dehors de la mégapole. Cette suggestion est confirmée indirectement par une large diffusion de la brucellose et la coxiellose en Ouzbekistan et Tadjikistan due au régime socio-économique de ces pays et la distribution du cheptel collectif entre les exploitations individuelles. On y assiste à la baisse d'efficacité des mesures de prévention à caractère anti-épizootique et anti-épidémique, suite à quoi ces infections revêtent un caractère de diffusion épidémique. Contrairement à la brucellose et la coxiellose, la contamination des travailleurs migrants par les leptospires vraisemblablement a eu lieu à Saint-Petersbourg. Les preuves en sont pratiquement les mêmes indices de contamination par ce pathogène des travailleurs migrants et des habitants autochtones de Saint-Petersbourg. D'autre part chez les travailleurs migrants on a détecté les anticorps contre les leptospires des sérogroupes *Icterogemorrhagiae* et *Canicola*, qui caractérisent l'étiologie de la leptospirose à Saint-Petersbourg.

Tableau 4. Résultats d'examen des travailleurs migrants résidant à Saint-Petersbourg et des habitants autochtones de la ville au sujet de la présence des anticorps contre les infections zoonoses

Pays du lieu de séjour permanent	Détection des anticorps contre les agents pathogènes			
	Total examinés	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>
Ouzbekistan	113	11 (9,7%)	2 (1,8%)	3 (2,7%)
Tadjikistan	29	3 (10,3%)	4 (13,8%)	1 (3,4%)
Russie — Saint-Petersbourg	320	2 (0,6%)	1 (0,3%)	10 (3,1%)

La possibilité de contamination des travailleurs migrants par les leptospires à Saint-Petersbourg s'explique, pour beaucoup, par le caractère du travail qu'ils accomplissent: ouvriers de peu de qualification sur les chantiers de construction, aux marchés (débardeurs), avec les équipements collectifs (balayeurs, agents de nettoyage), de même que par les conditions de vie défavorables qui n'excluent pas les contacts avec des rongeurs synanthropes qui, comme on sait, dans les conditions de vie d'une grande ville servent de source d'infection pour plus de 30% de personnes contaminées.

En règle générale l'homme sert d'impasse biologique (écologique) aux agents des zoonoses. Pour cette raison, contrairement aux anthroponoses, les travailleurs migrants, contaminés dans le passé par les agents de leptospirose, fièvre Q et brucellose, ne représentent pas un danger réel pour les habitants autochtones de Saint-Petersbourg. Pourtant dans certains cas les agents pathogènes énumérés persistent longtemps dans l'organisme humain. L'évolution chronique, typique pour la brucellose et la coxiellose, et les lésions pathologiques qui se conservent longtemps après la leptospirose subie (dans plusieurs cas non diagnostiquée), font dans une grande mesure baisser la qualité de vie des travailleurs migrants, diminuent leur aptitude au travail et augmentent la charge pesant sur les établissements médicaux de Saint-Petersbourg.

Etude de la diversité biologique des agents de *Leptospira* spp.

Dans le cadre de la recherche, assurée par la prime PTR No. 30-17 de l'Institut Pasteur à Paris — «Global diversity, genomic epidemiology and pathogen evolution of *Leptospira* spp.» (GlobE Evolution), ont été conditionnées 50 souches originales de *Leptospira* spp. provenant de la collection du laboratoire des infections zoonoses de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg. Les souches représentent 5 groupes sérologiques (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Tarassovi). Le typage a été effectué à l'aide des sérums agglutinants types qui ont permis de sélectionner à partir de 30 souches un ADN génomique de haute qualité.

Dans le cadre de ce projet a été effectuée l'identification de l'isolat *Leptospira* spp. au niveau de sérovar par la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La souche *Leptospira* spp. a été isolée à partir des poumons de l'homme mort de l'infection de leptospirose. Par la réaction d'agglutination microscopique (RAM) a été définie l'appartenance de l'isolat au sérotype Icterohaemorrhagiae. Les spectres de masse ont été obtenus à partir des extraits d'acides éthanolique et méthanolique issus des cellules de la souche étudiée et de 10 souches de référence de *Leptospira* spp. utilisées dans la RAM sur le spectromètre de masse «Microflex» (Bruker Daltonik). L'identification de l'isolat a été effectuée par la méthode de comparaison du spectre de masse de l'échantillon étudié avec les données des principaux profils spectraux (PPS) des souches de référence, que nous avons obtenues avant. La base de données de travail obtenue des PPS a été ensuite ajoutée à celle taxonomique que nous avons utilisée et qui est la bibliothèque des spectres de référence du logiciel «Biotyper» 3.1 (Bruker Daltonik). Le résultat de la comparaison a été évalué

selon le coefficient de coïncidence des pointes du spectre de l'isolat avec les spectres de référence. Nous avons proposé d'interpréter les valeurs du coefficient $< 2,1$ comme une éventuelle identification jusqu'au niveau du sérovar, et les valeurs $> 2,1$ — comme absence de l'identification correcte du sérovar.

La coïncidence avec la valeur maximum du coefficient du spectre de l'échantillon étudié (2,152) a été enregistrée avec le spectre de la souche de référence *L. interrogans* du sérovar copenhageni. On a également signalé une légère différence des évaluations de la coïncidence de l'isolat avec la souche *L. interrogans* du sérovar icterohaemorrhagiae (2,123) et avec la souche non pathogénique *L. biflexa* du sérovar patoc (2,149). Les valeurs du coefficient de coïncidence avec d'autres spectres de référence des sérovars ont été inférieures à 2,1. L'analyse des spectres de l'isolat et des sérovars copenhageni, icterohaemorrhagiae, patoc a montré la présence d'un grand nombre de pointes identiques, y compris, éventuellement, des protéines ribosomiques témoignant de leur proche parenté évolutionniste. Les divergences spectrales ont été observées dans la gamme des poids moléculaires $m/z = 3000-3500$ Da, où toutes les souches manifestaient des regroupements de pointes typiques pour les polysaccharides linéaires. Les poids moléculaires des pointes de ces regroupements étaient de $m/z = 3301$ Da pour le sérovar patoc, et de $m/z = 3209$ Da — pour l'isolat des sérovars copenhageni et icterohaemorrhagiae. Cela étant, le spectre du sérovar icterohaemorrhagiae avait la pointe $m/z = 2958$ Da absente chez l'isolat et le sérovar copenhageni.

Ainsi les résultats obtenus témoignent de l'appartenance de l'isolat au sérotype Icterohaemorrhagiae et au sérovar copenhageni, tandis que la méthode proposée peut être utilisée pour la définition de l'appartenance des souches isolées des leptospires à un sérotype et un sérovar.

Evaluation de la propagation de la fièvre Q sur le territoire de la République de Guinée pour élaborer les mesures efficaces de prévention

Pendant ce travail, effectué dans le cadre de Collaboration internationale avec la République de Guinée, a été réalisée une étude sérologique des sérums sanguins des habitants en relativement bonne santé de la République de Guinée (596 échantillons) au sujet de la présence des anticorps IgG contre l'agent pathogène de la fièvre Q. Il a été établi que la part des personnes séropositives à la fièvre Q parmi les habitants en relativement bonne santé de la République de Guinée constitue 5,4%. Il a été effectué une étude des matières biologiques (250 pools de tiques, ramassées sur les espèces bovines) pour détecter la présence de l'ADN de l'agent de la fièvre Q — *Coxiella burnetii* en utilisant un test-système vidéo-spécifique élaboré à l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg. La fréquence de détection des marqueurs génétiques de la coxiellose dans les matières étudiées a fait 3%. Les données obtenues témoignent de l'existence des foyers de la fièvre Q dans la préfecture de Kindia et de la participation des arthropodes hématophages dans la circulation du pathogène comme agents transmetteurs.

Publications

1. Eremeeva M.E., Capps D., Winful E.B., Warang S.S., Braswell S.E., Tokarevich N.K., Bonilla D.L., Durden L.A. Molecular markers of pesticide resistance and pathogens in human head lice (Phthiraptera: Pediculidae) from rural Georgia, USA // *Journal of Medical Entomology*. 2017; 1–6. doi: 10.1093/jme/tjx039
2. Freylikhman O.A., Tokarevich N.K., Kondrashova V.D. Methods of laboratory diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii* // *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2017; 2: 49–60.
3. Freylikhman O., Kiselev A., Kazakov S., Sergushichev A., Panfereva Y., Tokarevich N., Kostsreva A. Draft genome sequence of *Coxiella burnetii* historical strain Leningrad-2, isolated from blood of a patient with acute Q fever in Saint Petersburg, Russia // *American Society for Microbiology, genome Announcements*. 2018; 6 (3): e01464–17.
4. Grigoryeva L.A., Tokarevich N.K., Freylikhman O.A., Samoylova E.P., Lunina G.A. Seasonal changes in populations of sheep tick, *Ixodes ricinus* (L., 1758) (Acari: Ixodidae) in natural biotopes of St. Petersburg and Leningrad province, Russian Federation // *Systematic & Applied Acarology*. 2019; 24 (4): 701–710. doi: 10.11158/saa.24.4.14 701
5. Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Y., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bessalova G.I. Infection of labour migrants from central Asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (1): 61–70. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70 (En Russ.)
6. Najdenski H., Dimova T., Zaharieva M.M., Nikolov B.P., Petrova-Dinkova M.M., Dalakchieva S., Popov K.S., Hristova-Nikolova I.P., Zhehtindjiev P., Peev S.G., Trifonova-Hristova A., Carniel E., Panferova Y.A., Tokarevich N.K. Migratory birds along the Mediterranean/Black Sea Flyway as carriers of zoonotic pathogens // *Canadian Journal of Microbiology*. 2018. doi: 10.1139/cjm-2017-0763
7. Panferova Y.A., Suvorova M.A., Shapar A.O., Tokarevich N.K. Bacterial and viral pathogens in *Ixodes* sp. ticks in St. Petersburg and Leningrad District // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 219–222. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-219-222 (En Russ.)
8. Panferova Yu.A., Freylikhman O.A., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Detection of *Coxiella burnetii* in the blood of patients with suspected Q fever using amplification technologies // *Molecular Diagnostics 2018: Proceedings of the international research and practice conference*. Minsk, September 27–28, 2018: 437–438.
9. Tokarevich N., Stoyanova N., Gnativ B., Kazakovtsev S., Blinova O., Revich B. Seroprevalence of tick-borne diseases in the population of the European North of Russia // *Med. Saf. Glob. Health*. 2017; 6 (1): 1000132.
10. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of the Komi Republic // *International Journal of Circumpolar Health*. 2017; 76: 1298882. doi: 10.1080/22423982.2017.1298882
11. Zyeva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Totolian Areg A. Identification of *Leptospira* serovars by MALDI-TOF mass-spectrometry // *Journal of Microbiol. Epidemiol. Immunol.*, 2017; 1: 42–47. (En Russ.)

LABORATOIRE D'ÉTIOLOGIE ET DE CONTRÔLE DES INFECTIONS VIRALES

Chef de laboratoire: Maina Bichurina

Chercheurs permanents: N. Romanenkova, N. Rozaeva, N. Zheleznova, O. Kanaeva, O. Kubar

Surveillance de la poliomyélite et des infections à entérovirus en Russie

Le Laboratoire Subnational pour la poliomyélite de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg qui fait partie du Réseau des laboratoires poliomyélitiques de l'OMS s'occupe de la surveillance virologique des paralysies flasques aiguës (PFA) et de la poliomyélite paralytique associée à la vaccination (PPAV) chez les enfants de moins de 15 ans sur 14 territoires administratifs de Russie. Les territoires administratifs envoient les échantillons des selles des enfants atteints des PFA ou de PPAV et de leurs contacts (enfants vivant à proximité immédiate), ainsi que les échantillons de selles des enfants des familles des migrants, des patients atteints des infections à entérovirus et les échantillons des eaux d'égouts à examiner. Le procédé diagnostique est réalisé en accord avec le protocole de l'OMS.

La surveillance virologique des cas de paralysie flasque aiguë et de la poliomyélite paralytique associée à la vaccination reste toujours le «standard d'or» du programme d'éradication mondiale de la poliomyélite. En même temps le rôle de la surveillance complémentaire (surveillance de l'environnement et surveillance des groupes de population à risque) devient de plus en plus important pendant la période de post-certification d'éradication mondiale de la poliomyélite.

Au cours de la surveillance de la poliomyélite et des paralysies flasques aiguës des dernières années (2016–2018), 343 échantillons des selles ont été examinés, 3 souches des poliovirus du type 1 et 4 souches des poliovirus du type 3. Toutes les souches des poliovirus selon les résultats de différenciation intra typique ont été vaccinales. En plus 7 souches des entérovirus non polio (Echovirus 6, Enterovirus 71, Coxsackievirus A4, Coxsackievirus B1–6) ont été isolées.

Parmi 167 cas de paralysies flasques aiguës deux cas ont été classifiés comme poliomyélite paralytique associée à la vaccination. De 1998 au 2017 on a enregistré en Russie 132 cas de paralysies flasques aiguës, 109 cas de 1998 au 2008 et 23 cas de 2009 au 2017. On peut voir ces données en Fig. 2. Jusqu'au 2008 la plupart des cas ont été enregistré

chez les enfants — récipients du vaccin poliomyélitique, après les cas de poliomyélite paralytique associée à la vaccination ont été fixés chez les enfants non vaccinés vivant à proximité des enfants récemment vaccinés.

Ci-dessous suit la description de deux cas de la poliomyélite paralytique associée à la vaccination qui ont eu lieu dans le District fédéral Nord-Ouest de Russie en 2016 et 2017.

Cas de la PPAV (poliomyélite paralytique associée au vaccin) chez l'enfant T.: La paralysie flasque aiguë (PFA) a été enregistrée chez un enfant âgé d'un an et neuf mois après obtention de la première dose du vaccin antipoliomyélique. Pour la vaccination a été choisi non le vaccin inactivé (conformément au Calendrier national des vaccinations), mais le vaccin antipoliomyélique oral. Dans son choix du vaccin le personnel médical s'est fait guider par l'âge de l'enfant et non par son statut vaccinal réel. La paralysie flasque aiguë s'est développée 12 jours après l'immunisation par le vaccin antipoliomyélique oral. Les poliovirus des types 1 et 3 ont été isolés à partir des échantillons des selles. Dans le sérum sanguin prélevé en état avancé de la paralysie ont été détectés les anticorps contre les poliovirus dans les titres: PV1 — 1:256, PV3 — 1:32. Les paralysies résiduelles ont été constatées pendant l'examen au 60-ème jour de la maladie. Le diagnostic définitif était la PPAV développée chez le receveur du vaccin antipoliomyélique administré par voie orale.

Cas de la PPAV chez l'enfant K.: La paralysie flasque aiguë (PFA) a été enregistrée chez un enfant âgé de 10 semaines non vacciné contre la poliomyélite. Pendant plus d'un mois l'enfant se trouvait au service de réanimation sous ventilation mécanique. Le poliovirus du type 3 a été isolé à partir des échantillons des selles. Dans le sérum sanguin prélevé au 2-ème jour de la maladie ont été détectés des anticorps contre les poliovirus des types 1, 2 et 3 dans les titres 1:32 (probablement maternels). Dans le sérum sanguin prélevé au 20-ème jour de la maladie a été constaté un accroissement quadruple des anticorps uniquement contre le poliovirus du type 3 (1:128). 7 personnes, qui avaient contacté le malade, ont été examinées. Le poliovirus du type 3 a été aussi détecté chez la soeur du malade, âgée de 19 mois, qui

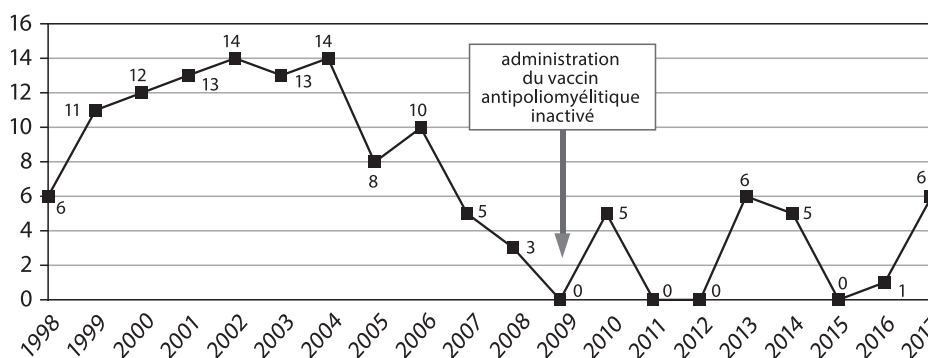


Figure 2. Cas de la poliomyélite paralytique associée à la vaccination en Russie en 1998–2017

a obtenu 3 doses du vaccin inactivé contre la poliomyélite (VPI). Chez la fille ont été révélés les anticorps contre le poliovirus du type 3 dans le titre 1:512. Les titres des anticorps contre les poliovirus des types 1 et 2 ont été égaux à 1:32. Probablement la soeur a servi de source du poliovirus pour le malade K la source du poliovirus à elle n'étant jamais établie. Pendant l'examen au 60-ème jour de la maladie les paralysies résiduelles ont été constatées chez le malade K. Son diagnostic définitif — poliomyélite paralytique associée au vaccin administré à la personne de contact.

Etant donné que le risque de l'importation des poliovirus sauvages dans les pays certifiés exempts de la poliomyélite existe jusqu'à l'éradication globale de la maladie, le Laboratoire de la poliomyélite de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg a effectué la surveillance virologique renforcée des groupes de population à risque, notamment, des enfants des familles des migrants des pays d'Asie Centrale, de l'Ukraine et certains autres pays récemment arrivés à Saint-Petersbourg.

Au cours de la surveillance des enfants des familles des migrants les échantillons des selles de 375 enfants ont été examinés. Chez l'enfant non vaccine 2 souches de poliovirus de type 1 et de type 3 ont été isolées. Selon les résultats de différenciation intra typique les souches des poliovirus ont été vaccinales (se sont avérées être d'origine vaccinale). Les entérovirus non polio ont été isolés chez 37 enfants examinés (9,9%). C'étaient les Echovirus 6, 11 et 30, Coxsackievirus A, Coxsackievirus B1–6 et d'autres entérovirus non polio.

En deux ans (2017–2018) sur les territoires ont été étudiés par la méthode virologique 9360 échantillons prélevés chez les malades atteints de l'infection à entérovirus. Les poliovirus vaccinaux ont été isolés dans un nombre limité de cas chez les enfants vaccinés contre poliomyélite. Les entérovirus non polio (953) ont été isolés dans 10,2% d'échantillons avec la plus haute fréquence pour les Coxsackievirus A des divers sérotypes (46%), Coxsackievirus B1–6 (15%), Echovirus 6 (10%), Echovirus 30 (10,4%), Enté-

rovirus 71 (4,8%) et Echovirus (5% en 2017). Ont été également isolés les Echovirus 7, 9, 11, 13, 25 ainsi que d'autres Echovirus en faible pourcentage.

On a effectué une étude moléculaire selon les résultats de laquelle ont été déterminées les séquences nucléotidiques des entérovirus non polio isolés dans les différents groupes de population (malades atteints de PFA et des infections à entérovirus, enfants des familles des migrants). On a identifié Echovirus 6, Echovirus 9, 11, 13, Echovirus 18, Echovirus 30, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, Coxsackievirus A2, A3, A4, A6, A9, A10, A16 et A24, de même que les entérovirus 75 et 99.

En 2017 l'accroissement de l'indice de morbidité de l'infection à entérovirus a été révélé dans certaines régions de Russie. A Saratov 65% des cas d'infection ont été représentés par les méningites virales provoqués par l'Echovirus 18. Le facteur étiologique a été établi par les méthodes virologiques et moléculaires. La part de l'entérovirus ECHO 18 a fait 42% de tous les entérovirus, isolés chez les malades. Dans la région de Mourmansk et en République des Komis les maladies exanthémiques, qui ont fait 95% et 60% de tous les cas de l'infection à entérovirus, on été provoqués en majorité de cas par Coxsackievirus A6.

L'étude moléculaire a démontré que les souches d'Echovirus 18 isolées en Russie dans les dernières années ont été distribuées en trois groupes. Les souches qui ont provoqué les méningites à Saratov appartenaient au groupe numéro 3. Ces souches ont été formées séparément d'autres souches d'Echovirus 18 qui ont circulées dans la région Nord-Ouest de Russie. Le Fig. 3 représente l'arbre phylogénétique de la région génomique VP1 des Echovirus 18.

La plupart des souches de Coxsackievirus A6 identifiées dans nos régions appartenaient aux deux sous-génotypes 6 et 8 du génotype pandémique de Coxsackievirus A6 qui prédominaient dans la structure de Coxsackievirus A6 dans le District fédéral Nord-Ouest de la Fédération de Russie. Le Fig. 4 représente l'arbre phylogénétique de la région génomique VP1 des Coxsackievirus A6.

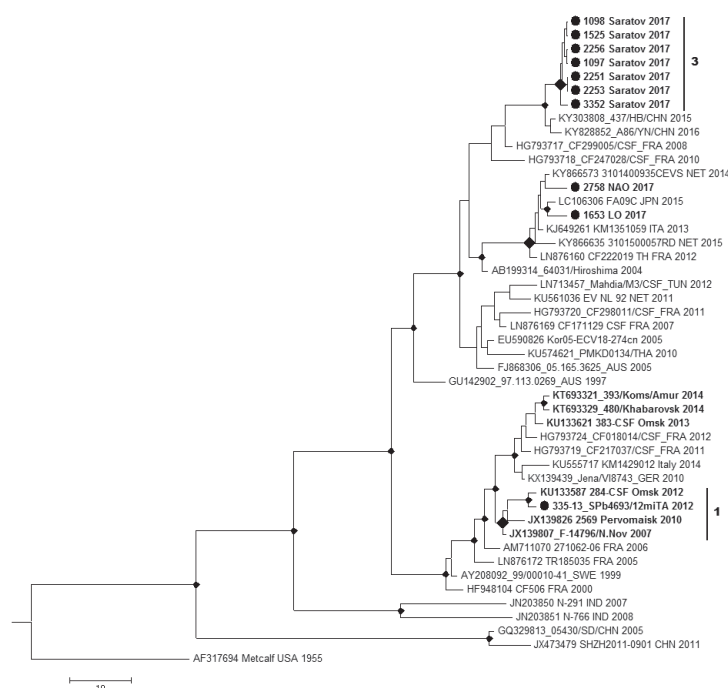


Figure 3. Arbre phylogénétique de la région génomique VP1 des Echovirus 18

Pendant la période d'été-automne 2018, comparée à celle de l'année précédente, sur les territoires administratifs, supervisés par le Centre régional de Saint-Petersbourg, l'augmentation de morbidité par l'infection entérovirale n'a pas été constatée. Sur cinq territoires sur 14 dominaient les affections présentant les symptômes cliniques de la méningite entérovirale. Leur part dans l'ensemble des infections entérovirales a fait 88,9% en République de Carélie, 65,4% dans l'oblast d'Arkhangelsk, 64,7% dans l'oblast de Saratov, 48,5% à Saint-Petersbourg et 47,8% dans l'oblast de Novgorod. Sur d'autres territoires les affections se caractérisaient principalement par les symptômes cliniques de l'exanthème viral de la cavité buccale et des extrémités ou évoluaient sous forme de l'angine herpétique. Un pourcentage significatif de telles formes des infections entérovirales a été enregistré en République des Komis (61,3%), dans les oblasts de Mourmansk (61,2%), de Léningrad (49,4%), de Kostroma (42,2%) et de Vologda (35%).

Sur certains territoires ont été enregistrées des affections collectives chez les enfants. Ainsi dans un des établissements pour enfants à Saint-Petersbourg en septembre 2018 trois enfants de 3 à 6 ans sont tombés malades et ont été hospitalisés avec le diagnostic méningite aseptique. Les échantillons des matières biologiques obtenues de deux malades et de 10 personnes, qui les contactaient, ont été envoyées au laboratoire de notre Institut pour l'analyse virologique. Les entérovirus non polio ont été isolés à partir des échantillons obtenus des deux enfants malades et de sept autres qui les contactaient. L'identification du virus a permis d'arrêter l'agent étiologique de l'affection — entérovirus Cocksackievirus B5. Dans deux établissements pour enfants de l'oblast de Novgorod ont été enregistrés les cas des affections collectives par l'infection entérovirale ayant les symptômes cliniques de l'exanthème viral de la cavité buccale et des extrémités (trois enfants dans chaque établissement). Au laboratoire de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg ont été isolés et identifiés les entérovirus obtenus à partir des échantillons des matières biologiques de

six enfants. Les entérovirus Cocksackievirus A6 se sont avérés être les agents étiologiques de l'affection par l'infection entérovirale.

En effectuant la surveillance de l'environnement en 2017–2018 nous avons étudié 3690 échantillons des eaux d'égouts. Parmi les souches isolées, 115 (31,0%) ont été identifiées comme étant les poliovirus et 256 (69,0%) — comme les entérovirus non poliomyélitiques. Toutes les souches isolées du poliovirus se sont avérées vaccinales. La fréquence d'isolement des entérovirus non poliomyélitiques a été de 6,9%. La plupart des souches non polio de l'entérovirus appartenaient aux variétés Cocksackievirus B1–6 (38,0%), Cocksackievirus A (12,5%), Echovirus 30 (12,5%) et Echovirus 6 (9,0%). D'autres ont été identifiées comme étant des Echovirus des sérotypes 7, 9, 11, 13, 25 et d'autres sérotypes.

Une corrélation entre le sérotype des entérovirus ECHO 6, ECHO 30, Cocksackievirus B1–6, Cocksackievirus A et les différents sérotypes, isolés à partir des échantillons des masses biologiques obtenues des malades de l'infection à entérovirus et des échantillons des eaux d'égouts, a confirmé le fait d'une circulation intense de ces entérovirus sur les territoires des différentes régions.

Les résultats d'étude des échantillons des selles des enfants atteints des PFA ou de PPAV et de leurs contacts, des enfants des familles des migrants et des malades atteints de l'infection à entérovirus ont prouvé que tous les territoires surveillés de la région ont gardé le statut des territoires Nord-Ouest de Russie exempts de la poliomyélite. Il convient de maintenir le haut niveau de couverture par les vaccinations contre la poliomyélite des enfants de toutes les catégories d'âge et d'assurer une bonne qualité de surveillance épidémiologique et virologique de la poliomyélite et des paralysies flasques aiguës.

Les données obtenues témoignent de ce que seule la combinaison de surveillance des paralysies flasques aiguës de la population à risque et de l'environnement peut nous fournir les données précises sur la circulation du poliovirus,

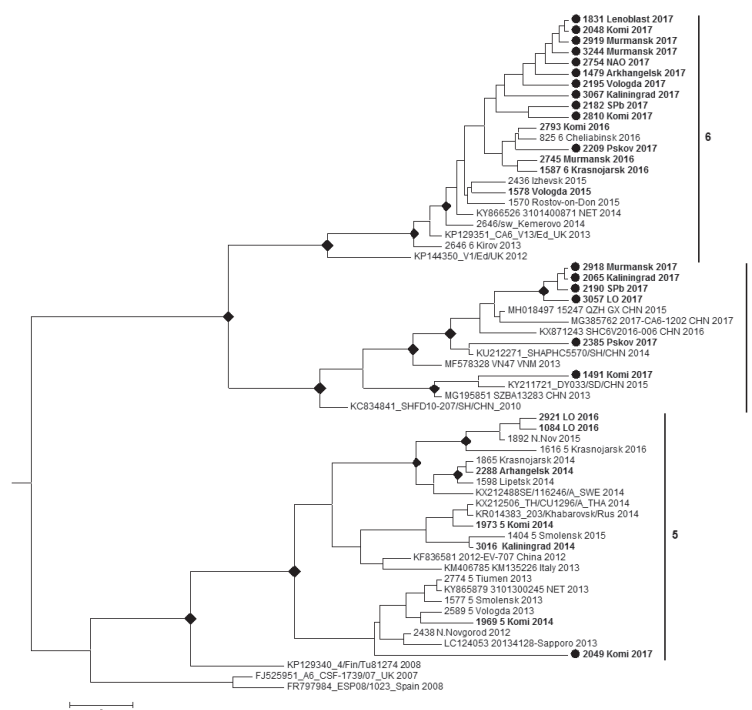


Figure 4. Arbre phylogénétique de la région génomique VP1 des Cocksackievirus A6

Tableau 5. Données d'examen moléculaire génétique des matières biologiques obtenues des malades en 2018 (DFNO)

Territoire	Date d'atteinte (mois)	Génotype du virus de la rougeole
Oblast de Kaliningrad	février	1 — D8 Frankfurt
Saint-Petersbourg	mars	3 — B3 Kabul
Oblast de Vologda	mars	1 — B3 Kabul
Saint-Petersbourg	juin-juillet	2 — B3 Dublin 1 — D8 Cambridge 1 — D8
	juin-décembre	7 — D8 Gir Somnath
Oblast de Léningrad	juin	1 — D8 Frankfurt
République de Carélie	juillet	2 — D8 Gir Somnath

y compris des souches sauvages et des VDPV dans la population et dans l'environnement. Ce qui peut garantir au territoire surveillé le maintien du statut du territoire exempt de la poliomyélite après les cas d'importation des poliovirus sauvages.

Perfectionnement de la surveillance épidémiologique de la rougeole et de la rubéole dans la période de l'élimination de l'infection

En 2017 a été effectuée une étude de 17 échantillons de sérum sanguin prélevés des malades de la rougeole, 45 échantillons — des malades de la rubéole et 316 échantillons — des personnes atteintes des différents types d'exanthèmes dans 11 territoires du District fédéral Nord-Ouest (DFNO).

A Saint-Petersbourg il a été enregistré au total 3 cas de la rougeole chez les personnes adultes (le ratio est de 0,02 pour 1 000 000 d'habitants). Tous ces cas ont été confirmés par la méthode sérologique (IFA). Il y a eu un cas importé de la République de Tchétchénie. L'examen moléculaire génétique a été effectué sur les matières biologiques prélevées des malades au diagnostic primaire rougeole. Il a été détecté le virus de la rougeole du génotype D8 Frankfurt Main Deu/17.11.

On a continué à retester les personnes séronégatives au virus de la rougeole dans certains groupes de risque sur le territoire du DFNO. Les résultats des examens se sont confirmés dans 100% de cas sur trois territoires (République Komi, oblast de Novgorod et oblast de Léningrad). Sur deux autres territoires le taux de confirmation variait entre 94,6% et 97%.

En 2017 aucun cas de la rubéole n'a été enregistré dans le district.

Le laboratoire a adhéré au standard de contrôle de qualité interne d'examen de laboratoire élaboré par la société «Vector-Best». A été réalisé le monitoring mensuel des échantillons de contrôle dans les examens de laboratoire par la méthode IFA avec les test-systèmes de détection de la rougeole et la rubéole.

A été édité un aperçu analytique «Situation épidémiologique de la rougeole sur les territoires du DFNO et difficultés du diagnostic dans les conditions d'incidence sporadique».

En 2018 a été effectué une étude de 186 échantillons de sérum sanguin prélevés des malades de la rougeole,

48 échantillons — des malades de la rubéole et 344 échantillons — des personnes atteintes des différents types d'exanthèmes dans 11 territoires du DFNO.

En 2018 a eu lieu une recrudescence d'incidence de la rougeole. Au total ont été enregistrés 109 cas de la maladie (le ratio a été 0,8 par 100 000 habitants) (Fig. 5).

La rougeole a été enregistrée sur 6 territoires du district. Saint-Petersbourg a fourni le plus grand nombre de cas — 54 (le ratio a été 0,02 par 100 000 habitants) et le ratio le plus élevé a été celui de la République de Carélie (4,62 par 100 000 habitants). Parmi les cas de la rougeole enregistrés dans le DFNO 5 avaient été importés d'Italie, France, Turquie et Ukraine, 25 — importés d'autres territoires de la Fédération de Russie. On a détecté 3 foyers de contamination intrahospitalière et 3 foyers de contamination en famille à Saint-Petersbourg, 2 foyers de contamination en famille dans l'oblast de Léningrad et une éclosion de la rougeole en République de Carélie (29 cas). Parmi les personnes atteintes les adultes et les non-vaccinés représentaient la majeure partie (64,2% et 53,2% respectivement). Dans 18,4% de cas ont été atteintes les personnes revaccinées.

Les données d'examen moléculaire génétique des matières biologiques obtenues des malades de la rougeole témoignent de la variété des génotypes révélés du virus de la rougeole et des multiples cas d'importation de ce virus sur les territoires du district (Tabl. 5).

Ainsi à Saint-Petersbourg ont été identifiés les génotypes B3 Kabul, B3 Dublin, D8 Cambridge et D8 Gir Somnath.

L'éclosion de la rougeole dans un des districts de la République de Carélie représente un intérêt particulier. Le premier cas diagnostiqué comme infection entérovirale, accompagné d'une forte fièvre et une éruption, n'a pas été examiné au laboratoire. Le test sanguin de ce patient, prélevé 26 jours après, a révélé la présence des anticorps IgM contre le virus de la rougeole. Ce malade avait fréquenté l'hôpital de son arrondissement ce qui a provoqué une éclosion de la rougeole. Parmi les malades les adultes représentaient 71,4% et les personnes revaccinées — 41,4%. Au stade précoce de la maladie dans le sérum sanguin de ces malades ont été révélés les anticorps IgG en haut titre (plus de 3/0 ME/ml) et un taux élevé d'avidité des anticorps IgG (plus de 94,3%) qui témoignait de ce qu'ils avaient été effectivement vaccinés et correspondaient bien au type secondaire. Chez ces malades la période passée après la revaccination était de 15 à 32 ans.

Dans ce groupe chez 67,0% de malades l'affection a évolué en forme légère sans aucune complication signalée. Dans le groupe des personnes non vaccinées les complications ont été signalées chez 30% de malades. L'examen moléculaire génétique de leurs matières biologiques a révélé un seul génotype du virus de la rougeole — D8 Gir Somnath.

En 2018 un seul cas de la rubéole a été enregistré dans le district qui a donné le ratio 0,007 par 100 000 habitants.

Etude d'étiologie de la grippe à Saint-Petersbourg en 2017–2018

La hausse d'incidence de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës en décembre 2016 — février 2017 à Saint-Petersbourg a été sensiblement plus faible que dans la saison épidémiologique précédente (janvier–mars 2016). Le dépassement du seuil épidémique (11 138 cas en une journée) a été enregistré à mi-décembre (12 356 cas en une journée). En mars 2017 l'incidence restait au niveau

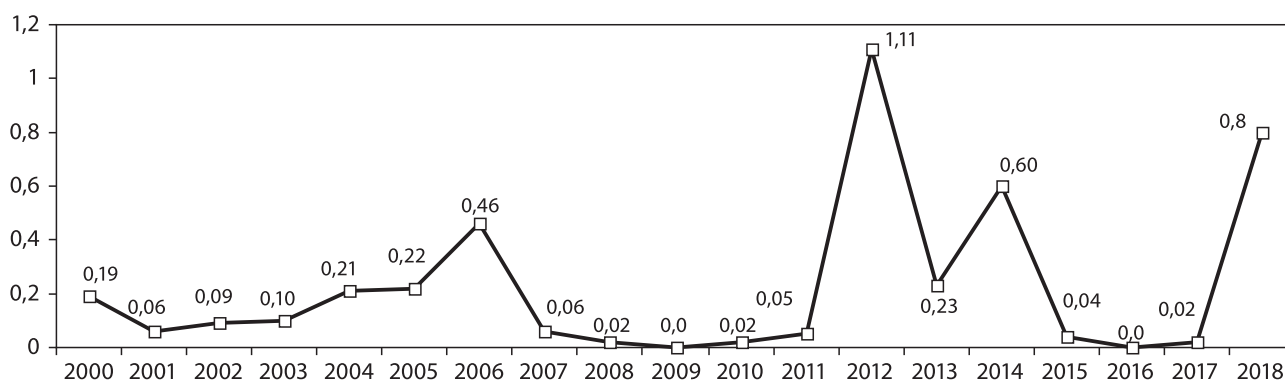


Figure 5. Incidence de la rougeole sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest en 2000-2018 (par 100 000 habitants)

de 8-9 mille cas en une journée. Les résultats des examens virologiques et sérologiques ont démontré qu'en 2017 la hausse saisonnière d'incidence a été conditionnée principalement par la circulation du virus de la grippe A (H3N2) antigéniquement proche à la souche de référence A/Hong Kong/4801/2014 et du virus de la grippe «B» de la variété «Victorienne» génétiquement proche à B/Brisban/60/08.

Pendant la période de l'hiver 2018 le dépassement du seuil épidémique a été enregistré en février et le nombre de cas maximum en mars (12.03.18 — 16 365 cas en une journée), et l'incidence restait toujours élevée pendant la première semaine d'avril (Fig. 6).

Le nombre total de malades de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës à Saint-Petersbourg à partir de la 1-ère et jusqu'à la 20-ème semaine de 2018 a été de 932 684, y compris 820 cas de la grippe confirmés par les examens de laboratoire.

L'analyse de la structure d'âge d'incidence de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës a démontré que les indices les plus élevés à la 11-ème semaine ont été constatés dans la catégorie d'âge de 3-6 ans (maximum 678 cas par 100 000 habitants), dans celle de 0-2 ans (547 cas par 100 000 habitants) et chez les enfants de 7-14 ans (421 cas par 100 000 habitants). L'incidence dans la catégorie d'âge de 15 ans et plus n'a pas été élevée avec 76 cas par 100 000 habitants (Fig. 7)

Tous les cas d'incidence de la grippe manifestaient l'état grave et de gravité modérée et exigeaient une hospitalisa-

tion. Au total depuis le commencement de l'année jusqu'au mai 2018 dans la ville on a hospitalisé 20 880 malades atteints de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës (Fig. 8).

Il a été effectuée une analyse comparée des données de laboratoire de 1152 patients à l'âge de 16 à 91 ans, diagnostiqués «grippe» et «infection respiratoire virale aiguë», admis à l'hôpital des maladies infectieuses de Saint-Petersbourg de janvier à mai 2018. On a prélevé les échantillons de la muqueuse du nez et du mésopharynx aux patients admis avant le 7-ème jour de la maladie pour leur examen ultérieur en méthode PCR et méthode virologique.

Selon les résultats, obtenus par la méthode PCR, les virus de la grippe A(H3N2) dominaient avec la fréquence de leur détection 15,9%. Le virus de la lignée B/Yamagata a été à la deuxième place (14,0%). Les virus de la grippe A(H1N1) pdm09 et B (lignée «Victorienne») ont été détectés chez environ 5% de malades. Les rhinovirus ont été détectés avec la même fréquence.

En janvier-mai 2018 le laboratoire a obtenu 111 écouvillons nasopharyngés des malades diagnostiqués «grippe» et «infection respiratoire virale aiguë» et hospitalisés pour effectuer leur examen virologique. Les échantillons, dont la méthode PCR a confirmé le diagnostic «grippe», ont été passivés sur les cultures cellulaires MDCK conformément aux recommandations.

Après deux passages sur les cultures cellulaires MDCK de 50 échantillons au diagnostic «grippe» confirmé par la mé-

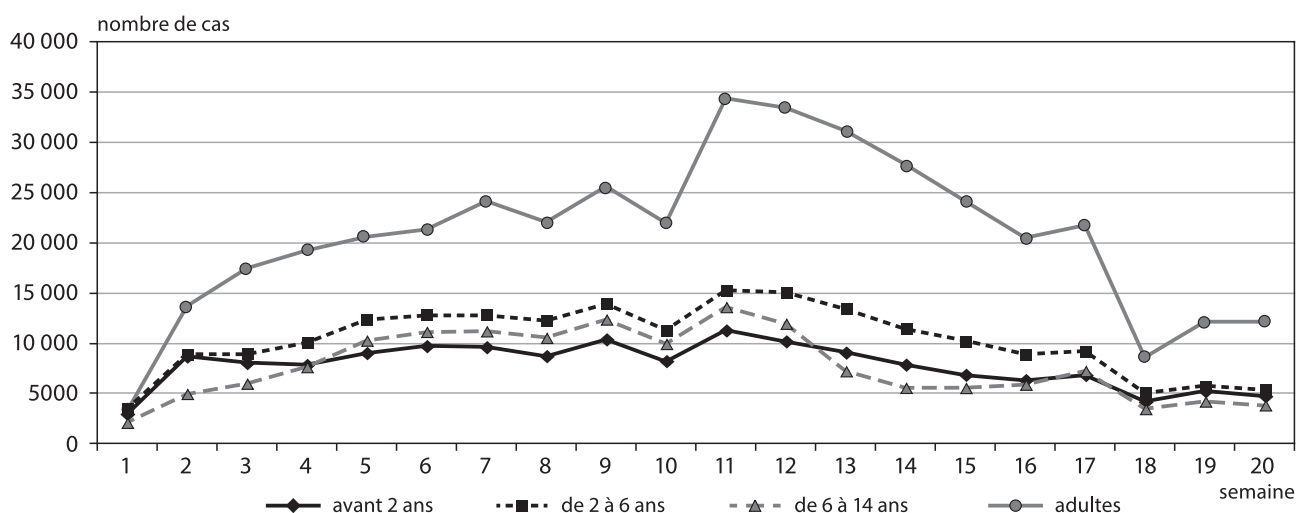


Figure 6. Cas de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës en 2018 à Saint-Petersbourg

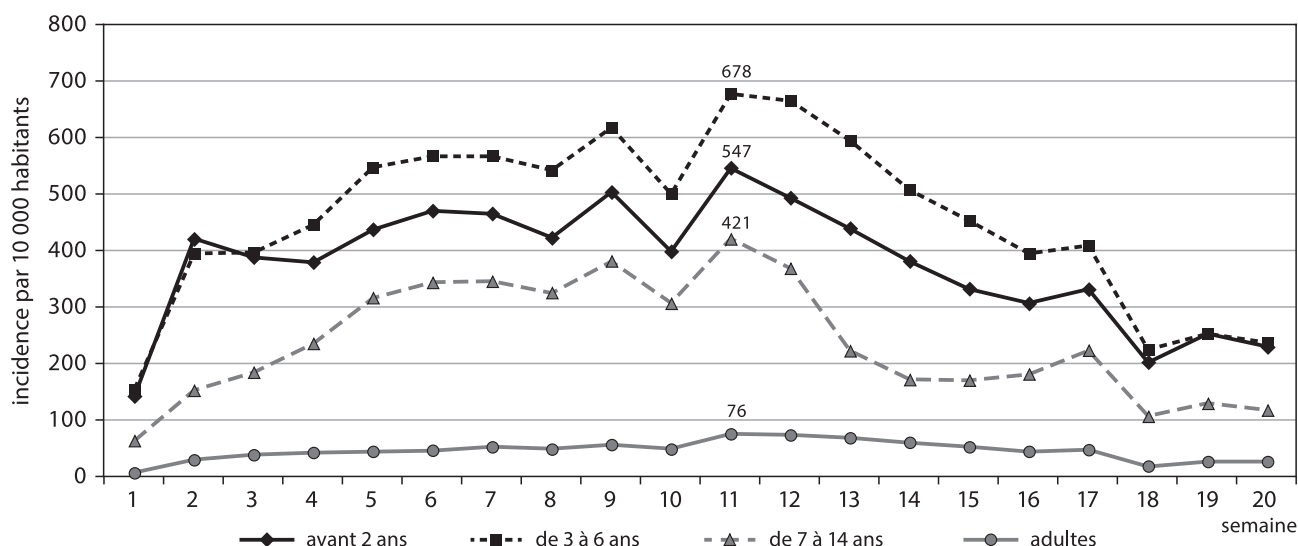


Figure 7. Incidence de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës dans les différentes catégories d'âge pendant la période de la hausse épidémique à Saint-Petersbourg en 2018

thode PCR, ont été isolés et identifiés 26 souches du virus de la grippe. Le typage des isolats des virus de la grippe par les sérums de test diagnostic et sérums actifs contre les souches épidémiques du virus a démontré qu'en janvier-mars 2018 à Saint-Petersbourg ont circulé tous les trois sérotypes du virus de la grippe. Dans 50% de cas ont été identifiés les virus de la lignée B/Yamagata antigéniquement proches de la souche de référence B/Phuket/3073/13. 30,8% d'isolats étaient du sérotype A(H3N2) et antigéniquement proches de la souche A/HK/4801/14 et 19,2% d'isolats étaient très proches de la variante pandémique du virus de la grippe A(H1N1)pdm09.

Parmi les virus de la grippe isolés et identifiés au laboratoire pendant la période épidémique de 2018 on n'a pas détecté le virus B (lignée «Victorienne») qui prévalait dans la circulation aux années précédentes.

A deux virus de la grippe A (H1N1)/SPb/24/18 et B/SPb/9/18 isolés ont été attribués les sérums de rat obtenus par l'introduction intrapéritonéale (5ml) du liquide contenant le virus.

Le sérum obtenu contre le virus B/Spb/9/2018 avait le titre homologué 320. La souche B/Spb/9/2018 a interagi avec les antisérums obtenus contre la variante de la souche de référence B/Phuket/3073/2013 à ½ du titre homologué, ce qui témoigne de l'appartenance de cet isolat au groupe antigénique et génétique Phuket. Ce virus a également interagi à ½ du titre homologué avec les antisérums contre les souches isolées dans les dernières années, à savoir B/Hong Kong/3417/4 et B/Spb/118/17.

Le sérum obtenu contre la variante cellulaire du virus A(H1N1)Spb.24/2018 avait le titre homologué 160. Ce virus a interagi avec l'antisérum obtenu contre la souche de référence A/California/7/09 à ½ du titre homologué. Le virus isolé a également interagi à ¼ du titre homologué avec l'antisérum contre le candidat aux souches de référence A/Michigan/45/15, ce qui témoigne du flux antigénique insignifiant de l'isolat. Le virus A(H1N1)SPb/24/2018 a également interagi avec le sérum contre la souche de référence actuelle A/Israel/Q-504/15 à ½ du titre homologué, ce qui témoigne de leur parenté antigénique.

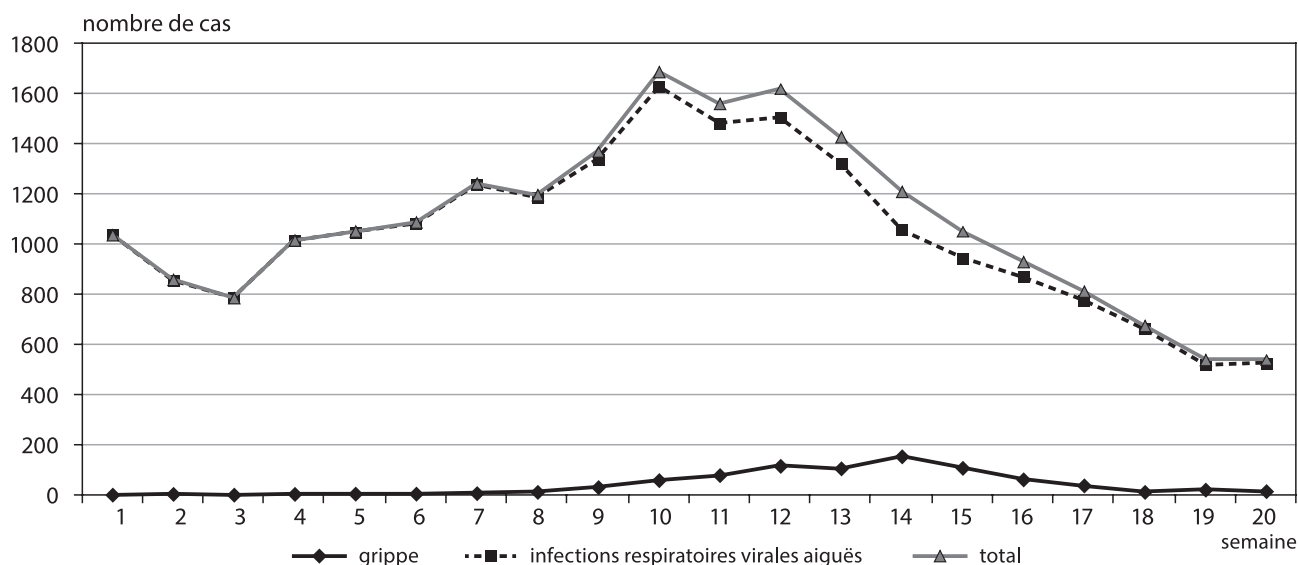


Figure 8. Nombre de personnes atteintes de la grippe et des infections respiratoires virales aiguës hospitalisées pendant la saison épidémique de 2018

Ainsi a été déchiffrée l'étiologie de la hausse épidémique d'incidence de la grippe à Saint-Petersbourg en janvier-mars 2018, conditionnée principalement par les souches du virus de la grippe des deux sérotypes: lignée B/Yamagata et A(H3N2). La forte incidence, surtout parmi les enfants, en 2018 a été due à la non-coïncidence des souches faisant partie du vaccin en 2017 (virus de la lignée B/Yamagata) et celles ayant provoqué la hausse d'incidence de la grippe en 2018 (virus de la lignée B/Yamagata).

L'imprévisibilité de la circulation des deux lignées du virus de la grippe B exige l'introduction des deux variantes dans la composition du vaccin.

Aspects éthiques de prévention vaccinale des infections

L'étude comprend les questions de détection et d'analyse de la composante éthique des différentes étapes de l'ensemble des actions relatives à l'organisation, mise en oeuvre et contrôle des manifestations de prévention immunologique. Les principaux défis éthiques générés par la vaccination sont conditionnés par la nécessité de résoudre la situation conflictuelle entre les intérêts de l'individu et de la société, d'assurer le respect d'autonomie de la personne, garantir le droit du libre choix, l'équité dans la répartition des bienfaits et des risques/dommages, la prise en compte de la variété culturelle et religieuse, les conditions particulières pour les catégories de la population vulnérables, éviter la discrimination, promouvoir l'accessibilité, la responsabilité sociale et la solidarité.

Les situations, qui exigent la mise en pratique des principes éthiques universels susmentionnés, apparaissent pendant tout le processus de vaccination: depuis l'élaboration des vaccins jusqu'à leur utilisation. À titre d'aspect significatif moderne de l'étude ont été posées les questions de régulation éthique et juridique des essais et d'utilisation des vaccins, de recherche de l'équilibre du profit et du risque de leur utilisation et de l'équité dans les questions d'accès à la vaccination égal à tous. Les conclusions éthiques sont basées sur les projets d'auteur étudiant les facteurs de confiance et d'attitude à la vaccination existant dans les différentes catégories de la population, sur la participation aux programmes de l'OMS visant à l'élimination des infections d'actualité et à l'implication au dialogue international de composition et d'interprétation de l'accompagnement éthique de la vaccinoprophylaxie dans le cadre des projets de l'OMS et de l'UNESCO.

Pour la première fois le laboratoire a réalisé une étude de l'algorithme des principes éthiques, agissant lors de la mise en pratique des politiques d'élimination/éradication des infections à l'échelle mondiale, sur l'exemple du programme de l'OMS visant à l'élimination de la poliomyélite. Une analyse d'ensemble, comprenant plusieurs arguments bioéthiques, épidémiologiques, virologiques et socio-juridiques pris en compte dans l'élimination de l'infection, a permis de révéler les éléments de la composante éthique et de démontrer l'importance du respect des principes éthiques pour composer la stratégie d'élimination d'une maladie infectieuse. Les réalités modernes ont suggéré et formulé de nouveaux objectifs dans l'étude de l'authenticité des résultats de l'analyse interdisciplinaire sur l'exemple du programme de l'OMS visant à l'élimination de la rougeole. Le fait du double report des délais de réalisation du plan stratégique de l'OMS visant à l'élimination de la rou-

geole pour la raison du manque de simultanéité dans la mise en oeuvre des manifestations de prévention prouve d'une manière univoque l'importance majeure que revêt l'attachement aux principes éthiques, tels que solidarité et concertation des actions et collaboration de tous les systèmes de gestion et de contrôle. La diversité des situations, dans lesquelles est réalisé le plan stratégique de l'OMS dans les différentes parties du monde et la variété des statuts culturels, sociaux, religieux, économiques et psychologiques des différents groupes de population nécessite l'adhésion aux principes éthiques de vulnérabilité de l'homme, au respect de son intégrité physique, de l'égalité, l'équité, la justice, de la prise en considération de la diversité culturelle et du pluralisme. L'analyse des systèmes d'administration et de gestion à chaque niveau concret d'exécution a révélé la nécessité d'exercer les principes éthiques de protection de la dignité humaine et des droits de l'homme contre toute atteinte, de responsabilité individuelle et sociale, de jouissance collective des bienfaits, de protection des générations futures, de l'environnement, de la biosphère et de la biodiversité. Il a été révélé que tous les objectifs de la mise en pratique des développements scientifiques, aussi bien dans la sphère des pratiques de laboratoire que dans les questions de perfectionnement des vaccins à des différentes étapes de réalisation du programme d'élimination, peuvent être atteints en respectant les principes des pratiques transnationales, d'échange des nouvelles technologies, et de garantie d'accès à l'éducation et à la formation professionnelle en bioéthique. Il est hautement significatif que dans le plan stratégique global de l'OMS a été introduit à titre d'un de ses éléments les plus importants «l'apprentissage de la foi publique et de la demande à l'immunisation» qui témoigne de l'orientation du Plan stratégique de l'OMS à l'application des principes éthiques à toutes les étapes d'adoption des décisions et à leur exécution. Cet élément oblige tous les acteurs participant au niveau professionnel, public et interétatique de maintenir et de développer les relations de solidarité sur la base de la responsabilité individuelle et collective, de l'équité, ouverture et redevabilité civile.

Un autre axe des travaux est l'étude de l'élément éthique au processus de constitution et de réaction au mouvement anti-vaccins. Le principe d'attachement à la responsabilité personnelle dans le respect des normes morales et éthiques justifie la structure de cette section qui l'oriente à la définition de la possibilité d'engager un dialogue permanent avec la société civile en tant que seul participant permanents et adversaires de la vaccination. Une telle possibilité se présente comme une initiative réelle et éthiquement admissible, capable d'opérer une brèche dans la ligne de défense du lobby anti-vaccinal. Du point de vue de l'éthique l'objectif de notre travail consiste en analyse des situations critiques et des erreurs éthiques commises par la vaccination devenue vulnérable et générant elle-même le mouvement anti-vaccinal. Cependant il est important de tenir compte du fait que le degré d'opposition dépend toujours du niveau socio-culturel et politico-économique de la formation sociale-économique. Les causes de la méfiance vis-à-vis de la vaccination ont un caractère multifactoriel et consistent globalement en vulgarisation des doutes du côté juridique et spirituel de l'ingérance pendant la vaccination, d'hyperbolisation/présentation exagérée de l'insécurité des vaccins. Le courant actuel a acquis une nouvelle

particularité — le caractère incontrôlable et, parfois, l'anonymat total de la présentation des informations, la massivité de ses volumes, les délais et la vitesse de sa diffusion grâce à l'utilisation des moyens modernes et, avant tout, de l'Internet. Mais il convient de reconnaître que le mouvement anti-vaccins construit souvent sa politique sur les imperfections de la vaccinoprophylaxie. Le premier objet fondamental de la critique est le fondement scientifique de création des vaccins qui n'est toujours pas parfait, parce que la significativité scientifique et sociale de tout produit de santé est le canon de l'éthique, aussi bien au stade de recherche qu'à celui d'utilisation. Poursuivant le thème de primauté du savoir (cohésion scientifique de l'information), il convient de remarquer encore que la thèse «il est immoral d'ignorer et recommander en même temps» s'adresse aussi bien aux uns qu'aux autres: aux partisans et aux adversaires de la vaccination. Pour résister valablement aux adversaires de la vaccination et gagner la confiance de la société il faut accumuler constamment les connaissances sur les bienfaits/méfaits des vaccins. C'est sur cette base qu'il convient de perfectionner d'une manière opérationnelle les produits et la politique de la vaccination, porter successivement les nouvelles informations à la connaissance de la population pour qu'elle puisse les maîtriser et adopter. En absence des connaissances suffisantes de ce que les produits existants sont fabriqués sur un haut niveau scientifique et technologique, assurant un équilibre optimum des bienfaits/risques, les structures responsables de la politique de vaccination peuvent éventuellement adopter la décision d'arrêter ou de suspendre l'utilisation d'un vaccin jusqu'à l'élimination du risque par le perfectionnement prioritaire du produit. En dehors de la perfection scientifique du produit du point de vue de l'équilibre entre risques et profits, une perfection doit être atteinte aussi dans l'opportunité de son utilisation dans une catégorie concrète de la population dans des conditions socio-économiques et épidémiques concrètes. L'exemple en est la nécessité d'étude minutieuse de la charge de l'infection dans un pays concret avant la mise en pratique du produit vaccinal. Toutes ces occurrences témoignent non seulement de la nécessité de fournir les informations véridiques et objectives, mais, s'appuyant sur le facteur envisagé, d'assurer également une approche scientifique à la vaccination, soulignant une fois de plus que la base scientifique de la vaccination doit être globale, absolue visant à atteindre un vaste ensemble d'objectifs. La responsabilité scientifique assumée par l'Etat comprend:

la qualité du produit, l'étude de la charge de l'infection, l'état de l'immunité collective, la connaissance de la pathogénèse des effets indésirables et leur traitement, l'étude de l'éventail socio-culturel de la population, l'élaboration des programmes spécialisés de formation adressés aux spécialistes, les médias, les relations avec le monde associatif. Une telle approche est aussi au plus haut point importante du point de vue de son ouverture à la société et, surtout, du développement de la confiance des différentes couches de la société civile s'appuyant sur une étude minutieuse de l'efficacité d'utilisation des différents vaccins contre les différentes maladies chroniques, sur l'étude de la structure et de la pathogénèse de développement des effets indésirables et des complications après la vaccination, sur l'élaboration et l'argumentation des protocoles thérapeutiques de traitement des enfants atteints des complications post-vaccinales. C'est ce fondement scientifique et l'accessibilité de tout l'ensemble des manifestations qui jouent un rôle incomparablement plus important dans la propagande de la levée des obstacles au développement de la confiance à la vaccination, diminuant réellement le champ de ses contre-indications en étendant la vaccination sur les patients atteints des affections chroniques et qui sont les plus vulnérables du point de vue du danger de l'infection. D'autre part il est indispensable de créer un espace informationnel ouvert entre les organismes, responsables de la vaccination, et la société civile. Avec, comme fondement, une ferme conviction que toute information secrète (d'autant plus visant aux actions globales à l'égard des grandes masses de la population) fait naître la méfiance et la corruption libérant le champ aux informations alternatives utilisées en pratique par le mouvement anti-vaccins. Ainsi sont définis les essentiels principes éthiques d'opposition au lobby anti-vaccinal par la construction d'un dialogue avec la société civile: la solidarité, la coopération, l'égalité en droits, l'équité (individuelle et sociale).

On peut retenir, comme conclusion, la thèse de ce que pour assurer la victoire dans la confrontation entre la vaccination et le mouvement anti-vaccins dans le monde moderne il convient, répondant aux principes éthiques d'accomplissement des obligations professionnelles, de remplir le vide informationnel de la méfiance par le dialogue ouvert avec la société. Il est important de comprendre qu'il ne s'agit pas tellement de la lutte d'une faction contre l'autre que plutôt du passage sensé et progressif des adversaires de la vaccination dans le camp de ses partisans.

Publications

1. Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2 // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (1): 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-79-84
2. Bashketova N.S., Chkyhindzheriya I.G., Bichurina M.A., Krainova T.I., Bryanceva E.A., Lavrentyeva I.N., Suhobaevskaya L.P., Degtjarev O.V., Demakova T.E. Epidemic rise in the incidence of influenza in St. Petersburg in 2016 // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (3): 303–308. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-303-308
3. Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Golitsyna L.N., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P., Bataeva A.Yu., Baryshnikova A.S., Novikova N.A. Nonpolio enteroviruses which caused the rise of enterovirus infection on some territories of Russia in 2016 // *Journal of Infectology*. 2017; 9 (3): 98–108. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-98-108
4. Kubar O., Glasa J., Glasova H. Good ethical practice in vaccine research // *Russian Journal of Bioethics*. 2017; 1 (19): 19–23.
5. Kubar O. Compliance mechanisms and conditions available in Russia to ensure adherence to ethical guidelines // *Russian Journal of Bioethics*. 2017; 2 (20): 32–35.
6. Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R. Prevention of infection's re-emergency on the final stage of poliomyelitis eradication // *Ensuring epidemiological welfare: challenges and solutions: Materials of XI Congress of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists Society, Moscow, 16–17th of November 2017*: 80–81.

7. Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Timofeeva E.V. Characteristic of laboratory diagnostic of measles in vaccinated patients // Ensuring epidemiological welfare: challenges and decisions: Materials of XI Congress of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists Society. Moscow, 16–17th of November 2017: 456.
8. Bryantseva E.A., Bichurina M.A., Lvov N.I. Influenza etiology in Saint-Petersburg in 2013–2016 // Ensuring epidemiological welfare: challenges and solutions: Materials of XI Congress of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists Society. Moscow, 16–17th of November 2017: 261–262.
9. Romanenkova N., Rozaeva N., Joffret M.-L., Kanaeva O., Delpeyroux F., Bichurina M. Risks provoking re-emergence of poliomyelitis in polio free countries // The 7th Wuhan International Symposium on Modern Virology. Wuhan, China: 2017: 49–50.
10. Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Kanaeva O.I. Measles in the North-Western region of Russia, difficulties of diagnostics during sporadic level of morbidity: Analytic review. St. Petersburg: Pasteur Institute, 2017: 76.
11. Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I. Enterovirus infection on some territories of the Russian Federation in 2017 // Morbidity, etiology and prevention of enterovirus infection. Information bulletin. 2018; 5: 23–26. URL: <http://www.nniiem.ru/file/razrabotki/2018/byulleten-evi-2017-n5-may-18-1.pdf>
12. Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Kulyashova L.B., Totolian Areg A. Comparative study of different ELISA test-systems for detection of IgM antibodies against measles virus in different geographic zones. Preliminary results // Russian Journal of Infection and Immunity. 2018; 8 (2): 230–234. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-230-234
13. Kubar O.I., Mikirtichan G.L., Sedova N.N., Likhtshangof A.Z. Competent participation of Russian medical centers in UNESCO'S programs for training and information in the field of bioethics // Russian Journal of Bioethics. 2018; 2 (22): 25–29.
14. Kubar O.I., Mikirtichan G.L., Asatryan H.Zh. Ethical conception of the countermeasures towards anti-vaccination movement // Medicine and Health Care Organization. 2018; 3 (1): 41–48.
15. Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N. Implementation of the World Health Organization Western Pacific Regional Plan of Action for Measles Elimination // Russian Journal of Infection and Immunity. 2018; 8 (4): 465–472.
16. Lukashev A.N., Golitsina L.N., Vakulenko Y.A., Akhmadishina L.V., Romanenkova N.I., Sapega E.Yu., Morozova N.S., Novikova N.A., Trotsenko O.E., Ivanova O.E. Current possibilities and potential development of molecular enterovirus surveillance. Experience of the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity. 2018; 8 (4): 452–464.
17. Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Zverev V.V., Sozonov D.V., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P., Ermakova M.V., Kamynina L.S., Petukhova M.B., Gritsay A.B., Novikova N.A. Enterovirus infection morbidity and peculiarities of nonpolio enteroviruses circulation on some territories of Russia in 2017 // Journal of Infectology. 2018; 10 (4): 124–133.
18. Kubar O., Bichurina M., Romanenkova N. Ethical principles for infectious diseases eradication // Journal of Vaccines & Vaccination. 2018; 9: 77.
19. Romanenkova N., Bichurina M., Rozaeva N. Vaccination — the key strategy of the global eradication of poliomyelitis // Journal of Vaccines & Vaccination. 2018; 9: 79.
20. Ethics of vaccination. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute, 2018: 176.
21. Poliomyelitis and other acute flaccid paralyses among children: epidemiology, clinical symptoms, diagnostics, therapy and prevention: Manual // Ed. Skripchenko N.V. Saint-Petersburg, 2018: 108.
22. Bichurina M.A., Romanenkova N.I., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Kubar O.I., Terentieva Zh.V. 20 years in Global Polio Eradication Initiative: Analytical review. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute, 2018: 88.

LABORATOIRE DE VIROLOGIE EXPERIMENTALE

Chef du laboratoire: I.N. Lavrentieva

Chercheurs permanents: V.V. Zarubaev, A.Y. Antipova, A.V. Slita, A.V. Galochkina, R.A. Kadyrova, S.V. Belyayevskaya, E. Sinegubova

Cocontractants: A.V. Semenov, M.A. Bichurina, Yu.V. Ostankova, I.V. Khamitova

En 2017–2018, les recherches du Laboratoire de virologie expérimentale ont été menées selon les axes de recherche suivants:

1. Description des isolats de B19 parvovirus circulant dans les unités territoriales du district fédéral du Nord-Ouest de la Fédération de Russie;

2. Étude de la prévalence des marqueurs de l'infection parvovirale dans les groupes à risque;

3. Étude de l'immunité communautaire contre la rougeole dans la population de la République de Guinée;

4. Étude de l'activité antivirale des préparations de camphre.

1. Caractéristiques des isolats de Parvovirus B19 circulant dans le territoire Russe

Le but de nos travaux était le génotypage et la caractérisation génétique moléculaire du PVB19, répandu dans le nord-ouest de la Russie.

Matériels et méthodes

Dans l'étude, des échantillons de sang négatifs pour les anticorps IgM anti-rougeole et rubéole reçus par le Centre régional de surveillance de la rougeole et de la rubéole dans le district fédéral du Nord-Ouest de la Fédération de Russie (NWFD) et provenant de 821 patients présentant une éruption maculo-papuleuse en 2009–2017 ont été examinés.

La détection des anticorps IgM contre PV B19 a été réalisée par ELISA à l'aide de kits de diagnostic (EUROIMMUN, Allemagne). La détermination quantitative de l'ADN de PVB19 dans les échantillons a été réalisée par PCR. Des paires d'amorces superposées du locus (NS1-VP1u) de la structure suivante ont été utilisées pour le génotypage: PVB191F: CAATTGTCACAGACACCAGTA; PVB192F: CCCGCGCTCTAGTACGCCCA; PVB191R: ACTTAGCCAGTTGGCTATACCT; PVB192R: TTGCGGGGGCCAGCTTGTA. La réaction de séquençage a été effectuée en 3 lectures sur des amorces directes et inverses.

Résultats

Des anticorps IgM anti-PVB19 ont été détectés dans 139 échantillons (16,9%); l'ADN de PVB19 a été détecté chez 59 patients séropositifs (42,4%). Dans 54 échantillons, la charge virale dépassait 10^4 copies/ml.

Pour évaluer l'hétérogénéité des isolats, 14 échantillons ont été prélevés sur des patients de régions géographiquement éloignées de la DNF, d'âges différents, sans distinction de sexe, avec une charge virale élevée (10^6 – 10^7 copies/ml), dont 1 isolat importé de la La région de Moscou.

L'analyse phylogénétique a montré que tous les isolats appartenaient au génotype 1A. Dans ce cas, les séquences de nucléotides peuvent être divisées en deux sous-groupes: 13 isolats (92,8%) appartiennent au sous-groupe 1A2, un isolat au sous-groupe 1A1 (Fig. 9).

La comparaison des séquences de nucléotides de différentes souches a révélé un niveau d'identité élevé. Suivant

la comparaison de paires, l'identité de nucléotide des isolats du sous-groupe 1A2 variait de 98,3 à 100%.

Par rapport à l'isolat de référence NC_000883 (Genbank), on a trouvé entre 1 et 10 substitutions de mutation dans les séquences de nucléotides. Dans la région étudiée du gène NS1, des substitutions d'acides aminés de F554L dans les isolats MF481196, MG711455, MF408298, JX644429 et F554S dans l'isolat MF405142 ont été détectées par rapport à l'isolat de référence NC_000883. Dans le gène VP1 des isolats étudiés, 1 à 5 substitutions d'acides aminés ont été détectées: E14K, Q21H, V30L, S98N, D107N, Q124P.

Discussion

Ainsi, les isolats largement représentés dans le monde entier ainsi que les isolats caractéristiques du nord-ouest du continent eurasiatique ont été identifiés. Tous ces cas ont été mis en évidence en 2010–2011 chez nos patients et dans les années 2005–2011 dans les travaux d'autres groupes de recherche, ce qui indique la circulation virale continue. Cependant, un certain niveau de regroupement de virus par année peut indiquer des importations répétées de virus ou un réservoir renouvelable de l'agent pathogène. Les isolats identifiés en 2014–2017 présentaient des substitutions uniques de nucléotides et d'acides aminés non encore représentées dans la base de données internationale Genbank, y compris le seul isolat obtenu en 2014 et appartenant au groupe B19 1A1 importé de la région de Moscou.

La mise en œuvre du dépistage du B19 chez les patients présentant une fièvre/une éruption cutanée peut fournir des informations importantes sur la prévalence de l'infection à parvovirus. L'application systématique de la phylogénétique moléculaire dans l'analyse des isolats de parvovirus B19 aidera à comprendre l'épidémiologie du processus infectieux et à identifier les caractéristiques de la propagation du virus et de ses génovariants.

2. Étude des marqueurs de la répartition des infections paraboveriques dans les groupes à risque

2.1. Impact de la coinfection du PVB19 sur le cours et le pronostic du paludisme causé par le *Plasmodium falciparum*

L'infection à parvovirus complique l'évolution des maladies accompagnées de déficiences immunitaires (oncologiques, hématologiques, etc.). Selon plusieurs auteurs, l'infection à PVB19 peut aggraver l'évolution du paludisme.

Le paludisme est une maladie parasitaire à transmission vectorielle causée par les protozoaires du genre *Plasmodium*, répandu dans les pays d'Afrique équatoriale, d'Asie du Sud-Est, d'Océanie, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Le problème du paludisme est particulièrement urgent pour l'Afrique subsaharienne. Ce territoire représente 90% des cas et 92% des décès dus au paludisme dans le monde. Selon l'OMS, 815 000 cas de paludisme confirmé en laboratoire ont été détectés en République de Guinée (GR)

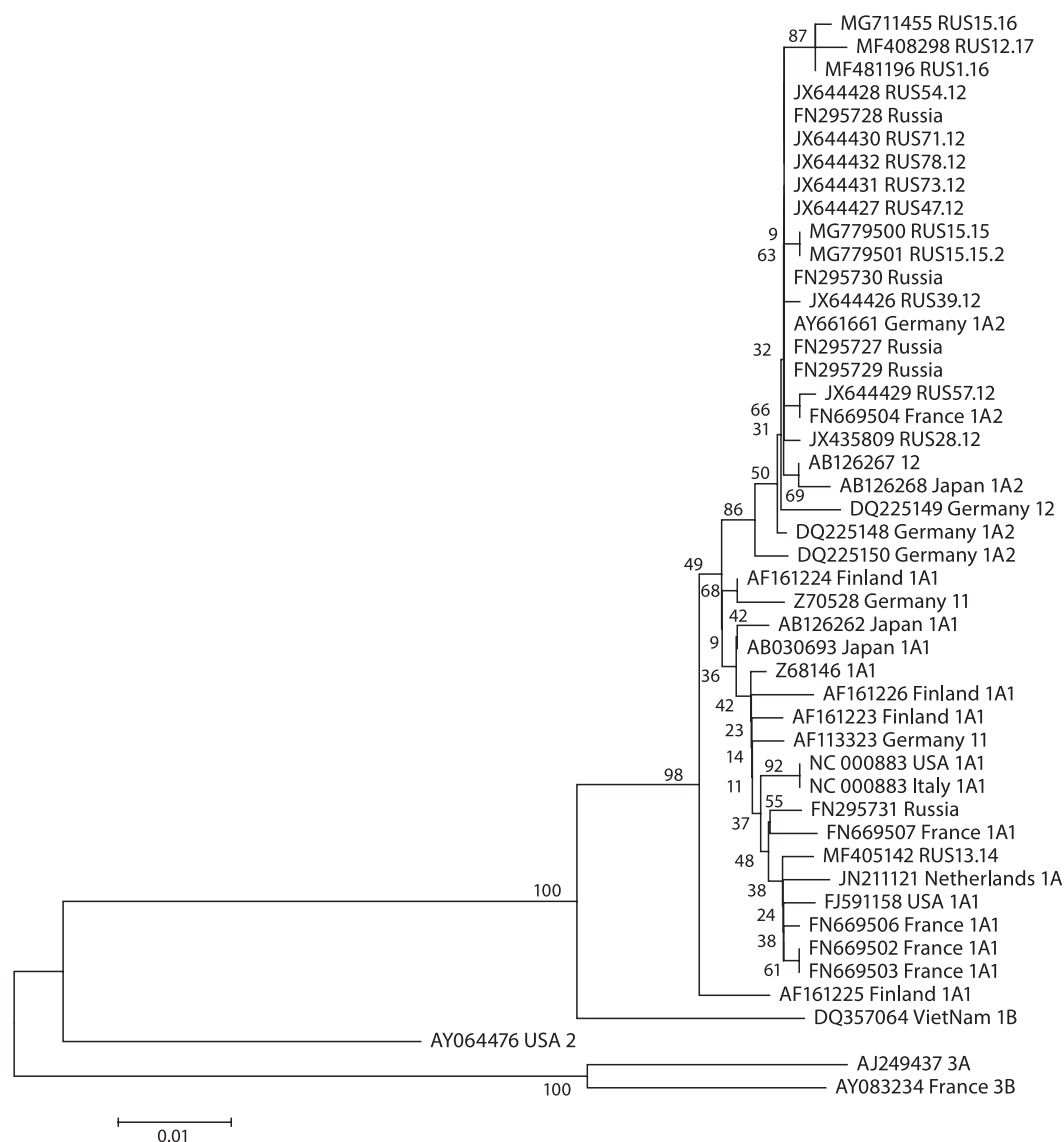


Figure 9. Dendrogramme des relations phylogénétiques entre les isolats de PVB19 étudiés extraits de patients du district fédéral du Nord-Ouest et les séquences de référence présentées dans GenBank

en 2015. La maladie se manifeste par une fièvre cyclique, des paroxysmes fébriles, un syndrome hépatorénal et anémique. Les complications graves du paludisme entraînant la mort peuvent être un œdème cérébral, un coma cérébral (paludisme), une insuffisance splénique et rénale, un syndrome de coagulation intravasculaire disséminée (syndrome de CIV), une hémolyse massive aiguë, une hémoglobinurie, un syndrome hémorragique.

L'objectif de la présente étude était d'évaluer l'effet de l'infection à parvovirus B19 sur l'évolution clinique du paludisme et sur l'évolution de la maladie sous-jacente.

Matériels et méthodes

Au cours de la période 2016–2018, des échantillons de plasma sanguin de 316 patients de l'hôpital de la préfecture de Friya en République de Guinée (GR) présentant un diagnostic confirmé de paludisme ont été examinés pour rechercher la présence d'ADN de PVB19. L'ADN PVB19 a été détecté par PCR à l'aide des ensembles de réactifs Ampli-primé «RIBO-prep» et «AmpliSens® Parvovirus B19-FL» (Institution centrale d'épidémiologie, Rospotrebnadzor, Russie), conformément aux instructions du fabricant.

Le traitement statistique des résultats a été effectué à l'aide de l'analyse des distributions de fréquence et des tables de conjugaison du logiciel GraphPadInStat 3. La signification des différences et l'intervalle de confiance ont été déterminés par le test t de Student. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,01$.

Résultats

L'évolution clinique du paludisme chez 316 patients examinés a été divisée en groupes: modérée ou compliquée. Une évolution modérée du paludisme a été identifiée chez 177 patients ($56,01 \pm 2,79\%$). Cette forme de maladie se caractérisait par une fièvre avec une température ne dépassant pas 39°C , une faiblesse générale et une anémie modérée (concentration en hémoglobine supérieure à 70 g/l). 139 patients ($43,99 \pm 2,79\%$) ont manifesté l'évolution compliquée du paludisme accompagnée d'une fièvre jusqu'à 40°C , de nausées, de vomissements, d'une anémie sévère (concentration en hémoglobine inférieure à 70 g/l), de taux élevés de transaminases, créatinine, et de diminution de la protéine totale dans le sang. Dans 8 cas ($2,53 \pm 0,88\%$), l'évolution sévère de la maladie a entraîné une issue fatale.

Tableau 6. Effet de l'infection par le parvovirus B19 sur l'évolution du paludisme chez des patients de la préfecture de Fria en République de Guinée

Evolution du paludisme	Nombre de patients	Présence de PV19 DNA	
		Positive (abs./%)	Négative (abs./%)
Modérée	177/56,01±2,79%	15/27,27±2,75%	162/62,07±3,0%
Complicquée	139/43,99±2,79%	40/72,73±2,75%	99/37,93±3,0%
Issue fatale	8/2,53±0,88%	6/10,91±4,40%	2/0,77±0,54%
Total	316/100%	17,41±2,13%	261/82,6±2,13%

Les échantillons de plasma de patients atteints de formes modérées et compliquées de paludisme ont été testés pour la présence d'ADN de PVB19. Les résultats font l'objet de la Tabl. 6.

Au total, l'ADN de PVB19 a été détecté dans le plasma sanguin chez 55 des 316 patients (17,41±2,13%). Dans les deux groupes de patients, positifs et négatifs, à PVB19, se présentaient des cas d'évolution modérée et compliquée ainsi que des issues fatales. Cependant, dans le groupe co-infecté par PVB19 et *P. falciparum*, les taux de complications et de mortalité étaient significativement plus élevés. En effet, des complications ont été observées chez 40 patients sur 55 (72,73±2,75%), et dans 6 cas sur 55 (10,91±4,40%), la maladie a entraîné la mort. Dans le groupe des patients atteints de paludisme sans IVP, des complications sont survenues chez 99 des 261 patients (37,9±3,0%); dont 2 (0,77±0,54%) sont décédés. Ainsi, la probabilité de développer une évolution compliquée du paludisme avec une co-infection est significativement plus élevée qu'en l'absence d'IVP ($p < 0,0001$; RR = 1,917; IC à 95%: 1,532 to 2,399).

Pour étudier la structure d'âge des patients atteints de paludisme, ils ont été répartis en sept groupes d'âge: 0–5, 6–10, 11–15, 16–25, 26–45 et 46–65 ans (Tabl. 7). On constate que le groupe le plus nombreux dans la structure des patients atteints de paludisme est représenté par les enfants de moins de 5 ans (médiane 3) (89, ou 28,25±2,53%). Le moins de cas de paludisme se situe dans le groupe d'âge de 46 à 65 ans (médiane 57 ans): 17 cas, soit 5,4±0,71%. Il est à noter que l'ADN de PVB19 dans le plasma sanguin des patients de ce groupe n'a pas été détecté.

Dans les autres groupes d'âge de patients atteints de paludisme, la présence d'ADN de PVB19 dans le plasma sanguin est caractérisée par les taux suivants: chez les enfants de moins de 5 ans (médiane à 3 ans), elle a été détectée chez 17,98±4,07% des patients; dans le groupe de 6 à 10 ans (médiane de 8 ans), le taux de détection a augmenté à 28,85±6,28 et a atteint un maximum de 34,29±8,02% dans le groupe de 11 à 15 ans (médiane de 13 ans). Ces résultats indiquent une large prévalence de l'infection à parvovirus

chez les enfants et les adolescents et correspondent aux données disponibles dans la littérature. Chez les patients âgés, cette valeur a été réduite à 15,38±5,0% dans le groupe des 16–25 ans (médiane à 20 ans), à 5,71±3,22% dans le groupe des 26 à 45 ans (médiane à 36,5 ans) et à zéro dans le groupe d'âge de 46 à 65 ans (médiane de 57 ans). La gravité du paludisme associé au PVB19 a été analysée dans différents groupes d'âge. Les résultats sont résumés dans le Tabl. 8.

Selon les résultats présentés, le nombre maximum de cas de paludisme compliqué avec PVI ($n = 15$) a été observé chez les patients de moins de 5 ans, où il représente 93,75±6,05% des cas, contre 27,27±7,04% chez tous les patients positifs au PVB19. La probabilité de développer une évolution compliquée du paludisme avec une co-infection dans ce groupe est significativement plus élevée qu'en l'absence d'IVP ($p < 0,0001$; RR = 2,44; IC à 95%: 1,780–3,357). Il est important de noter que 6 décès sur 8 surviennent dans ce groupe, ce qui est significativement plus élevé qu'en l'absence d'infection par le PV B19 ($p = 0,0003$, RR = 13,688, IC 95%: 3,034–61,740). Avec l'augmentation de l'âge, l'incidence de l'évolution compliquée du paludisme combiné PVI diminue, même si la tendance persiste chez les moins de 26 ans. Ainsi, chez les patients âgés de 6 à 10 ans, le paludisme compliqué a été enregistré chez 18,18±5,75% des personnes infectées par le PV B19; dans le groupe des 11–15 ans — dans 14,55±5,14% des cas; chez les personnes de 16 à 25 ans dans 9,09±4,07% des cas. Cependant, les différences d'évolution du paludisme entre patients infectés et non infectés par le parvovirus B19 ne sont pas statistiquement fiables dans tous ces groupes d'âge.

Discussion

Il est connu que, chez les individus séronégatifs présentant une primo-infection, le parvovirus en phase aiguë peut provoquer une défaillance de la formation des érythrocytes pendant 5 à 7 jours, ce qui entraîne une diminution significative de l'hémoglobine. Les érythrocytes sont également la cible principale du plasmodium du paludisme, qui se mul-

Tableau 7. Répartition par âge des patients atteints de paludisme et présentant une infection parvovirale combinée

Tranche d'âge, ans	Nombre de patients (abs./%)	Positifs à PVB19 (abs./%)
0–5	89/28,25±2,53	16/17,98±4,07%
6–10	52/16,51±2,09	15/28,85±6,28%
11–15	35/11,11±1,77	12/34,29±8,02%
16–25	52/16,51±2,09	8/15,38±5,00%
26–45	70/22,22±1,16	4/5,71±3,22%
46–65	17/5,40±0,71	0/0,0%
Total	315/100%	55/17,46±2,14%

Tableau 8. Évolution modérée et compliquée du paludisme associée à l'infection à parvovirus B19 dans différents groupes d'âge

Age, ans	Maladie modérée, abs./%	Maladie compliquée, abs./%
0–5	1/1,82±1,80%	15/27,27±7,04%
6–10	5/9,09±3,88%	10/18,18±5,75%
11–15	4/7,27±3,50%	8/14,55±5,14%
16–25	3/5,45±3,06%	5/9,09±4,07%
26–45	2/3,64±2,52%	2/3,64±2,57%
46–65	0/0,0%	0/0,0%
Total ($n = 55$)	15/27,27±6,01%	40/72,73±11,50%

tiplie à l'intérieur et les détruit, provoquant ainsi une anémie de gravité variable. Selon plusieurs auteurs, l'infection à PVI survient après la baisse de l'immunité cellulaire causée par *P. falciparum*. Il a été prouvé que dans les régions où le paludisme est sévère, les formes graves d'anémie sont la principale cause de mortalité infantile. Ainsi, l'anémie grave est considérée comme la cause de décès infantile associé au paludisme dans 17 à 54% des cas.

Nos résultats sont en corrélation avec les données d'autres chercheurs qui ont étudié le paludisme associé à l'IVP chez les enfants des régions d'endémie palustre: chez les enfants de moins de 5 ans, la majorité absolue des cas d'IVP était accompagnée d'une évolution compliquée du paludisme.

Sachant que, selon des études, dans les pays africains 50 à 90% de la population à l'âge de 6 ans possède des anticorps IgG anti-PVB19, et suivant les résultats obtenus, on peut supposer que la probabilité d'évolution compliquée du paludisme associé à l'IVP dépend de l'âge du patient. Plus le patient est âgé, plus la probabilité d'immunité au parvovirus est élevée, et donc moins influente est l'infection associée.

En revanche, l'infection primaire à parvovirus, qui survient généralement dans la petite enfance, est aiguë et peut aggraver l'évolution du paludisme, en particulier lorsqu'elle est associée à d'autres conditions défavorables (carence en fer, malnutrition, infections à helminthes, co-infections, etc.). Ainsi, l'infection par PVB19 devient un facteur critique pouvant provoquer une anémie grave qui met la vie en danger, ainsi que d'autres complications.

En général, les résultats de cette étude indiquent que l'infection à parvovirus a une grande importance médico-sociale dans les pays où le paludisme est endémique.

2.2. Incidence de Parvovirus B19, réponse d'anticorps spécifique et récupération hématopoïétique retardée après la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogènes

Le parvovirus B19 (PVB19) est un petit virus à ADN bien connu du genre *Erythrovirus* qui est associé depuis des décennies aux pédiatres et qui est associé à des troubles de l'érythropoïèse, des arthropathies, une myocardite et d'autres affections cliniques invalidantes (Asano, Yoshikawa, 1993). Le PVB19 présente une affinité pour l'antigène du groupe P des globules rouges, avec des quantités moindres dans le plasma sanguin (Lee et al., 2011). On pense que le principal effet hématotoxique du virus se produit au stade pronormoblaste, provoquant ainsi l'arrêt de la différenciation érythroïde. Le PVB19 a parfois été détecté dans les anémies aplasiques et les aplasies érythrocytaires pures (Urban et al., 2011). À cet égard, la plupart des études portaient sur des cas d'anémie résistante chez des patients soumis à une transplantation rénale où le PVB19 n'était pas une découverte rare (Egbuna et al., 2006).

Au cours des dernières années, de nombreux cas de myocardite et d'hépatite graves ont été associés à une infection à parvovirus, en raison de la présence positive d'antigène PVB19 ou d'ADN dans les tissus affectés. Pendant ce temps, une persistance latente de PVB19 était assez fréquente dans la peau, les tissus synoviaux, le myocarde et la moelle osseuse (Corcioli et al., 2008). L'ADN viral était détectable dans le sang périphérique de 5% des donneurs en bonne santé (Gama et al., 2017). Les auteurs suggèrent que le risque de transmission virale donneur-receveur lors

de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) est faible.

Après la HSCT allogénique, on observe l'activation régulière des virus de l'herpès et d'autres agents pathogènes latents, en raison d'une myélosuppression aiguë et d'un déficit immunitaire cellulaire (Chukhlovina, Pankratova, 2017). La signification clinique du PVB19 chez les patients immunodéprimés n'a pas encore été correctement évaluée. Par exemple, une étude prolongée de la charge virale en PVB19 a été réalisée chez 53 patients après allo-HSCT par PCR quantitative (Rahiala et al., 2013). L'ADN viral spécifique était détectable dans le sérum sanguin chez 30% des bénéficiaires de la HSCT, soit avant, soit après la HSCT, à la charge virale maximale observée 2 mois après la greffe. Cependant, les patients atteints de PVB19 détectable ne présentaient pas de symptômes cliniques spécifiques pouvant être attribués à une infection à parvovirus.

La question du diagnostic optimal du PVB19 chez les patients hématologiques lourdement traités n'est pas encore claire puisque, selon Lundqvist et al. (1999), les résultats des tests sérologiques (anticorps sériques IgM et IgG) ne correspondaient pas à la détection de l'ADN viral dans le sérum sanguin ou dans la moelle osseuse des sujets HSCT.

L'objectif de notre travail était donc de comparer les niveaux d'ADN du PVB19 avant la HSCT allogénique et un à deux mois après la greffe, ainsi que de rechercher des corrélations avec des taux d'anticorps spécifiques et des taux de récupération hématopoïétique dans les 60 jours suivant l'allo-HSCT. Nos données préliminaires indiquent une signification pronostique de la détection de l'ADN du parvovirus et de l'augmentation des taux d'anticorps en tant que prédicteurs possibles du retard de la prise de greffe et de la neutropénie fébrile.

Patients et méthodes

L'étude couvrait soit 54 enfants et adolescents âgés de 7,2 ans en moyenne (0,6 à 19 ans), au diagnostic initial d'une maladie maligne de l'hématopoïèse ou de troubles héréditaires, qui avaient reçu une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT). 51 patients de ce groupe ont été observés pendant au moins 2 mois (60 jours) après la HSCT. La sélection des patients pour l'allo-HSCT, le choix des schémas de conditionnement et la prévention de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte ont été effectuées conformément aux recommandations actuelles de l'EBMT. La majeure partie de ce groupe était représentée par les patients atteints de leucémie myéloblastique aiguë (LMA, n = 16; 30%) et de leucémie lymphoblastique aiguë (LAL, n = 14; 26%); ainsi que d'anémies sévères (ASA) d'origine différente (13%; n = 7). 33% des patients étaient en première rémission après un traitement antérieur.

La moelle osseuse a été utilisée comme source de cellules souches hématopoïétiques dans 83% des cas (45 patients sur 54), une perfusion de cellules souches périphériques a été appliquée dans les autres cas. Un allo-HSCT provenant de donneurs non apparentés a été réalisé dans 45% des cas (24 sur 54); une greffe de donneurs apparentés ou une greffe haplo-identique a été réalisée chez respectivement 20% (11/54) et 35% (19/54) des patients. Un conditionnement d'intensité réduite a été utilisé dans presque tous les cas (51 patients sur 54). Le développement de la GvHD aiguë au début de la période suivant l'allo-HSCT a été observé chez 25 patients, dont 9 présentaient une GvHD de grade 3–4.

Les examens réguliers des patients avant et après HSCT étaient effectués selon un protocole clinique local standard. L'étude a été approuvée par le Conseil local des institutions de l'Université de médecine I. Pavlov de Saint-Petersbourg. Les études de laboratoire comprenaient des numérations globulaires et une biochimie sérique, des analyses d'urine, etc. La numérotation de l'ADN du PVB19 ainsi que des virus de l'herpès (CMV, EBV, HSV) et des polyomavirus (BK, JC) dans le plasma sanguin a été réalisée avant le traitement de conditionnement précédant l'allo-HSCT, ainsi qu'au jour+30 (J+30) et jour+60 (J+60) post-greffe. L'extraction de l'ADN à partir des échantillons et l'évaluation quantitative de l'ADN de PVB19 dans les échantillons ont été réalisées par PCR avec des sondes fluorescentes spécifiques à l'aide des kits d'amplification AmpliPrime et Amplisens® Parvovirus B19-FL (Moscou, Russie). De plus, la numérotation des anticorps IgM et IgG dirigés contre le PV B19 a été réalisée au moyen d'un test ELISA 0, +30 et +60 jours après la greffe, à l'aide de kits Anti-Parvovirus B19 ELISA IgM et Anti-Parvovirus B19 ELISA IgG (EUROIMMUN, Allemagne). Les kits de diagnostic ont été utilisés conformément aux instructions. L'évaluation statistique des données a été réalisée avec un progiciel Winstat.

Résultats

Changements des taux d'ADN de PVB19 et des anticorps anti-PVB19 liés aux greffes

Le contenu pré-transplantation de l'ADN du PVB19 et des anticorps IgG dirigés contre le virus présentait une dispersion à large spectre (Tabl. 9). Le PVB19 n'a été trouvé que chez 31,5% des patients de ce groupe. Parallèlement, 68% des patients ont présenté une augmentation des taux d'anticorps IgG anti-PVB19 (> 10 UI/ml), reflétant ainsi la prévalence élevée de la réponse immunitaire adaptative. Cepen-

dant, le contenu moyen de l'ADN de PVB19 avant la greffe ne corrélait ni à l'âge des patients, ni au statut clinique de la maladie, à l'état physique ou à l'activation d'autres virus latents.

La prévalence et les taux moyens d'ADN de PVB19 ainsi que les concentrations d'anticorps anti-PVB19 n'ont montré aucun changement significatif 30 ou 60 jours après la HSCT. Cependant, la dispersion réelle de ces données s'est révélée plutôt suffisante, suggérant ainsi certaines corrélations entre ces index de laboratoire et les signes cliniques chez les patients individuels. En particulier, des charges virales positives (non nulles) ont été enregistrées dans 28% des cas avant l'allo-HSCT, 29% et 30,4% au jour+30 et jour+60 après l'allo-HSCT, ce qui signifie que 70% des patients environ se sont montrés négatifs au PVB19 au début de la période après allo-HSCT.

Interaction entre la présence de PVB19 et la réponse spécifique des anticorps après Allo-HSCT

La détection de l'ADN du PVB19, à la fois avant et après l'allo-HSCT, n'était accompagnée d'aucune détection d'anticorps IgM à aucun moment d'observation, suggérant ainsi l'absence de processus infectieux aigu provoqué par une infection à parvovirus.

Parallèlement, une corrélation positive significative a été constatée entre la charge virale globale de PVB19 et les taux sériques d'anticorps antiviraux IgG ($r = 0,351$; $p = 8 \times 10^{-6}$, 153 analyses dans 54 cas cliniques). En particulier, une forte corrélation a été démontrée entre la charge virale initiale et les niveaux d'anti-PVB19 aux trois périodes de l'étude. Cependant elle était à son maximum au jour+60 après l'allo-HSCT.

D'après la Fig. 10, il existe une corrélation significative entre la charge de PVB19 avant la greffe et la réponse exprimée en anticorps détectée 60 jours après l'allo-HSCT. C'est-

Tableau 9. Valeurs moyennes et médianes des anticorps IgG PVB19 sériques et de l'ADN viral spécifique avant et aux différentes périodes après l'allo-HSCT

Paramètres étudiés	Anticorps IgG à PVB19 (ME)		
	Pré-HSCT	Jour+30	Jour+60
Conditions de l'étude			
Nombre de cas	54	51	49
Valeurs moyennes	21,7	24,8	22,8
SE	3,7	3,4	3,6
SD	26,9	24,1	25,4
Médiane	10,7	18,8	12,5
Minimum	0,0	1,6	1,5
Maximum	100,0	96,3	110,0
ADN du parvovirus B19, nombre de copies $\times 10^3$ /mL			
Conditions de l'étude	Pré-transplantation	Jour+30	Jour+60
Nombre de cas	54	51	49
Valeurs moyennes	27,2	32,9	25,7
SE	6,7	9,7	6,8
SD	49,5	68,8	47,3
Médiane	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	178,3	280,9	222,2
Corrélations entre la charge virale pré-transplantation et les anticorps IgG anti-PVB19 aux différentes périodes après HSCT			
Conditions de l'étude	Pré-HSCT (Jour 0)	Jour+30	Jour+60
Quotient R	0,367	0,274	0,464
Niveau de signification P	0,003	0,02	0,0004

à-dire que les charges virales différentes de zéro étaient associées au contenu plus élevé d'anticorps spécifiques, ce qui suggère à son tour une association entre la persistance du PVB19 et la production d'anticorps spécifiques au virus (Fig. 10).

La demi-vie des anticorps IgG endogènes chez l'homme est d'environ 1 à 4 semaines (Kontermann, 2009). Ces découvertes suggèrent une possibilité de production d'anticorps spécifiques dans la période précoce après un traitement cytotatique intensif, en raison de l'activité potentielle de cellules mémoires survivantes, par exemple, de

plasmocytes capables de fonctionner pendant des mois et même des années après leur maturation.

Activation du parvovirus B19 et récupération de l'hématopoïèse

Dans notre série clinique, la prise de greffe altérée était généralement plus fréquente lorsque les taux d'anticorps IgG PVB19 étaient augmentés, suivant l'examen à 60 jours après la HSCT ($r = 0,315$; $p = 0,034$; $n = 46$).

Plus précisément, des corrélations significatives ont été montrées entre la détection initiale de l'ADN du parvovirus et la reconstitution retardée des érythrocytes et des throm-

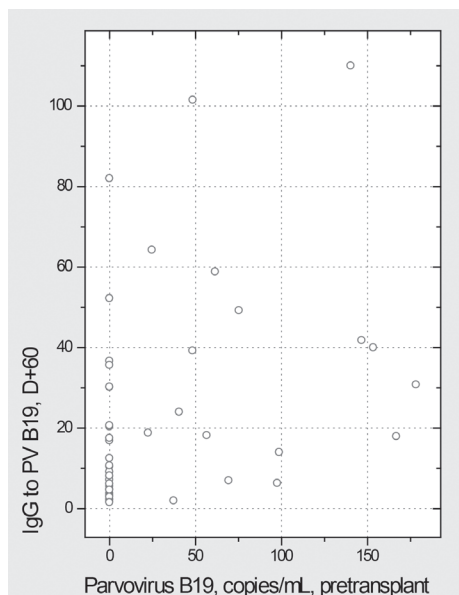


Figure 10. Association entre la charge virale initiale en PVB19 (jour 0) et les anticorps IgG contre PVB19 au jour 60 ($r = 0,464$; $p = 0,0004$). En abscisse, concentration de parvovirus (copies par ml); en ordonnée, les quantités d'anticorps IgG spécifiques, exprimées en UI/ml, 2 mois après la HSCT

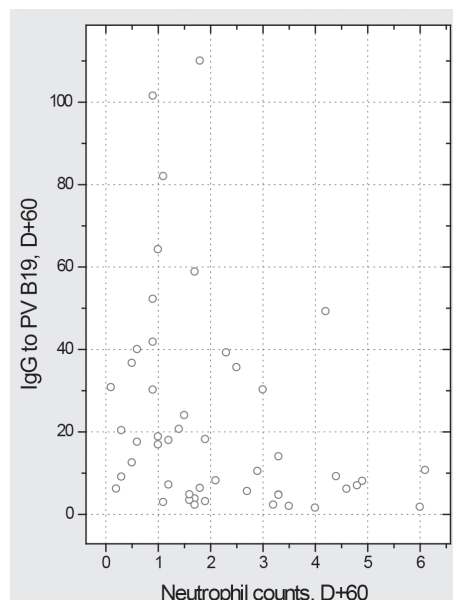


Figure 12. Corrélation négative entre le nombre de neutrophiles dans le sang et les quantités d'anticorps spécifiques du PVB19, exprimées en UI/ml, au jour+60 après la HSCT ($r = -0,422$; $p = 0,002$)

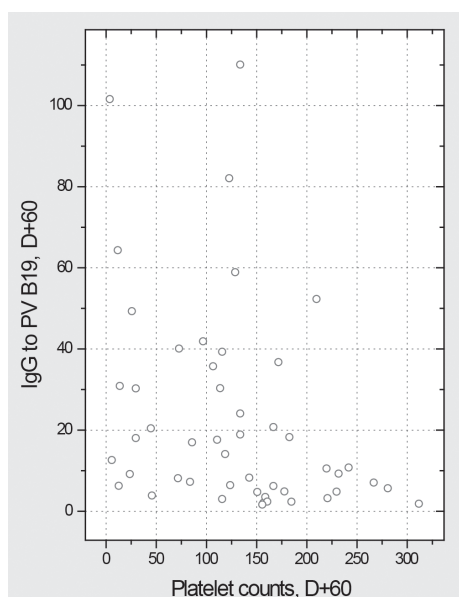


Figure 11. Corrélation négative entre le nombre de plaquettes sanguines (10^9 par ml) et les anticorps IgG anti-PV B19, exprimée en UI/ml, au jour+60 après la HSCT ($p = 0,001$; $r = -0,422$)

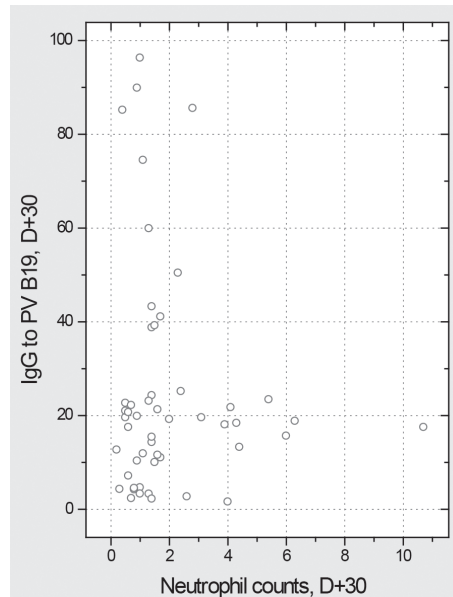


Figure 13. Corrélation négative entre les teneurs en neutrophiles dans le sang et les quantités d'anticorps spécifiques du PVB19, exprimées en UI/ml, au jour+30 après Allo-HSCT ($r = -0,380$; $p = 0,003$)

Tableau 10. Différences de niveaux de PVB19 chez les patients avec/sans neutropénie fébrile (p = 0,015)

	Neutropénie fébrile	Libre de neutropénie fébrile
Nombre de patients	37	11
Nombre moyen de copies PVB19	42,37	0
Déviations moyennes	77,01	0
Erreur moyenne	12,7	0

bocytes dans le sang périphérique (respectivement, $r = -0,281$; $p = 0,02$; $r = -0,303$, $p = 0,01$). De plus, une corrélation marquée a été observée au jour+60 entre la diminution du nombre de neutrophiles et du nombre de thrombocytes, et l'augmentation du taux d'anticorps anti-PVB19 (Fig. 11 à 13). Cette association peut suggérer une relation entre la persistance continue du parvovirus et le rétablissement plus lent de l'hématopoïèse 30 à 60 jours après la greffe.

En règle générale, une greffe altérée a également été enregistrée dans les cas où il y avait plus d'anticorps IgG contre le parvovirus 60 jours après la HSCT ($r = 0,315$; $p = 0,034$; $n = 46$).

Détection de parvovirus et neutropénie fébrile

La positivité pour l'ADN du PVB19 au jour+30 après l'allo-HSCT était, dans tous les cas (14/14), associée à une neutropénie fébrile (FN), contre 68% chez les patients atteints de PVB19 non détectable (23/34; $p = 0,015$, voir Tabl. 10). Par conséquent, une infection active à parvovirus pourrait constituer un facteur suffisant des réactions fébriles courantes observées au début de la neutropénie post-greffe, renforçant ainsi l'importance pathogène de cette infection, du moins dans un sous-groupe de patients immunodéprimés. Le développement de ces réponses fébriles pourrait être soit induit par le virus, soit combiné à des infections bactériennes secondaires causées par une récupération lente de l'immunité cellulaire.

Conclusions

1. La présence du parvovirus B19 dans le sang périphérique des enfants avant la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est suivie d'une augmentation du nombre d'anticorps anti-PV spécifiques de la classe des IgG dans le sérum sanguin à toutes les périodes après l'allo-HSCT.
2. L'augmentation des taux d'anticorps IgG dans le sang des patients après l'allo-HSCT est associée à une neutropénie et à une thrombocytopénie relatives au cours des deux premiers mois suivant l'allo-HSCT.
3. La détection de l'ADN du parvovirus aux conditions initiales (avant la HSCT) et 30 à 60 jours plus tard peut être suivie du développement de neutropénies fébriles précoces et du rétablissement plus lent de la numération des érythrocytes et des plaquettes dans le sang périphérique.

3. Étude du niveau d'immunité contre la rougeole dans certains groupes de la population de la République de Guinée

Malgré tous les progrès réalisés dans la lutte contre la rougeole, des épidémies de rougeole sont toujours enregistrées dans le monde entier. En 2010–2016, notamment, des

épidémies de rougeole ont été enregistrées aux États-Unis et dans plusieurs pays européens à forte couverture vaccinale. Des épidémies majeures de rougeole ont également été enregistrées en Afrique, à savoir en République démocratique du Congo (plus de 121 000 cas), dans le sud de l'Afrique (176 000 cas), au Nigéria (environ 30 000 cas) et dans quelques autres pays africains.

En raison de l'augmentation de l'incidence, le nouveau Plan stratégique a été adopté dans le monde entier avec les nouveaux délais pour l'élimination de la rougeole dans certaines régions de l'OMS. L'élimination de la rougeole dans la région du Pacifique occidental devait être achevée d'ici 2012; dans les régions d'Europe et de la Méditerranée orientale — d'ici 2015; dans la région africaine — d'ici 2020. En Asie du Sud-Est, l'objectif était de réduire la mortalité par rougeole d'ici 2015. À l'heure actuelle, la date fixée pour la mise en œuvre du Plan mondial de lutte contre la rougeole et la rubéole a été reportée une nouvelle fois.

La population de la République de Guinée compte plus de 12 millions d'habitants, dont env. 2 millions d'enfants de moins de 5 ans. La vaccination antirougeoleuse est réalisée une fois à l'âge de 9 mois. Selon l'OMS, entre 1980 et 2001, l'incidence de la rougeole en Guinée était élevée, atteignant parfois quelques 15 000 à 18 000 nouveaux cas chaque année (Fig. 14). En 2002, le nombre de cas de rougeole était 3,4 fois inférieur à celui de 2001 et 8,4 fois inférieur à celui de 1999. Plus tard, seuls les cas singuliers de rougeole ont été enregistrés. En 2014–2015, toutefois, le taux d'incidence accru de rougeole a été enregistré en République de Guinée: selon l'OMS, au cours des 11 mois de 2016, le nombre de cas suspectés de rougeole était de 616, alors que le nombre de cas confirmés en laboratoire était de 290. L'incidence était de 2,68 pour 100 000 habitants. Il est évident que cette augmentation de l'incidence est due à la couverture vaccinale antirougeoleuse qui est passée de 90 à 99% en 2010–2013 à 60 à 62% en 2014–2015 en raison de l'épidémie d'Ebola au cours de ces années.

Afin de réduire le risque d'épidémies majeures de rougeole sur le continent africain, l'OMS recommande de mener des campagnes de vaccination supplémentaire contre la rougeole après la fin de la propagation du virus Ebola. Il est évident que l'augmentation de l'efficacité de telles campagnes est due à l'identification de groupes d'âge significativement affectés par la épidémie et nécessitant une vaccination supplémentaire.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le niveau d'immunité contre la rougeole dans différents groupes d'âge de la population de la République de Guinée.

Matériels et méthodes

Examinations: 257 échantillons de sérum sanguin d'enfants et d'adultes hospitalisés à l'hôpital de Kindia (République de Guinée). Les échantillons cliniques ont été reçus en 2015–2016.

Les échantillons de sérum sanguin ont été testés pour détecter la présence d'anticorps IgG de rougeole à l'aide du système de test anti-rougeole ELISA d'Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Allemagne), conformément à son mode d'emploi.

Le traitement des données statistiques a été effectué à l'aide des statistiques paramétriques et du test t de Student servant à évaluer les différences entre les événements. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.

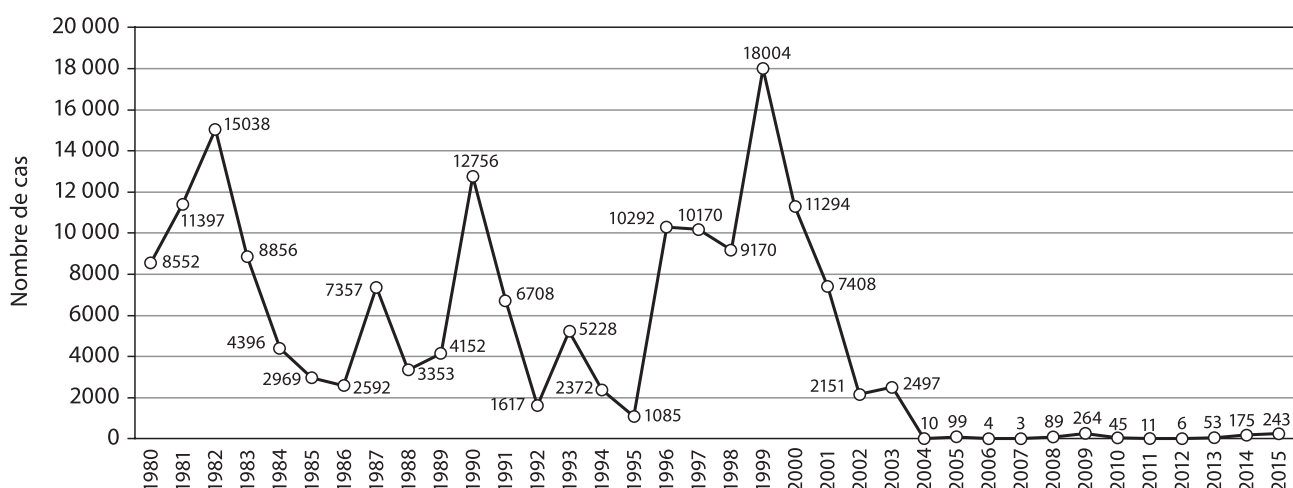


Figure 14. Nombre de cas de rougeole en République de Guinée entre 1980 et 2015 (WHO/IVB, 2016)

Résultats et discussion

Les tests de dépistage des IgG anti-rougeoleuses effectués sur 210 échantillons de sérum sanguin provenant des patients d'un âge connu et atteints de rougeole qui ont été hospitalisés à l'hôpital de Kindia en 2015–2016 ont indiqué que 36 personnes (17,1%) étaient séronégatives. L'âge de 25 autres patients séronégatifs pour la rougeole n'était pas connu. Le nombre total de personnes séronégatives était de 61, soit 23,7% de toutes les personnes examinées.

Le Tabl. 14 présente la répartition des échantillons de sérum des patients par âge et par titre d'anticorps IgG antirougeoleux.

Dans le groupe d'âge des moins de 17 ans, 7 patients n'avaient pas d'IgG anti-rougeole. Chez 16 patients de ce groupe d'âge, les titres d'IgG n'étaient pas élevés, mais se situaient entre 201 et 1000 UI/L. C'étaient probablement des anticorps post-vaccinaux. Chez 8 enfants et adolescents, des titres d'anticorps élevés (plus de 1001 UI/L) ont été mis en évidence, ce qui témoigne d'une rougeole récente. Des titres élevés d'IgG contre la rougeole ont été trouvés, entre autres, chez deux enfants âgés de 2 ans et 7 mois (1600 et 3200 UI/L), ce qui signifie également qu'ils avaient eu la rougeole récemment. Ces enfants n'avaient évidemment pas été vaccinés.

Les titres élevés d'IgG (1001 à 3000+ UI/L) ont été enregistrés chez 10 des 44 sujets examinés âgés de 18 à 22 ans (22,7±6,4%). En même temps, dans le groupe de personnes âgées de 23 ans et plus, ces titres ont été trouvés chez un nombre significativement plus élevé de patients, c'est-à-dire chez 53 personnes (39±6%) ($p < 0,05$). Ces titres d'anticorps sont évidemment le signe d'une rougeole précoce.

Dans le groupe d'âge des 18 à 22 ans, 14 des 44 personnes examinées étaient séronégatives à la rougeole (31,8%); chez les patients âgés de 23 à 40 ans, 14 des 71

personnes examinées étaient séronégatives à la rougeole (19,7%). Globalement, dans le groupe d'âge de 18 à 40 ans, la proportion de sujets séronégatifs était de 24,3±5,1%, ce qui est significativement plus élevée ($p < 0,05$) que chez les patients de plus de 41 ans, où 1 sur 64 personnes examinées seulement était séronégative à la rougeole (1,6±3,6%).

Tenant compte des épidémies majeures de rougeole en République de Guinée enregistrées en 1981–1982 et en 1996–2000 avec une incidence de 15 000 à 18 000 par 100 000 habitants, il serait logique de supposer que la prédominance considérable des personnes séropositives à la rougeole parmi les patients de 23 ans et plus examinés à l'hôpital de Kindia est due à la rougeole que ces personnes avaient contractée au cours des épidémies des années 1980–1990. Étant donné qu'en 2015–2017, une nouvelle augmentation de l'incidence de la rougeole a été enregistrée en République de Guinée, on peut supposer que 37 sur 210 personnes examinées qui présentaient des titres d'IgG supérieurs à 3000 UI/L avaient récemment contracté la rougeole. Il est important de noter que 76% des moins de 22 ans n'avaient pas ou peu de titres d'anticorps antirougeoleux, ce qui peut indiquer que le calendrier de vaccination des enfants n'était pas respecté.

Conclusion

De nombreuses années d'expérience internationale de la lutte antirougeoleuse dans le monde démontrent de manière convaincante l'efficacité épidémiologique de la prévention vaccinale antirougeoleuse à condition d'atteindre et de maintenir une couverture vaccinale élevée (95% et plus) des cohortes.

Par exemple, dans la Fédération de Russie, la mise en œuvre du programme d'élimination de la rougeole vers 2010, élaborée conformément à la résolution de l'OMS,

Tableau 11. Répartition des échantillons de sérum des patients par âge et titre d'anticorps IgG antirougeoleux

Densité optique, IU/L	Age (ans)					Total
	Moins de 17	18–22	23–40	41+		
< 200,0	7	14	14	1	36	17,1%
201,0–1000,0	16	20	35	32	103	82,9%
1001,0–3000,0	3	4	14	13	34	
> 3000,0	5	6	8	18	37	
Total	31	44	71	64	210	100%

a permis de réduire considérablement l'incidence de la rougeole, de renforcer le système national de vaccination antirougeoleuse et d'améliorer la surveillance épidémiologique de la rougeole et d'autres maladies à exanthème. Plus de 95% des enfants russes ont reçu deux doses de vaccin antirougeoleux vivant.

L'étude du niveau d'immunité contre la rougeole en République de Guinée a montré que les IgG de la rougeole étaient retrouvées chez la majorité des enfants et des adultes dont les échantillons avaient été examinés en laboratoire. Cependant, chaque groupe d'âge comprenait des personnes séronégatives, ainsi que des personnes présentant un faible taux d'anticorps antirougeoleux. Dans l'ensemble, nous avons constaté que 23,7% des sujets examinés à l'hôpital de Kindia étaient séronégatifs pour la rougeole. Chez les patients âgés de 18 à 40 ans, la proportion de personnes séronégatives était de $28,5 \pm 5,1$ de toutes les personnes examinées. Cette cohorte est susceptible d'être infectée par le virus de la rougeole et peut contribuer à maintenir et à activer le processus épidémique en cas d'épidémie de rougeole en République de Guinée.

L'Organisation mondiale de la santé déclare que même des perturbations à court terme du calendrier de vaccination entraînent un nombre croissant d'individus sensibles à l'infection et un risque accru d'épidémies qui pourraient autrement être évitées par la vaccination. Pour réduire le risque d'épidémies majeures de rougeole dans les régions exemptes du virus Ebola, l'OMS recommande des campagnes de vaccination massives contre la rougeole.

4. Evaluation de l'action anti-grippale de nouveaux dérivés de camphre

En 2017–2018, nos études portaient principalement sur l'évaluation de l'activité antigrippale de nouveaux dérivés du camphre. Précédemment, nous avons identifié les dérivés du camphre en tant qu'inhibiteurs efficaces de la réplication du virus de grippe en culture cellulaire. Au cours de la présente étude, nous avons déchiffré le mécanisme d'activité du composant principal, soit le camphécène (2-(E)-((1R,4R)-1,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ylidène-aminoéthanol) en identifiant sa cible (étape 1). Dans le but d'optimiser les propriétés pharmacologiques du camphécène, une chimiothèque basée sur l'échafaudage du camphécène a été construite. Les modifications incluaient l'introduction de fragments hétérocycliques mono et bicycliques à la place du groupe hydroxyle terminal du camphécène (étape 2).

1. Etape 1

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Virus et cellules

Le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) a été obtenu à partir de la collection de virus de l'Institut Smorodintsev de recherche sur la grippe. En préparation à l'expérimentation, le virus a été propagé dans les cavités allantoïques d'embryons de poulet âgés de 9 à 11 jours pendant 48 heures à 36°C. Le titre infectieux du virus a été déterminé dans des cellules MDCK (ATCC # CCL-34) à l'aide des plaques à 96 puits.

1.1.2. Animaux

Souris BALB/c femelles âgées de 6 à 8 semaines ont été obtenues auprès de l'élevage de Rappolovo de l'Académie

de médecine de Russie (Rappolovo, Russie) et mises en quarantaine une semaine avant la manipulation expérimentale. Les souris étaient nourries avec des aliments standards pour rongeurs, ayant un accès illimité à l'eau. Les expériences sur les animaux ont été conduites conformément aux principes de protection des animaux de laboratoire (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996) et approuvées par le Comité d'éthique de l'institution.

1.1.3. Essai de résistance au virus

Du camphécène à des concentrations en série (500–1,5 μM) a été incubé avec des cellules MDCK pendant 1 h à 36°C. La culture cellulaire a ensuite été inoculée par le virus de la grippe (m.o.i. 0,01) pendant 1 heure. Le virus non lié était lavé avec du MEM, ensuite une nouvelle portion de camphécène était ajoutée. Ensuite, les plaques étaient incubées pendant 24 h à 36°C en présence de CO_2 à 5%. Le titre du virus dans le milieu de culture était déterminé dans un passage séparé après 48 heures de culture. Pour détecter le virus, le milieu (100 μL) a été placé dans les puits d'une plaque à fond rond et complété de la quantité égale d'une suspension à 1% d'érythrocytes de poulet dans une solution saline. La réaction a été évaluée après 60 min d'incubation à température ambiante. Chaque concentration des composants a été testée en triple. Les titres de virus ont été comparés au logarithme de concentration et les valeurs de CI_{50} de chaque virus ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

1.1.4. Sélection et analyse *in vitro* de mutants résistants

Afin d'étudier le développement de la résistance au camphécène, le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) a été passé en série dans des cellules MDCK en présence de concentrations croissantes du composé entraînant la formation du virus CF+. Les cellules ont été infectées par le virus et incubées pendant 3 à 5 jours à 36°C avec du CO_2 à 5% jusqu'à obtention d'un effet cytopathique. Les surnageants de culture ont été centrifugés, ensuite des aliquotes ont été utilisées pour la sélection séquentielle. Deux passages initiaux ont été réalisés en présence de 100 μM de camphécène, suivis de quatre passages à 200 μM . Le virus de contrôle (CF) a été passé en série le même nombre de fois dans les cellules MDCK en l'absence de l'agent antiviral.

Après la procédure de transfert, nous avions trois virus: le PR8 initial qui n'était pas transmis; CF–; et CF (deux puits chacun). Les milieux de culture de deux puits parallèles de ces virus ont été mélangés, et les virus ont été purifiés sur plaque dans des cellules MDCK. Trois clones de chaque virus ont été propagés dans des embryons de poulet en l'absence ou en présence de 200 μM de camphécène. L'ARN viral était extrait à l'aide du kit RNAzol® (Gibco BRL). Après transcription inverse, l'ADNc était amplifié à l'aide de quatre paires d'amorces.

Les conditions du séquençage étaient les suivantes: (i) dénaturation (3 min à 95°C), (ii) 20 cycles à 95°C pendant 30 s, 60°C pendant 30 s, 72°C à 45 s et (iii) 30 cycles à 95°C pour 30 s, 50°C pendant 30 s, 72°C pendant 60 s avec allongement final à 72°C pendant 7 min. Les produits de PCR ont été séquencés à l'aide d'un analyseur génétique ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, USA) en utilisant le kit de séquençage du cycle BigDye Terminator et le logiciel de collecte de données ABI PRISM 3100-Avant fourni par le fabricant. Toutes les séquences ont été comparées à la séquence d'acides aminés du virus A/Puerto Rico/8/34 (code d'accès P03452).

1.1.5. Essai de réduction du rendement viral

Une solution mère de camphécène (5 mM) a été préparée dans du MEM avec 1 µg/ml de trypsine, diluée en série (1500 — 2 µM) et incubée avec des cellules MDCK pendant 1 h à 36°C. Chaque concentration de camphécène a été testée en triple. Les cultures cellulaires ont ensuite été infectées par le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (m.o.i. 0,01) pendant 24 h à 36°C en présence de CO₂ à 5%. Les titres de virus dans les surnageants ont été déterminés par test d'hémagglutination après culture de la descendance du virus dans des cellules MDCK pendant 48 h à 36°C en présence de CO₂ à 5%. Les concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) et l'indice de sélectivité (SI, rapport CC₅₀/IC₅₀) ont été calculés à partir des données obtenues.

1.1.6. Microscopie électronique à transmission (TEM)

Les cellules MDCK dans des plaques à 6 puits ont été incubées avec le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), m.o.i. 100, à 4°C pendant 1 heure. Les virions non liés ont été éliminés en lavant les cellules deux fois avec du MEM froid, le milieu contenant 100 µM de camphécène et 1 µg/ml de trypsine a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 1,5 heure à 36°C dans le CO₂ à 5%. Du MEM avec de la trypsine (sans camphécène) a été ajouté dans les puits contenant le virus de contrôle. Après incubation, les cellules ont été collectées à partir des puits, transférées dans des tubes et centrifugées à 2000g pendant 15 min. Les culots cellulaires ont été fixés avec 1,5% de glutaraldéhyde dans du PBS pendant une nuit, puis post-fixation avec 1,5% de OsO₄ pendant 1 heure et de l'acétate d'uranyle pendant 45 minutes à la température ambiante. Ils ont ensuite été déshydratés dans de l'acétone et incorporés à de la résine Epon/Araldit (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne). Des coupes minces (90 nm) ont été colorées avec du citrate de plomb et examinées au microscope électronique JEM-100S (JEOL, Tokyo, Japon) à un grossissement de 2000 à 50 000. Le nombre de virions intacts observés attachés aux membranes endosomales internes et le nombre de virions observés fusionnant leurs membranes avec des membranes d'endosomes ont été comptés. Dans chaque groupe expérimental, 20 champs visuels contenant 82 virions dans l'échantillon témoin et 74 virions dans un échantillon traité au camphécène ont été analysés.

1.1.7. Expériences *in vivo*

Afin de comparer la virulence des virus sensibles au camphécène et des virus résistants au camphécène, des souris (10 par groupe) ont été infectées avec trois doses de virus (contrôle ou résistant au camphécène). Les virus ont été administrés par voie intranasale (volume de 50 µl). Chaque groupe a fait l'objet d'un suivi quotidien du poids corporel et du décès pendant deux semaines après l'inoculation. De plus, deux groupes (n = 10 souris dans chacun) ont été infectés avec 5 × 10⁵ pfu de chaque virus. Aux jours 3 et 6 après l'infection, cinq souris de chaque groupe ont été euthanasiées, leurs poumons ont été prélevés et homogénéisés dans dix volumes de solution saline, et les activités virales ont été mesurées dans des homogénats par titrage dans des cellules MDCK.

1.1.8. Traitement statistique des résultats

Les titres de virus ont été comparés au logarithme de concentration, et les valeurs de CI₅₀ de chaque virus ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les taux de survie ont été analysés à l'aide du test logarithmique par rangs Mantel-Cox incorporé dans le logiciel Statistica 8.0.

Les titres viraux dans les tissus pulmonaires, ainsi que le poids des animaux, ont été comparés avec ANOVA à une voie. Les nombres de virions comptés avec la TEM ont été ensuite comparés à l'aide du test t de Student. Les valeurs de p < 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

1.1.9. Modélisation moléculaire

L'interaction du camphécène avec des hémagglutinines de type sauvage et mutantes (résistant au camphécène) a été réalisée à travers la modélisation moléculaire et le calcul de la stabilité des HA. La sous-unité HA2 a été choisie comme cible biologique clé. Deux structures cristallines ont été téléchargées de la Banque de données des protéines (Rose et al., 2017) (codes PDB: 1RU7 (Gamblin et al., 2004). Deux chaînes polypeptidiques (deux monomères du trimère HA) ont été prises en compte dans le calcul et la troisième a été exclue de l'analyse. Des atomes d'hydrogène ont été ajoutés aux résidus d'acides aminés et optimisés au pH de 5,0±0,2. Toutes les molécules d'eau ont été prises en compte. Les paramètres géométriques de la protéine et du ligand ont été soumis à une minimisation restreinte en utilisant le champ de force OPLS3 (Small Molecule Drug Discovery Suite 2017–3).

Deux sites de liaison ont été considérés. Le premier était situé dans la région de liaison de la tert-butyl hydroquinone (TBHQ), inhibiteur bien connu de l'HA (Russell et al., 2008). Le deuxième se trouvait près du peptide de fusion et contenait de la valine en position 458 (615). La numérotation des résidus ici et après correspond au code PDB 1RU7 indiqué entre parenthèses.

Toutes les procédures d'amarrage ont été effectuées à l'aide du logiciel Schrödinger Suite 2017–3 (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2017–3). L'amarrage a été réalisé dans les conditions suivantes: un ligand flexible et une protéine; précision de prédiction standard (protocole IFD et approche QM/MM-docking).

Afin d'attacher le ligand à l'espace hydrophobe près de V458, une boîte à mailles a été centrée sur le résidu sélectionné. Les acides aminés ont été raffinés à moins de 5 Å de la position du ligand. L'énergie de liaison (ΔGMM GBSA) du complexe ligand-protéine a été estimée à l'aide du modèle de Born généralisé à diélectrique variable, qui incorpore des effets dépendant des résidus. De l'eau a été utilisée comme solvant.

La mutation V458L de la sous-unité HA2 (code PDB: 1RU7) de l'hémagglutinine a été modélisée à l'aide des méthodes MM et QM. Nous avons estimé les valeurs énergétiques totales de l'HA2 des virus de type sauvage et des virus mutants afin de modéliser la réaction de substitution homodésique de la valine par la leucine (en position 458) à l'aide de la méthode DFT B3LYP avec l'ensemble de base 6–311G (d,p).

1.2. Résultats

1.2.1. Le camphécène inhibe la fusion des membranes virales et endosomales

Afin de visualiser l'effet du camphécène sur la morphogenèse virale, nous avons effectué une analyse de l'ultrastructure des cellules infectées aux premiers stades du cycle viral, lorsque le composé démontre la plus grande activité. A ce stade, dans les deux cellules traitées par placebo, de nombreuses vacuoles endosomales ont été observées dans le cytoplasme. Les virions étaient localisés dans les endosomes. Ils étaient observés dans des forma-

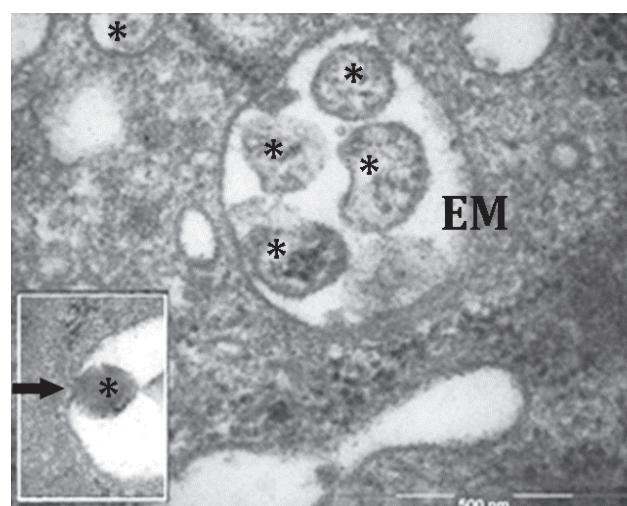


Figure 15. Virions de la grippe dans les endosomes aux premiers stades du cycle viral. Les cellules ont été infectées avec le virus (m.o.i. 100) et incubées pendant 1,5 heure, puis traitées et analysées par microscopie électronique à transmission. Ici on présente les virions au sein de l'endosome, dans la cellule cultivée avec du camphécène, ainsi que le virion en cours de fusion membranaire (incorporation) dans l'endosome de la cellule cultivée sans camphécène. Les virions sont marqués par des astérisques; le site de fusion membranaire par une flèche; EM: membrane endosomale

tions comportant une fixation à la membrane endosomale interne ou dans des structures présentant une fusion entre les membranes virale et endosomale. Ces formations typiques font l'objet de la Fig. 15.

Ces virions représentaient 15,9% de toutes les particules virales analysées ($n = 82$). De même, les cellules traitées au camphécène contenaient de nombreux endosomes avec des virions. En revanche, le pourcentage de virions dans le processus de fusion membranaire était trois fois inférieur (5,4%, $n = 74$, $p = 0,0032$, test t). Cependant, le nombre de virions par endosome ne différait pas significativement ($4,1 \pm 2,1$ et $3,7 \pm 1,7$ respectivement dans les cultures traitées au placebo et traitées au camphécène; $p = 0,5080$, test t). Ces résultats confirment indirectement que le camphécène supprime le processus de fusion membranaire dans les cellules infectées par le virus de la grippe.

1.2.2. Le virus résistant au camphécène peut être sélectionné après six passages en culture cellulaire

Le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (PR8), qui avait précédemment prouvé sa sensibilité au camphécène, a fait l'objet d'une série de passages en présence de concentrations croissantes de camphécène (six passages au total) afin d'obtenir un virus résistant aux médicaments (CF+). Le virus de contrôle correspondant (CF) a été passé six fois en série

sans médicament. Nous avons ensuite mesuré la sensibilité des trois virus (virus PR8 initial, CF- et CF+) au camphécène par titrage dans des cellules MDCK en présence de diverses concentrations de camphécène. Les valeurs de CI_{50} du camphécène ont ensuite été calculées pour chaque virus (Tabl. 12).

Selon les résultats, les trois virus se sont développés dans les cellules MDCK avec une efficacité similaire, cependant le virus résistant au camphécène était légèrement moins productif. Six passages dans les cellules MDCK sans additifs n'ont pas modifié la sensibilité du virus au camphécène. Néanmoins, la culture du virus de la grippe en présence de camphécène a induit, après six passages, une résistance au médicament environ 160 fois supérieure à celle de la souche parentale ou du virus transmis sans le médicament.

1.2.3. Le virus résistant au camphécène acquiert une mutation V458L dans la sous-unité HA2 de l'hémagglutinine

Après purification sur plaque, les segments 4 provenant de trois clones de chaque variante du virus (PR8, CF- ou CF+) ont été séquencés et leurs compositions en acides aminés comparées les unes aux autres, ainsi qu'à la séquence de référence HA du virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (PubMed P03452). Les résultats de l'analyse de séquence ont montré qu'il existait une variabilité parmi les clones initiaux du virus (PR8). Plus précisément, les changements observés (par rapport à la souche de référence) étaient les suivants: un des trois clones contenait la substitution N104S; un clone contenait les substitutions A240T et I353V; et un clone contenait la substitution L345I. Les trois clones initiaux du virus PR8 présentaient la substitution P199S. Cette différence peut refléter les modifications de la souche dues à sa culture à long terme, dans des conditions spécifiques, au sein de notre laboratoire.

La variabilité a également été détectée parmi les clones du virus qui ont été passés sans médicament. Un clone présentait la mutation D455E et l'autre la mutation G475R. Comme le virus PR8 initial, les trois clones présentaient les substitutions de P199S, par rapport à la séquence de référence P03452.

Contrairement à la souche de référence et aux trois clones du virus témoin passés sans médicament, les trois clones du virus résistant au camphécène contenaient de la leucine au lieu de la valine en position 458 (substitution G→T, Fig. 16A). Ainsi, la résistance du virus de la grippe au camphécène est associée à la mutation V458L de l'hémagglutinine. Pour plus de clarté, l'emplacement de la mutation est présenté sur le modèle 3D d'hémagglutinine virale (Fig. 16B). Selon le modèle, la mutation V458L est localisée dans la région de la tige de la sous-unité HA2 à proximité du peptide de fusion et du site du clivage protéolytique de HA.

1.2.4. Résultats de la modélisation moléculaire

Afin d'élucider le mécanisme structural derrière la résistance de la grippe au camphécène, nous avons effectué des expériences de modélisation moléculaire. Dans cette partie de l'étude, nous avons examiné l'affinité du camphécène avec les sites de liaison de HA de type sauvage et avec ceux présentant la mutation V458L. Les énergies totales des deux types de molécules de HA ont également été évaluées. Selon des calculs théoriques, le site de liaison de l'inhibiteur de TBHQ situé à proximité du peptide de fusion est plus favorable pour la liaison avec le camphécène. Les valeurs du score d'ancrage sont inférieures aux valeurs caractérisant la liaison entre le ligand natif (TBHQ) et la pro-

Tableau 12. Titre et CI_{50} des virus de la grippe sensibles au camphécène et résistants au camphécène

Variante de virus	Titre sans composés, $\log_{10}ID_{50}$	Camphécène CI_{50} , μM
Virus initial (PR8)	$7,0 \pm 0,0$	$1,9 \pm 0,5$
Contrôle (CF-)	$6,3 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,6$
Traité au camphécène (CF+)	$6,0 \pm 0,0$	$477,4 \pm 44,2$

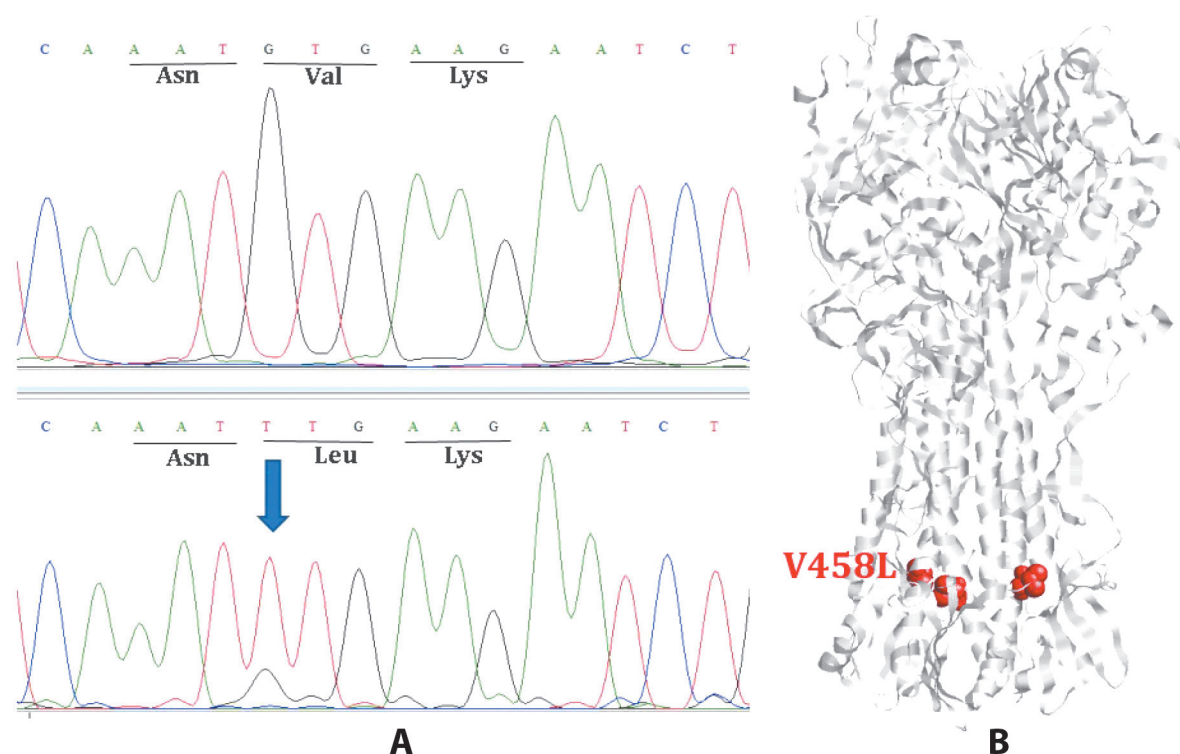


Figure 16. La résistance du virus grippal au camphécène est associée à une mutation du gène HA. (A) L'analyse de la séquence des virus passés a révélé une mutation, au niveau de la position de l'acide aminé 458 dans l'hémagglutinine, qui transforme la valine en leucine. (B) La substitution d'acide aminé (marquée en rouge) dans l'hémagglutinine du virus CF+ mutant résistant au camphécène est localisée près du peptide de fusion et du site de clivage protéolytique. La substitution a été identifiée dans trois sur trois clones de virus résistants comparée à la souche parentale A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (numéro d'accès à la BDP 1RU7)

téine (Tabl. 13, inscriptions 1–4). Cependant, ce site actif est situé à une distance d'environ 20 Å de l'acide aminé V458. Il semble improbable que le camphécène soit à l'origine de la mutation V458L s'il se lie à cette région de HA2 (Fig. 17).

Le deuxième site de liaison a été trouvé dans la région de la tige proche du site de clivage protéolytique. Sur ce site, le camphécène est entouré de résidus d'acides aminés de deux chaînes polypeptidiques et forme des liaisons H avec V458 et I9 (Fig. 17B). Les valeurs du score QM-docking étaient comparables pour la liaison du ligand au niveau des deux sites actifs (Tabl. 13, inscriptions 3 et 4), mais l'énergie de liaison (ΔG_{MM_GBSA}) du camphécène et de l'HA au second site était supérieure de 15,2 kcal/mol par rapport au ΔG_{MM_GBSA} de liaison du ligand au site actif TBHQ.

Les paramètres géométriques de la protéine ont été légèrement modifiés après la mutation V458L (Fig. 13C) et le site de liaison du ligand a été déplacé par rapport à sa

position dans l'hémagglutinine de type sauvage. La liaison du camphécène au niveau de L458 était défavorable après une mutation en raison d'effets stériques (ceux-ci sont représentés par des lignes pointillées rouges sur la Fig. 13). Le ligand était situé plus haut le long de la tige au-dessus de la leucine et formait une liaison H avec T31 (Fig. 13D). L'énergie de liaison était supérieure de 12,9 kcal/mol par rapport à l'énergie de liaison du camphécène avec l'HA de type sauvage (Tabl. 13, inscriptions 3 et 4). La liaison du camphécène avec l'HA mutant est donc plus faible que celle de l'HA sauvage qui peut servir de base structurale à la résistance aux médicaments.

Il convient de noter que la valeur de l'énergie totale du mutant HA2 était inférieure à celle du type sauvage (ΔE 28,4 kcal/mol de moins de le mutant V458L). Selon les calculs de la chimie quantique, le processus de remplacement homodesmique de la valine en leucine est carac-

Tableau 13. Résultats de l'analyse de l'interaction du camphécène avec l'hémagglutinine du virus de la grippe dans les sites de liaison de HA

Inscription	Ligand ^a	Score d'ancrage QM	MGM GBSA, kcal/mol	Ponts de liaison H entre le ligand et les acides aminés ^b
site de liaison TBHQ				
1	TBQH	-6,7±0,2	-35,3	aucun
2	Camphécène	-8,1±0,3	-45,0	Tyr295, Lys558
site de liaison V458				
3	Camphécène	-8,0±0,4	-29,8	Ile9, Val615
site de liaison V458L				
4	Camphécène	-5,7±0,5	-16,9	Thr31

^a TBQH: hydroquinone de tert-butyle; ^b La numérotation des résidus correspond aux codes PDB.

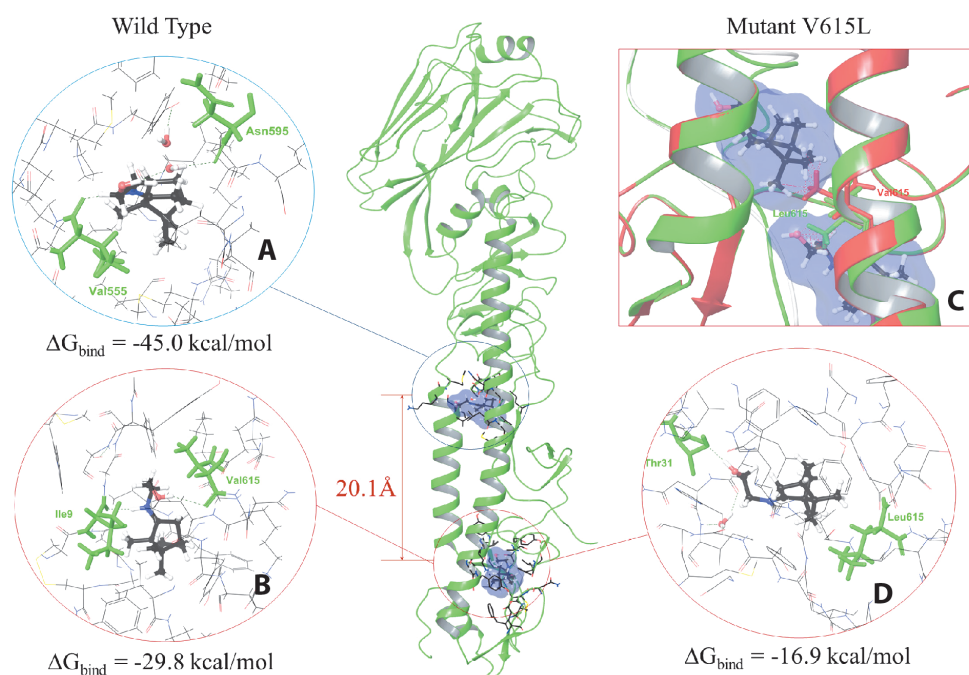


Figure 17. Sites de liaison du camphécène au sein du HA du virus de la grippe A. Deux sites de liaison sont étiquetés sur le modèle général de HA (au centre). Orientation de la molécule de camphécène au premier (A) et deuxième (B) sites de liaison de HA de type sauvage. Interaction du camphécène avec les premier (C) et deuxième (D) sites de liaison du mutant V458L. L'énergie de liaison pour chaque site et la distance entre deux sites sont indiquées. La numérotation des acides aminés correspond ici au code PDB 1RU7

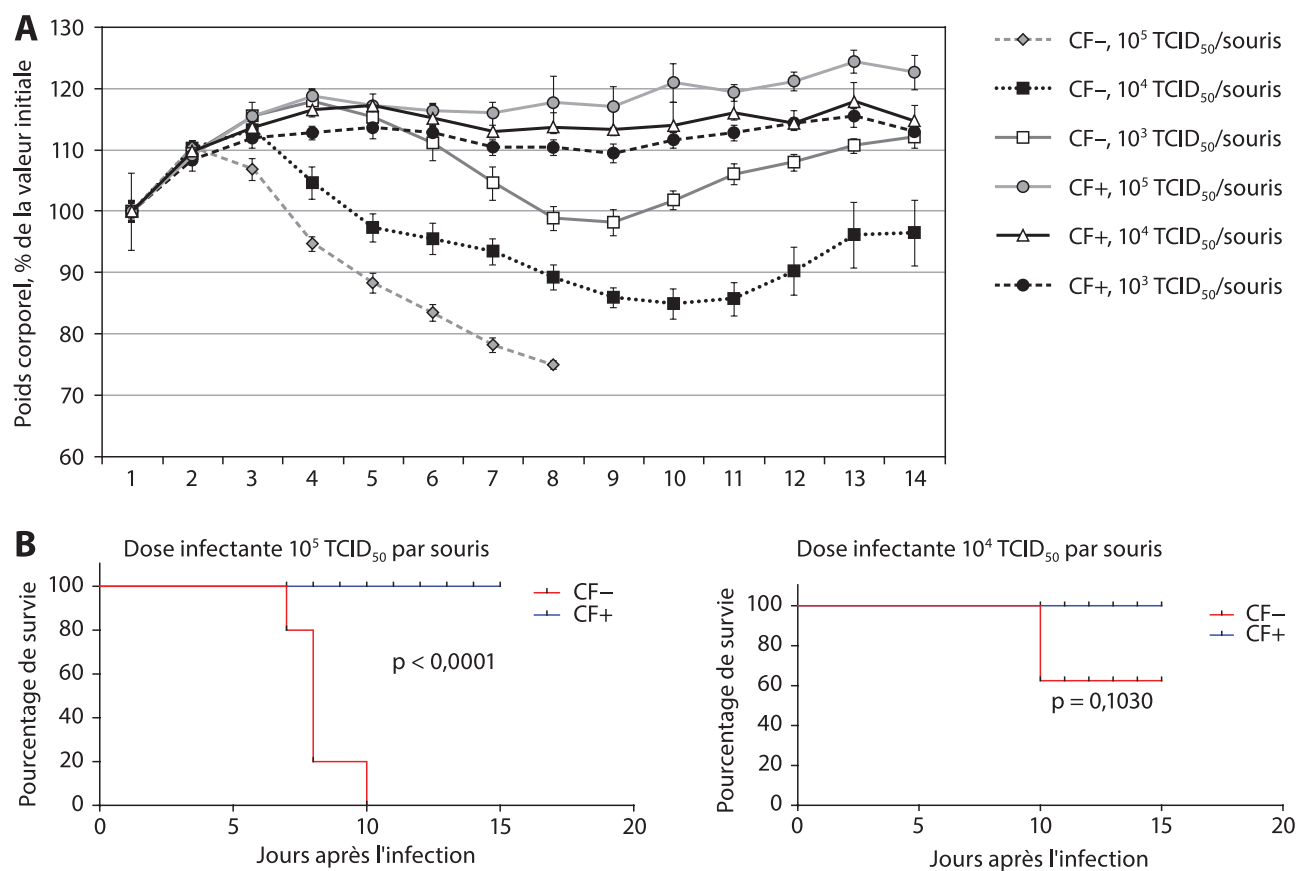


Figure 18. Le passage en série du virus grippal A/Puerto Rico/8/34 en présence de camphécène entraîne une atténuation du virus sur le modèle d'infection grippale chez la souris. On présente les valeurs de poids (A) et les courbes de survie (B) de souris infectées par le virus grippal A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) qui avait déjà été passé six fois dans des cellules MDCK contenant du camphécène (résistant au camphécène, CF+) ou par le virus sans présélection de camphécène (sensible au camphécène, CF-)

térisé par une valeur d'énergie négative (données non présentées). Cela nous a permis de supposer que la mutation V458L entraîne une diminution de l'énergie totale de cette sous-unité de la molécule HA. Cela a pu résulter en la stabilisation du monomère HA et/ou du complexe multi-sous-unités de la protéine. Comme la mutation est située près du site de clivage, elle pourrait avoir un impact sur la protéolyse de l'HA au cours du cycle viral.

1.2.5. Le virus résistant au camphécène possède une pathogénicité plus faible chez les animaux que la souche témoin

Pour évaluer l'effet de la résistance au camphécène sur les propriétés pathogéniques du virus, nous avons inoculé à des souris Balb/c (10 par groupe) trois doses différentes de chaque virus pour suivre les changements de poids et la mortalité dans chaque groupe. La production du virus dans les tissus pulmonaires a également été surveillée.

Les souris infectées par le virus de type sauvage (sensible au camphécène) ont présenté une mortalité et une perte de poids liées à la dose. En revanche, l'infection de souris par le virus résistant au camphécène n'a entraîné ni mortalité ni perte de poids (Fig. 18). De plus, lorsque les souris étaient infectées avec 5×10^5 pfu de l'un ou l'autre virus, l'efficacité de la réplication dans les tissus pulmonaires était environ 1,5 à 2,0 ordres de grandeur plus basse pour le virus résistant au camphécène que pour le virus sensible au camphécène ($6,1 \pm 0,3$ contre $4,2 \pm 0,2$ $\log_{10}$ TCID₅₀ au jour 3 ($p = 0,0003$); et $4,9 \pm 0,3$ contre $3,4 \pm 0,2$ $\log_{10}$ TCID₅₀ au jour 6 ($p = 0,0017$) (Fig. 19). Ainsi, l'acquisition d'une résistance au camphécène est associée à une diminution significative de la pathogénicité virale et à un affaiblissement de la capacité de croissance des poumons de souris.

Etape 2

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Chimie

Les composés cibles portant un fragment hétérocyclique ont été synthétisés comme indiqué sur le Fig. 20. Le camphécène de départ a été préparé comme décrit précédemment. Par la suite, du camphécène a été traité avec du PBr₃ pour produire l'intermédiaire clé 1 qui a été utilisé immédiatement dans d'autres réactions. Les composés clés 2 à 16 ont été préparés par substitution nucléophile d'amines ou de thiols secondaires avec le bromure 1 en présence de carbonate de potassium et de 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ène (DBU). Les structures des composés cibles ont été confirmées par diverses méthodes spectroscopiques, notamment la RMN ¹H et ¹³C (voir ESI). À la suite de modifications synthétiques du camphécène, nous avons obtenu des composés contenant l'imine camphre et les N-hétérocycles saturés du pharmacophore clé: pyrrolidine 2, pipéridine 3, 4-méthylpipéridine 4, pipéridin-4-ol 5, pipérazine 6, N-méthyle- 7 et fragments de N-éthylpipérazine 8. Nous avons synthétisé des agents contenant des fragments hétérocycliques à cinq chaînons (fragments 4,5-dihydrothiazole 9, N-méthyl-imidazole 10 et 1,2,4-triazole 11), séparés du groupe imino par l'atome de soufre via un agent de liaison aliphatique. Nous avons décrit les composés contenant des fragments aromatiques à six chaînons: fragments 4-chlorobenzène 12, pyridine 13 et pyrimidine 14, ainsi que les composés avec des échafaudages hétérocycliques aromatiques benzothiazole 15 et benzoimidazole 16.

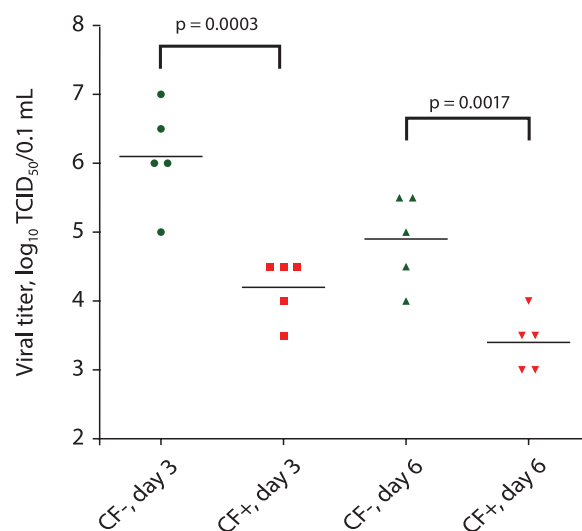


Figure 19. Titres viraux pulmonaires de souris infectées par les virus de la grippe sensibles au camphécène (CF-) et résistants au camphécène (CF+). Les souris (dix par groupe) ont été infectées par voie intranasale avec 5×10^5 pfu de l'un ou l'autre des virus. Aux jours 3 et 6 après l'infection, cinq souris de chaque groupe ont été euthanasiées, leurs poumons ont été isolés et homogénéisés dans dix volumes de solution saline, et l'activité virale a été mesurée dans les homogénats par titrage au sein des cellules MDCK. Les titres viraux ont été comparés entre les groupes par ANOVA à une voie

2.1.2. Essai d'inhibition du virus

Les composés ont été dissous dans 0,1 mL de DMSO pour préparer les solutions mères, tandis que les solutions finales (1000,0 à 4,0 μ M) ont été préparées par addition de MEM avec 1 μ g/mL de trypsine. Les composés ont été incubés avec des cellules MDCK pendant 1 h à 36°C. Chaque concentration des composés a été testée en triple. La culture cellulaire a ensuite été infectée par le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (m.o.i. 0,01) pendant 24 h à 36°C en présence de CO₂ à 5%. Le titre de virus dans le surnageant a été déterminé par le test d'hémagglutination après culture du virus dans des cellules MDCK pendant 48 h à 36°C en présence de CO₂ à 5%. La Rimantadine, l'Amantadine, la Deitiforin et la Ribavirine ont été utilisées comme médicaments de référence. Pour les calculs, le titre du virus a été exprimé en pourcentage du titre dans les puits témoins sans composés. Les concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) et l'indice de sélectivité (SI, rapport CC₅₀/IC₅₀) ont été calculés à partir des données obtenues.

2.1.3. Test de cytotoxicité

Le test au microtétrazolum (MTT) a été utilisé pour évaluer la cytotoxicité des composés. En bref, on a préparé des séries de dilutions de trois fois dans du MEM pour chaque composé. Les cellules MDCK ont été incubées pendant 48 h à 36°C dans du CO₂ à 5% en présence des substances dissoutes. Les cellules ont été lavées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), et la solution de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolum (ICN Biochemicals Inc. Aurora, Ohio) (0,5 μ g/mL) dans du PBS a été ajoutée aux puits. Après 1 heure d'incubation, les puits ont été lavés, et le résidu de formazan a été dissous dans du DMSO (0,1 mL par puits). La densité optique dans les puits a ensuite été mesurée sur un lecteur multi-

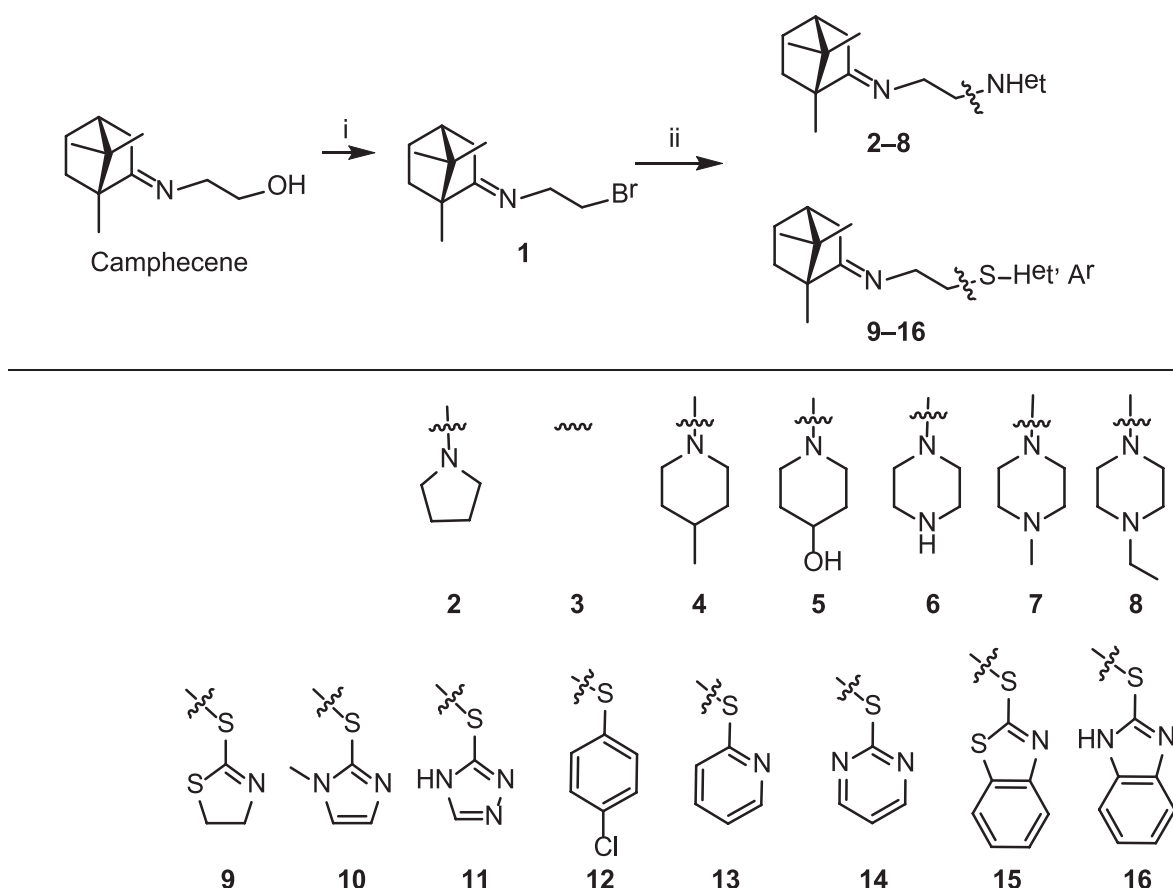


Figure 20. (i) PBr_3 , Et_2O , température ambiante (t.a.); (ii) amine ou thiol appropriée, K_2CO_3 , DBU, CH_3CN , t.a.

Tableau 14. Activité antivirale de composés à base de camphène 2–16 contre le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) dans des cellules MDCK

Composé	CTD_{50}^a , μM	IC_{50}^b , μM	SI ^c
2	> 1260	12±2	106
3	> 1141	27±4	43
4	294±14	25±2	12
5	> 1031	NA	1
6	1196±90	37±5	33
7	1079±82	45±6	24
8	222±19	101±12	2
9	753±62	33±4	23
10	1126±63	341±46	3
11	197±15	24±3	8
12	170±12	47±6	4
13	503±38	6±1	91
14	> 1025	6±1	183
15	383±22	19±2	20
16	406±29	21±3	20
Rimantadine	335±27	67,0±4,9	5
Amantadine	284±21	64±5	4
Deitiforin	1266±82	209±15	6
Ribavirin	> 2000	25	> 81,0

^a CTD_{50} , concentration cytotoxique; la concentration entraînant la mort de 50% des cellules.

^b IC_{50} , concentration efficace; la concentration entraînant une inhibition de 50% de la réplication du virus.

^cSI, indice de sélectivité, ratio $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$.

fonctionnel Victor2 1440 (Perkin Elmer, Finlande) à une longueur d'onde de 535 nm et tracée en fonction de la concentration en composés. Chaque concentration a été testée en trois parallèles. La concentration cytotoxique à 50% (CC_{50}) de chaque composé a été calculée à partir des données obtenues.

2.1.4. Expériences de temps d'addition

Pour déterminer le stade du cycle de vie du virus affecté par le composé **14**, les cellules ont été ensemencées dans des plaques à 24 puits et incubées avec le virus grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (m.o.i.10) pendant 1 h à 4°C. Après lavage pendant 5 minutes avec 0,5 ml de MEM froid (+4°C) par puits, afin d'éliminer les virions non absorbés, les plaques ont été incubées pendant 8 h à 36°C avec du CO_2 à 5%. Le point de départ de cette incubation a été indiqué comme 0h. Le composé **14** (concentration finale 300 $\mu\text{mol/L}$) a été dissous dans du MEM et ajouté aux cellules aux moments suivants: -2 et -1 hpi (avant l'infection); 0 (simultanément avec l'infection); 2, 4 et 6 hpi (après l'infection). Après 8 h de croissance, le titre infectieux du virus dans le milieu de culture et les cellules a été déterminé selon le procédé ci-dessus.

2.2. Résultats

2.2.1. Activité biologique des dérivés

Parmi les 15 composés testés, 11 (73%) ont démontré un indice de sélectivité (SI) supérieur à 10 et des valeurs de CI_{50} dans la gamme micromolaire. On a démontré que l'activité antivirale et la toxicité dépendaient fortement de la nature du substituant hétérocyclique. Les composés **2** et **14** ont démontré l'activité inhibitrice du virus la plus élevée avec les SI de 106 et 183, portant des fragments de pyrroli-

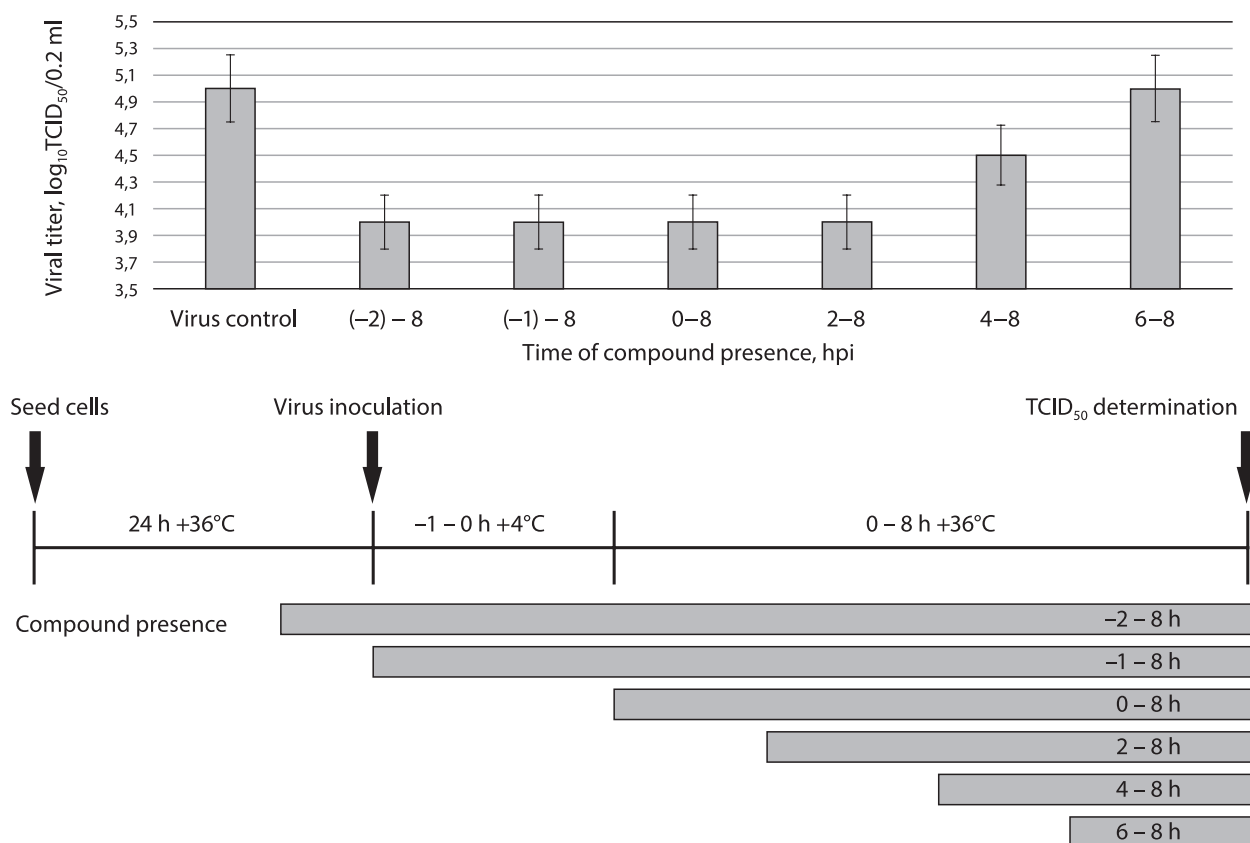


Figure 21. Activité du moment du no. 14 contre le virus de la grippe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)pdm09. au moment d'addition. Le virus de la grippe a été absorbé sur des cellules MDCK pendant 1 h à + 4°C, les virions non liés ont été éliminés par lavage, et la plaque a été transférée vers un incubateur à CO₂ (36°C) (t = 0). Le composé 14 a été ajouté aux moments indiqués. L'activité infectieuse de la descendance virale a été testée par titrage supplémentaire dans des cellules MDCK. hpi, quelques heures après l'infection

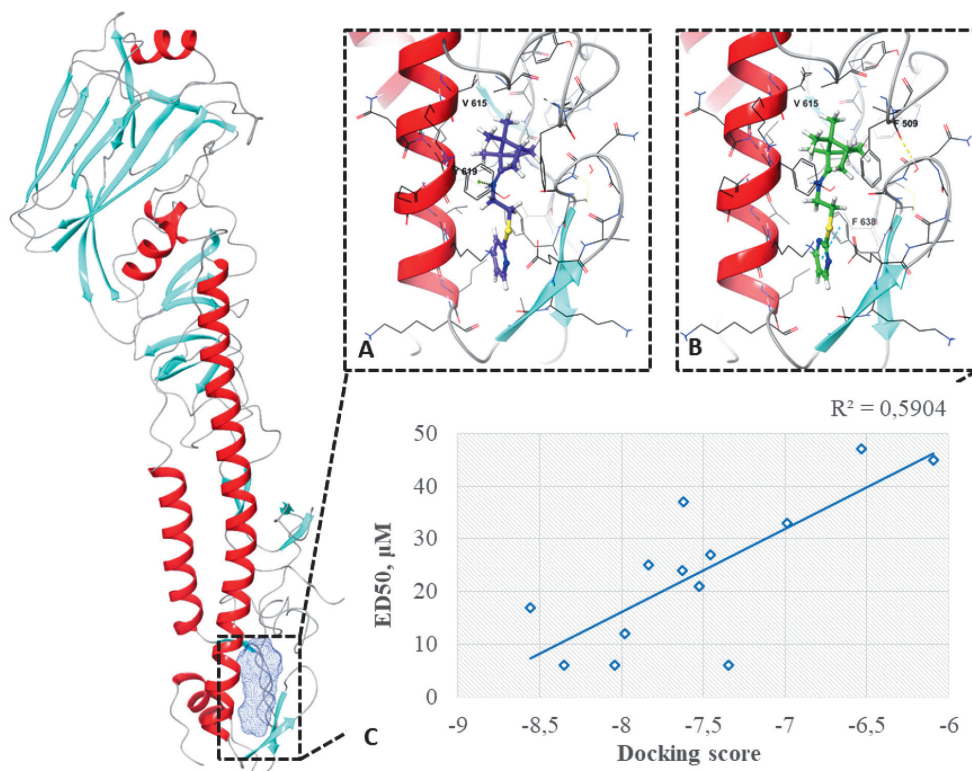


Figure 22. Amarrage moléculaire. A et B, les emplacements des composés 13 et 14 dans le site actif de HA2, respectivement: l'interaction n-cation est représentée par une ligne pointillée verte et l'empilement π - π en bleu. C, corrélation entre les valeurs de ED₅₀ et les résultats d'accouplement du composé actif

dine et pipéridine, respectivement. On a démontré que le composé **14** interférait avec la reproduction virale au début du cycle de vie du virus (0 à 2 heures après l'infection). L'ensemble des données témoignent du potentiel élevé des dérivés du camphécène en particulier et des dérivés de l'imine à base de camphre en général, en tant que composés anti-grippaux efficaces (Tabl. 14).

Il convient de noter que la comparaison directe des valeurs des IS pour les composés de différents types structuraux n'a généralement aucun sens, car ils peuvent avoir des propriétés pharmacocinétiques fondamentalement différentes *in vivo*. Lors de l'identification de composés prometteurs pour les recherches ultérieures, il convient de sélectionner les composés les plus actifs de chaque type structurel, dont les IS dépassent 10.

Parmi les dérivés hétérocycliques contenant de l'azote, le composé **2** avec un fragment de pyrrolidine était le plus efficace contre le virus de la grippe ($IC_{50} = 12 \mu M$). Le dérivé **2** a montré une activité inhibitrice virale puissante associée à une faible toxicité, ce qui indique un indice thérapeutique élevé ($IS = 10^6$). Les activités antivirales des composés contenant des fragments de pipéridine **3** et de 4-méthylpipéridine **4** étaient presque identiques; cependant, le composé **3** était beaucoup moins toxique. La présence du groupe hydroxyle dans le noyau pipérine du composé **5** entraînait une perte d'activité antivirale, bien que le composé reste non toxique. Les substances contenant des fragments de pipérazine **6** et de N-méthylpérazine **7** présentaient une activité antivirale comparable et une faible toxicité.

Parmi les composés contenant un fragment azoté à cinq chaînons lié par un atome de soufre au squelette naturel du camphre **9–11**, les agents **9** et **11** présentaient une activité antivirale, bien que le composé **9** soit bien moins toxique que le **11**. Les agents contenant la pyridine **13** ($IC_{50} = 6 \mu M$) et le fragment de pyrimidine **14** ($IC_{50} = 6 \mu M$) présentaient l'activité la plus élevée. Il convient de noter que le remplacement du fragment pyridine-2-thiol par le radical pyrimidine-2-thiol dans le composé **14** réduisait significativement la toxicité, alors que l'activité antivirale restait élevée. Dans la série des sulfures portant des noyaux de benzothiazole **15** et benzoimidazole **16**, la toxicité et l'activité antivirale observées étaient les mêmes.

Pour déterminer la cible évocatrice de l'activité inhibitrice du virus du composé le plus actif (**14**) dans le cycle de vie du virus, nous avons procédé aux expériences de temps d'addition. Les résultats sont résumés sur la Fig. 21. Comme les données suggèrent, le composé **14** s'est révélé le plus efficace lorsqu'il a été ajouté 0 à 2 heures après l'infection. Au fil du temps, l'efficacité du médicament diminuait et, à partir de 4 h après l'infection, l'activité infectieuse du virus ne différait pas statistiquement des valeurs du contrôle.

Selon ces résultats, on peut supposer que le dérivé **14** agit au stade initial du cycle de vie du virus de la grippe, ce qui implique l'adsorption des virions à la surface de la cellule cible et la pénétration du virion à l'intérieur de la cellule hôte. A ce stade, deux protéines virales sont essentielles. Tout d'abord, l'HA viral permet la fixation des virions à la surface des cellules et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. Deuxièmement, le canal de protons M2 spécifique au virus conduit les protons vers l'intérieur du virion, permettant ainsi l'acidification du noyau et permettant la dissociation des ribonucléoprotéines virales des structures de l'enveloppe. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le mécanisme exact de l'activité anti-grippale des molécules apparentées au camphécène.

2.2.2. Étude d'amarrage moléculaire

D'après les résultats des études biologiques, l'HA pourrait être une cible moléculaire pour les composés **2** à **16**. Nous avons considéré un site de liaison situé près du peptide de fusion avec la valine en position 615 (code PDB 1RU7 [(2004) Science 303: 1838–1842, 10.1126/science.1093155]). Nous avons analysé l'amarrage des composés les plus actifs **2–16** (**8** et **10** étant exclus comme inactifs) dans le site actif décrit ci-dessus, et nous avons comparé les résultats de l'amarrage moléculaire et des tests biologiques à l'aide d'un modèle de régression. La dépendance du score d'amarrage à la valeur ED_{50} a été prise en compte. Toutes les étapes des calculs théoriques (préparation du ligand et des protéines, procédure d'amarrage) ont été effectuées à l'aide de Small-Molecule Drug Discovery Suite 2018–1 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018).

L'amarrage moléculaire a démontré une bonne corrélation entre les données expérimentales et les calculs théoriques. L'indice de corrélation n'a pas dépassé 59%. Cette valeur peut être considérée comme une preuve que les composés **2** à **16** peuvent être situés dans le site actif de HA2 près de la fusion peptidique. Les composés les plus actifs **13** et **14** forment des interactions π -cation et empilement π - π avec la tyrosine en position 619 (Fig. 22).

Conclusion

En résumé, nous avons évalué la capacité du virus de la grippe à développer une résistance au camphécène et étudié les propriétés de la souche résistante. Nous avons démontré que la sélection de la résistance au camphécène était accompagnée d'une diminution considérable de la forme virale et de la pathogénicité chez les souris. Nous avons synthétisé l'ensemble des analogues du camphécène et avons démontré que certains dérivés, similaires au camphécène lui-même, possèdent une activité antivirale élevée, confirmant ainsi les puissantes propriétés anti-virales des dérivés du camphre en général.

Publications

1. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Baev D.S., Shtro A.A., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Aliphatic and alicyclic camphor imines as effective inhibitors of influenza virus H1N1 // *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 127: 661–670. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.035.
2. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Semenova M.D., Shtro A.A., Orshanskaya I.R., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and in vitro study of novel borneol derivatives as potent inhibitors of the influenza A virus // *Med. Chem. Comm.* 2017; 8: 960–963. doi: 10.1039/C6MD00657D.
3. Nazimova E.V., Shtro A.A., Anikin V.B., Patrusheva O.S., Il'ina I.V., Korchagina D.V., Zarubaev V.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. Influenza antiviral activity of Br-containing [2R,4R(S),4aR,7R,8aR]-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2H-chromen-4-ols prepared from (–)-isopulegol // *Chem. Nat. Compounds.* 2017; 53 (2): 260–264. doi: 10.1007/s10600-017-1966-7
4. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shtro A.A., Borisova M.S., Morozova E.A., Tolstikova T.G., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and biological activity of heterocyclic borneol derivatives // *Chem. Heterocyclic Compounds.* 2017; 53 (3): 371–377. doi: 10.1007/s10593-017-2063-3

5. Kovaleva K.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Zarubaev V.V., Shtro A.A., Orshanskaya Y.R., Salakhutdinov N.F. Synthesis of new heterocyclic dehydroabietylamine derivatives and their biological activity // *Chem. Heterocyclic Compounds*. 2017; 53 (3): 364–370. doi: 10.1007/s10593-017-2058-0
6. Artyushin O.I., Sharova E.V., Vinogradova N.M., Genkina G.K., Moiseeva A.A., Klemenkova Z.S., Orshanskaya I.R., Shtro A.A., Kadyrova R.A., Zarubaev V.V., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Synthesis of camphene derivatives using click chemistry methodology and study of their antiviral activity // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017; 27 (10): 2181–2184. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.051
7. Khomenko T.M., Zarubaev V.V., Orshanskaya I.R., Kadyrova R.A., Sannikova V.A., Korchagina D.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. Anti-influenza activity of monoterpene-containing substituted coumarins // *Bioorg. Med. Chem.*, 2017; 27: 2920–2925. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.04.091
8. Suslov E., Zarubaev V., Slita A., Ponomarev K., Korchagina D., Ayine-Tora D., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N. Anti-Influenza activity of diazaadamantanes combined with monoterpene moieties // *Bioorg. Med. Chem.*, 2017; 27: 4531–4535. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.08.062
9. Zarubaev V.V., Kris'ko T.C., Kriukova E.V., Muraviova T.D. Effect of albumin on the fluorescence quantum yield of porphyrin -based agents for fluorescent diagnostics // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2017; 20: 137–143. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.09.009
10. Sirotkina E.V., Efremova M.M., Novikov A.S., Zarubaev V.V., Orshanskaya I.R., Starova G.L., Kostikov R.R., Molchanov A.P. Regio- and diastereoselectivity of the cycloaddition of aldonitrone with benzylidenecyclopropane: an experimental and theoretical study // *Tetrahedron*, 2017; 73 (21): 3025–3030. doi: 10.1016/j.tet.2017.04.014
11. Zarubaev V.V., Slita A.V., Lavrentieva I.N., Smirnov V.S. Anti-viral activity of vitamin C // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 319–326. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-319-326
12. Voronov A.A., Alekseeva K.A., Ryzhkova E.A., Zarubaev V.V., Galochkina A.V., Zaytsev V.P., Majik M.S., Tilve S.G., Gurbanov A.V., Zubkov F.I. The first example of the cascade acylation/IMDAV/ene reaction sequence, leading to N-arylbenzo[f]isoindole-4-carboxylic acids possessing anti-viral activity // *Tetrahedron. Lett.*, 2018, 59 (12): 1108–1111.
13. Mueller A., Grein F., Otto A., Gries K., Orlov D., Zarubaev V.V., Girard M., Sher X., Shamova O., Roemer T., Francois P., Becher D., Schneider T., Sahl H.G. Differential daptomycin resistance development in *Staphylococcus aureus* strains with active and mutated *gra* regulatory systems // *Int. J. Med. Microbiol.*, 2018, 308: 335–348. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.12.002
14. Volcho C., Ilyina I., Zarubaev V.V., Lavrentieva I.N., Shtro A.A., Korchagina D., Borisevich S., Salakhutdinov N.F. Highly potent activity of isopulegol-derived substituted octahydro-2h-chromen-4-ols against influenza A and B viruses // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018; 28 (11): 2061–2067. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.04.057
15. Hossan S., Fatima A., Rahmatullah M., Khoo T.J., Nissapatorn V., Galochkina A.V., Slita A.V., Shtro A.A., Nikolaeva Y.N., Zarubaev V.V., Wiart C. Antiviral activity of *Embelia ribes* Burm. f. against influenza virus in vitro // *Arch. Virol.*, 2018, 163: 2121–2131. doi: 10.1007/s00705-018-3842-6
16. Melnichuk N., Zarubayev V., Iosyk I., Andreychyn M., Semernikova L., Tkachuk Z. Pre-clinical and clinical efficiency of complexes of olidoribonucleotides with D-mannitol against respiratory viruses // *Pharmaceutics* 2018; 10 (2). pii: E59. doi: 10.3390/pharmaceutics10020059
17. Zarubaev V.V., Pushkina E.A., Borisevich S.S., Galochkina A.V., Garshina A.V., Shtro A.A., Egorova A.A., Sokolova A.S., Khursan S.L., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Selection of influenza virus resistant to the novel camphor-based antiviral camphene results in loss of viral pathogenicity // *Virology*. 2018; 524 (11): 69–77. doi: 10.1016/j.virol.2018.08.011
18. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Amosov E.V., Zarubaev V.V., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Un-targeted search and identification of metabolites of antiviral agent camphene in rat urine by liquid chromatography and mass spectrometry and studying their distribution in organs following peroral administration of the compound // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018; 161: 383–392.
19. Kovaleva K.S., Zubkov F.I., Bormotov N.I., Novikov R.A., Dorovatovskii P.V., Khrustalev V.N., Gatilov Y.V., Zarubaev V.V., Yarovaya O.I., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. Synthesis of D-(+)-camphor-based N-acylhydrazones and their antiviral activity // *Med. Chem. Commun.* 2018; 9: 2072–2082. doi: 10.1039/C8MD00442K
20. Dar'in D., Zarubaev V., Galochkina A., Gureev M., Krasavin M. Non-chelating p-phenylidene-linked bis-imidazoline analogs of known influenza virus endonuclease inhibitors: synthesis and anti-influenza Activity // *Eur. J. Med. Chem.* 2019; 161 (1): 526–532.
21. Nor Azman N.S., Hossan M.S., Nissapatorn V., Uthaipibull C., Prommana P., Jin K.T., Rahmatullah M., Mahboob T., Raju C.S., Jindal H.M., Hazra B., Mohd Abd Razak M.R., Prajapati V.K., Pandey R.K., Aminudin N., Shaari K., Ismail N.H., Butler M.S., Zarubaev V.V., Wiart C. Anti-infective activities of 11 plants species used in traditional medicine in Malaysia // *Exp. Parasitol.* 2018; 194: 67–78. doi: 10.1016/j.exppara.2018.09.020
22. Dadeko A., Starodubtsev A., Ponomarev G., Lilge L., Kaspler P., Murav'eva T., Kiselev M., Zarubaev V. Photophysical properties and in vitro photocytotoxicity of disodium salt 2.4-di(alpha-methoxyethyl)-deuteroporphyrin-IX (Dimegine) // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019; 25: 35–42.
23. Galochkina A.V., Bollikanda R.K., Zarubaev V.V., Tentler D.G., Lavrenteva I.N., Slita A.V., Chirra N., Kantevari S. Synthesis of novel derivatives of 7,8-dihydro-6H-imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-5-one and their virus-inhibiting activity against influenza A virus // *Arch. Pharm.*, 2018; 1–8. doi: 10.1002/ardp.201800225
24. Antipova A.Y., Lavrentieva I.N. Viruses of the parvoviridae family: molecular genetical aspects of reproduction and medical importance // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (1): 7–20. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-7-20 (En Russ.)
25. Antipova A., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Totolian A.A. Measles in countries in the WHO African region at the stage of elimination of the infection // *Actual infection in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. Popova A.Yu. Saint Petersburg: Saint Petersburg Pasteur Institute, 2017: 264–278.
26. Antipova A.Y., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N. Implementation of the World Health Organization Western Pacific regional plan of action for measles elimination // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (4): 465–472. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-465-472
27. Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Y., Kanaeva O.I. The situation with measles in the North-Western Federal district and the difficulties of diagnosis in sporadic incidence: an analytical review. Saint Petersburg: Saint Petersburg Pasteur Institute, 2017: 76. (En Russ.)

28. Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrentieva I.N., Antipova A.Y., Kulyashova L.B., Totolian A.A. Study of ELISA test-systems of different formats for detection of measles virus specific IgM in different geographic zones // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 230–234. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-230-234 (En Russ.)
29. Khamitova I. V., Lavrentyeva I. N., Averyanova M. Yu., Chukhlov A. B., Zubarovskaya L. S., Afanasyev B. V. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Cellular Therapy and Transplantation*. 2018; 7 (1): 36–43. (En Russ.)
30. Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Y., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Beshpalova G.I. Infection of labour migrants from Central Asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (1): 61–70. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70 (En Russ.)
31. Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K., Sow T.C., Naydenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M. Impact of coinfection of PV B19 on the course and prognosis of malaria caused by *Plasmodium falciparum* // *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018; 8 (3): 383–387. (En Russ.)
32. Nikishov O.N., Maltsev O.V., Kuzin A.A., Lavrenteva I.N., Chinenov S.V., Antipova A.Yu., Lvov N.I., Vinogradova N.V. Clinical and laboratory characteristics of parvovirus B19 infection // *Treatment and Prevention*. 2017; 7 (4): 20–27. (En Russ.)
33. Popova A.Y., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Y., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian A.A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the Republic of Guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2 // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (1): 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-79-84 (En Russ.)

LABORATOIRE D'IDENTIFICATION DES PATHOGÈNES

Chef du laboratoire: Natalia Roschina

Chercheurs permanents: L. Kouliasheva, A. Zakrevskaya, A. Svarval, K. Ermolenko

En 2017–2018 au laboratoire d'identification des pathogènes a été effectuée l'étude des particularités séroépidémiologiques de contagion de la population de Saint-Petersbourg par *H. pylori* en 2007–2016. Pendant cette période la contagion de la population adulte par *H. pylori* a été au niveau de $68,00 \pm 0,9\%$; la contagion par les souches *cagA*+: $57,21 \pm 1,0\%$. La période de dix ans d'observation a détecté dans la population adulte une tendance à la stabilisation des indices de séroprévalence à *H. pylori* à un niveau suffisamment élevé de 60,22–72%. Une situation analogue s'observe aussi dans la séroprévalence à *cagA*+ *H. pylori*: 48,15–61,91%. La contagion par *H. pylori* parmi les enfants et les adolescents a constitué $30,28 \pm 1,1\%$, dont celle par les souches *cagA*+: $27,81 \pm 1,1\%$. La période de dix ans d'observation a détecté dans la population des enfants une tendance à la baisse des indices de séroprévalence à *H. pylori* de $45,74 \pm 4,4\%$ en 2008 à $20,9 \pm 3,8\%$ en 2016. Une situation analogue s'observe aussi dans la séroprévalence à *cagA*+ *H. pylori*: de $37,21 \pm 4,4\%$ en 2008 à $16,36 \pm 3,5\%$ en 2016. Les valeurs élevées de séroprévalence à l'infection à *H. pylori* détectées à Saint-Petersbourg au cours de la dernière décennie témoignent de la nécessité de continuer la surveillance de sa prévalence qui permettra d'asseoir les stratégies de traitement et de prévention des maladies associées à *H. pylori*.

L'étude des particularités génotypiques de *H. pylori* a démontré la forte circulation résiduelle des souches toxigènes contenant *cagA* dans leur génome. Ainsi parmi les patients atteints des pathologies gastriques la part de *cagA* constitue 79,59%, cet indice atteignant 87,23% au cas de maladie ulcéreuse. Ensemble avec l'Institut de la Médecine Expérimentale (Saint-Petersbourg) a été effectué une étude de présence des gènes de pathogénicité chez *H. pylori*, isolés à partir de l'estomac et le duodénum. A été évaluée la présence des gènes de pathogénicité *vacA*, *cagA*, *cagE*, *cagH*, *ureC*, *ureI*. Les gènes *ureC*, *ureI* et *vacA* ont été plus souvent détectés dans la muqueuse gastrique (respectivement 100%, 67% et 89%) comparés aux spécimens obtenus du duodénum (respectivement 44%, 14% et 43%). Le gène *cagA* n'a été détecté que dans les échantillons de la muqueuse gastrique (33%). Dans deux échantillons de *H. pylori* d'un coup ont été révélés 3 gènes porteurs de pathogénicité: *cagA*, *cagI*, *cagH*. Dans l'ensemble il n'a pas été révélé de corrélation directe entre la pathologie gastro-intestinale et le choix des gènes responsables des facteurs de pathogénicité *H. pylori*. La présence d'un grand nombre de gènes de pathogénicité dans les échantillons gastriques peut s'avérer être une condition de développement des processus oncologiques dans cette zone qui exigerait une observation dynamique des patients ayant un certain choix de gènes révélé.

Ensemble avec les spécialistes de l'Académie de médecine militaire S.M. Kirov a été réalisée une étude d'influence des facteurs de pathogénicité *H. pylori cagA* et *vacA* sur l'intensité inflammatoire de la muqueuse gastrique et le dé-

veloppement de ses transformations atrophiques. Ont été examinés 40 patients âgés de 30 à 60 ans, leur âge moyen étant de $44,1 \pm 7,9$ ans, atteints de la gastrite chronique. Pour vérifier l'intensité du processus inflammatoire de la muqueuse gastrique on a utilisé la méthode de microscopie en lumière visible avec calcul des leucocytes polymorphonucléaires. La présence des déterminants des facteurs de pathogénicité *H. pylori cagA* et *vacA* dans les échantillons de biopsie de la muqueuse gastrique a été déterminée par la méthode PCR en temps réel avec le test-système fabriqué par la SARL «Sintol» à Moscou. Les déterminants des facteurs de pathogénicité *H. pylori cagA* et *vacA* ont été détectés chez la plupart des malades atteints de la gastrite chronique (dans 72,5% de cas). Cependant le phénomène inflammatoire intense de la muqueuse gastrique a été révélé dans la plupart de cas présentant ces facteurs (86,7%). Il s'est également avéré que la présence de *H. pylori cagA* et *vacA* n'exerçait aucune influence sur l'existence et le degré d'expression des altérations de la muqueuse gastrique.

Ensemble avec l'établissement fédéral «Institut de la médecine expérimentale», l'Université d'Etat de Saint-Petersbourg et l'Hôpital clinique No. 122 L.G. Sokolov a été effectuée une étude des particularités de la microbiocénose intestinale associée à l'infection à *Helicobacter*. L'objectif en a été de comparer le microbiote intestinal des malades atteints de la dyspepsie associée et non associée avec l'infection à *Helicobacter*. L'étude clinique a été effectuée sur 21 patient atteint de dyspepsie. Pour les besoins de la gastroscopie chez tous les patients on a prélevé les échantillons de biopsie du corps et de la zone gastrique antrale. La présence de *H. pylori* a été confirmée au moyen des méthodes génétique et bactériologique. Le microbiote intestinal a été analysé avec utilisation de la méthode PCR en temps réel. La détection des virus herpétiques a été réalisée avec les ensembles Amplisens® Multiplex Real-Time les patients étant divisés en deux groupes: H.p.(+) — 10 malades à l'infection *H. pylori* confirmée; H.p.(–) — 11 patients sans infection *H. pylori*. La valeur moyenne de la teneur quantitative en bactéries du genre *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* est plus élevée dans les échantillons prélevés aux patients du groupe H.p.(+). Dans ce groupe il y avait moins de bactéries du genre *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. et *Feacalibacterium* spp. Le virus citomégalique et l'herpès simplex virus n'ont pas été révélés dans les deux groupes. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) n'a été révélé que chez les malades avec *H. pylori* (3 échantillons). Le virus herpétique du 6-ème type a été révélé dans 1 cas aussi bien dans le groupe H.p.(+) que dans le groupe H.p.(–). On peut remarquer qu'au cas de l'hélicobactériose d'habitude se développe la dysbiose intestinale qui se manifeste en augmentation du nombre de bactéries opportunistes et diminution du celui de bactéries utiles. La présence du virus herpétique dans les échantillons de biopsie gastrique est plus caractéristique pour les patients atteints de l'infection à *Helicobacter pylori*.

En 2017–2018 a été poursuivie l'étude des particularités séroépidémiologiques d'infection de la population de Saint-Petersbourg et du District fédéral Nord-Ouest, notamment des enfants et adolescents de Saint-Petersbourg, par les agents des infections sexuellement transmissibles (IST). A été également poursuivie l'étude des propriétés biologiques et moléculaires des souches des agents des IST circulant sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest.

On a réalisé une étude du spectre des génotypes de l'ADN du virus du papillome humain (VPH) (types 16, 18, 26, 31, 33, 35, 38, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 82), de leur incidence et de la charge virale chez les habitants de Saint-Petersbourg. L'âge des personnes examinées variait de 17 à 50 ans. A été examiné 351 patient, dont 279 femmes et 72 hommes. Dans l'examen des patients diagnostiqués VPH dans l'anamnèse ou avec suspicion de l'infection VPH on procédait à la définition du génotype et de la charge virale. L'analyse d'incidence des génotypes VPH parmi les femmes en âge de procréer a révélé la prévalence du VPH du type 16 (32,8%). Ensuite on a constaté la répartition suivante des génotypes: type 51 — 23,7%, type 56 — 22,3%, type 31 — 17,2%. Le VPH des types 53, 73 et 68 a été révélé avec la même fréquence de 15,6%, type 33 — 14,8%, type 66 — 13,1%, type 18 — 13,1%, type 39 — 11,5%, types 52 et 45 — 9,8%, type 59 — 9%, autres génotypes (3, 82 et 26) — dans moins de 5% de cas. La fréquence de détection des types oncogènes chez les hommes a été la suivante: génotype 59 — 10%, génotype 31 — 8%; les génotypes 16, 18 et 56 ont été détectés avec la même fréquence de 6,8%; l'incidence d'autres génotypes a été de 5% et moins.

Parmi les patientes au VPH la mono-infection a été observée dans 52,8% de cas, la multi-infection avec 2 types de virus — dans 24,7% et avec 3 et plus génotypes — dans 22,47% de cas. Chez les hommes la mono-infection a été révélée dans 65% de cas. Dans 23,5% de cas ont été détectés 2 génotypes des VPH oncogènes. Chez les femmes infectées la charge virale provoquée par le VPH variait entre 1,8 et 7,8 lg VPH pour 10^5 cellules. Chez les hommes la charge virale maximum variait entre 1,2 et 4,7 lg VPH pour 10^5 cellules.

A été réalisée une étude de la fréquence d'excrétion asymptomatique du virus d'Epstein-Barr (EBV) chez les femmes atteintes de l'herpès génital récidivant en fonction du stade du processus infectieux et la composition du microbiote vaginal. Il a été démontré qu'au cas de déroulement grave de l'herpès génital ce phénomène est observé aussi bien au cours des récurrences de la maladie (28% de cas) qu'en rémission (18% de cas). Au cas d'évolution moyennement grave en rémission, mais sur fond de la vaginose bactérienne, le EBV a été isolé dans 23% de cas, et après le traitement — dans 8% de cas. Ce qui s'explique aussi bien par le type Th2 de la réaction immunitaire que par l'insuffisance de l'immunité antivirale locale au cas de la vaginose bactérienne. Il a été démontré que la baisse d'intensité de la réaction immunitaire antivirale locale et générale est capable «d'enclencher» le mécanisme d'excrétion asymptomatique du EBV.

Ensemble avec l'Université d'Etat de la médecine I.P. Pavlov de Saint-Petersbourg pour la première fois en Russie a été effectuée une étude de définition de la séropositivité VPH du type 7 chez les enfants. Ont été examinés 116 enfants à l'âge de 10 jours à 10 ans. Il a été établi que 18% de patients de moins de 10 ans examinés avaient le contact avec l'agent et que le nombre d'enfants séropositifs au VPH du type 7 augmente parmi ceux âgés de plus de 4 ans. La fréquence assez élevée de détection des enfants séropositifs au VPH du type 7

à la naissance s'explique probablement par la présence des anticorps maternels spécifiques. Sont également intéressantes les données de la forte fréquence de détection simultanée des anticorps aux VPH des types 6 et 7. L'analyse comparée de la séropositivité au VPH du type 7 et VPH du type 6 a démontré une forte prévalence de l'infection au VPH du type 6 parmi les enfants examinés de toutes les catégories d'âge, qui témoigne du contact plus tardif des enfants avec le VPH du type 7 qu'avec celui du type 6. Tenant compte de la fréquence différente de détection des anticorps (probablement maternels) aux VPH des types 6 et 7 chez les enfants dans leurs premières semaines et premiers mois de vie, on peut supposer que dans la population adulte la prévalence du VPH du type 6 est également plus élevée. D'autre part, l'allaitement au sein et l'obtention des anticorps maternels par l'enfant sont censés être facteurs protecteurs, ce qui est probablement à l'origine du développement plus tardif de l'infection primaire au VPH du type 7 comparé à celui du type 6.

Ensemble avec l'Institut de la médecine expérimentale (Saint-Petersbourg) ont été commencées les études de l'activité antivirale des entérocoques et des probiotiques. Les résultats obtenus indiquent que l'activité antivirale des entérocoques et de la souche *E. faecium* L3 dirigée contre la reproduction de l'herpès simplex virus du 1-er type est comparable à la thérapie antivirale *in vitro*.

Ainsi les résultats de l'étude du spectre des VPH oncogènes témoignent de la charge virale exprimée chez les femmes examinées, ce qui accentue le risque de développement des altérations dysplasiques dans ce groupe. Au cours de l'étude réalisée a été révélée la prévalence du génotype 16 dans la structure des génotypes VPH chez les femmes de Saint-Petersbourg; le groupe des génotypes dominants comprenait également les génotypes 51, 56 et 31. Chez les hommes ont été détectés plus souvent les génotypes 59 et 31. Chez les femmes de Saint-Petersbourg l'incidence globale des génotypes VPH 16 et 18, visés par les vaccins existants, représente 45,9%. Les données de l'étude d'excrétion asymptomatique du EBV permettent de supposer qu'au cas de déroulement récidivant de l'herpès génital sur le fond de l'insuffisance immunologique secondaire les conditions se créent pour la persistance et l'excrétion à partir des organes du tractus urogénital d'encore un représentant de la famille des virus herpétiques qui est le EBV. Ce phénomène s'observe pendant la période de récurrence et, moins souvent, pendant la rémission. Tenant compte de la relative autonomie locale du vagin, il est possible de considérer la vaginose bactérienne comme encore un facteur potentiel qui contribue au développement d'un tel état. De même, comme jusqu'à 20% des uréthrites masculines s'associent avec le EBV, il est important d'évaluer l'excrétion de l'agent pendant la récurrence et la rémission de l'herpès génital dans cette catégorie des patients. Les résultats obtenus démontrent que dans le cadre d'une baisse générale d'intensité de la réaction immunitaire antivirale les variations analogues de l'immunité locale sont capables de provoquer le développement des conditions pour l'excrétion asymptomatique du EBV mais aussi soulignent la nécessité de l'étude ultérieure de ce phénomène. Les résultats présentés, visant à définir la séropositivité au virus herpétique du type 7 chez les enfants, correspondent à des représentations modernes de la prévalence de ce virus dans la population. En même temps nos données ont révélé la valeur de la séropositivité au virus herpétique du type 7 chez les enfants sensiblement plus faible que dans les études étrangères, ce qui exige de poursuivre les recherches.

Publications

1. Gizinger O.A., Zarucheynova O.V., Zima M.A., Shemetova M.A., Zakrevskaya A.V., Verbov V.N., Kulyashova L.B., Ziganshin O. R., Frantseva O.V. Assessment of detection frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp. a culture method and a polymerase chain reaction // *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017; 62 (1): 60–64.
2. Ermolenko K.D., Kulyashova L.B., Roschina N.G., Ermolenko D.K., Razdyakonova I.V., Gonchar N.V. Immunological features of viral intestinal infections in children // *Farmateka*. 2017; 11 (344): 67–71.
3. Ermolenko D.K., Zakrevskaya A.V., Zheltakova I.R., Ermolenko K.D., Isakov V.A., Isakov D.V., Roschina N.G. Features of subclinical allocation of a virus Epstein-Barr in women of childbearing age with genital herpes depending on the stage of the infectious process and the state of the vaginal microbiota // *Herald of Saint Petersburg University, episode 11 «Medical»*. 2017; 4.
4. Baryshnikova N., Ermolenko E., Svarval A., Ferman R., Colobov A., Alechina G., Roschina N., Uspenskiy Y., Haertle T., Suvorov A. Enterococcus faecium L-3 in eradication of *Helicobacter pylori*: In-vivo and In-vitro // *International Journal of Clinical & Medical Microbiology*. 2017; 2: 123–127.
5. Ermolenko K.D., Gonchar N.V., Lobzin Y.V., Grigoriev S.G. Predictors of formation of functional disorders of the gastrointestinal tract after norovirus infection in children // *Journal of Infectology*. 2010; 9 (2): 42–47.
6. Aronova E.B., Colomiech E.O., Dmitrienko M.A., Svarval A.V., Roschina N.G. HELPIL Rapid urease test: from simulation to clinical practice // *Gastroenterology*. 2017; 3: 11–15.
7. Soultanov V.S., Kulyashova L.B., Nikitina T.V., Roschin V.I. Antimycotic activity of conifer green needle complex against clinical strains of *Candida* species // *Natural Product Communications. An International Journal for Communications and Reviews Covering all Aspects of Natural Products Research*. 2018; 13 (1): 75–78.
8. Ermolenko K.D., Gonchar N.V., Lobzin Y.V. The Importance of premorbid background factors in the formation of postinfectious gastrointestinal disorders in children: the results of a prospective study // *Pharmateca*. 2018; 1: 76–82.
9. Potapova T.V., Ermolenko K.D., Lioznov D.A. Pseudomembranous colitis: risk factors, clinical picture, treatment // *Pharmateca*. 2018; 2: 72–76.
10. Suvorov A.N., Baryshnikova N.V., Svarval A.V., Niyazov R.M. Capacity of some probiotic strains in eradication of *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo // *Pharmateca*. 2018; 2: 74–78.
11. Ermolenko E., Varsin S., Baryshnikova N., Svarval A., Ferman R., Besedina N., Zakrevskaya A., Molostova A., Suvorov A. Gastrointestinal dysbiosis accompanied of *Helicobacter pylori* infection and its correction by probiotic // *Journal of Clinical Gastroenterology and Treatment*. 2018; 4 (1).
12. Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrent'eva I.N., Roschina N.G., Kaftyreva L.A., Kurilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Y., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Beshpalova G.I. Infection in labour migrants from Central Asia and residents of St. Petersburg pathogens of various infectious diseases and susceptibility to them // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (1): 61–70.
13. Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrent'eva I.N., Antipova A.Yu., Kulyashova L.B., Totolian A.A. The Results of a comparative study of test-systems of ELISA in determining IgM-measles antibodies in different geographical zones // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 230–234.
14. Nikolsky M.A., Kulyashova L.B., Zakrevskaya A.V., Lioznov D.A., Kaptur T.A., Zolotova M.A. Detection of IgG antibodies to human herpes virus type 7 in children // *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2018; 23 (2): 89–92.
15. Molostova A.S., Gusev A.S., Svarval A.V., Kravchenko A.V., Kashchenko V.A., Garifullina R. A., Lavrenova N.S., Kotyleva M. P., Shishkin A.N., Varzin S.A., Ermolenko E.I. Peculiarities of microbiocenosis of stomach in association with *Helicobacter pylori* infection // *Health-the basis of human development. Problems and ways to solve them. Proceedings of the XIII all-Russian scientific and practical conference with international participation, 22–24 November 2018, St. Petersburg. Yearbook*. 2018; 13 (1): 343–346.

LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE MOLÉCULAIRE (DU PÔLE D'USAGE COLLECTIF)

Chef du laboratoire: Areg Totolian

Chercheurs permanents: N. Arsentieva, O. Batsunov, V. Drobychevskaya, E. Zueva, N. Lubimova, Y. Ostankova, O. Petrova

Le Laboratoire d'immunologie moléculaire s'occupe des recherches dans le domaine d'immunologie clinique, en particulier des maladies infectieuses. Le champ des intérêts du laboratoire s'étend également sur l'étude des agents infectieux. Le chef du Laboratoire est le directeur de l'Institut, académicien de l'Académie des sciences de Russie, docteur en médecine, professeur Totolian Areg Artemovitch. Le collectif du laboratoire est composé des chercheurs de haute qualification dans les différentes spécialités médico-biologiques: médecins, biologistes, y compris généticiens et immunologues, spécialistes en biotechnologie. Sur la base du Laboratoire fonctionne le Pôle d'usage collectif de l'Institut Pasteur. Le support matériel et technique de son travail de recherche est composé d'un ensemble des appareils qui permettent d'effectuer les recherches au niveau moderne: cytofluorimètres à flux NovoCyte (ACEA Biosciences) et FACS Canto II (Beckton Dickinson), analyseur multiplex utilisant la technologie xMAP (Luminex) MagPix (Millipore), spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics), analysant le temps de vol, avec désorption/ionisation laser à matrice, analyseur génétique GenomeLab XP (Beckman-Coulter) avec système d'analyse génétique Pyromark Q24 (Qiagen), équipement pour électrophorèse 2D Ettan

IPGphor 3 IEF System et Ettan DALTsix Large Vertical System (GE Healthcare), station de travail automatisée Biomek 4000 (Beckman Coulter) et d'autres types d'équipements.

Les chercheurs du laboratoire prennent part aux projets de recherche suivants:

- **Diagnostic immunologique et moléculaire-biologique des déficits immunitaires primaires (DIP).** Sur la base du Pôle d'usage collectif a été créé le Centre de diagnostic et de traitement des déficits immunitaires primaires (Primary Immunodeficiency Center, PID Center). Le Centre effectue les recherches de détection des sous-populations des lymphocytes, y compris des sous-populations mineures des B- et T-cellules, d'explosion oxydative des granulocytes et de phagocytose par la méthode de cytofluorométrie à flux. Pour détection les mutations au cas de confirmation du diagnostic du DIP on fait recours aux méthodes moléculaires génétiques. On effectue le séquençage des gènes *bt1*, *rag1*, *rag2*, *cybb*. Au schéma du diagnostic de détection du DIP a été incorporée la méthode de définition quantitative des cercles d'excision TREC et KREC comme moyen de screening de détection des DIP. L'activité de recherche et de diagnostic effectuée par le Centre DIP se combine avec le travail clinique au service polyclinique et hospitalier de l'Institut.
- On réalise l'étude et l'analyse comparée du contenu des cytokines et chimiokines, faisant partie de la réponse immunitaire antivirale, dans le sang périphérique des malades de l'hépatite chronique virale B (HVB), y compris dans les groupes des patients atteints de la fibrose hépatique aux différents stades. On étudie les mécanismes de passage à la chronicité et les particularités de la réponse immunitaire contre le virus de l'hépatite B. Dans les travaux du Centre on étudie l'expression des récepteurs des chimiokines sur les différentes sous-populations des lymphocytes. Une étude ultérieure de l'expression des récepteurs des chimiokines et des marqueurs d'activation sur la surface des cellules-clefs du système immunitaire, participant au contrôle de l'infection virale, permettra de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre le microorganisme et le système immunitaire.
- On effectue aussi le travail de définition de la concentration des cytokines/chimiokines au plasma sanguin des malades atteints des affections hépatiques auto-immunes. Les résultats des recherches sur cette thématique ont été testés à des différentes conférences scientifiques.
- On continue également la recherche des marqueurs de laboratoire pour détecter les lésions du foie des différentes genèses. La réalisation de ce projet est programmée pour plusieurs années et inclut deux approches de méthode: génomique et protéomique. A été conçu et validé un test-système d'évaluation quantitative de l'ADN circulaire fermé de façon covalente du virus de l'hépatite B dans les tissus hépatiques (Fig. 23). On étudie la fréquence de l'hépatite B, non détectée par les méthodes routinières, chez les personnes infectées par le VIH.

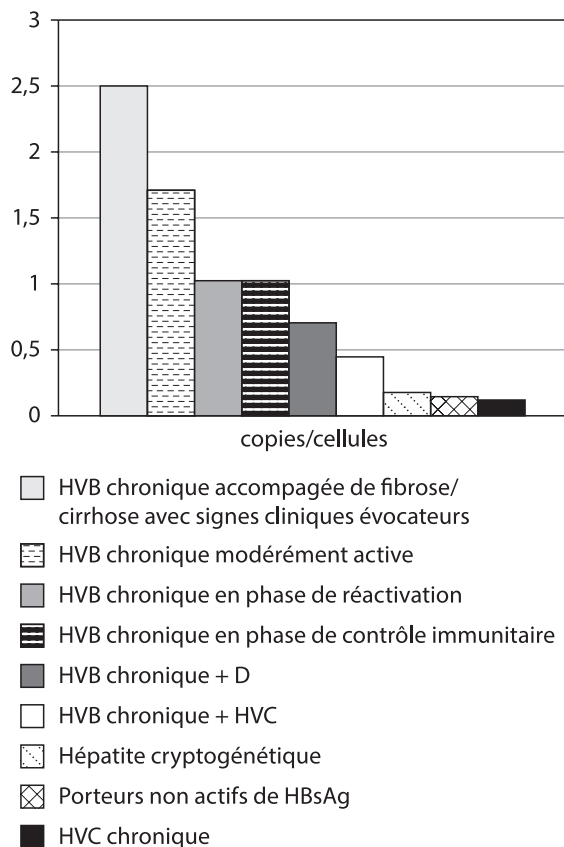


Figure 23. Evaluation quantitative de l'ADN circulaire fermé de façon covalente du virus de l'hépatite B dans les échantillons de ponction de biopsie hépatique

- Dans le cadre des recherches sur l'élimination des hépatites virales on évalue la significativité du processus migratoire dans leur propagation y compris de l'HVB HbsAg-négative des génotypes/sous-génotypes qui ne sont pas caractéristiques pour la région receveuse.
- Encore un vecteur de ces recherches est l'évaluation de la prévalence de l'HVB HbsAg-négative (occulte) aussi bien dans la population et les différents groupes risque que chez les donneurs de sang, ce qui est particulièrement important vu la forte contagiosité de l'agent pathogène même dans les conditions d'une faible charge virale. Pour effectuer ces recherches a été élaborée et testée la méthode basée sur la PCR asymétrique à deux étapes avec séquençage ultérieur permettant de révéler l'HVB HbsAg-négative dans les conditions d'une faible charge virale au plasma sanguin. On mène l'élaboration d'un test-système dans le format PCR RT pour permettre de révéler l'HVB HbsAg-négative dans la pratique clinique.
- A été écrite une thèse de doctorat sur le thème des marqueurs moléculaires et immunologiques de lésion hépatique par les hépatites chroniques virales (Semenov A.V.). Le travail s'assignait comme but la révélation de la significativité et informativité des marqueurs moléculaires-biologiques et immunologiques de la lésion des tissus hépatiques, associée aux hépatites chroniques virales B, B+D et C, pour déterminer le stade de la fibrose hépatique des malades, atteints de l'hépatite chronique virale C, avec utilisation de trois cytokines (Fig. 24). A l'achèvement de la recherche en 2017 a eu lieu la soutenance réussie de la thèse. A Semenov A.V. a été attribué le grade de docteur en biologie.
- A été également écrite une thèse de doctorat du troisième cycle sur le thème de la caractéristique moléculaire-génétique du virus de l'hépatite B dans les cas des formes HbsAg-positif et Hbs-négatif (latente) de la maladie (Ostankova Y.V.). A l'achèvement de la recherche en 2018 a eu lieu la soutenance réussie de la thèse. A Ostankova Y.V. a été attribué le grade de docteur du troisième cycle en sciences en biologie.
- Au Laboratoire on continue les recherches de définition de l'incidence des variantes alléliques du génotype CCR5 dans la population de Saint-Petersbourg. CCR5 joue un rôle important au cas de réaction inflammatoire à l'infection. La définition de la fréquence des délétions dans

le gène CCR5 permet de préciser la prévisibilité d'incidence du SIDA dans la région Nord-Ouest. Parallèlement à l'étude de prévalence de l'hétéromorphisme du gène CCR5 on étudie l'hétéromorphisme d'encore un gène à effet protecteur, — CCR2, sur le même échantillon de la population qu'on a utilisé pour l'examen de l'hétéromorphisme de CCR5. On a élaboré une méthode originale de définition de l'état allélique du gène CCR2 par la méthode de pyroséquençage.

Ensemble avec d'autres laboratoires de l'Institut on mène les recherches selon les projets suivants:

- Analyse du génome des souches du virus de l'hépatite B, circulant sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest de la Fédération de Russie (ensemble avec le laboratoire des hépatites virales). On effectue le séquençage et l'analyse phylogénétique comparée des souches de l'HVB. La définition des séquences Cor/preCor et preS/S des différentes régions du génome de l'HVB permet de génotyper le virus détecté et effectuer les recherches de la résistance (primaire et secondaire) de l'HVB aux produits antiviraux. L'accumulation de données d'épidémiologie moléculaire de l'HVB fait partie du programme d'éradication de l'hépatite virale aiguë B sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest. Selon les résultats de séquençage des souches de l'HVB a été préparée à la soutenance une thèse de candidat es sciences de la biologie.
- On effectue l'évaluation de la prévalence des mutations de la résistance aux médicaments du virus de l'hépatite C dans les régions NS3, NS5a, NS5b chez les patients qui ont reçu la thérapie antivirale avec des produits d'action directe.
- Dans le cadre de la recherche «Elaboration de la méthode d'identification rapide des souches pathogènes de *Leptospira* sur la base de l'analyse de spectrométrie de masse MALDI-TOF» (ensemble avec le laboratoire des infections zoonanthropiques de l'Institut Pasteur) ont été effectués les travaux de composition d'une base de données des spectres de masse de référence des protéines obtenues des lysats cellulaires des souches de *Leptospira* spp. de la collection de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg. A été élaborée la méthode d'identification des sérovars des bactéries du genre *Leptospira* par la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Fig. 25).

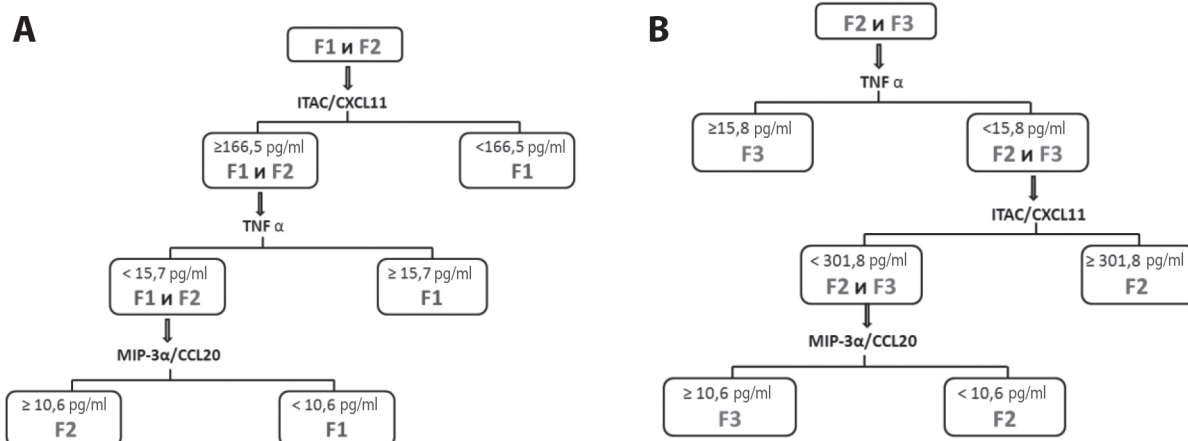


Figure 24. L'arbre logistique de distinction entre groupes des malades de l'HVC chronique aux différents stades de la fibrose hépatique (F). Sur le dessin A est présenté l'arbre logistique de distinction entre groupes des malades de l'HVC chronique aux stades F1 et F2; sur le dessin B — de distinction entre groupes des malades aux stades F2 et F3

- Par la méthode de l'analyse multiplex est effectuée l'étude des sérums sanguins des patients qui ont supporté la leptospirose. On définit aussi la concentration des chimiokines et cytokines, y compris au cas des formes sévère et fatale de la leptospirose. La collection des souches *Leptospira* sp. a été caractérisée par 16S ARNr.
- Il est effectuée une identification des bactéries des espèces *Yersinia enterocolitica*-like par la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF. La diversité spécifique des *Yersinia* rend compliquée leur identification selon les caractères phénotypiques, suite à quoi on les identifie souvent comme *Y. enterocolitica* à cause du nombre insuffisant des tests biochimiques existant dans le commerce. On a créé notre propre collection de spectres de masse de référence pour *Yersinia* spp. faisant partie de l'ensemble pour la mise en oeuvre de la réaction d'agglutination microscopique. La collection réunie est utilisée pour le contrôle d'invariabilité de la composition des pointes spécifiques dans les spectres de masse des souches de référence de *Yersinia* pendant les réensemencements de la collection.

Dans le cadre de la réalisation du règlement du Gouvernement de la Fédération de Russie sur la coopération dans le domaine de la recherche scientifique et technique entre la Fédération de Russie et la République de Guinée les chercheurs du laboratoire étudient la prévalence des marqueurs sérologiques et moléculaires-biologiques des hépatites virales (A, B, C, D, E) et du VIH parmi les habitants conventionnellement en bonne santé de la République de Guinée et dans les groupes risque. On mène une analyse de la structure génotypique/sous-génotypique et des mutations des virus détectés. On évalue la prévalence du virus HbsAg-négatif (occulte) de l'hépatite virale B.

Les recherches dans le cadre de la coopération entre la Fédération de Russie et la République du Vietnam sont

aussi consacrées en premier lieu à de telles maladies à impact social comme les hépatites virales et le VIH. On effectue l'évaluation de la prévalence des marqueurs des hépatites virales entérales et parentérales et l'analyse de la structure génétique des virus des l'hépatite et du VIH au Vietnam.

Le Pôle d'usage collectif maintient une collaboration dans la recherche avec les organismes suivants:

- «Institut de recherche en médecine expérimentale» de la Filiale Nord-Ouest de l'Académie des sciences de médecine de Russie (service d'immunologie), Saint-Petersbourg;
- «Université d'Etat de médecine pédiatrique de Saint-Petersbourg» (département des maladies infectieuses des adultes et de l'épidémiologie), Saint-Petersbourg;
- «Université d'Etat de médecine de Saint-Petersbourg I.P. Pavlov» (département des maladies infectieuses, de la pneumologie, de l'oto-rhino-laryngologie, Centre de la médecine moléculaire), Saint-Petersbourg;
- «Université d'Etat russe de médecine» (département de la pédiatrie), Moscou;
- «Académie de médecine militaire S.M. Kirov» du Ministère de la défense de la Fédération de Russie (département des maladies infectieuses), Saint-Petersbourg.

L'agenda du Laboratoire comprend l'écriture et la présentation à la soutenance de deux thèses de doctorat du troisième cycle, qui sont en état de travail.

Le collectif du Laboratoire participe activement à la présentation des résultats de ses recherches à des plus importantes conférences russes et internationales. En 2017–2018 les chercheurs du laboratoire ont fait 80 communications en forme orale et sous forme de présentation visuelle, et publié 123 thèses.

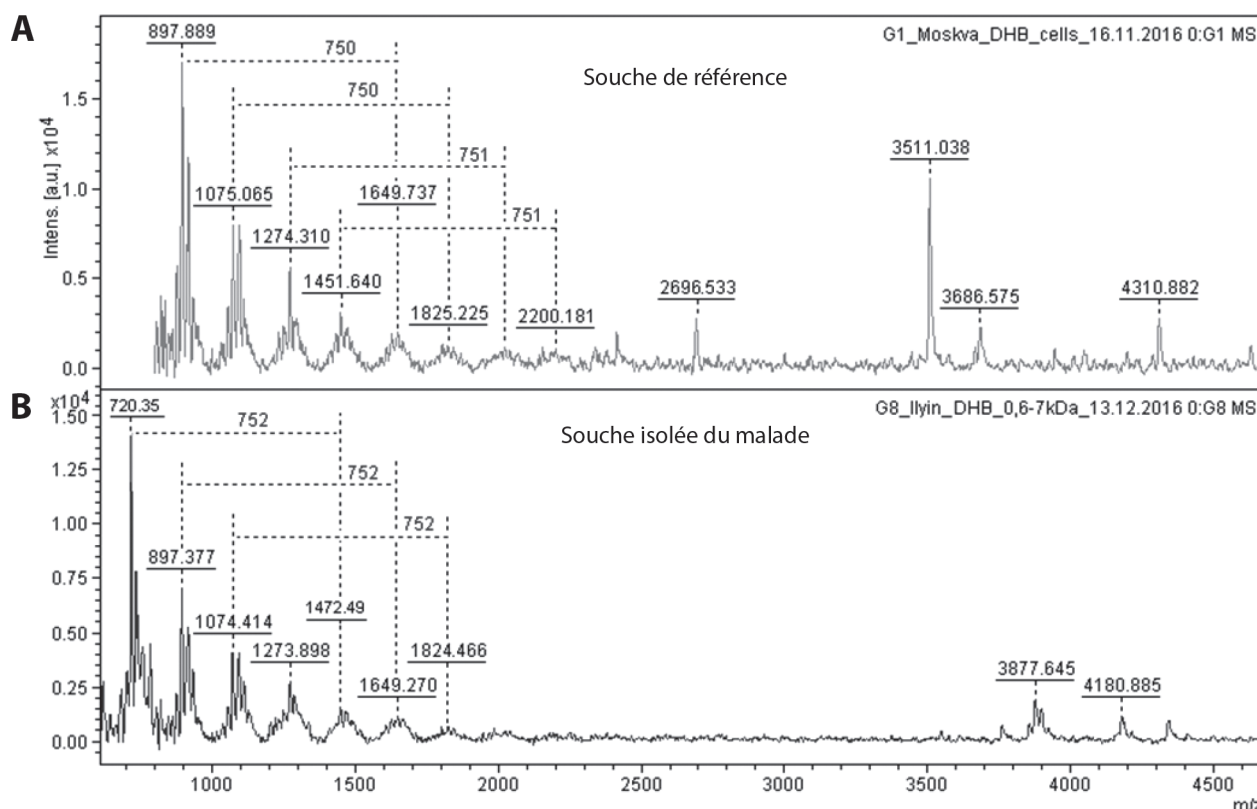


Figure 25. Comparaison des profils spectraux des sous-unités répétitives des chaînes polysaccharidiques des O-antigènes de la souche de référence, qui se rapporte au sérovar grippotyphosa (A), et de la souche isolée du malade (B)

Publications

1. Zyeva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Totolian A.A. Identification of *Leptospira* serovars by MALDI-ToF mass-spectrometry // *Journal of microbiology, epidemiology and immunology*. 2017; (1): 42–49.
2. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenotrophomonas maltophilia* using the techniques of direct sequencing 16S rRNA and MALDI-ToF mass-spectrometry // *The Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017; 62 (3): 165–170.
3. Churina M.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovsky A.P., Grebyonkina E.V., Tkachenko T.N., Zhandarmova T.A., Trofimova T.S., Asadullayev M.R., Belyakov N.A., Totolian A.A. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with art failure in Veliky Novgorod // *HIV infection and immunosuppressive disorders*. 2017; 9 (1): 82–92.
4. Ostankova Y.V., Semenov A.V., Churina M.A., Totolian A.A. Cases inefficient antiretroviral therapy for HIV-1 in children // *Journal Infectology*. 2017; 9 (2): 72–79. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-72-79 (En Russ.)
5. Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Churina M.A., Nikitina N.A., Rosolovsky A.P., Grebenkina E.V., Tkachenko T.N., Zhandarmova T.A., Totolian A.A. Molecular-biological methods of diagnostics for investigation of HIV infection transmission // *Journal of microbiology, epidemiology and immunology*. 2017; 4: 59–66.
6. Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Gusev D.A., Semenov A.V., Ostankova Y.V., Sukachev V.S., Shakhmanov D.M., Zhabrov S.S., Yurkaev I.M., Zhanarstanova G.A., Zubik T.M., Ivanov K.S., Lyashenko Y.I. Occult HBV-infection (clinical report) // *Journal Infectology*. 2017; 9 (1): 107–109. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-1-107-109 (En Russ.)
7. Popova A.Y., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V., Zbrovskaya A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V., Porin A.A., Boiro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian A.A. Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 375–382. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382 (En Russ.)
8. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N., Totolian A.A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 383–392.
9. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Pishchik V.N., Popov A.A., Totolian A.A. 16S rRNA Sequencing for Species Identification in Mixed Cultures for New Bio Preparations in Agriculture // *Adv. Biotech. & Micro*. 2017; 2 (5): 555599. doi: 10.19080/AIBM.2017.02.555599
10. Belopolskaya M.A., Avrutin V.Y., Ostankova Y.V., Dmitrieva M.I., Rukoiatkina E.A., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Prevalence and genetic variants of virus hepatitis B in pregnant women // *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2017; 9 (4): 55–64. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-4-55-64 (En Russ.)
11. Kozlov G.V., Zueva E.V., Pushkarev M.A., Naumov A.M., Garabadzhiu A.V., Belyaev D.Yu., Danilovich D.P., Tsvetkov A.P. Study of microbiological aspects of waste processing at experimental mechanized waste processing plant // *Bulletin of the Saint-Petersburg State Technological Institute*. 2017; 41: 82–88.
12. Popova A.Yu., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V., Zbrovskaya A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V., Porin A.A., Boiro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian A.A. Comparative characteristics of intestine microbiome of republic Guinea and Russian federation residents // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 375–382.
13. Usenko T.S., Nikolaev M.A., Lyubimova N.E., Pchelina S.N. Using multiplex analysis technology by the Luminex MagPix analytical system for assessing the cytokine profile of blood plasma // *Molecular biological technologies in medical practice*. 2018 (28): 127–141.
14. Voytenkova E.V., Matveeva Z.N., Makarova M.A., Egorova S.A., Zbrovskaya A.V., Suzhaeva L.V., Zueva E.V., Kaftyreva L.A. Selection and features identification *Comamonas kersterii* in the study of the intestinal microbiota of residents of St. Petersburg and the Republic of Guinea / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 204–209.
15. Esaulenko E.V., Semenov A.V., Sukhoruk A.A., Ponyatishin M.V., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Totolian A.A. Epidemiology of enteric hepatitis in the African continent / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 216–224.
16. Esaulenko E.V., Semenov A.V., Sukhoruk A.A., Ponyatishin M.V., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Naidyonova E.V., Kritsky A.A., Bumbali S., Barry M.S., Buaro M.Y., Shcherbakova S.A., Totolian A.A. A seroepidemiological study of enteric hepatitis in the Republic of Guinea / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 225–231.
17. Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Esaulenko E.V., Ponyatishina M.V., Bumbali S., Barry M.S., Buaro M.J., Totolian A.A. Epidemiology of Hepatitis B in African Countries continent. / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 232–241.
18. Popova A.Yu., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Shcherbakova S.A., Bumbali S., Barry M.S., Buaro M.J., Totolian A.A. Distribution of the genotypes of the hepatitis B virus among patients of the Russian-Guinean hospital of the city of Kindia of the Republic of Guinea / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 242–249.
19. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Ponyatishina M.V., Khamitova I.V., Safronov V.A., Kritsky A.A., Bumbali S., Barry M.S., Buaro M.J., Totolian A.A. The prevalence of hepatitis B virus markers among patients of the Russian-Guinean hospital of the city of Kindia, Republic of Guinea / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 250–255.
20. Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Levkovsky A.E., Ostankova Yu.V., Agafonov A.P., Chub E.V., Totolian A.A. Effect of infection with parvovirus B19 on the course of malaria in the Republic of Guinea / *Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* / Ed. A.Yu. Popova. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 285–288.
21. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Bushmanova A.D., Ingabire T., Ostankova Y.V. Current epidemiological, molecular and genetic characteristics of enteric viral hepatitis in Russia // *Almanac of Clinical Medicine*. 2018; 46 (1): 50–58. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-1-50-58 (En Russ.)
22. Pishchik V., Vorobyev N., Ostankova Yu., Semenov A., Totolian A.A., Popov A., Khomyakov Y., Udalova O., Shibanov D., Vertebny V., Dubovitskaya V., Sviridova O., Walsh O., Shafian S. Impact of *Bacillus subtilis* on Tomato Plants Growth and Some Biochemical Characteristics under Combined Application with Humic Fertilizer // *International Journal of Plant and Soil Science*. 2018; 22 (6): 1–12.

23. Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Y., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bessalova G.I. Infection of labour migrants from central asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (1): 61–70. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70 (En Russ.)
24. Khamitova I.V., Lavrentyeva I.N., Averyanova M.Yu., Chukhlov A.B., Zubarovskaya L.S., Afanasyev B.V. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Cellular Therapy and Transplantation*. 2018; 7 (1): 36–43. doi: 10.18620/ctt-1866-8836-2018-7-1-36-43.
25. Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Makarova M.A., Egorova S.A., Zablovskaia A.V., Suzhaeva L.V., Zueva E.V., Kaftyreva L.A. Difficulties in identification of *Comamonas kerstersii* strains isolated from intestinal microbiota of residents of Republic of Guinea and Russian Federation // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 163–168. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-163-168
26. Petrova O., Stoyanova N., Basina V., Dzyuban D., Lubimova N., Arsentieva N., Tokarevich N., Semenov A., Totolian A. The Main Clinical, Laboratory and Immunological Parameters in Patients with Leptospirosis in Saint-Petersburg // *Russian Immunology Journal*. 2018; 12 (21): 725–727.
27. Arsentieva N.A., Totolian A.A. Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral blood from healthy individuals // *Medical Immunology (Russia)*. 2018; 20 (5): 763–774. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774 (En Russ.)
28. Basina V.V., Sukhoruk A.A., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. Clinical and immunological characteristics of patients with chronic hepatitis C during antiviral therapy in interferon-free regimen // *Kazan Medical Journal*. 2018; 99 (5): 760–765. doi: 10.17816/KMJ2018-765
29. Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K., Sow T.C., Naydenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M. Impact of coinfection of PV B19 on the course and prognosis of malaria caused by *Plasmodium falciparum* // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018; 8 (3): 375–379.
30. Basina V.V., Peradze Kh.D., Lyubimov A.S., Tsertsvadze G.K., Petrova O.A. Listerioz — new point of view // *Bulletin of the Dagestan State Medical Academy*. 2018; 29 (4): 33–37.
31. Semenov A.V., Schemelev A.N. Virut hiv gây hội chứng suy giảm miễn dịch (aids) ở người tại việt nam. Giám sát và Kiểm soát dịch những bệnh truyền nhiễm do virut mang tính thời sự với nước cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam. St. Petersburg 2018.

Patent

1. METHOD FOR IDENTIFYING SEROVARS OF LEPTOSPIRA BACTERIA USING MALDI-TOF SPECTROMETRY. Zueva Elena Viktorovna, Stoyanova Nataliya Aleksandrovna, Tokarevich Nikolaj Konstantinovich, Totolian Areg Artemovich No. 2017102864/10 (004987), 01/27/2017. Patentee: Saint-Petersburg Pasteur Institute.
2. METHOD FOR HEPATITIS B VIRUS DNA IDENTIFICATION IN BIOLOGICAL MATERIAL WITH LOW VIRAL LOAD BASED ON TWO-STAGE PCR. Ostankova Yuliya Vladimirovna, Semenov Aleksandr Vladimirovich, Totolian Areg Artemovich No. 2016144898 (2633755), 17/10/2017. Patentee: Saint-Petersburg Pasteur Institute.

Département d'épidémiologie

LABORATOIRE D'ÉPIDÉMIOLOGIE DES MALADIES INFECTIEUSES ET NON INFECTIEUSES

Chef du laboratoire: Liudmila Lyalina

Chercheurs permanents: J. Terentieva, V. Kaziahmedova, V. Vetrov

En 2017–2018 le Laboratoire d'épidémiologie des maladies infectieuses et non infectieuses a pris part à la réalisation des travaux de recherche suivant les directions ci-dessous:

- Fondement épidémiologique et évaluation de l'efficacité de la vaccination contre l'infection au papillomavirus et les néoformations malignes associées au virus du papillome humain.
- Épidémiologie de la rougeole et de la rubéole à l'étape de leur éradication au Nord-Ouest de la Russie.
- Réalisation du programme d'éradication de l'hépatite virale B sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest de la Russie.
- Épidémiologie de la tuberculose et la résistance de *M. tuberculosis* aux médicaments dans l'oblast de Léninegrad.

Infection au virus du papillome humain

La vaccination contre l'infection au virus du papillome humain est effectuée en Fédération de Russie depuis 2007, mais elle n'est pas incluse au Calendrier national des vaccinations préventives. En 2017–2018 à Saint-Pétersbourg et dans l'oblast de Léninegrad a été poursuivi le travail de l'étude des particularités de propagation des maladies associées au virus du papillome humain (VPH) dans les conditions de faible couverture par la vaccination contre le VPH. La vaccination n'a été effectuée qu'aux frais de la population informée. 770 personnes ont obtenu en 2018 le cours complet de vaccination contre 268 personnes en 2018 (principalement les femmes).

L'incidence des condylomes ano-génitaux fait partie des critères précoces d'évaluation de l'efficacité de la vaccination contre le virus du papillome humain. Le Fig. 26 présente l'incidence des condylomes ano-génitaux à Saint-Pétersbourg et l'oblast de Léninegrad pendant la période de faible couverture par la vaccination. L'incidence dans la population de la mégapole de Saint-Pétersbourg et de l'oblast de Léninegrad, qui en est la zone environnante,

est sensiblement différente. En 2017 et 2018 l'incidence des condylomes ano-génitaux à Saint-Pétersbourg a fait respectivement 52,9 et 55,4 par 100 000 habitants. Dans l'oblast de Léninegrad cet indice a été de 19,4 et 17,0 par 100 000 habitants. A Saint-Pétersbourg on observe la tendance à la hausse d'incidence qui témoigne de l'absence d'influence des vaccinations de faible étendue sur la population.

Les cas d'affection par les condylomes ano-génitaux ont été constatés parmi les patients hommes et femmes dans toutes les catégories d'âge. Même chez les enfants ont été détectés les cas isolés (Fig. 27). Le principal groupe risque est celui des jeunes gens âgés de 18 à 29 ans. En 2017 et 2018 les taux d'incidence dans cette catégorie ont été de 9,5 et 8,4 par 100 000 personnes. Parmi les patients âgés de 30–39 ans le taux d'incidence des condylomes ano-génitaux a été plusieurs fois plus faible (5,3–4,0 par 100 000 habitants). Dans la catégorie des adolescents de 15–17 ans les taux d'incidence variaient de 1,6 (en 2017) à 1,7 (en 2018) par 100 000 habitants.

Parmi les critères précoces d'évaluation de l'efficacité de vaccination contre le virus du papillome humain on utilise aussi la prévalence des types du VPH à haut risque cancérogène. Le Fig. 28 présente les résultats de l'étude de prévalence du VPH (16 génotypes globalement) parmi les patients d'un dispensaire antivénérien de Saint-Pétersbourg. Les résultats de l'étude ont démontré qu'en 2013–2018 la fréquence de détection du VPH variait entre 20,0 et 25,2 par 100 patients examinés. En 2017–2018 le VPH a été détecté respectivement dans 23,4% et 20,0% de cas. Pour le diagnostic de laboratoire ont été utilisés les test-systèmes russes et la méthode choisie pour l'étude a été la PCR en temps réel.

La prévalence des génotypes concrets du VPH dans cette catégorie des patients est présentée au Fig. 29. Le VPH du génotype 16 est au premier rang pour sa prévalence à Saint-Pétersbourg de même que dans d'autres régions de la Russie et dans d'autres pays (10,6 par 100 personnes

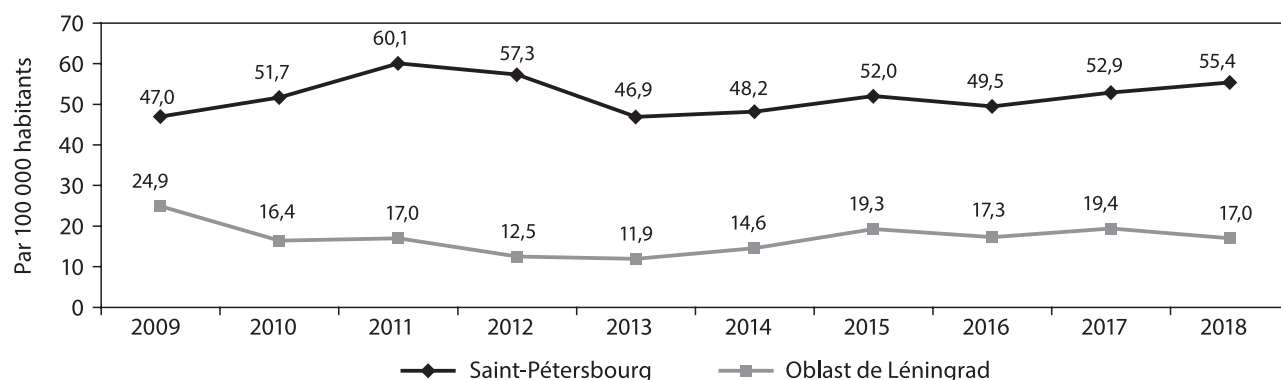


Figure 26. Incidence des condylomes ano-génitaux à Saint-Pétersbourg et dans l'oblast de Léninegrad en 2009–2018

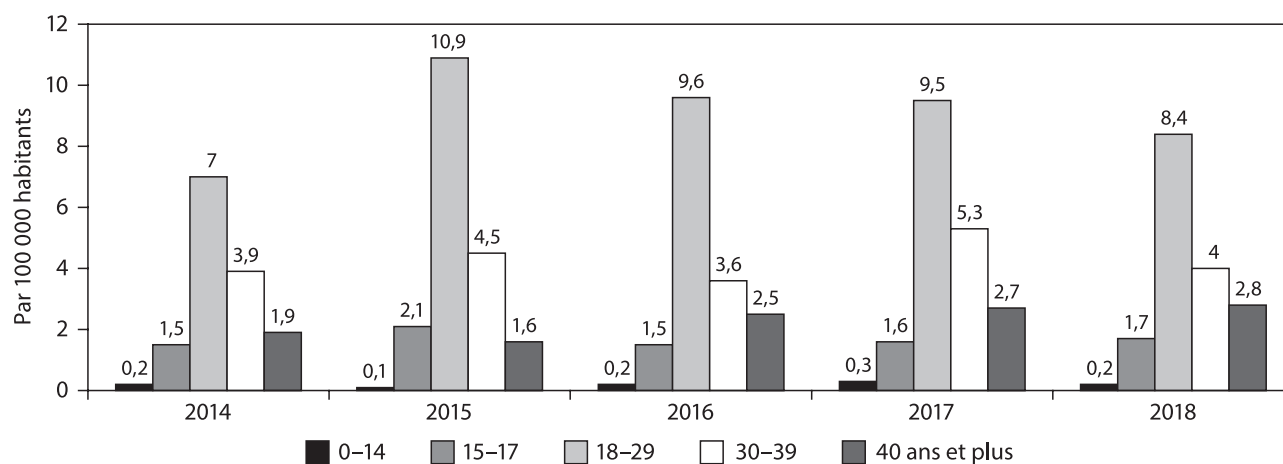


Figure 27. Incidence des condylomes ano-génitaux dans les différentes catégories d'âge dans la population de l'oblast de Léningrad, 2014-2018

examinées). Le VPH des génotypes 33 et 18 sont au deuxième et troisième rang (respectivement 6,7 et 6,4 par 100 personnes examinées). Ensuite par ordre de fréquence on trouve le VPH des génotypes 31, 45, 51, 56 et 39. Dans cette étude le VPH des génotypes 52 et 58 n'a pas été détecté.

Sur d'autres territoires de la Fédération de Russie, où ont été menées les études pareilles, les taux de prévalence des génotypes concrets variaient, ce qui témoigne de la nécessité d'étudier ces données dans chaque région en particulier pour légitimer l'actualité du problème, son importance et l'appréciation de l'efficacité de la vaccination contre l'infection au virus du papillome humain au niveau de la population.

Le cancer du col utérin est un des problèmes d'actualité de la santé publique en Fédération de Russie en général et sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest en particulier. Du point de vue de la vaccination contre le VPH l'incidence du cancer du col utérin fait partie des critères tardifs d'évaluation de l'efficacité de la vaccination. Au Fig. 30 est présentée l'incidence du cancer du col utérin en Fédération de Russie et à Saint-Petersbourg en 2008-2017. On dénote la tendance à la croissance des indices standardisés de

l'incidence. Pendant toute la période étudiée le taux d'incidence à Saint-Petersbourg a été plus faible (12,08% par 100 000 habitants) que celui moyen de la Russie (15,76% par 100 000 habitants).

La rougeole et la rubéole

En 2017-2018 continuait le travail selon le Programme d'éradication de la rougeole et la rubéole en Fédération de Russie dans le cadre des activités du Centre régional de surveillance de la rougeole et la rubéole de Saint-Petersbourg fonctionnant sur la base de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg. Le Centre effectue le suivi de 11 territoires du District fédéral Nord-Ouest de la Russie ayant la population de 13,5 million. de personnes. Les fonctions des chercheurs permanents du Laboratoire d'épidémiologie des maladies infectieuses et non infectieuses consistent en:

- établissement des rapports mensuels enregistrant les cas de la rougeole et la rubéole dans la région et envoi de ces rapports au Centre national de méthode et recherche dans la surveillance de la rougeole et la rubéole (Moscou);
- inspections électives des territoires contrôlés afin de vérifier les activités effectuées selon le programme d'éradication de la rougeole et la rubéole (2 inspections en 2017-2018);
- octroi des consultations pendant les éclosions importantes de l'infection (2 consultations en 2017-2018);
- inscription des données des formulaires d'examen épidémiologique des foyers de la rougeole et la rubéole au Système d'information centralisé des maladies infectieuses (SICMI);
- analyse d'incidence de la rougeole et la rubéole sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest de la Russie;
- présentation des rapports, faisant état de la surveillance épidémiologique de la rougeole et la rubéole sur les territoires contrôlés, aux réunions annuelles des spécialistes de la Fédération de Russie;
- établissement des rapports annuels faisant état de la réalisation du programme d'éradication de la rougeole et la rubéole sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest de la Russie.

En 2017 sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest ont été enregistrés 3 cas de la rougeole qui ont donné le taux d'incidence 0,2 par 1 000 000 d'habitants. Tous les cas de la maladie ont été détecté sur un seul territoire —

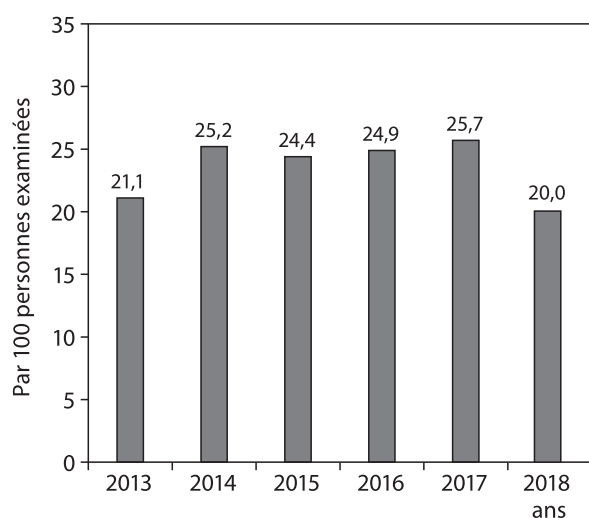


Figure 28. Prévalence du VPH (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 83) parmi les patients d'un dispensaire antivénérien de Saint-Petersbourg, 2013-2018

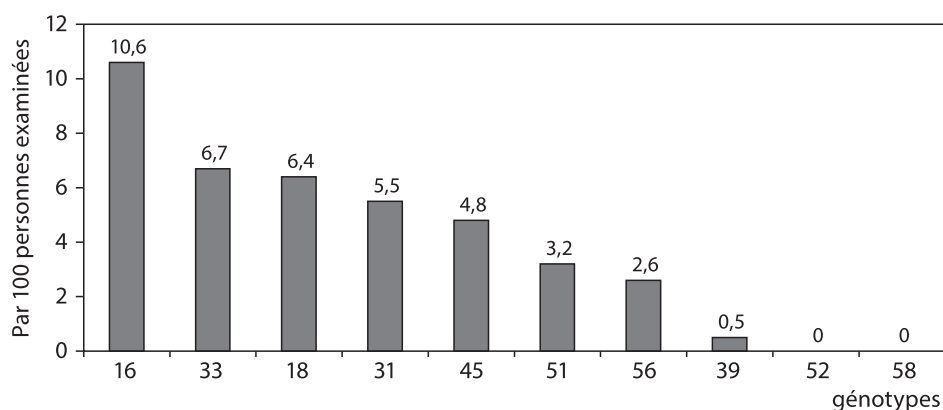


Figure 29. Prévalence des différents génotypes du VPH parmi les patientes d'un dispensaire antivénérien de Saint-Petersbourg, 2014-2017 (n = 312)

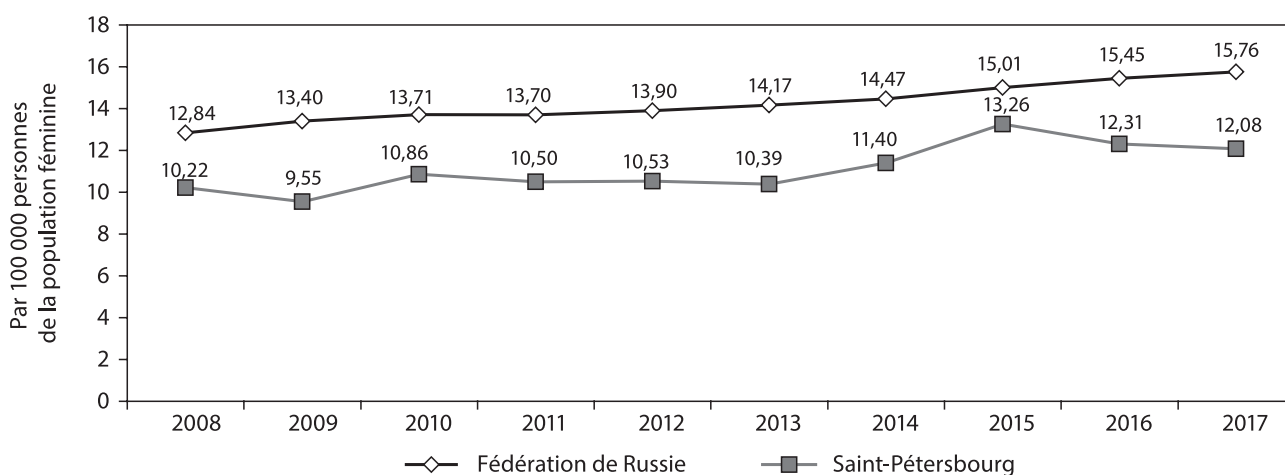


Figure 30. Incidence du cancer du col utérin en Fédération de Russie et à Saint-Petersbourg en 2008-2017 (indices standardisés, standard mondial de la population)

à Saint-Petersbourg (taux d'incidence — 0,6 par 1 000 000 d'habitants). Selon les résultats de l'enquête épidémiologique 2 cas de la rougeole chez les adultes ont été qualifiés d'importés d'Italie, et le troisième cas a été celui d'un enfant, arrivé d'une autre région de la Russie et qui n'a pas été vacciné contre la rougeole.

En 2018 dans le District fédéral Nord-Ouest a été constatée la croissance de l'incidence de la rougeole. Sur 6 territoires ont été détectés 109 cas de l'infection qui ont donné le taux d'incidence 7,8 par 1 000 000 d'habitants. Le plus grand nombre de malades a été enregistré à Saint-Petersbourg — 54 cas (taux d'incidence 10,2 par 1 000 000 d'habitants), en République de Carélie — 29 cas (taux d'incidence 46,0 par 1 000 000 d'habitants) et dans l'oblast de Léninegrad — 21 cas (taux d'incidence 12,2 par 1 000 000 d'habitants). Les principales causes des éclosions de la rougeole ont été les cas négligés des affections primaires: chez les patients a été diagnostiquée une infection respiratoire aiguë accompagnée des exanthèmes d'origine diverse. Le manque de vigilance des médecins à l'égard de la rougeole sur certains territoires s'explique par une absence totale des enregistrements de cette infection pendant 10 ans et plus. Sur trois territoires ont été détectés les cas séparés de la rougeole sans propagation ultérieure. Sur 5 territoires du District la rougeole n'a pas été enregistrée.

Dans la structure d'âge des malades, enregistrés au District fédéral Nord-Ouest en 2018, dominait la population

adulte de 18 ans et plus (64,2%). La part des enfants et adolescents a fait 35,8% (Fig. 31).

Les patients non vaccinés contre la rougeole (53,2%) et les malades au statut vaccinal inconnu (21,1%) représentaient la majorité des cas enregistrés. La part des personnes vaccinées et revaccinées contre la rougeole a fait respectivement 6,4% et 18,4%.

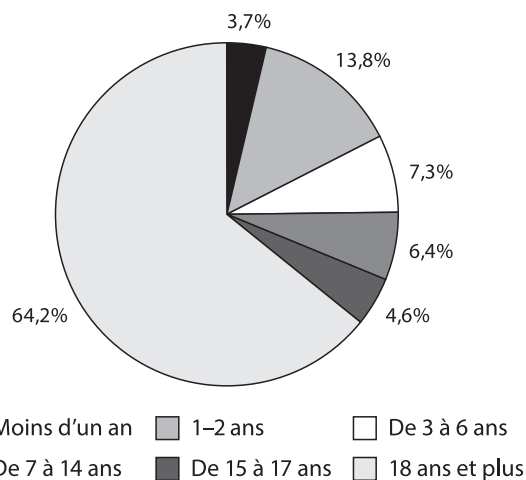


Figure 31. Répartition par catégories d'âge des malades de la rougeole sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest en 2018

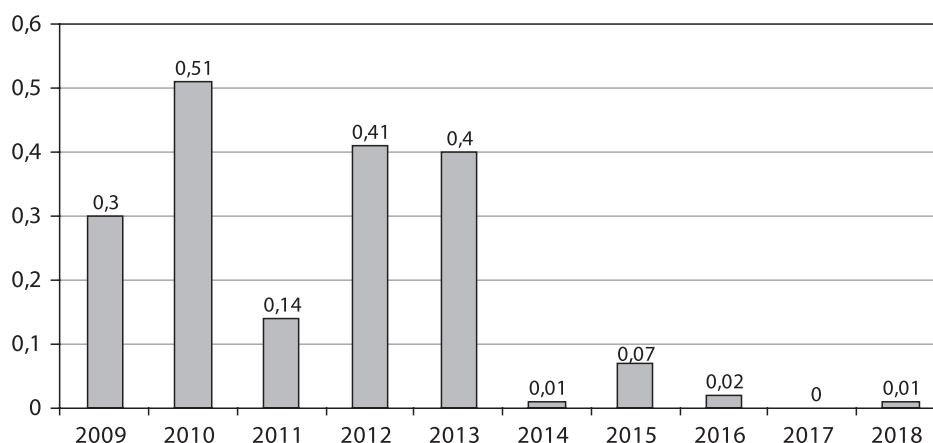


Figure 32. Incidence de la rubéole sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest de la Russie en 2009–2018

Depuis 2014 l'incidence de la rubéole sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest de la Russie fait moins de 1 par 1 000 000 d'habitants (voir Fig. 32). En 2017 aucun cas de la rubéole n'a été enregistré sur les territoires du District. En 2018 un cas a été détecté dans l'oblast de Léninegrad chez un adulte appartenant à la catégorie 20–24 ans et qui n'a pas été vacciné contre cette infection. Le taux de couverture par les vaccinations contre la rougeole et la rubéole dans les groupes ciblés de la population a fait 95% et plus, mais sur un territoire dans les catégories d'âge de 1 an et de 6 ans il a été au-dessous du niveau requis.

Réalisation du Programme d'éradication de l'hépatite virale aiguë B sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest de la Russie

En 2017–2018 a été poursuivie la réalisation du Programme régional d'élimination de l'hépatite aiguë B au Nord-Ouest de la Russie, élaboré par les chercheurs de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg sous l'autorité de son directeur, professeur A. Jebrun en 2010–2012. En août 2013 le programme a été validé par le responsable du Service fédéral de surveillance dans le domaine de la protection des droits des consommateurs et du bien-être de l'homme.

A la II-ème étape de la réalisation du Programme (2016–2018) a été effectué le travail d'organisation, de consultation et d'analyse de l'incidence de l'hépatite aiguë et

chronique B, d'évaluation des indices de couverture par la vaccination contre cette infection et des résultats du monitoring sérologique de l'immunité au virus de l'hépatite B. Tous les ans ont été organisées les réunions des spécialistes participant à la réalisation du Programme pour dresser le bilan et synthétiser le travail accompli de même que pour déterminer les objectifs pour la période suivante.

Grâce à la vaccination de la population contre l'hépatite B un succès considérable a été atteint dans la baisse d'incidence de l'hépatite virale aiguë B sur le territoire de la Russie et du District fédéral Nord-Ouest. En 2017 et 2018 dans l'ensemble du District les taux d'incidence ont fait 0,50 et 0,37 par 100 000 habitants (0,58 par 100 000 habitants en 2016). Sur le territoire de l'oblast de Léninegrad les cas d'affection par l'hépatite aiguë B n'ont pas été enregistrés (voir Tabl. 15).

En 2018 sur un territoire le taux d'incidence a été moins de 1,0 par 1 000 000 d'habitants. En même temps l'affection de la population par l'hépatite virale chronique B diminue beaucoup plus lentement, et sur certains territoires la tendance à la baisse ne se manifeste pas.

Tuberculose

Les résultats de l'étude ont révélé une baisse d'incidence de la tuberculose en Fédération de Russie et sur tous les territoires du District fédéral Nord-Ouest. Dans l'oblast de Lénine-

Tableau 15. Incidence de l'hépatite aiguë B sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest en 2016–2018

Territoires	2016		2017		2018	
	Nombre de malades	Par 100 000 habitants	Nombre de malades	Par 100 000 habitants	Nombre de malades	Par 100 000 habitants
Oblast d'Arkhangelsk	6	0,53	2	0,18	4	0,36
Oblast de Vologda	5	0,42	10	0,84	1	0,08
Oblast de Kaliningrad	8	0,82	9	1,32	2	0,20
Oblast de Léninegrad	1	0,06	0	0	0	0
Oblast de Mourmansk	3	0,39	2	0,26	2	0,26
District autonome de Nénétsie	1	2,29	0	0	1	2,27
Oblast de Novgorod	3	0,49	3	0,65	2	0,33
Oblast de Pskov	0	0	1	0,16	0	0
République de Carélie	4	0,63	1	0,16	1	0,16
République des Komis	8	0,93	5	0,59	3	0,35
Saint-Petersbourg	42	0,81	24	0,61	36	0,68
District fédéral Nord-Ouest	81	0,58	70	0,50	52	0,37

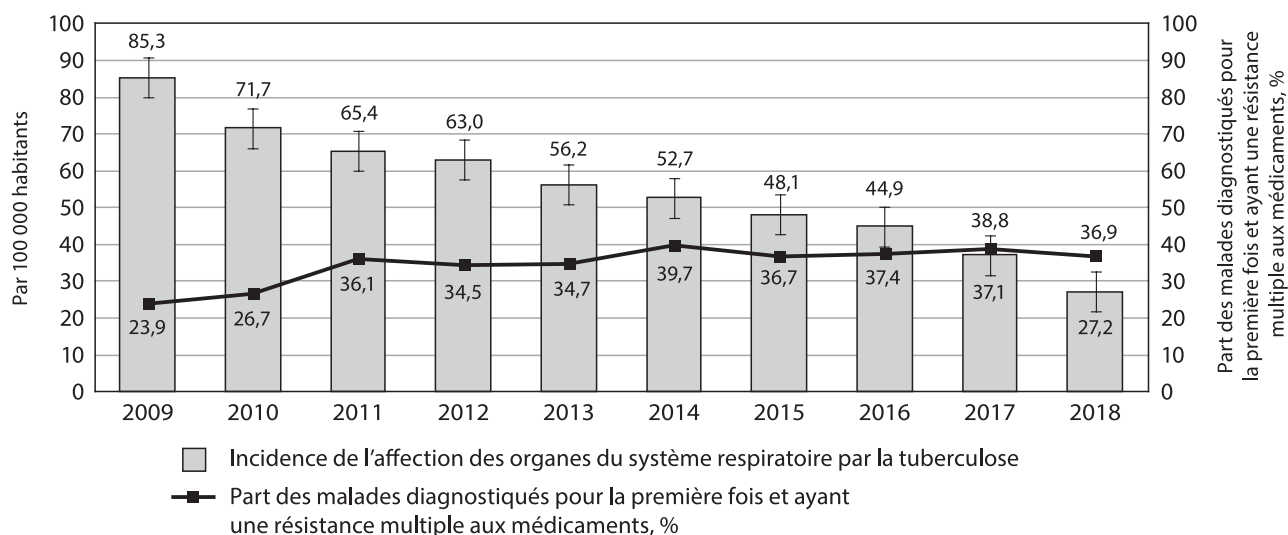


Figure 33. Incidence de l'affection des organes du système respiratoire par la tuberculose et la part des malades diagnostiqués pour la première fois et ayant une résistance multiple de *M. tuberculosis* aux médicaments sur le territoire de l'oblast de Léningrad en 2009–2018

grad en 2009–2018 l'incidence des affections des organes du système respiratoire par la tuberculose a diminué de 85,3 (95% CI 80,7–89,9) à 27,2 (95% CI 24,8–29,6) par 100 000 habitants. En même temps on constate l'augmentation de la part des malades diagnostiqués pour la première fois et ayant une résistance multiple de *M. tuberculosis* aux médicaments (Fig. 33). Les taux de 2009 et 2018 ont été respec-

tivement 23,9% et 36,9% ($p < 0,05$). On observe la tendance à la hausse des indices de la résistance multiple de *M. tuberculosis* aux médicaments aussi bien chez les patients qui obtenaient le traitement par les produits antituberculeux. Les études moléculaires génétiques ont démontré dans ce groupe de malades la domination des mycobactéries de la tuberculose de la famille Beijing (76,5%).

Publications

1. Rudakova A.V., Kharit S.M., Lyalina L.V., Lisianskaya A.S., Protsenko S.A., Mikheeva I.V., Uskov A.N., Lobzin Y.V. Cost-Effectiveness of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccination in Adolescent Girls in Russian Federation // *Pediatric pharmacology*. 2017; 14 (6): 494–500.
2. Terenteva Zh.V., Bichurina M.A., Lyalina L.V., Zheleznova N.V. Solution of epidemiological problem on measles elimination state with the help of molecular methods in the North-West of Russia // *Problems in medical mycology*. 2017; 19 (2): 143.
3. Vyazovaya A.A., Vetrov V.V., Lyalina L.V., Mokrousov I.V., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Vishnevskiy B.I., Narvskaya O.V. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains (a 15-year survey in Leningrad region, Russia // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (1): 34–40.
4. Nechaev V.V., Ivanov A.K., Sacra A.A., Romanova E.S., Lyalina L.V., Pozhidaeva L.N. Chronic viral hepatitis, tuberculosis, and HIV as comorbidity: From theory to practice // *Journal of Infectology*. 2017; 9 (4): 126–132.
5. Vasilyev D.V., Pozhidaeva L.N., Chugunova G.V., Lyalina L.V. Epidemiological characteristics of Incidence of chronic viral hepatitis B infection among healthcare workers in Saint-Petersburg in 2013–2017 // *Russian Journal of infection and Immunity*. 2018; 8 (4): 509–510.
6. Lyalina L.V., Kasatkin E.V., Filippova Yu.N., Ershov V.A., Kaziahmedova V.V., Gultseva N.Yu., Khorkova E.V., Tsyganova O.D., Goryaev E.V., Kholopov, D.V., Chugunova G.V. Epidemiological justification vaccination against human papillomavirus infection. St. Petersburg, 2018: 16.

LABORATOIRE DES HÉPATITES VIRALES

Chef du laboratoire: Elena Essaoulenko

Chercheurs permanents: V. Skvoroda, A. Bouchmanova, N. Ivanova, N. Jeleznova

Hépatites virales aiguës

En 2017–2018, tout comme dans les années précédentes, dans la structure étiologique dominant les hépatites transmises par voie entérale: hépatite A (HA) — 64% et hépatite E (HE) — 1,2%. La part des hépatites transmises par voie parentérale — hépatite aiguë B (HAB) et hépatite aiguë C (HAC) représente respectivement 13,8% et 18% des cas.

Pendant la période de 1997 à 2018 sur le territoire de la Fédération de Russie ont eu lieu les transformations importantes du processus épidémique de l'hépatite A (HA), qui concernent en premier lieu son intensité (tendance durable à la baisse d'incidence) et la structure d'âge des malades (adultes). Mais cette situation a eu comme conséquence une baisse de l'immunité collective, principalement de la population adulte ce qui, combiné avec un faible niveau d'aménagement communal de certains territoires, suppose une éventuelle hausse d'incidence de l'HA. L'accroissement d'incidence de l'HA, enregistré en 2017, témoigne du commencement d'une nouvelle poussée périodique de morbidité.

À la différence de l'HA, l'enregistrement officiel des cas de l'hépatite E (HE) n'a été commencé qu'en 2013. Pendant la période analysée l'incidence a varié de 0,06% à 0,08% avec une tendance à une légère croissance en 2017–2018. Malgré le fait que la Fédération de Russie est le territoire traditionnellement épidémique pour l'HE, on y constate de plus en plus fréquemment les cas d'affection autochtones.

Résultant de l'ensemble des manifestations préventives multiformes, y compris dans le cadre du projet prioritaire national de la santé publique, l'incidence des hépatites aiguës B et C (HAB et HAC) a fortement baissé en Fédération de Russie.

L'analyse d'incidence de l'HAB, menée à long terme sur le territoire de la Fédération de Russie en 1999–2017, a révélé sa diminution multiple (de plus de 100 fois). L'incidence de l'HAB a baissé dans le District fédéral Nord-Ouest de 1,29 par 100 000 habitants en 2013 à 0,58 par 100 000 habitants en 2016. En 2015–2018 le taux d'incidence de l'HAB a été de moins de 1 par 100 000 habitants. Dans l'oblast de Léningrad, en République de Carélie et dans le district autonome de Nénétsie les cas de l'HAB n'ont pas été enregistrés. Dans la structure d'âge des malades de l'HAB dominant les personnes adultes: de 96,3% à 99,4%. En 2016–2018 la part des cas d'incidence locaux a constitué 89,6%.

Les résultats de l'étude du statut vaccinal des malades de l'HAB en 2016 ont démontré la morbidité prioritaire des personnes non vaccinées contre l'hépatite B (72,8%). La part des personnes à l'anamnèse vaccinale inconnue a fait 23,5% et des personnes vaccinées — 3,7% (3 patients). Chez ces dernières la période depuis la troisième dose de vaccination jusqu'au commencement de la maladie variait de 5 à 10 ans. Une évolution positive est constatée également pour l'incidence de l'HAC: en 2017 en Fédération de Russie le taux chez les adultes a fait 1,48 par 100 000 habitants et en 2018 — 1,28 par 100 000 habitants, tandis qu'en 2001 il a été de 16,7 par 100 000 habitants. Dans le District

fédéral Nord-Ouest cette évolution c'est exprimée encore plus nettement — l'incidence a diminué de presque 30 fois (de 31,9 par 100 000 habitants en 2001 à 1,2 par 100 000 habitants en 2017).

L'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire élargit le champ d'étude des particularités d'évolution des hépatites virales aiguës et améliore l'efficacité des manifestations de surveillance épidémiologique. Il est établi qu'en 2017–2018 sur le territoire de Saint-Petersbourg ont circulé deux sous-génotypes de l'hépatite virale A: 1a et 1b avec domination de 1a.

Pendant la période de 2017–2018 l'analyse phylogénétique a établi la circulation du virus de l'hépatite B (génotype D) dans 95,8% de cas. L'analyse de la propagation des sous-types de l'hépatite virale B a révélé trois types de circulation: sous-type D1 (100%) — oblasts de Mourmansk et de Pskov; sous-type D2 (74,4%) — Saint-Petersbourg, oblast de Léningrad, République de Carélie; sous-type D3 (89,5%) — oblast de Vologda, République des Komis. Le génotype A a été révélé dans 2 isolats (4,2%) et appartient au sous-type A2. Les données obtenues sur la distribution des génotypes/sous-types de l'hépatite virale B circulant sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest reflètent la situation dans la population et correspondent aux résultats des études précédentes de la circulation des génotypes de l'hépatite virale B sur le territoire indiqué dans les cas de l'hépatite chronique B.

Les principales sources de l'infection pour les personnes atteintes de l'HAB et l'HAC sur le territoire de la Fédération de Russie et du District fédéral Nord-Ouest sont les malades de l'hépatite chronique B et de l'hépatite chronique C. Leur part dans les sources de l'infection confirmées atteint 94,1%.

Hépatites chroniques virales

Dans le processus épidémique des hépatites chroniques virales B et C (HCB, HCC) on ne constate pas d'importantes tendances positives. Au cours des dernières années on observe une tendance durable à l'augmentation du nombre cumulé de personnes atteintes des maladies hépatiques chroniques d'étiologie virale.

Il faut reconnaître qu'en tenant compte du nombre de malades avec le diagnostic confirmé, l'HCC se présente pour la Fédération de Russie comme un problème plus important que l'HCB. Dans la structure étiologique générale des hépatites chroniques virales sa part fait presque 77% de tous les nouveaux cas révélés de la maladie.

En 2017 le nombre total de malades atteints de l'HCC en Fédération de Russie a été de 562 622 personnes (0,4% de la population). En utilisant une approche standard à la distribution des territoires du pays selon le taux d'incidence de l'HCC, il se trouve qu'en 2018 il y a eu six districts ayant ce taux plus élevé que celui moyen de la Fédération de Russie (35,3 par 100 000 habitants), dont le plus insatisfaisant a été le District fédéral Nord-Ouest (50,0 par 100 000 habitants).

Dans les conditions d'absence des moyens de prévention spécifique de l'hépatite C, l'option prioritaire de la lutte est la thérapie étiotrope administrée aux patients at-

teints d'une maladie en phase aiguë ou une maladie chronique, y compris de la cirrhose hépatique et ayant subi une greffe d'organe visant à l'éradication de l'agent pathogène. En Fédération de Russie la part des patients ayant reçu une telle thérapie est de 3,5% qui est un taux qui peut rendre difficile l'atteinte de l'objectif global annoncé: couverture par la médication à 80% vers 2030. Dans la dernière décennie l'incidence de l'HCB en Fédération de Russie reste pratiquement au même niveau. Le taux moyen pour la Fédération de Russie pendant les dix dernières années a fait 12,1 cas par 100 000 habitants. Mais le nombre total de malades, augmentant chaque année, a atteint 253 668 en 2017. A la différence de l'HCC, les moyens existants de thérapie de l'hépatite B ne permettent jamais de libérer l'organisme du virus complètement. Mais la baisse de la charge virale jusqu'à un niveau indéfinissable permet de ralentir l'évolution du processus pathologique et de réduire au minimum la menace épidémiologique de la source d'infection.

Hépatite B latente

Il convient de remarquer que, selon nos données, la fréquence de prévalence de l'HB HBsAg-négative chez les patients atteints de l'hépatite chronique virale B, examinés à des différentes étapes d'octroi de l'aide médicale spécialisée, se situe entre 27,1% (étape ambulatoire) et 67,8% (étape hospitalière). L'analyse des résultats d'examen de laboratoire clinique des patients atteints de l'HB HBsAg-négative a révélé une variabilité d'évolution clinique et des stades de la maladie jusqu'au stade cirrhotique (52,1%). Dans les cas de l'HB HBsAg-négative les stades de la fibrose hépatique exprimée (F3-F4), confirmés par les méthodes d'examen instrumentales, constituent le taux de 55,4%. Pour l'évaluation clinique du stade de la maladie et du degré de gravité

de la cirrhose, développée à l'issue de la HB HBsAg-négative, un rôle particulièrement important revient à la définition des taux d'albumine, de prothrombine, des plaquettes, des gammaglobulines, de même que des titres de HBsAb. L'étude morphologique post-mortem du tissu hépatique des patients atteints de la cirrhose avec l'anti-HBsAg vitale dans le sérum sanguin confirme le diagnostic clinique de l'hépatite chronique virale B.

Variantes des hépatites virales mixtes

La circulation continue des agents des hépatites virales aiguës et le nombre grandissant chaque année de patients atteints des maladies hépatiques chroniques virales créent le risque de leur surinfection par d'autres virus hépatotropes.

Sur 241 malade des hépatites virales d'étiologie combinée (hépatite aiguë sur fond de l'hépatite chronique) chez 69,7% la maladie a évolué sur fond de l'HCC, chez 30,3% — sur fond de l'HCB, qui est la situation analogue à la structure de la population des malades des hépatites chroniques virales. L'analyse de la structure étiologique des hépatites aiguës dans cette catégorie des malades confirme la plus grande fréquence des hépatites au mécanisme parentéral de transmission: dans 46,5% de cas — hépatite aiguë B, y compris avec agent delta, dans 16,6% de cas — hépatite aiguë C. La part de l'hépatite A est de 36,9%.

L'analyse d'incidence des hépatites aiguës aux mécanismes entéral et parentéral de transmission des malades atteints ce l'HCB a révélé leur fréquence comparable (respectivement 45,2% et 54,8%), tandis que chez les malades de l'HCC l'hépatite aiguë au mécanisme parentéral de transmission a été constatée deux fois plus souvent qu'au mécanisme entéral (respectivement dans 66,7% et 33,3% de cas; $p < 0,05$).

Publications

1. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Ivanova N.V. The possibility of elimination parental viral hepatitis in the Russian Federation and the North-Western Federal District // *Collection of scientific articles on the materials of the scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 25th anniversary of the Institute of Medical Education of Novgorod State University «Topical issues of fundamental, clinical medicine and pharmacy»*, 2018: 230–233.
2. Basina V.V., Sukhoruk A.A., Arsenteva N.A., Lubimova N.E., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. Clinical and immunological characteristics of patients with chronic hepatitis C during antiviral therapy in an interferon-free regimen // *Kazan Medical Journal*. 2018; 99 (5): 760–765.
3. Sukhoruk A.A., Esaulenko E.V. Parenteral viral hepatitis in children in Russia, particularly in the North-Western Federal District. 8 (1): 72.
4. Sukhoruk A.A., Esaulenko E.V., Ivanova N.V. Analysis of morbidity of hepatitis C in children in the North-Western Federal District // *Health is the basis of human potential: problems and their solutions*. 2018; 13 (1): 386–391.
5. Ponyatishna M.V., Priima E.N., Alekseeva M.V., Semenov A.V., Ostankova J.V., Esaulenko E.V. Results of studying the genetic variability on the hepatitis B virus in subjects of the North-Western Federal District // *Socially significant and especially dangerous infectious diseases Materials of the IV All-Russian Scientific-Practical Conference with international participation: conference theses*. 2017: 188–189.
6. Esaulenko E.V., Ponyatishna M.V., Alekseeva M.V., Semenov A.V., Ivanova N.V. Molecular-epidemiological characteristic of the acute hepatitis B in the North-Western Federal District // *Infection diseases*. 2017; 15 (S1): 329.
7. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Ponyatishna M.V., Goncharenko R.A. Chronical viral hepatitis C in the North-Western Federal District // *HIV-infection and immunosuppression*. 2018; 10 (S4-1): 77–78.
8. Shibaeva E.O., Semenova S.A., Esaulenko E.V. Liver cirrhosis as outcome occult hepatitis B // *Socially significant and especially dangerous infectious diseases Materials of the V All-Russian Interdisciplinary Scientific and Practical Conference with international participation*. 2018: 277–278.
9. Esaulenko E.V., Shibaeva E.O. Frequency and the clinical significance of occult hepatitis virus infection // *Infection and immunity*. 2018; 8 (4): 714.
10. Zakharov K.A., Volkov G.A., Sukhoruk A.A., Esaulenko E.V. Comparative safety assessment of vaccines from hepatitis in second and third generation // *Journal of Infectology*. 2018; 10 (4-1): 77–78.
11. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Bushmanova A.D., Ingabire T., Ostankova Yu.V. Epidemiological and molecular-genotypic peculiarities of enteral hepatitis in Russia // *Almanac of clinical medicine*. 2018; 46 (1): 50–58.

12. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A. Genotypic variability on the hepatitis C virus in the North-Western Federal District // *Socially significant and especially dangerous infectious diseases Materials of the IV All-Russian Scientific-Practical Conference with international participation*. 2017: 275–276.
13. Bushmanova A.D., Sukhoruk A.A., Ivanova N.V., Esaulenko E.V. Characteristics of viral hepatitis A in the background of chronic hepatitis B // *Kazan Medical Journal*. 2017; 8 (4): 521–526.
14. Esaulenko E.V., Bushmanova A.D., Sukhoruk A.A. Clinical-laboratory characteristic hepatitis A patients with markers the hepatitis B virus // *Journal of Infectology*. 2017; 9 (3): 75–80.

LABORATOIRE D'ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DE GÉNÉTIQUE ÉVOLUTIVE

Chef du laboratoire: Igor Mokrousov

Chercheurs: O. Narvskaya, O. Kalinina, A. Vyazovaya, D. Starkova, A. Gerasimova, V. Molchanov, E. Lichnaya (mi-temps)

TUBERCULOSE ET AUTRES MYCOBACTÉRIES

PROJETS ET COLLABORATIONS

Projets

- «Evolution du potentiel pathogénétique des lignées phylogénétiques de *Mycobacterium tuberculosis*» (PI — I. Mokrousov), 2014–2018 — Russian Science Foundation projet #14-14-00292.
- «Une approche personnalisée de la lutte contre l'épidémie de tuberculose multirésistante et VIH en Irkoutsk, Sibérie» (PI — O. Ogarkov, Centre scientifique pour la santé de la famille et les problèmes de reproduction humaine, Irkoutsk, Russie), 2017–2019 — Russian Foundation for Basic Research projet No. 17-54-30020.
- «Population de *Mycobacterium tuberculosis* en Sibérie occidentale: épidémiologie moléculaire actuelle dans le contexte de la reconstruction macro-évolutive» (PI — I. Mokrousov), 2017–2018 — Russian Foundation for Basic Research projet 17-04-00367.
- «Étude du rôle de l'élément de répétition IS6110 dans la micro et la macro-évolution de la lignée phylogénétique 2 de *Mycobacterium tuberculosis*» (PI — E. Shitikov, Centre de médecine physico-chimique, Moscou), 2018–2019 — Russian Foundation for Basic Research projet 18-04-01035.
- «Caractéristiques pathogénomiques et potentiel épidémique de souches résistantes d'ancienne sous-lignée du génotype de *Mycobacterium tuberculosis* à Beijing» (PI — I. Mokrousov), 2019–2020 — Russian Foundation for Basic Research, projet #19-04-00263.

Collaborations internationales

Institut national de la santé publique et de l'environnement, RIVM, Bilthoven, Pays Bas (2018–2021), Institut Aitkhozhin de biologie moléculaire et de biochimie, Almaty, Kazakhstan (2015–2017), Institut de la santé de Kobe, Japon (2016–2018), Hôpital pour enfants malades de Pékin, Chine (2017–2021), Centre hospitalier universitaire général Gregorio Maraón (Madrid, Espagne), Centre médical nord-estonien (Tallinn, Estonie), Centre de recherche et d'études biomédicales, Université de Riga (Lettonie).

Collaborations nationales

Institut central de recherche en épidémiologie (Moscou); Université médicale d'État, Omsk; Centre scientifique de la santé de la famille et des problèmes de reproduction (Irkoutsk), Instituts de recherche en phthisiopulmonologie (Saint Pétersbourg, Ekaterinbourg), Dispensaires antituberculeux de Kaliningrad, Petrozavodsk (Carélie), Syktyvkar (Komi), Mourmansk, Pskov.

PRINCIPALES DIRECTIONS DE RECHERCHE ET RÉSULTATS OBTENUS

Analyse des génomes pour l'analyse phylogénétique et la recherche de marqueurs moléculaires de géovariants de *M. tuberculosis*

Le génotype Beijing 94–32-cluster de *Mycobacterium tuberculosis* domine au Kazakhstan et en Asie centrale. Il s'agit de l'un des deux principaux sous-types de *M. tuberculosis* en Russie, souvent associé au multirésistance (MDR/XDR) et caractérisé par une distribution mondiale due aux flux migratoires. Suite à l'analyse génomique bioinformatique, nous avons identifié un polymorphisme nucléotidique unique dans le gène *sigE*, spécifique des souches de grappe Beijing 94–32, et développé une méthode de détection dans les formats PCR-RFLP et PCR en temps réel. Les méthodes ont été validées *in silico* (en analysant la base de données GMTV) et expérimentalement sur la collection mondiale de souches de différents génotypes (342 isolats de Russie, Kazakhstan, Chine, Vietnam, Bulgarie, Estonie et Brésil). Les méthodes développées pour détecter le génotype Beijing 94–32-cluster peuvent être utilisées (simultanément avec la méthode de détection de l'autre souche épidémique russe importante Beijing B0/W148) dans des études prospectives ou pour une évaluation rétrospective de collections d'ADN historiques.

Population de *M. tuberculosis* dans la région de Sibérie occidentale: épidémiologie moléculaire actuelle dans le contexte de la reconstruction macro-évolutive

De nouvelles données ont été obtenues sur les tendances de la prévalence de la population de *M. tuberculosis* multirésistante dans la région d'Omsk en Sibérie occidentale. L'analyse moléculaire de 425 souches de *M. tuberculosis* isolées chez des patients atteints de tuberculose pulmonaire à différentes années dans la région d'Omsk a révélé une diversité de la structure des génotypes et de la prévalence des souches du génotype de Beijing (~60%). La proportion de grappes B0/W148 à Beijing a été augmentée de 13,5% en 2015–2016 à 19,2% en 2017 et ces souches étaient associées à la MDR. En général, trois familles contribuent de manière significative à la propagation des souches résistantes aux médicaments — Beijing, LAM ('Latin American Mediterranean') et Ural.

Pour la première fois, deux groupes de la sous-lignée ancienne du génotype Beijing ont été identifiés comme sous-types émergents et potentiellement épidémiques (Fig. 34). Presque toutes les anciennes souches de Beijing étaient des souches MDR. Une comparaison avec les données disponibles au niveau mondial a montré que ces deux clones circulent principalement dans la partie asiatique de la Russie et démontrent une certaine affinité phylogénétique avec des souches du Japon, de la Corée et du nord-est de la Chine. Sur la base de données phylogénétiques,

phylogéographiques et historiques, nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle ces deux clones auraient probablement été importés en Russie il y a environ 70 ans après la Seconde Guerre mondiale avec des prisonniers de guerre japonais. Leur prévalence relativement plus élevée à Omsk, associée à une association extrêmement forte avec le MDR, mais également avec le pré-XDR/XDR, également observés dans d'autres régions de la Fédération de Russie, démontre leur potentiel épidémique et nécessite un suivi permanent.

Complexes clonaux du génotype Beijing de *M. tuberculosis* dans les régions du nord-ouest de la Russie, à la frontière des pays de l'Union européenne

La prévalence élevée de la tuberculose multirésistante dans le nord-ouest de la Russie pourrait avoir un impact négatif sur les programmes de lutte antituberculeuse non seulement en Russie mais également dans les pays voisins de l'Union européenne (UE). 304 isolats de *M. tuberculosis* des régions du nord-ouest de la Russie (régions de Pskov, Kaliningrad et Mourmansk, République de Carélie) ont été étudiés (Fig. 35). La prévalence des souches de *M. tuberculosis* du génotype Beijing était différente et s'élevait à 44,9% dans la région de Pskov, 55,1% en Carélie, 48,4% dans la région de Mourmansk et 63% dans la région de Kaliningrad. Le génotype B0/W148 a été détecté dans 6,7%, 17,9%, 9,4% et 19,2% des souches de *M. tuberculosis*, respectivement. La prévalence de la grappe Beijing 94–32 dans les quatre territoires étudiés ne diffère pas: 29,2%, 28,2%, 31,3% et 28,8%, respectivement. Dans les régions de Pskov et de Mourmansk, 62,9% et 60,9% des souches de *M. tuberculosis* étaient sensibles aux médicaments antituberculeux, et 17,9% et 26,6% des souches étaient MDR. Les souches MDR prévalaient en Carélie et dans la région de Kaliningrad — 51,3% et 43,8%; tandis que 41,0% et 36,9% des souches, respectivement, étaient sensibles. Au total, dans quatre régions, 90,0% des isolats de *M. tuberculosis* Beijing B0/W148 étaient MDR. Les souches Beijing 94–32 présentaient des proportions similaires d'isolats sensibles aux médicaments (41,6%) et MDR (34,8%). Ainsi, dans les territoires du nord-ouest de la Russie, la proportion de souches Beijing variait de 44,9% à 63,0%. Les souches Beijing 94–32 (28,2% à 31,3%) et du groupe B0/W148 (6,7% à 19,2%) étaient prévalant. Cependant, ces clones de *M. tuberculosis* différaient significativement dans la proportion de MDR. La circulation des souches MDR du groupe *M. tuberculosis* Beijing B0/W148 pose un grave problème pour les programmes de lutte antituberculeuse.

Dynamique de la MDR-TB en Estonie: rôle de l'immigration et programme national de contrôle de la tuberculose

Nous avons évalué la structure de la population de *M. tuberculosis* en Estonie, en nous référant plus particulièrement aux principaux clones épidémiques/endémiques et aux déterminants de la résistance aux médicaments. 39,8% des isolats sont attribués au génotype Beijing; 56,8% d'entre eux étaient MDR. En revanche, les trois autres grands génotypes (LAM, Haarlem, Ural) étaient principalement sensibles aux médicaments. Le MDR était plus fréquent parmi les isolats Beijing B0/W148 (81,8%) par rapport aux autres isolats Beijing (20,0%, $P = 0,0007$). Le phénotype Pre-XDR a été trouvé dans 8 isolats, dont 6 appartenaient à Beijing B0/W148. Conclusion: le pool principal d'isolats du géno-

type Beijing a été introduit en Estonie entre 1945 et 1990 en raison de l'immigration humaine massive de l'URSS. Cependant, la circulation active du groupe Beijing B0/W148 lié au MDR n'a commencé qu'au cours des 20 dernières années et représente une grave menace pour la lutte contre la tuberculose en Estonie.

Kazakhstan: influence de la Russie et de la Chine sur la structure de la population de *M. tuberculosis*

La population de *M. tuberculosis* en Kazakhstan se caractérise par la prédominance de souches du groupe Beijing 94–32 (probablement originaires du nord-ouest de la Chine) et par des rare souches de la famille LAM (qui, jusqu'à récemment, appartenaient presque totalement à la branche russe LAM-RUS). Dans notre étude, nous avons identifié la première souche génétiquement confirmée de la sous-lignée LAM RD-Rio au Kazakhstan. L'analyse moléculaire et la comparaison avec la base de données mondiale de LAM ont montré qu'elle appartenait à une branche endémique du nord de la Russie européenne/Europe de l'Est. Contrairement à l'opinion populaire (et justifiée) sur l'association de souches RD-Rio avec MDR, cette branche ne comprenait que des souches sensibles aux médicaments. Nous émettons l'hypothèse que cette souche aurait été introduite dans le sud du Kazakhstan non de la région d'origine principale de RD-Rio (la région ibéro-américaine), mais de la zone de circulation secondaire (Russie) (Fig. 36).

Clone émergent résistant de *M. tuberculosis* en Asie occidentale

Les souches de *M. tuberculosis* de génotype NEW-1/SIT127 sont endémiques en Asie occidentale (Iran, Afghanistan), se trouvent en Asie centrale et sporadiquement en Russie. L'analyse phylogénétique des isolats de la lignée 4 a confirmé la position distincte de la famille NEW-1, que nous avons désignée sous le nom de L4.5.1/Iran. L'hypothèse du scénario de migration et évolution a été développée: origine de L4.5 1000–1300 ans en Chine, apparition ultérieure du génotype intermédiaire pré-NEW-1 au Tibet, poursuite de la migration vers le Xinjiang et enfin vers l'Iran il y a 800 ans (émergence de NEW-1/SIT127) (Fig. 37). Après cela, SIT127 s'est lentement étendu vers l'est depuis l'Iran, probablement en raison d'un continuum de langues iraniennes, d'échanges commerciaux et d'interactions dans le monde islamique. L'analyse des données des 20 à 25 dernières années a montré une forte augmentation de la prévalence des souches NEW-1 en Iran, en Afghanistan et au Pakistan, accompagnée d'une association significative avec la multirésistance (Fig. 38). Les migrations de la population, en particulier les flux de réfugiés afghans, peuvent entraîner une propagation plus large du sous-type résistant NEW-1, que nous avons nommé un clone émergent résistant de *M. tuberculosis* en Asie occidentale.

Conclusions sur le rôle des migrations dans la propagation des souches épidémiques de *Mycobacterium tuberculosis* sont les suivantes.

1. L'échange ordinaire (contacts sporadiques, tourisme) est insuffisant pour amener et installer la souche *M. tuberculosis* importée dans une nouvelle population.
2. Une nouvelle souche émergente devient épidémique dans sa région d'origine, où la souche ancestrale circule.
3. L'immigration massive de la population est un facteur critique conduisant à un changement de la population locale de *M. tuberculosis*.
4. La souche importée doit non seulement

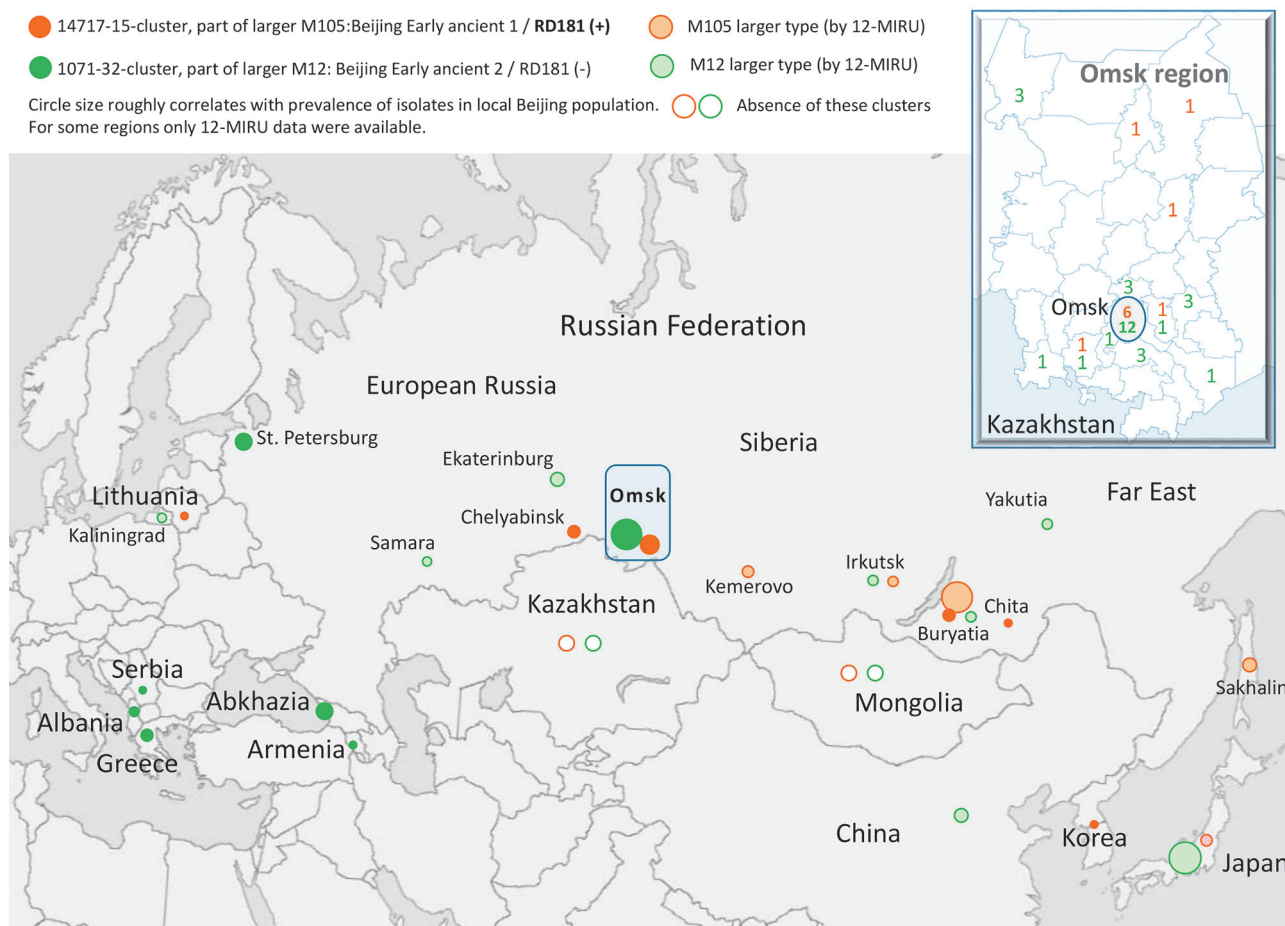


Figure 34. Répartition géographique des souches *M. tuberculosis* d'anciens sous-types de Beijing dans différentes localités du nord de l'Eurasie et dans différents districts de la région d'Omsk. Reproduit de Mokrousov et al. (2019). Copyright Elsevier NV



Figure 35. Distribution des sous-types de génotype *M. tuberculosis* Beijing dans le nord-ouest de la Russie. Reproduit de Vyazovaya et al. (2018). Copyright Infektsiya i Immunitet

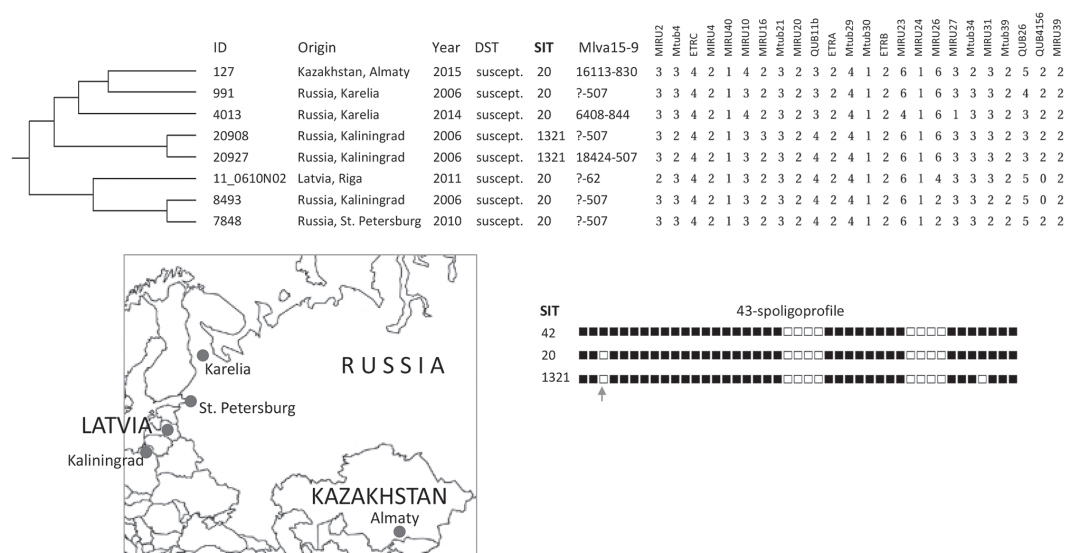


Figure 36. Partie du dendrogramme basé sur MIRU-VNTR de la famille LAM de *M. tuberculosis* avec branche élargie, y compris la souche SIT20 du Kazakhstan. Reproduit de Skiba et al. (2019). Copyright CDC, Atlanta, USA

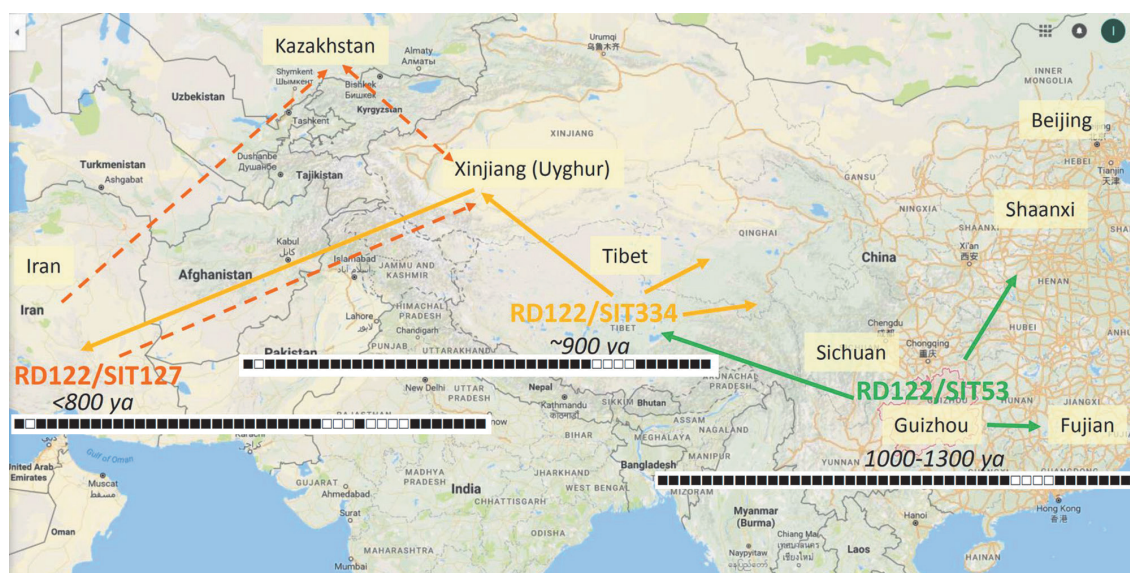


Figure 37. Scénario d'évolution/migration de la lignée RD122 de *M. tuberculosis*. Reproduit de Mokrousov et al. (2017). Copyright Elsevier NV

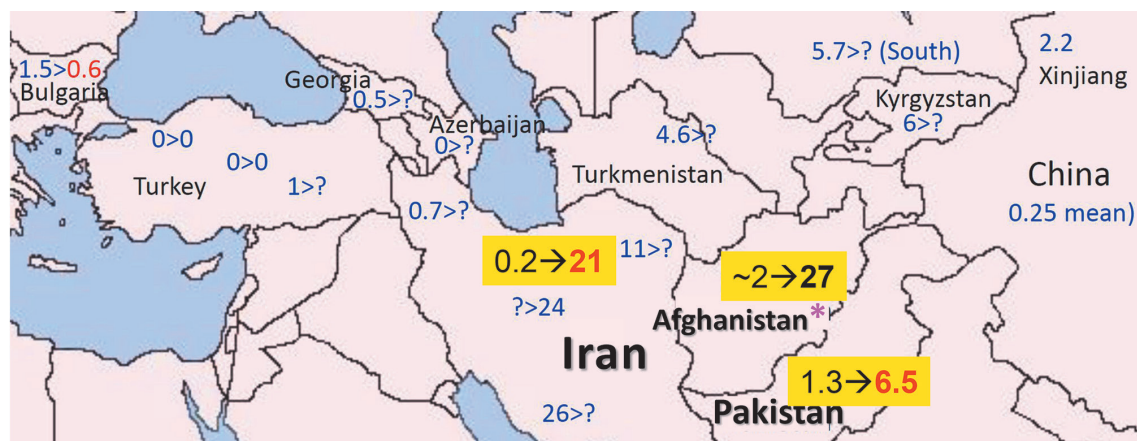


Figure 38. Les données longitudinales depuis 1990 révèlent une augmentation de *M. tuberculosis* SIT127/NEW-1 en Iran et chez ses voisins, ainsi qu'une association avec le MDR. Modifié de Mokrousov et al. (2017). Copyright Elsevier NV
Flèches: transition entre les études antérieures (2005–2008) et récentes (2014–2016). Rouge: association significative avec la multirésistance.

être épidémique, mais également suffisamment répandue dans son pays d'origine.

La contagiosité, la virulence d'une souche de *M. tuberculosis* est conditionnelle et non absolue. Spéculeativement, une sorte de résistance humaine se développe au sein de la population locale du fait de sa coexistence avec des clones historiques locaux et agissant contre des clones importés: d'où le rôle de la génétique de l'hôte.

Même au sein des familles «moins intéressantes» de *M. tuberculosis*, telles que NEW-1/Iran et Ural, des clones plus dangereux peuvent émerger. Nous ne savons pas où la nouvelle souche émergente de *M. tuberculosis* va émerger. Une fois qu'il est apparu, il est conseillé d'examiner leur génomique et leur phénotype, ainsi que de suivre de près les flux de migration pertinents, afin de prédire sa propagation.

Les raisons du succès de différents clones émergents peuvent être différentes dans chaque cas particulier et être liées aux propriétés de la souche.

Les polymorphismes nucléotidiques dans les gènes *hsp65* et *MACPPE12* de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

Mycobacterium avium subsp. *hominissuis* (MAH) est l'habitant typique de l'environnement, appelé pathogène opportuniste chez l'animal et chez l'homme. Le but de notre étude était d'analyser les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) des gènes *hsp65* et *MACPPE12* afin de caractériser la population russe de MAH dans le contexte de l'étude des relations phylogénétiques et de l'évolution des populations géographiquement éloignées de *M. avium* subsp. *hominissuis*.

L'analyse de séquence des gènes *hsp65* et *MACPPE12* a été appliquée à 40 souches de MAH isolées chez l'homme (patients atteints de mycobactériose) (Fig. 39). Les séquences nucléotidiques ont été alignées sur le génome de souche de référence de *M. avium* subsp. *hominissuis* 104. Les profils de mutations des souches russes ont été comparés à ceux isolés dans d'autres pays. Au total, les 40 souches MAH ont été classées en trois séquevars de *hsp65*: code 1, code 2 et code 3. La majorité des souches de MAH (72,5%) appartenaient au code 1, le même séquevar que pour la souche MAH 104. L'analyse de séquence du gène *MACPPE12* a révélé 20 SNP groupés en neuf séquevars au niveau des acides nucléiques: NA01, NA02, NA03, NA06, NA10, NA10, NA13, NA14, NA19 et NA_Rus01. Parmi 20 SNP, huit étaient non synonymes, ce qui a entraîné sept séquevars au niveau des acides aminés: AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13 et AA_Rus01. La séquevar AA02 consistait de trois variantes de NA différentes avec des profils de SNP synonymes: NA02, NA03 et NA06. La moitié des souches MAH appartenaient à la séquevar AA02 (type NA02). Actuellement, le groupe prédominant AA02 (type NA02)/code 1 et le variant unique AA_Rus01 (NA_Rus01) ont été identifiés parmi les souches MAH originaires de Russie. Ainsi, nous avons confirmé le caractère relativement conservateur de la séquence de nucléotides du gène *hsp65* mais le polymorphisme du gène *MACPPE12*. Dans le même temps, une analyse comparative des profils SNPs des gènes *hsp65* et *MACPPE12* a permis d'identifier les différences entre les populations de MAH géographiquement éloignées, ce qui a mis en évidence la variabilité de la population mondiale d'espèces de *M. avium*.

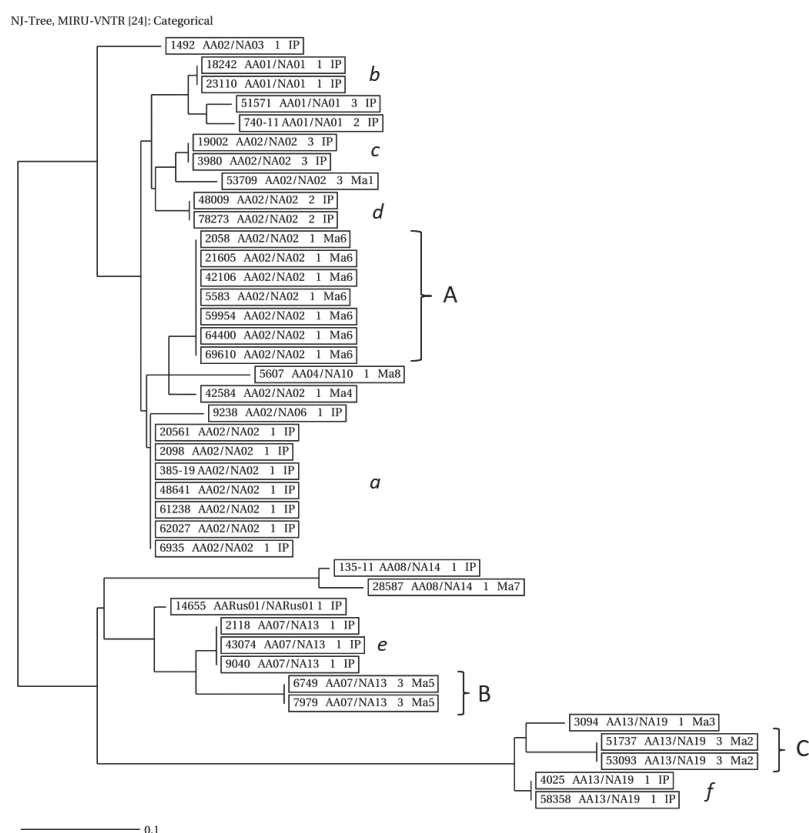


Figure 39. Dendrogramme des profils VNTR de 40 souches *M. avium* subsp. *hominissuis* avec des informations sur ses types de SNP (*MACPPE12*, *hsp65*). Reproduit de Starkova et al. (2019). Copyright MAIK Nauka-Interperiodika

Les informations suivantes sont fournies pour chaque isolat dans les boîtes: identifiant de souche, types de séquence *MACPPE12*/*hsp65* et type de MATR-VNTR (IP signifie profil individuel). Les groupes A à C combinent des isolats MAH avec des profils de type de séquence et de MATR-VNTR identiques. Les grappes a à f combinent des isolats avec des types SNP *MACPPE12* et *hsp65* identiques, mais des profils individuels MATR-VNTR.

Articles dans des revues avec comité de lecture (Pubmed, Web of Science)

EN ANGLAIS. 18 articles: 12 en Q1; IF cumulatif = 92,453; IF moyen = 5,136

1. Mokrousov I. Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2017 May; 104: 20–23. Impact factor 2.952. Q1.
2. Jagielski T.; Partnership to fight against TB in Central and Eastern Europe (Aleksa A., Bachiyiska E., Bakos Á., Crudu V., Dziadek J., Homolka J., Homorodean D., Jansone I., Katalinic-Jankovic V., Krenke R., Kuzmic U., Mokrousov I., Nikolayevskyy V., Nikolenka A., Osmani G.M., Papaventsis D., Pole I., Porvaznik I., Savic B., Shubladze N., Solovic I., Szabó N., Tafaj S., Ustamujic A., van Ingen J., Vasiliauskiene E., Yablonsky P.K., Zemanova I., Zhuravlev V., Zolnir-Dovc M.). FATE: the new partnership to fight Against TB in Central and Eastern Europe // *Lancet Infect. Dis.* 2017 Apr; 17 (4): 363. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30120-2. Impact factor 19.864. Q1.
3. Li Q.J., Jiao W.W., Yin Q.Q., Li Y.J., Li J.Q., Xu F., Sun L., Xiao J., Qi H., Wang T., Mokrousov I., Huang H.R., Shen A.D. Positive epistasis of major low-cost drug resistance mutations rpoB531-TTG and katG315-ACC depends on the phylogenetic background of *Mycobacterium tuberculosis* strains // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017 Jun; 49 (6): 757–762. Impact factor 4.307. Q1.
4. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., Bespyatykh J., Ischenko D., Ilina E., Govorun V. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* // *Sci. Rep.* 2017 Aug 23; 7 (1): 9227. Impact factor 4.259. Q1.
5. Mokrousov I., Shitikov E., Skiba Y., Kolchenko S., Chernyaeva E., Vyazovaya A. Emerging peak on the phylogeographic landscape of *Mycobacterium tuberculosis* in West Asia: Definitely smoke, likely fire // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017 Nov; 116: 202–212. Impact factor 4.419. Q1.
6. Ioannidis P., van Soolingen D., Mokrousov I., Papaventsis D., Karabela S., Konstantinidou E., Marinou I., Nikolaou S., Kanavaki S., Mantadakis E., Samonis G., Anthony R., Vogiatzakis E. Multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Greece: predominance of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes endemic in the Former Soviet Union countries // *Clin. Microbiol. Infect.* 2017 Dec; 23 (12): 1002–1004. Impact factor 5.292. Q1.
7. Yano H., Iwamoto T., Nishiuchi Y., Nakajima C., Starkova DA, Mokrousov I., Narvskaya O., Yoshida S., Arikawa K., Nakanishi N., Osa-ki K., Nakagawa I., Ato M., Suzuki Y., Maruyama F. Population Structure and Local Adaptation of MAC Lung Disease Agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* // *Genome Biol. Evol.* 2017 Sep 1; 9 (9): 2403–2417. Impact factor 3.979. Q1.
8. Vyazovaya A., Levina K., Zhuravlev V., Viiklepp P., Kütt M., Mokrousov I. Emerging resistant clones of *Mycobacterium tuberculosis* in a spatiotemporal context // *J. Antimicrob. Chemother.* 2018 Feb 1; 73 (2): 325–331. Impact factor 5.071. Q1.
9. Mokrousov I., Chernyaeva E., Vyazovaya A., Skiba Y., Solovieva N., Valcheva V., Levina K., Malakhova N., Jiao W.W., Gomes L.L., Suf-fys P.N., Kütt M., Aitkhodzina N., Shen A.D., Narvskaya O., Zhuravlev V. Rapid Assay for Detection of the Epidemiologically Important Central Asian/Russian Strain of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype // *J. Clin. Microbiol.* 2018 Jan 24; 56 (2). pii: e01551–17. Impact factor 3.712
10. Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitrov S., Tatarintseva M., Blokh A., Stasenko V., Mokrousov I. Major genotype families and epidemic clones of *Mycobacterium tuberculosis* in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis-HIV coinfection // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2018 Jan; 108: 163–168. Impact factor 2.873
11. Chernyaeva E., Rotkevich M., Krashenninnikova K., Yurchenko A., Vyazovaya A., Mokrousov I., Solovieva N., Zhuravlev V., Yablonsky P., O'Brien S.J. Whole-Genome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients with Tuberculous Spondylitis, Russia // *Emerg. Infect. Dis.* 2018 Mar; 24 (3): 579–583. Impact factor 8.222. Q1.
12. Mokrousov I. On sunspots, click science and molecular iconography // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2018 May; 110: 91–95. Impact factor 2.873
13. Sun L., Zhang L., Wang T., Jiao W., Li Q., Yin Q., Li J., Qi H., Xu F., Shen C., Xiao J., Liu S., Mokrousov I., Huang H., Shen A. Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* induced by anti-tuberculosis treatment result in metabolism changes and elevation of ethambutol resistance // *Infect. Genet. Evol.* 2018 Oct 4. pii: S1567-1348(18)30759-7. Impact factor 2.885
14. Perdigão J., Silva C., Diniz J., Pereira C., Machado D., Ramos J., Silva H., Abilleira F., Brum C., Reis A.J., Macedo M., Scaini J.L., Silva A.B., Esteves L., Macedo R., Maltez F., Clemente S., Coelho E., Viegas S., Rabna P., Rodrigues A., Taveira N., Jordao L., Kritski A., Lapa E Silva J.R., Mokrousov I., Couvin D., Rastogi N., Couto I., Pain A., McNerney R., Clark T.G., von Groll A., Dalla-Costa E.R., Rossetti M.L., Silva P.E.A., Viveiros M., Portugal I. Clonal expansion across the seas as seen through CPLP-TB database: A joint effort in cataloguing *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Portuguese-speaking countries // *Infect. Genet. Evol.* 2018 Mar 17. pii: S1567-1348(18)30102-3. Impact factor 2.885
15. Sinkov V., Ogarkov O., Mokrousov I., Bukin Y., Zhdanova S., Heysell S.K. New epidemic cluster of pre-extensively drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Ural family emerging in Eastern Europe // *BMC Genomics.* 2018 Oct 22; 19 (1): 762. Impact factor 3.70. Q1.
16. Wang T., Dong F., Li Q.J., Yin Q.Q., Song W.Q., Mokrousov I., Jiao W.W., Shen A.D. Clinical and drug resistance characteristics of new pediatric tuberculosis cases in northern China // *Microb. Drug Resist.* 2018 Nov; 24 (9): 1397–1403. Impact factor 2.344.
17. Skiba Y., Mokrousov I., Nabirova D., Vyazovaya A., Maltseva E., Malakhova N., Ismagulova G., Pole I., Ranka R., Sapiyeva Z., Ismailov S., Moffett D. *Mycobacterium tuberculosis* RD-Rio strain in Kazakhstan // *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25 (3): 604–606. doi: 10.3201/eid2503.181179. Impact factor 7.422. Q1.
18. Mokrousov I., Vyazovaya A., Pasechnik O., Gerasimova A., Dymova M., Chernyaeva E., Tatarintseva M., Stasenko V. Early ancient sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: unexpected clues from phylogenomics of the pathogen and human history // *Clin. Microbiol. Infect.* 2018 Dec 5. pii: S1198-743X(18)30767-5. Impact factor 5.394. Q1.

EN RUSSE: 1 monographie, 4 articles

1. Shulgina M.V., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V., Vasilieva I.A. Pathogenic and conditionally pathogenic mycobacteria. Moscow, NEW TERRA, 2018: 104. ISBN 978-5-9907505-7-9. Russian.
2. Mokrousov I., Pasechnik O., Vyazovaya A., Stasenko V., Blokh A. On importance of evolutionary robust markers for detection of *M. tuberculosis* strains of LAM family // *Zhurnal mikrobiol. epidemiol. immunobiol.* 2018. (3): 60–66.
3. Pasechnik O., Blokh A., Vyazovaya A., Stasenko V. Meta-analysis of prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Latin-American Mediterranean in Russia and neighboring countries // *Zhurnal infektologii.* 2018. 10 (3): 97–107. Russian.
4. Vyazovaya A.A., Vetrov V.V., Lyalina L.V., Mokrousov I.V., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Y., Vishnevskiy B.I., Narvskaya O.V. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains (a 15-year survey in Leningrad Region, Russia) // *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2017; 7 (1): 34–40. Russian.

5. Vyazovaya A.A., Akhmedova G.M., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Starkova D.A., Turkin E.N., Zhuravlev V.Y., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Kaliningrad Region of Russia: 10 years after // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (4): 367–374. Russian.

BREVETS D'INVENTION

1. Brevet (Mokrousov I., Vyazovaya A., Zhuravlev V., Solovieva N., Vishnevsky B., Narvskaya O. Méthode de détection du cluster B0 de génotype de Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* par PCR en temps réel). Priorité: No. 2017123302 of 30.06.2017. Approuvé le 09.01.2019.
2. Demande de brevet (Mokrousov I., Vyazovaya A., Chernyaeva E., Solovieva N., Narvskaya O., Zhuravlev V. Méthode de détection du cluster Beijing 94–32 de *Mycobacterium tuberculosis* par PCR en temps réel). Priorité: No. 2017142885, 11.12.2017.
3. Demande de brevet (Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., Mushkin A.Y., Vishnevsky B.I., Narvskaya O., Zhuravlev V. Méthode de détection des souches de *Mycobacterium bovis* BCG par PCR en temps réel). Priorité: No. 2018120630, 06.06.2018.

HEPATITES VIRALS

PROJETS et COLLABORATIONS

Projets

- «Molecular-seroepidemiological monitoring and genetic characteristics of parenteral hepatitis viruses in Vietnam», 2012–2017, funded by Russian Vietnamese Tropical Center, Hanoi and by Rospotrebnadzor (Russian PI — O. Kalinina).
- «Laboratory Diagnosis of Hepatitis C virus in Guinea», funded by Rospotrebnadzor (Federal Service for sanitary and epidemiological Surveillance, Moscow), 2015–2017; Russian PI — O. Kalinina.

Collaborations nationales

- Saint-Petersburg Botkin Infectious Disease Hospital.
- St. Petersburg Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases.
- Moscow Central Research Institute for Epidemiology.
- Moscow State University of Medicine and Dentistry.
- Saratov Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe».

Collaborations internationales

- Baltic Network for control and prevention of life-threatening disease
- Vietnam: Russian Vietnamese Tropical Center (Hanoi)
- Guinea: Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée (Kindia)

PRINCIPALES DIRECTIONS DE RECHERCHE ET RÉSULTATS OBTENUS

L'occurrence de marqueurs de l'hépatite C chez les résidents de la République de Guinée

Le fardeau de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) continue d'être important dans les pays à revenu faible et intermédiaire, en particulier en Asie et en Afrique. L'étude de l'évolution du virus de l'hépatite C indique que la plupart de ses sous-types sont apparus il y a plus de 300 ans sur le continent africain, qui est maintenant considéré comme

un réservoir potentiel de «futurs» variants du VHC. Dans le même temps, pour des raisons économiques et sociales, la prévalence et la diversité génétique du VHC, la voie de transmission du pathogène, ainsi que l'évolution clinique de l'infection dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne, y compris la République de Guinée, reste encore peu étudié. L'élimination mondiale du VHC d'ici 2030 est possible avec l'avènement de méthodes de diagnostic efficaces disponibles pour la majorité de la population. Le but de cette étude était d'évaluer l'occurrence de marqueurs sérologiques et moléculaires de l'hépatite C chez les résidents de la République de Guinée.

Les 562 échantillons de sérum obtenus en 2016–2017 auprès de résidents âgés de 1 à 90 ans (âge moyen 38,91±1,6) de deux préfectures, Mamou et Kindia, ont été étudiés. Tous les échantillons de sérum et de plasma ont été obtenus pour la recherche scientifique sous les noms de code conformément à la déclaration d'Helsinki. La présence des anticorps anti-VHC total et des anticorps spécifiques pour les protéines core, NS3, NS4, NS5 du VHC ont été déterminées à l'aide de kits ELISA (Diagnostic Test Systems LLC, Russie). L'ARN VHC a été détecté par PCR en temps réel à l'aide du kit «AmpliSens HCV-FL» (FBIS «CRIE», Russie) et par PCR nichée développée dans notre laboratoire. Les génotypes du VHC ont été déterminés par analyse phylogénétique basée sur le gène 5'UTR/core. L'intervalle de confiance (IC 95%) a été calculé par la méthode de Wilson.

Des anticorps anti-VHC ont été détectés chez 5,16% (95%, IC 3,62–7,31) adultes et l'ARN VHC n'a été détecté que chez 0,71% (95%, IC 0,28–1,82) (Tabl. 16). L'analyse phylogénétique a révélé la circulation de deux variants du VHC d'importance épidémique: le sous-type 1b et le sous-type 2c. Quelle que soit la région, aucun marqueur du VHC n'a été détecté dans le groupe d'âge de 0 à 17 ans, et aucune différence significative dans la survenue de l'anti-VHC parmi les différents groupes d'âge n'a été révélée. Dans le même temps, les résultats incertains de l'anti-VHC ont été obtenus chez 3,20% (95%, IC 2,04–5,01). La présence d'un grand nombre de résultats faux positifs anti-VHC est un problème réel sur le continent africain, comme indiqué dans un certain nombre d'études. L'une des raisons des résultats faus-

Tableau 16. Résultats de la détection des marqueurs du VHC dans des échantillons obtenus d'habitants des préfectures de Mamou et Kindia

Regions	Total	anti-HCV (confirme) n (%; 95% CI)	anti-HCV (non-certain) n (%; 95% CI)	RNA HCV n (%; 95% CI)
Mamou_HR*	232	17 (7,33%, 4,63–11,42)	14 (6,03%, 3,63–9,87)	2 (0,86%, 0,24–3,09)
Kindia_**	242	9 (3,72%, 1,97–6,92)	2 (0,83%, 0,23–2,96)	0
Kindia_HR*	55	3 (5,45%, 1,87–14,85)	2 (3,64%, 1,00–12,32)	2 (3,64%, 1,00–12,32)
Total	562	29 (5,16%, 3,62–7,31)	18 (3,20%, 2,04–5,01)	4 (0,71%, 0,28–1,82)

*HR — patients atteints de fièvre présentant des symptômes cliniques de diverses maladies; **résidents pratiquement en bonne santé.

sement positifs peut être une pression infectieuse importante sur le système immunitaire de l'hôte, qui est causée par une grande variété de pathogènes de nature diverse et répandus en Afrique. Dans notre étude, les résultats positifs anti-VHC les plus incertains concernaient des échantillons de patients atteints de fièvre présentant des symptômes cliniques de diverses maladies dans les hôpitaux Mamou et Kindia (Tabl. 16).

Les résultats obtenus indiquent un poids important de l'hépatite C en République de Guinée et soulignent la nécessité de développer un algorithme de critères de diagnostic et d'améliorer les systèmes de tests de diagnostic

pour le dépistage de masse parmi la population africaine afin d'établir la proportion de personnes impliquées dans le processus épidémique.

Prevalence des hépatites virales parentérales au Vietnam

La région de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental est une région où le virus de l'hépatite B (VHB) est endémique et où il est transmis avec succès par voie périnatale et horizontale. Au Viet Nam, on estime que 8,4 millions de personnes vivent avec l'infection à VHB. Actuellement, la population vietnamienne adulte n'est pas suffisamment couverte par le vaccin universel contre le VHB. Cette étude visait à analyser la prévalence actuelle du VHB, du VHC et du VHD dans la population générale au Viet Nam et à étudier l'hétérogénéité génétique de la population du VHB.

Un total de 1041 adultes de 18 à 79 ans (âge moyen $43,38 \pm 11,97$) de quatre régions, Binh Duong (BD) (deux communautés, Binh My (BM) et Chanh My (CM)); Khanh Hoa (KH); Quang Tri (QT), Hai Phong (HP)) ont été inscrits à l'étude en 2013–2014. La présence d'HBsAg a été analysée avec le kit Monolisa® HBsAg (Bio-Rad, USA). La présence d'anti-VHC total et des anticorps spécifiques du noyau, les protéines NS3, NS4, NS5 du VHC, l'anti-HDV ont été déterminés à l'aide de kits ELISA (Diagnostic Systems, Russie). L'ADN VHB, l'ARN VHC, l'ARN HDV ont été détectés par PCR en temps réel en utilisant les kits «AmpliSens HCV-FL», «AmpliSens HBV-FL», «AmpliSens HDV-FL» (FBIS «CRIE», Russie). Les génotypes du VHB ont été déterminés par analyse phylogénétique basée sur le gène S. L'intervalle de confiance (IC 95%) a été calculé par la méthode de Wilson.

La prévalence élevée d'HBsAg a été révélée dans les quatre régions: 9,9% (IC à 95%, 6,6–14,1) dans le BD; 14,1% (IC 95%, 10,1–18,9) — en KH, 8,9% (IC 95%, 5,7–13,0) — en QT, et 12,3% (95% CI, 8,5–16,9) — en HP. Dans le même temps, dans la région BD, la prévalence de HBsAg entre les communautés de BM et de MC était significativement différente: 16,0% — dans les BM (95% IC, 10,0 à 23,6) et 4,8% — dans les CM (95% IC, 1,9–9,6). Le taux de résidents ayant un total d'anti-HBc était de 61,1% (IC 95%, 57,6–64,5). La prévalence des anticorps anti-VHC était faible: 1,33% (IC à 95%: 0,73 à 2,44). ARN de VHC a été détecté chez 0,66% (IC à 95%: 0,28–1,53). Aucun marqueur d'infection à VHD n'a été détecté chez les résidents des régions BD, JH et HP. Au total, 60 souches de VHB ont été génotypées. Quatre sous-génotypes du VHB (B2, B3, B4 et C2) et trois sous-types (ayw1, adr, adw2) ont été identifiés. Le sous-génotype B4 s'est révélé prédominant chez 71,7% (43/60) des adultes. Les souches vietnamiennes de VHB appartenant au sous-génotype B4 formaient une branche distincte séparée des autres souches isolées en Asie (Fig. 40). Dans cette branche, le sous-groupe constitué de six souches de VHB provenant d'hommes âgés de 38 à 42 ans qui travaillaient dans la même ferme dans la communauté BM a été révélé. Cette découverte indique la transmission intra-ferme du VHB parmi les travailleurs et explique la prévalence la plus élevée d'HBsAg dans la communauté BM par rapport à la MC. Aucune substitution d'acide aminé, qui pourrait être responsable de la fuite du vaccin, ni aucune mutation associée à la résistance aux analogues de nucléosides n'ont été trouvées.

La grande diversité génétique de la population virale du VHB met en évidence les multiples sources d'infection, la propagation réussie de diverses variantes virales et donne

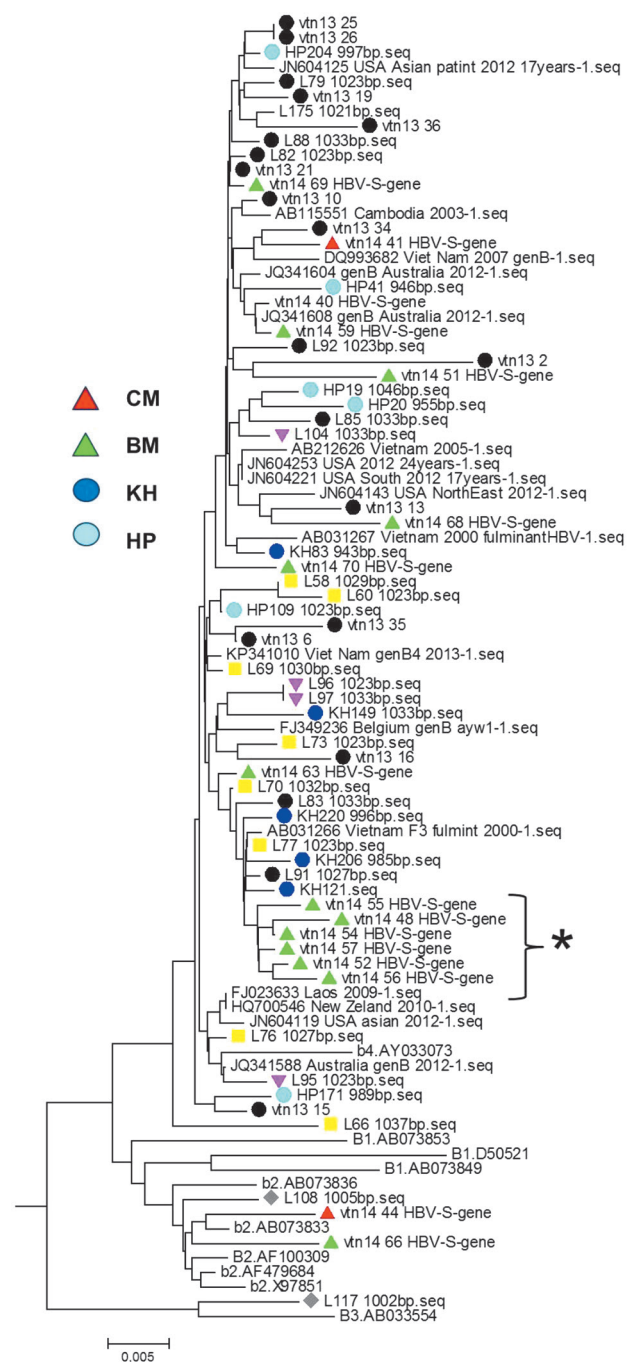


Figure 40. Dendrogramme, représentant la branche formée par les isolats de génotype B (obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance). Le sous-cluster constitué des souches de VHB isolées chez les travailleurs de la même ferme est indiqué par un astérisque

un aperçu de la force motrice du processus épidémique du VHB au Viet Nam. La transmission intra-agricole du VHB chez les travailleurs montre que la transmission horizontale est toujours une voie importante d'infection par le VHB au Viet Nam et indique que l'extension de la stratégie nationale de vaccination contre le VHB chez les adultes de 18 à 40 ans constitue une mesure importante pour empêcher la propagation horizontale de l'infection par le VHB au Viet Nam.

La protéine core+1/f du virus de l'hépatite C comme un facteur de progression du processus chronique

Un cadre de lecture alternative codant pour une protéine F est situé dans la région centrale du génome du virus de l'hépatite C (VHC). La longueur de la protéine F varie en fonction du génotype viral, de son rôle dans la morphogénèse virale et de la pathogénèse du processus infectieux activement étudié au cours de la dernière décennie. Le but de cette étude est de développer le test 'ELISA à partir des peptides synthétiques correspondant au déterminant antigénique de la protéine F des sous-types 1b et 3a du VHC et d'évaluer la présence des anticorps l'anti-F chez les patients positifs pour le VHC présentant la stade de fibrose.

Le peptide synthétique F10 correspondant au déterminant antigénique de la protéine F du sous-type 1b du VHC a été obtenu par synthèse en phase solide. L'immunogénicité et la spécificité immunochimique du peptide F10 ont été démontrées chez des animaux de laboratoire (souris). La condition optimale du test ELISA a été élaborée. La spécificité de l'ELISA développé a été testée sur les cinq panels de 165 échantillons de sérum (Tabl. 17). Les anticorps dirigés contre la protéine F ont été détectés dans des échantillons de patients anti-VHC (+) ou anti-VHC (+)/anti-VIH (+). Aucune différence statistiquement significative n'a été constatée entre la présence d'anti-F dans les panels 1 et 2 ($\chi^2 = 2,1876$; $p = 0,139$).

Tableau 17. Détection d'anticorps dirigés contre la protéine F du VHC dans différents panels

Panels	N	Anti-F (+), n (%)
No. 1 — anti-HCV(+)	72	7 (9,7)
No. 2 — anti-HIV(+)/anti-HCV(+)	35	7 (20,0)
No. 3 — anti-HIV(+)/anti-HCV(-)	7	0
No. 4 — HBsAg(+)/anti-HCV(-)	31	0
No. 5 — anti-HCV(-)/anti-HIV(-)/HBsAg(-)	20	0
Total	165	14 (8,5)

La présence de l'anti-F a été évaluée dans les échantillons de sérum de 105 patients infectés de manière chronique par le VHC avec différents stades de fibrose. 42 patients (40%) étaient infectés par le sous-type 1b du VHC, 63 (60%) par le sous-type 3a. La fibrose hépatique F0-F1 était chez 72 patients (68,57%). L'anti-F a été révélé chez 27 patients (25,71%): 12 d'entre eux infectés par le sous-type 1b et 15 par le sous-type 3a. Parmi 12 patients infectés par le sous-type 1b, 24,1% avaient F0-F1, 50,0% — F2, 33,3% — F3, 25,0% — F4. Parmi les 15 patients infectés par le sous-type 3a, 20,9% avaient F0-F1, 18,2% — F2, 25,0% — F3, 60,0% — F4. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre la présence d'anti-F chez les patients infectés par les sous-types 1b et 3a avec différents stades de fibrose ($p = 0,6397$ et $p = 0,2612$, respectivement).

Les résultats ont montré la possibilité d'utiliser des peptides synthétiques pour la détection d'anti-F dans des échantillons de sérum. La présence d'anti-F chez les patients anti-VHC (+) ainsi que chez les patients anti-VHC (+)/anti-VIH (+) montre l'expression de la protéine core+1/f du VHC dans l'évolution naturelle de l'hépatite C. La protéine anti-F a été détectée chez des patients atteints du VHC, quelle que soit la gravité de la fibrose et du sous-type du VHC.

Articles dans des revues scientifiques

- Lichnaia E.V., Klimashevskaya S.V., Obryadina A.P., Verbov V.N., Belopolskaya M.A., Esaulenko E.V., Kalinina O.V. The detection of antibodies to HCV F protein with immune enzyme analysis using synthetic peptide // *Klin. Lab. Diagn.* 2018; 63 (3): 183–186. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-3-183-186. En russe.
- Lichnaya E.V., Klimashevskaya S.V., Obryadina A.P., Verbov V.N., Belopolskaya M.A., Esaulenko E.V., Kalinina O.V. The use of synthetic peptides in the diagnosis of antibodies to the HCV Core+1/F protein // *Cytokines and Inflammation*. 2017; 16 (4): 33–35. En russe.
- Lichnaia E.V., Belopolskaya M.A., Kovaleva V.A., Esaulenko E.V., Kalinina O.V. Hepatitis C virus core+1/F protein as a possible factor in the progression of chronic process // *Russian Journal of Immunology*. 2018; 12 (4): 690–692. En russe.
- Kireeva A.G., Kalinina O.V., Kiselev A.M., Briko N.I., Glushkova E.V., Dmitriev A.V. An occurrence of ICE-*emm12* genetic element containing tetm and ermB resistance genes among Russian and Vietnamese group A streptococcal strains // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018; 2: 23–30. En russe.
- Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Makarova M.A., Tjulenev C.V., Trifonova G.F., Kalinina O.V. Antimicrobial resistance characteristics to *S. Typhi* isolated in Russian Federation in 2005–2016 // *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2017; 2 (63): 14–19. En russe.
- Belopolskaya M.A., Avrutin V.Yu., Ostankova Yu.V., Dmitrieva M.I., Rukoiatkina E.A., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Prevalence and genetic variants of virus hepatitis B in pregnant women // *HIV-infekciya i immunosuppressii*. 2017; 9 (4): 55–64. En russe.
- Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Boiro M.Y., Totolian A.A. The occurrence of the markers of hepatitis C among practically healthy residents of the Republic of Guinea: a pilot study // *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7 (3): 245–250. En russe.
- Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Boiro M.Y., Totolian A.A. The occurrence of the markers of hepatitis C among practically healthy residents of the Republic of Guinea: a pilot study // *Topical infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity* (Ed. A.Yu. Popova). St. Petersburg, 2017. En russe.
- Duong T.L., Bui Thi L.A., Pham N.Q., Doan T.T., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Study on prevalence and genotype of hepatitis B virus in some provinces in the period 2012–2013 // *J. Tropical Science and Technology*. 2017; 13: 90–97. En vietnamienne.

HERPÈSVIRUS HUMAIN

(en collaboration avec Vega LLC, Saint-Pétersbourg, et Pavlov First State Medical University, Saint-Pétersbourg)

L'invention concerne le domaine de la biotechnologie, en particulier le diagnostic clinique en laboratoire d'infections virales, et peut être utilisée pour le génotypage du

Herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6). La méthode permet l'identification rapide et fiable des virus HHV-6A et HHV-6B. La méthode permet de déterminer les polymorphismes mononucléotidiques spécifiques de HHV-6A et HHV-6B dans le gène U67 de HHV-6 par PCR en temps réel à l'aide d'amorces et de deux sondes marquées par fluorescence. L'invention peut être utilisée pour le génotypage du virus HHV-6.

BREVET D'INVENTION

1. Vedernikov V.E., Nikolsky M.A., Vyazovaya A.A., Lioznov D.A., Narvskaya O.V. Methode d'identification des variantes A et B du Herpèsvirus humain type 6. Brevet d'invention RUS 2627607 28.09.2016. <https://elibrary.ru/item.asp?id=36895519>

Centre régional du District fédéral Nord-Ouest pour la prévention et la lutte contre le SIDA

LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE ET VIROLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIH

Chef du Centre: N. Beliakov

Chercheurs permanents: N. Kononova, S. Ogurtsova, A. Bobreshova, U. Svetlichnaia, E. Boeva

Chef du laboratoire: A. Semenov

Chercheurs permanents: V. Rassohin, E. Yastrebova, A. Shchemelev, D. Valutite, E. Zueva, V. Fedotova, Y. Chornoguz, E. Yakubovskaya

Suite de l'étude des particularités du processus épidémique de l'infection par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest de la Fédération de Russie en 2017–2018

L'étude et la généralisation des données sur le processus épidémique de l'infection par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest de la Fédération de Russie constituent toujours les principaux objectifs de travail du Centre régional. L'information statistique officielle sur les cas de l'infection par le VIH détectés sur les territoires administratifs du District au cours du screening sérologique et fixés dans les documents de contrôle des observations statistiques fédéraux d'Etat constituent le fondement analytique du processus épidémique.

Le District fédéral Nord-Ouest est composé de 11 sujets de la Fédération de Russie peuplés de 13,7 million de personnes (9,5% de la population de Russie).

Comparée à 2016, en 2017 la population du District fédéral Nord-Ouest a augmenté de 0,3% (52 693 personnes). A Saint-Petersbourg et dans l'oblast de Leningrad on a vu se dessiner la croissance de la population due à l'accroissement de la natalité (à Saint-Petersbourg) et à la migration (respectivement +1,3%, +1,2%). Comparée à 2016, en 2017 dans l'oblast de Mourmansk la population a diminué de 0,5%, dans l'oblast de Vologda — de 0,8%, dans l'oblast d'Arkhangelsk — de 0,9%, dans l'oblast de Pskov — de 0,9%, dans l'oblast de Novgorod — de 1,1%, en République des Komis — de 1,1%. Dans ces régions l'émigration est la principale cause de diminution de la population. Au total dans le

District fédéral Nord-Ouest le nombre de morts a excédé de 1,1 fois celui des naissances. Le taux instantané de mortalité naturelle de la population a été 1,8 par 1000 habitants (0,9 en Fédération de Russie). Le taux de natalité le plus faible a été enregistré dans les oblasts de Leningrad et de Pskov.

Comparée à 2016, en 2017 la couverture des citoyens de la Fédération de Russie par le screening visant à détecter les anticorps contre le VIH a augmenté de 15,7%. Le nombre de personnes examinées au sujet de l'infection à VIH a constitué: citoyens de la Fédération de Russie — 3 025 246 personnes, ressortissants étrangers — 395 388 personnes. Comparé à 2016 (371 035 personnes), en 2017 le nombre de ressortissants étrangers examinés (395 388 personnes) a augmenté de 6,6%. Dans l'ensemble des personnes examinées en 2017 la part des ressortissants étrangers a constitué 11,6% (2,1% en 2005).

Comparé à 2016, en 2017 dans les groupes vulnérables, qu'on appelle aussi groupes risque (toxicomanes, homosexuels, personnes atteintes des maladies sexuellement transmissibles ou se trouvant dans les lieux de détention) globalement pour l'ensemble du District fédéral Nord-Ouest le volume de l'ensemble des tests a augmenté de 5,2% (Fig. 41). Mais comparé au niveau de 2007, cet indice est en baisse de 40%.

L'indice moyen de décelabilité dans le District fédéral Nord-Ouest (code 100) en 2017 a constitué 218,2 par 100 000 personnes examinées (261,8 en 2016), qui témoigne d'une diminution globale de 16,7%.

Analysant l'indice de décelabilité par territoires du District fédéral Nord-Ouest il convient de remarquer qu'en

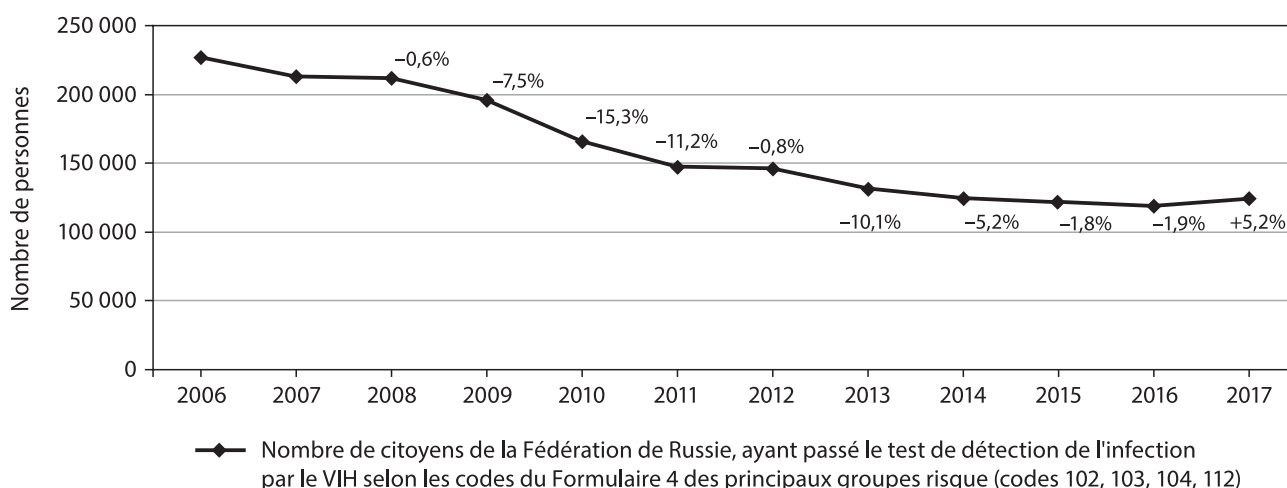


Figure 41. Evolution du nombre de personnes examinées par années au sujet de l'infection par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest, choisies parmi les plus actives dans leurs groupes risque (codes 102, 103, 104, 112) en 2006–2017

Tableau 18. Interprétation des codes adoptés pour l'examen de la population à risque de l'infection par le VIH

Cohortes examinées	Code des cohortes examinées
Citoyens de la Fédération de Russie	100
Donneurs (de sang, des liquides biologiques, des organes et tissus)	108
Personnel médical contactant les malades atteints de l'infection à VIH ou le matériel infecté	115
Toxicomanes	102
Homo- et bisexuels	103
Personnes atteintes des maladies sexuellement transmissibles	104
Personnes se trouvant dans les lieux de détention	112
Personnes examinées selon les indications cliniques	113
Femmes enceintes (donneuses du sang placentaire et d'avortement)	109
Autres	118
Personnes examinées dans le cadre d'une enquête épidémiologique	120
Ressortissants étrangers	200

2017 sa croissance a été observée dans l'oblast de Vologda (+9,8%), en République de Carélie (+8,9%), dans l'oblast de Novgorod (+5,2%) et en République des Komis (+4,4%). Sur d'autres territoires du District fédéral Nord-Ouest on a observé une baisse de l'indice de décelabilité.

En 2017 l'analyse d'efficacité du screening par groupes, effectuée dans le District fédéral Nord-Ouest (selon les codes du Formulaire 4), a révélé l'indice global de décelabilité dans le groupe des toxicomanes (code 102) — 2,6% (5,2% en 2008). Dans le groupe des personnes, testées selon le code 120, cet indice a constitué 1,9% (7,4% en 2008). L'indice de décelabilité dans le groupe des personnes se trouvant dans les lieux de détention (code 112) a constitué 1,8% (3,6% en 2008) (Tabl. 18).

Tableau 19. Enregistrement des nouveaux cas de l'infection par le VIH sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest en 2018 comparé à 2017

Territoire	2017	2018	Hausse/baisse (%)
République de Carélie	185	244	+31,9
Oblast de Vologda	389	451	+15,9
Oblast de Mourmansk	381	437	+14,7
Oblast d'Arkhangelsk	296	336	+13,5
Oblast de Pskov	90	102	+13,3
Oblast de Leningrad	1164	1243	+6,8
Oblast de Novgorod	306	325	+6,2
République des Komis	448	475	+6,0
Oblast de Kaliningrad	557	433	-22,3
Saint-Petersbourg	2778	2628	-5,4
District autonome de Nénétsie	5	9	+80
District fédéral Nord-Ouest	6599	6683	+1,3
Fédération de Russie	104 402	101 345	-2,9

L'indice de décelabilité pour le groupe des toxicomanes (code 102), supérieur à 5% et à celui moyen du District fédéral Nord-Ouest, a été observé dans la République des Komis — 6,8%. En 2017 l'indice de décelabilité dans ce district pour le groupe des homo- et bisexuels (code 103) restait au niveau de 3,5% (3,2% en 2009). Cet indice, supérieur à 5% et à celui moyen du district, a été observé dans les oblasts de Mourmansk (22,2%), de Vologda (5,0%) et de Pskov (8,3%). En 2017 l'indice de décelabilité de l'infection par le VIH parmi les ressortissants étrangers a diminué de 13,6% pour constituer 97,6 par 100 000 personnes examinées (273,2 en 2010).

Au 31.12.2018 pour toute la période d'enregistrement sur 11 territoires du District fédéral Nord-Ouest ont été enregistrés 136 359 cas de l'infection par le VIH. Ce qui représente 11,0% du nombre total 1 326 239 de personnes infectées par le VIH enregistrées à cette date en Fédération de Russie. Excepté les décédés (29 343 personnes), vers la fin de 2018 dans le District fédéral Nord-Ouest on comptait 107 016 personnes infectées par le VIH.

En 2018 sur 11 territoires du District fédéral Nord-Ouest ont été enregistrés 6 683 nouveaux cas de l'infection par le VIH parmi les citoyens de la Fédération de Russie, chiffre supérieur de 1,3% à celui de 2017 (voir Fig. 42, Tabl. 19).

L'augmentation du nombre de nouveaux cas de l'infection par le VIH est observée sur neuf territoires du District fédéral Nord-Ouest: en République de Carélie (31,9%), dans les oblasts de Vologda (15,9%), de Mourmansk (14,7%), d'Arkhangelsk (13,5%), de Pskov (13,3%), de Leningrad (6,8%), de Novgorod (6,2%), en République des Komis (6,0%) et dans le District autonome de Nénétsie (9 personnes en 2018 contre 5 en 2017).

Pendant plusieurs années d'observation l'incidence de l'infection par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest a été supérieure à celle moyenne de la Fédération de Russie (jusqu'à 1,5 fois). Mais à partir de 2009 on a vu se dessiner une tendance à la baisse de l'incidence, et en 2013 elle a déjà été inférieure à la moyenne du pays (respectivement 44,7 et 54,3 par 100 000 habitants). Comparée à 2017 (40,4 par 100 000 habitants), en 2018 dans le District fédéral Nord-Ouest l'incidence parmi les personnes, diagnostiquées «infection par le VIH» pour la première fois, a augmenté jusqu'à 47,9 par 100 000 habitants, qui est pourtant inférieure à la moyenne de la Fédération de Russie (69,0 par 100 000 habitants) (Fig. 43).

L'analyse du monitoring de la situation épidémiologique relative à l'infection par le VIH sur 11 territoires du District fédéral Nord-Ouest révèle les tendances suivantes.

En 2017 dans la répartition par catégories d'âge et par sexe les plus hauts indices de morbidité chez les hommes ont été observés dans la catégorie de 35–39 ans (174,5 par 100 000 habitants) et chez les femmes dans celle de 30–34 ans (89,4 par 100 000 habitants). Malgré les indices de morbidité relativement peu élevés, les adolescentes et les jeunes femmes restent une catégorie la plus vulnérable pour l'infection par le VIH.

En 2017 la part des jeunes a continué à décroître parmi les personnes diagnostiquées «infection par le VIH» pour la première fois. En 2015 la part de la catégorie d'âge de 15–19 ans y était au niveau de 8,4% et en 2016 — au niveau de 1,0%; celle de la catégorie de 20–24 ans en 2005 y était au niveau de 30,6% et en 2017 — au niveau de 5,3%.

En 2017 dans l'ensemble des personnes infectées par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest dominaient les

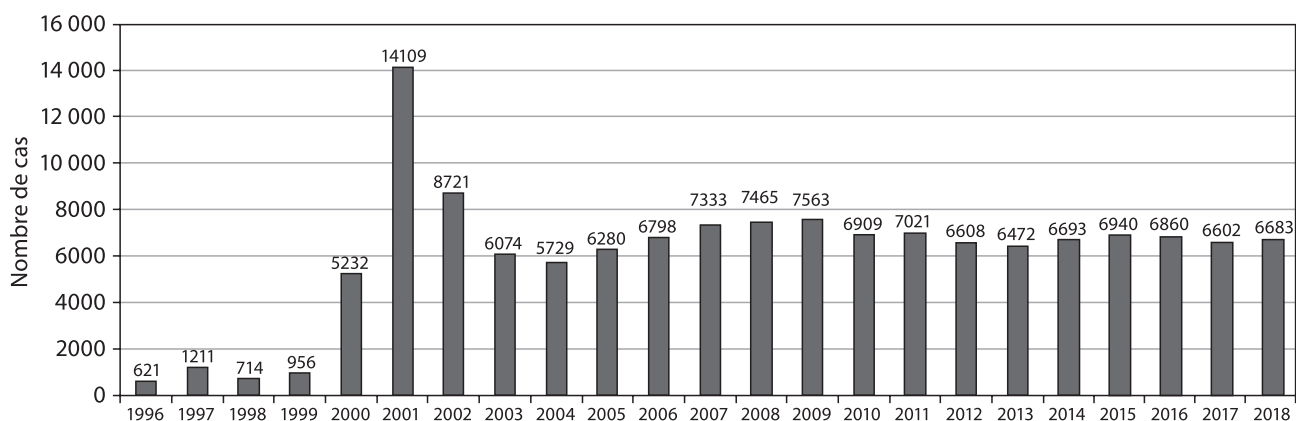


Figure 42. Evolution du nombre de nouveaux cas de l'infection par le VIH détectés dans le District fédéral Nord-Ouest (années 1996–2018)

hommes (60,7%). Dans cet ensemble augmente la part des femmes: de 18,9% en 1995 et 26,2% en 2000 à 39,2% en 2017.

En 2017 la transmission du virus pendant les contacts hétérosexuels a été enregistrée dans 65,3% de cas (53,5% en Fédération de Russie) et pendant l'injection intraveineuse des drogues — dans 29,1% de cas (43,6% en Fédération de Russie). La transmission du virus pendant l'injection intraveineuse des drogues ne prévalait que dans l'oblast d'Arkhangelsk (51,0%).

Aussi bien que globalement en Fédération de Russie, dans le District fédéral Nord-Ouest les cinq dernières années d'observation de l'épidémie de l'infection par le VIH ont révélé une augmentation de la part de la catégorie HSH (hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes), qui a constitué 4,5% en 2017 (1,3% en 2011). En 2017 l'analyse des territoires a démontré la part du groupe HSH au-dessus de la moyenne du District fédéral Nord-Ouest à Saint-Petersbourg (13,8%).

L'étude de distribution des cas de l'infection par le VIH selon les facteurs de risque séparément pour les hommes et les femmes a révélé que la transmission hétérosexuelle de l'agent pathogène reste prépondérante pour les femmes. En 2017 parmi les femmes infectées par le VIH la voie sexuelle comme essentiel facteur de risque de contamination a été enregistrée dans 81,9% de cas (en 2005 — dans 45,4% de cas). En cette même année chez les hommes la voie sexuelle comme facteur de risque de contamination a été établie

dans 54,2% de cas (en 2006 — dans 13,5% de cas) et l'injection intraveineuse des drogues — dans 37,3% de cas.

Etant donné la détection et la demande d'aide médicale tardives, de même que la croissance du nombre de malades atteints des affections concomitantes, dans le District fédéral Nord-Ouest on a assisté à l'augmentation du nombre de décès y compris avec le diagnostic «SIDA». Pourtant en 2017 et 2018 s'est profilée la tendance à la baisse de ce niveau à cause de l'augmentation du nombre de décès pour cause autre que l'infection par le VIH (Fig. 44).

En 2018 dans le District fédéral Nord-Ouest 1490 personnes infectées par le VIH sont décédées pour raisons diverses sans rapport à cette infection. A été enregistré 871 cas de décès avec le diagnostic SIDA. Les causes de la mort des malades au stade du SIDA ont été principalement la tuberculose, les pneumonies, les lymphomes et les méningo-encéphalites.

Au total depuis le commencement d'enregistrement de l'infection par le VIH de 1987 à 2018 sont décédées 29 343 personnes dont 10 590 diagnostiquées SIDA.

L'atteinte active des femmes par le processus épidémique détermine la croissance du nombre d'enfants nés des mères infectées par le VIH. Depuis le commencement d'enregistrement de l'infection par le VIH en 1987 dans le District fédéral Nord-Ouest 17 370 enfants avaient le contact avec l'infection par le VIH en état périnatal. Ainsi en 2000 a été enregistré 101 cas de contact périnatal,

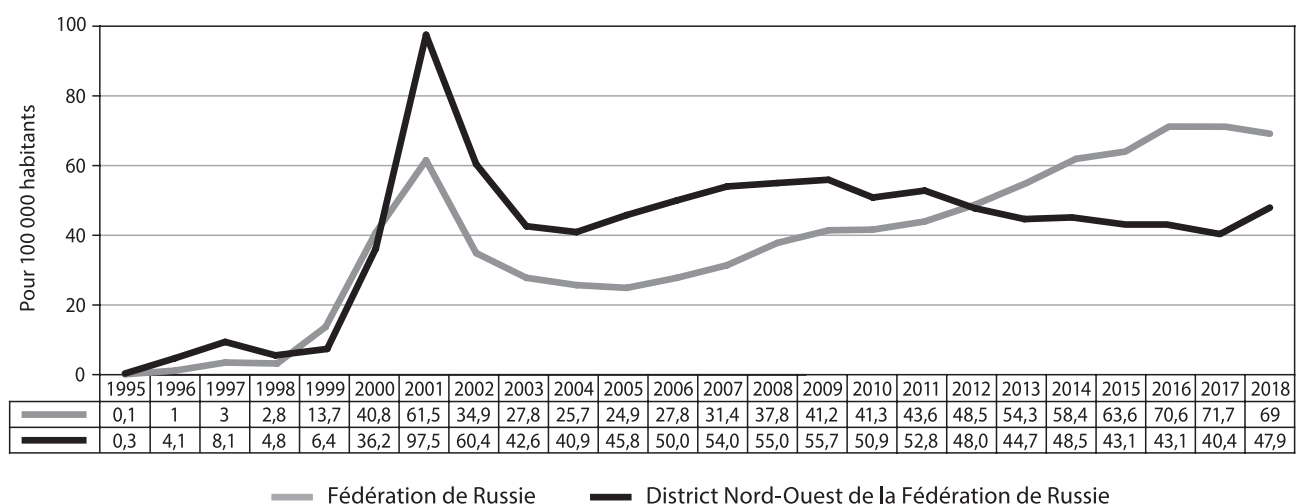


Figure 43. Incidence de l'infection par le VIH en Fédération de Russie et dans le District fédéral Nord-Ouest, 1995–2018

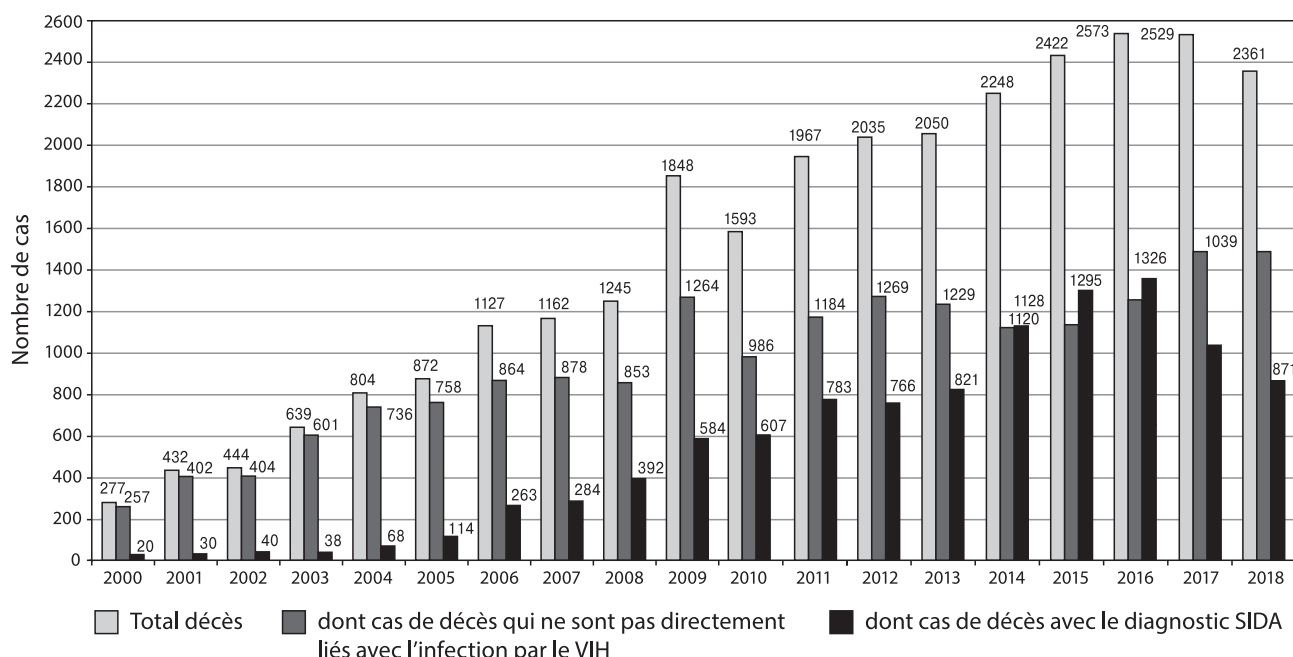


Figure 44. Enregistrement des cas de décès des personnes infectées par le VIH et les malades atteints du SIDA sur le territoire du District fédéral Nord-Ouest, 2000–2018

en 2012 — 1476 cas, en 2013 — 1353 cas, en 2014 — 1367 cas, en 2015 — 1379 cas, en 2016 — 1347 cas, en 2017 — 1270 cas. Au 31.12.2017 il y a eu au total 844 enfants ayant le diagnostic confirmé de l'infection par le VIH suite à la transmission périnatale. Il convient de remarquer que plus de la moitié d'enfants, auxquels en 2017 a été posé le diagnostic de l'infection par le VIH, étaient habitants de Saint-Petersbourg et de l'oblast de Leningrad. Dans le District fédéral Nord-Ouest la contamination périnatale des enfants a diminué de 25% à 1,3% avec les variations selon les territoires particuliers entre 0 et 3,3%, la couverture de la transmission du VIH de mère à l'enfant par la chimioprophylaxie en trois phases augmentant toujours. En 2017 le cours complet de chimioprophylaxie de la transmission du VIH de mère à l'enfant a été obtenu par 88,9% de couples «mère-enfant» contre 72,5% en 2006.

Chaque année dans le District fédéral Nord-Ouest augmente le nombre de personnes infectées par le VIH surveillées au dispensaire et fichées aux Centres pour la prévention et la lutte contre le SIDA. Au 31.12.2017 globalement dans 11 Centres territoriaux du SIDA ont suivi leur cours de surveillance au dispensaire 68 264 personnes infectées par le VIH.

Chez 34,1% de personnes surveillées l'infection par le VIH était au stade subclinique (latent). Chez 61,1% de patients a été diagnostiqué le stade des manifestations secondaires: 4A, 4B, 4C (31,5% en 2009 et 11,3% en 2005) (voir Fig. 45).

En 2017 34 180 malades infectés par le VIH obtenaient une thérapie spécifique antirétrovirale, dont 87,9% de patients nécessitant le traitement, 46,3% de malades fichés aux dispensaires et 33,3% de personnes diagnostiquées comme «infectées par le VIH».

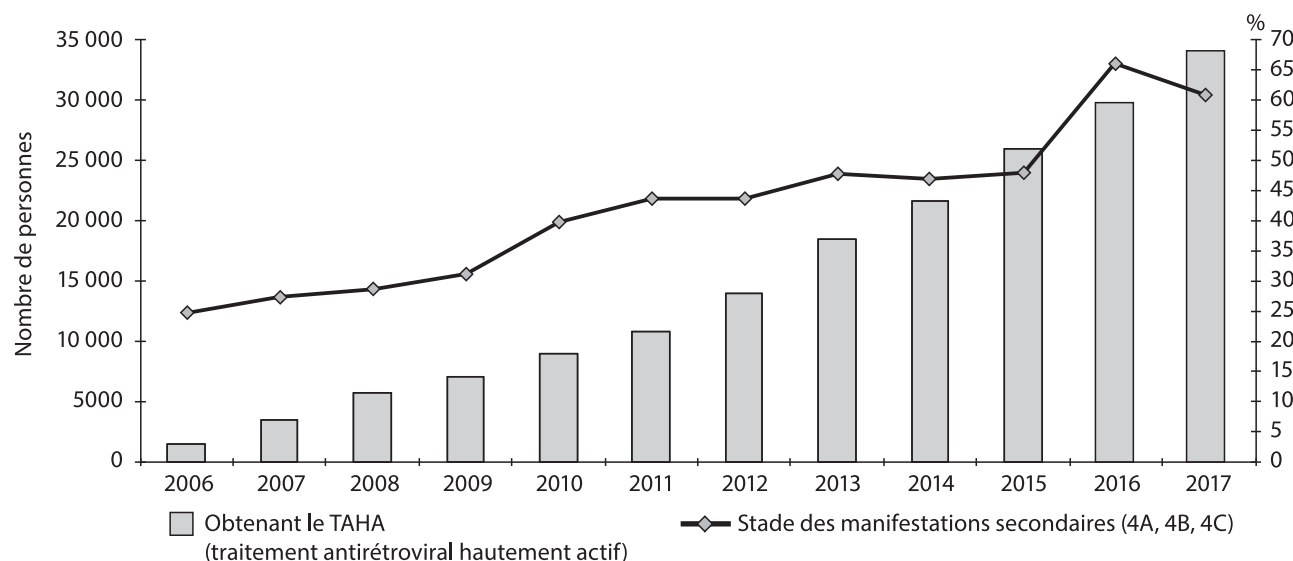


Figure 45. Nombre de patients infectés par le VIH, obtenant le TAHA, et la part des patients aux stades sévères de la maladie pendant la période du 2006 au 2017 sur les territoires du District fédéral Nord-Ouest

Laboratoire d'immunologie et virologie de l'infection par le VIH

Au laboratoire d'immunologie et virologie de l'infection par le VIH sont menées des recherches de génotypage du VIH de même que de détection des mutations de résistance aux médicaments. Elles sont effectuées depuis 2009 sur les demandes des Centres territoriaux pour la prévention et la lutte contre le SIDA du District fédéral Nord-Ouest.

En 2017–2018 ont été effectuées 323 recherches de détection de résistance aux produits antirétroviraux. Ont été révélés plusieurs mutations responsables de la résistance multiple aux Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et aux inhibiteurs de la protéase (IP).

L'analyse des résultats de la recherche étudiant la résistance du VIH aux médicaments a révélé certaines mutations parmi les plus répandues: M184V (51,08%), K103N (18,71%), L74V (12,95%), K101E (11,51%), A62V et G190S (10,79%). D'autres mutations sont moins fréquentes et ne sont enregistrées que dans 10% de cas. Elles sont apparues toutes sur fond de traitement par les produits antirétroviraux.

Les résultats de l'étude de la population des personnes infectées par le VIH dans le District fédéral Nord-Ouest sont inscrits dans la base de données unique pour effectuer ensuite une analyse rétrospective des tendances de développement de la résistance primaire et secondaire du VIH aux produits antirétroviraux dans la période de neuf ans entre 2009 et 2018.

Une option prometteuse des recherches est l'identification des marqueurs génétiques de résistance à la contamination par le VIH et des marqueurs de progression de l'infection par le VIH. En 2015–2016 on a fait progresser les recherches d'identification des marqueurs génétiques de résistance au VIH (CCR5delta32) et de la mutation CCR2 64I par la méthode de pyro-séquençage. L'étude de ces marqueurs de laboratoire présente un intérêt particulier pour le District fédéral Nord-Ouest puisque génétiquement cette région fait partie des zones de prévalence maximale de la mutation CCR5delta32.

Selon les données des études provisionnelles la prévalence de portage de l'allèle CCR5delta32 à Saint-Petersbourg constitue 17,9% (n = 586) qui est proche aux indices de sa prévalence dans la partie méridionale de la Suède et de la Finlande.

A été élaboré et est en train d'être testé sur la population du District fédéral Nord-Ouest un ensemble de réactants pour révéler les mutations de CCR2 64I qui représente un intérêt pour l'épidémiologie comme marqueur génétique de suppression de réplication du VIH.

Cliniquement est prouvée l'importance d'identification des marqueurs de résistance au VIH sur l'exemple des couples discordants.

Conclusion

1. Au cours des dernières années dans le District fédéral Nord-Ouest on observe la tendance à la diminution du nombre de personnes diagnostiquées VIH pour la première fois, aussi bien en chiffres absolus que par rapport à la population globale.
2. Les tendances de morbidité, révélées dans le District fédéral Nord-Ouest, se présentent comme moins alar-

mantes comparées à celles du district d'Oural et district Central voisins, de même que du District fédéral de la Volga et District fédéral de la Sibérie.

3. 60% de tous les nouveaux cas, diagnostiqués en 2017–2018, sont ceux de Saint-Petersbourg et de l'oblast de Léningrad où pendant plusieurs années on observe la tendance à la baisse du nombre de nouveaux cas. Ce tableau est typique pour toutes les régions où les mégapoles fournissent la majeure partie des personnes infectées par le VIH.
4. Pendant plusieurs années les principaux territoires du District fédéral Nord-Ouest se caractérisaient par un assez faible niveau de morbidité. Exception faite dans les années différentes pour l'oblast de Kaliningrad, la République des Komis et l'oblast de Vologda où les taux étaient quelque peu plus élevés. En 2017 on a constaté une hausse significative de morbidité dans les oblasts de Vologda (28%), de Kaliningrad (12,8%), de Novgorod (4,4%) et la République de Carélie (7,6%). En 2018 l'accroissement du nombre de nouveaux cas de l'infection par le VIH est remarqué sur neuf territoires du District fédéral Nord-Ouest: en République de Carélie (31,9%), dans les oblasts de Vologda (15,9%), de Mourmansk (14,7%), d'Arkhangelsk (13,5%), de Pskov (13,3%), de Léningrad (6,8%), de Novgorod (6,2%) et dans le District autonome de Nénésie (9 personnes en 2018 contre 5 en 2017). Selon leurs indices épidémiologiques et les données de laboratoire ces nouveaux cas étaient pourtant liés à la contamination qui avait eu lieu dans les années précédentes. Le délai moyen entre la contamination éventuelle du patient et la détection de l'infection par le VIH constituait de 3 à 6 ans et plus.
5. Il convient de prêter une attention particulière à la propagation de l'infection par le VIH dans la région (nombre de personnes vivantes porteuses du virus excepté ceux qui sont décédés avant). C'est cet indice qui reflète les tendances globales de propagation du virus dans la société et oriente à la nécessité d'assurer la prévention, le diagnostic et le traitement. Cet indice augmente systématiquement depuis l'an 2000. A la fin de 2018 on dénombrait quelque 107 016 personnes vivant avec le diagnostic VIH. Dans ces dernières années Saint-Petersbourg a abandonné la position de leadership en prévalence de la maladie tenant compte de sa population habitant dans la région. Néanmoins ces indices sont significatifs augmentant de manière inexorable aussi bien dans le pays que dans la région.
6. On assiste à l'augmentation de la fréquence de détection des isolats du VIH ayant une résistance multiple aux produits antirétroviraux, ce qui peut provoquer prochainement des changements dans les méthodes d'examen de laboratoire des patients au diagnostic primaire du VIH.
7. Ainsi l'analyse préalable de l'infection par le VIH en 2017 et 2018 a démontré que selon les deux principaux indices (nombre de nouveaux cas et nombre total de personnes vivant avec l'infection par le VIH) l'état épidémique de l'infection par le VIH correspond à l'instabilité et à la tendance à la hausse de morbidité et à la croissance du nombre de personnes vivant avec cette infection.

Publications

1. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Semenov A.V., Konovalova N.V., Ogurtsova S.V., Svetlichnaya Y.S., Boeva E.V., Bobreshova A.S., Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A. Reviewers: Stepanova E.V., Yastrebova E.B. HIV infection and comorbid conditions in the North-Western Federal District of the Russian Federation in 2016. Analytical review // Ed. Belyakov N.A. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017: 52.
2. Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Mikhailova N.B. Malignant tumors in HIV patients. *Epidemiology, pathogenesis, and variability. Part 1 // HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (1): 7–21.
3. Leonova O.N., Stepanova Ye.V., Belyakov N.A. Severe and comorbid conditions in HIV patients: an analysis of adverse outcomes // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (1): 55–64.
4. Churina M.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovsky A.P., Grebyonkina E.V., Tkachenko T.N., Zhandarmova T.A., Trofimova T.S., Asadullayev M.R., Belyakov N.A., Totolian A.A. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with art failure in Veliky Novgorod // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (1): 82–92.
5. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T.N., Totolian A.A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan // *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2017; 7 (4): 383–392.
6. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Pishchik V.N., Popov A.A., Totolian A.A. 16S rRNA Sequencing for Species identification in mixed cultures for new bio preparations in agriculture // *Adv. Biotech. & Micro.* 2017; 2 (5): 555599. doi: 10.19080/AIBM.2017.02.555599
7. Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Belyakov N.A. Malignant tumors in HIV patients. Localization, prevention, and treatment. Part 2 // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (2): 16–26.
8. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Bobreshova A.S. Countermeasures against HIV and increased HIV incidence in Russia // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (2): 82–90.
9. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Leonova O.N., Stepanova Ye.V., Bobreshova A.S. An integral estimate of the severity of HIV infection in patients with comorbidities // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (3): 47–53.
10. Uraeva G.E., Skochilov R.V., Krasnoselskikh T.V., Rassokhin V.V., Safonova P.V., Shaboltas A.V. Online HIV prevention program for people living with HIV: qualitative stage of the research // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (3): 81–90.
11. Rassokhin V.V., Bobreshova A.S. HIV infection and immunosuppressive conditions. Epidemiology and modern strategies advanced and comorbid forms of HIV infection // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2017; 9 (4): 106–110.
12. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Stepanova Ye.V., Leonova O.N., Boeva E.V. HIV infection, secondary conditions and comorbidities. Part 1: Epidemiology and the basis of the problem // *Medical Academic Journal.* 2018; 18 (4): 7–16.
13. Ruiz M.S., Heimer R., Levina O.S., Badosova N.V., Rassokhin V.V., Belyakov A.N., Belyakov N.A. HIV-care access among people with incarceration experience in St. Petersburg, Russia // *European Journal of Public Health.* 2018; 28 (1): 145–149.
14. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Stepanova Ye.V., Leonova O.N., Boyeva Ye.V. HIV infection: an algorithm for generation of detailed clinical diagnosis // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (1): 7–24.
15. Rassokhin V.V., Bobrovitskaya T.M. Kidney lesions in HIV patients: epidemiology, approaches to classification, and principal clinical manifestations. Part 1 // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (1): 25–36.
16. Shaboltas A.V., Rybnikov V.Yu., Granovskaya R.M., Rassokhin V.V. Basic principles and components of effective psychological HIV prevention technologies // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (1): 92–102.
17. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Bobkova M.R., Sofronov G.A., Totolian A.A. The 10th anniversary of the journal «HIV infection and immunosuppressive disorders»: we do it our way // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (2): 7–13.
18. Belyakov N.A., Trofimova T.N., Boeva E.V., Semenova M.D. The present day perception of the problem of immune restoration of upon art // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (2): 14–27.
19. Rassokhin V.V., Bobrovitskaya T.M., Belyakov N.A. Kidney lesions in HIV patients. iatrogenic lesions and their diagnostics and treatment. Part 2 // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (2): 28–42.
20. Leonova O.N., Stepanova E.V., Rassokhin V.V., Belyakov N.A., Bobreshova T.Y. Evaluation of clinical condition, immunosuppression and viral activity in patients with HIV infection // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (2): 54–68.
21. Chumakov E.M., Petrova N.N., Rassokhin V.V. Mental disorders and their influence on the commitment to observation in the infectious in HIV infected patients with early syphilis // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (2): 69–80.
22. Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Baikov V.V., Ilyin N.V., Vinogradova Yu.N. Epidemiology, diagnosis, and treatment of HIV-associated nonhodgkin lymphomas // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (3): 17–29.
23. Khalezova N.B., Boyeva E.V., Rassokhin B.B., Stasishkis T.A., Kovelonov A.Yu., Studilko E.V., Belyakov N.A. Women coinfecting with HIV and VHC. Part 1. Psychosocial characteristic and readiness to antiviral therapy // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (3): 30–39.
24. Azovtseva O.V., Trofimova T.S., Arkhipov G.S., Ogurtsova S.V., Panteleev A.M., Belyakov N.A. Letal outcomes in patients with HIV infection, parallels with adequacy of diagnostics, dispenser and treatment // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (3): 90–101.
25. Trofimova T.N., Katayeva G.V., Gromova E.A., Rassokhin V.V., Boeva E.V., Simakina O.E., Belyakov N.A. HIV associated neurocognitive disorders: diagnosis, detection of causes and therapy efficiency // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (4): 7–24.
26. Belyakov N.A., Rassokhin B.B., Boeva E.V., Gutova L.V., Khalezova N.B., Stasishkis T.A., Kovelonov A.Yu., Plavinskiy S.L. Women co-infected with HIV and VHC. Part 2. Clinical status and readiness to antiviral therapy // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (4): 57–66.
27. Yakovlev G.A., Uliukin I.M., Orlova E.S., Rassokhin V.V., Gorichny V.A. Treatment of patients against the pulmonary involvement in the conditions of comorbidity at late detection of HIV infection and without art // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (4): 76–82.
28. Kurganova T.Yu., Melnikova T.N., Ogurtsova S.V., Belyakov N.A. Predominant causes of increasing OF HIV infection morbidity rate, new wave among drug users in the Vologda Region // *HIV infection and Immunosuppressive disorders.* 2018; 10 (4): 83–89.
29. Belyakov N.A., Rassokhin V.V., Semenov A.V., Konovalova N.V., Ogurtsova S.V., Svetlichnaya Y.S., Boeva E.V., Bobreshova A.S., Esaulenko E.V. et al. HIV infection and comorbid conditions in the North-Western Federal District of the Russian Federation in 2016: Analytical review // Ed. Belyakov N.A. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2018: 52.
30. Belyakov N.A., Rassokhin V.V. Comorbid conditions in HIV infection. Part 1. Background of the issue // St. Petersburg, Baltiyskiy Healthcare Education Centre, 2018: 184.

Département des nouvelles technologies

Chef du Département: Vyatcheslav Verbov

Chercheurs permanents: O. Freilikhman, O. Zarutcheinova, V. Roka, N. Mikhailov, S.V. Borisenko, A. Vaganova, E. Savelieva, I. Likhatchev, O. Kuznetsova, Y. Petrova

Le Département des nouvelles technologies comprend le laboratoire des spécimens biologiques (chef du laboratoire — Vyatcheslav Verbov), laboratoire des technologies biologiques moléculaires (chef du laboratoire — Olga Freilikhman) et laboratoire des technologies immunochimiques (chef du laboratoire — Olga Zarutcheinova).

En 2017–2018 les travaux de recherche aux laboratoires ont été menés suivant plusieurs axes. Chaque activité comprenait aussi bien l'élaboration de nouveaux produits de diagnostic que la commercialisation des spécimens élaborés précédemment.

1. Analyse immuno-enzymatique (IFA)

1.1. Elaborations scientifiques

Dans l'évaluation de l'immunité cellulaire parmi les malades de la tuberculose et personnes atteintes par l'infection à VIH il a été démontré le suivant. L'ensemble QuantiFERON-TB Gold In-Tube conçu sur le mesurage quantitatif de l'interféron gamma-induit par l'antigène ne peut pas être utilisé pour l'examen des malades atteints des infections associées: tuberculose + VIH. Ceci est dû à la diminution du nombre de CD4 T-lymphocytes. Il est démontré en même temps que la chimiokine IP-10 peut être considérée comme un biomarqueur plus efficace.

1.2. Produits commercialisés.

Sur la base de ses propres élaborations conceptuelles le département produit les test-systèmes ELISA suivants:

- test-système immuno-enzymatique pour détection des anticorps IgG contre l'agent de la tuberculose (ELISA-anti-TUB);
- test-système immuno-enzymatique pour détection des anticorps IgM contre l'agent de la leptospirose (ELISA-anti-LER-M);
- test-système immuno-enzymatique pour détection des anticorps contre les *Coxiella burnetii* (ELISA-Q-ANTIGENE);
- test-système immuno-enzymatique pour détection des anticorps IgG contre l'agent de la Q-rickettsiose (ELISA-anti-Q).

2. Méthode de la réaction de polymérisation en chaîne

2.1. Elaborations scientifiques

2.1.1. Elaboration des test-systèmes PCR en temps réel pour détection des ADN des *Mycoplasma* et *Ureaplasma* en reproduction bovine

Les maladies de l'appareil reproducteur bovin, provoquées par les mycoplasmes des espèces *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* et *Ureaplasma diversum*, sont à l'origine du dommage économique substantiel causé à l'élevage. Ces maladies sont souvent accompagnées des symptômes faiblement exprimés ou ont une évolution asymptomatique.

Pour cette raison l'élaboration des méthodes du diagnostic de laboratoire de ces maladies se présente comme un important problème d'actualité.

En 2018 les collaborateurs du laboratoire ont conçu les test-systèmes sur la base de PCR en temps réel, destinés à la détection des ADN de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* et *U. diversum* dans les matières biologiques bovines. Il a été établi par les tests que la fréquence de portage de *U. diversum* est différente dans les différentes catégories d'âge. Le plus souvent *U. diversum* a été détecté chez les veaux.

La nouveauté du test-système élaboré pour la détection de l'ADN de *U. diversum* est confirmée par le brevet d'invention No. 2 683 029 «Procédé de détection et évaluation quantitative de la substance de l'ADN *U. diversum* par la méthode PCR en temps réel étudiées sur les matières biologiques des bovins adultes». Ce test-système a obtenu la Médaille d'Or de l'exposition «Bioindustrie-2018».

2.1.2. Elaboration du test-système PCR en temps réel pour détection de l'ADN de *Coxiella burnetii*

Il a été conçu un test-système (ensemble des amorces et d'une sonde fluorescente) pour détection de *C. burnetii* dans les matières biologiques par amplification, selon la méthode PCR en temps réel (PCR-TR) en utilisant la technologie TaqMan, du fragment du gène *higA*, codant la protéine, associée à la virulence, de la bactérie *C. burnetii*. Le test-système a été soumis à l'étude comparative, optimisation et évaluation de sa spécificité et sensibilité. Les résultats obtenus ont permis de conclure que la méthode PCR-TR en modification TaqMan, utilisant les amorces *higA* et la sonde de détection marquée par la fluorescéine, est efficace pour la détection et évaluation quantitative de *C. burnetii* dans les matières biologiques.

2.1.3. Etude de la résistance des mycoplasmes, pathogènes pour l'homme, aux fluorquinolones

Actuellement les principaux traitements pharmaceutiques des affections, provoquées par *M. hominis*, se font sur la base des macrolides et fluorquinolones. Pourtant les cas de résistance à ces composés sont également fréquents. L'étude réalisée a permis d'identifier et de caractériser génétiquement l'isolat *M. hominis* résistant aux fluorquinolones de la II-ème et III-ème génération. Le séquençage des gènes ciblés par les fluorquinolones, les sous-unités de la gyrase (*gyrA/B*) et la topoisomérase IV (*parC/E*) a permis de révéler deux mutations. Dans la composition de la protéine *ParC* a été détectée une nouvelle substitution, jamais décrite avant, de l'arginine contre la lysine en position 144, de même qu'une nouvelle mutation aboutissant à la substitution de la glycine contre la valine en position 409 dans la composition de la protéine *GyrB*, ce qui constitue de nouvelles données dans l'étude des fondements moléculaires de résistance des mycoplasmes aux fluorquinolones.

2.1.4. Adaptation de la méthode d'amplification isotherme à boucle (LAMP) pour la détection de *Neisseria gonorrhoeae*

Ont été sélectionnées les cibles génétiques optimum (gène *porA*) pour l'amplification isotherme à boucle de l'ADN *N. gonorrhoeae* à partir des matières cliniques.

3. Analyse néphélométrique

3.1. Elaborations scientifiques

Ont été conçus les kits de réactants suivants:

- kit de réactants de screening des urines pour détection de la bactériurie par la méthode de néphélométrie de fluctuation cohérente;
- kit de réactants pour détection des quantités résiduelles des antibiotiques dans les urines par la méthode de néphélométrie de fluctuation cohérente.

La méthode de néphélométrie de fluctuation cohérente possède plusieurs avantages par rapport à la néphélométrie traditionnelle. Le principal avantage consiste en une possibilité d'utiliser les flacons standard ronds en verre de 5 ml en qualité de cuvettes de réaction. Il est démontré qu'en utilisant les kits de réactants conçus on arrive à enregistrer fiablement la croissance bactérienne à partir de la concentration $10^3 \div 10^4$ UFC/ml.

4. Diagnostic des cultures

4.1. Elaborations scientifiques

Il a été élaboré un kit de réactants pour détection de la sensibilité des champignons du genre *Candida* aux antimycotiques. Le noyau du kit est constitué par le milieu de culture chromogène original. Son utilisation permet de visualiser les résultats obtenus. L'étude des isolats cliniques de *Candida albicans* a démontré leur forte sensibilité à la voriconazole (100%), la ketoconazole (96%), la fluconazole (94%), la miconazole (78%), l'amphotéricine B, l'itraconazole (78%) et une plus faible sensibilité à la clotrimazole (54%).

4.2. Produits commercialisés

Sur la base de ses propres élaborations conceptuelles le département fabrique et commercialise les test-systèmes suivants pour diagnostic dans le milieu de culture:

- kit de réactants pour la détection visuelle de *Mycoplasma hominis* (MYCOPLASMA-50);
- kit de réactants pour la détection visuelle de *Ureaplasma urealyticum* (UREAPLASMA-50);
- kit de réactants pour la détection de l'antibiosensibilité de *Mycoplasma hominis* (MYCOPLASMA-AS);
- kit de réactants pour la détection de l'antibiosensibilité de *Ureaplasma urealyticum* (UREAPLASMA-AS);
- kit de réactants pour la détection visuelle simultanée de *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* (UREA/MYCO-SCREEN-2);
- kit de réactants pour la détection, définition semi-quantitative du titre et définition de la sensibilité simultanées de *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* à 8 antibiotiques (UREA/MYCO-SCREEN-AS);

Publications

1. Gur'ev A.S., Kuznetsova O.Yu., Kraeva L.A., Rastopov S.F., Verbov V.N., Vasilenko I.A., Rusanova E.V., Volkov A.Yu. Development of Microbiological Analyzer Based on Coherent Fluctuation Nephelometry // *Advances in Artificial Systems for Medicine and Education, Advances in Intelligent Systems and Computing*. 2018; 658: 198–206.
2. Lysenko N.S., Freylikhman O.A., Vaganova A.N., Miroshnikova N.K., Mikhailov N.V., Verbov V.N. Development of the test system based on molecular methods for improved laboratory diagnosis of gonorrhea // *Science forum: Medicine, Biology and Chemistry: Proceedings of the VIII International Conference*. 2017; 6 (8): 63–71.
3. Vaganova A.N., Borisenko S.V., Freylikhman O.A., Roca V.V., Verbov V.N. Fertilization failure in heifers infected by *Ureaplasma diversum* // *Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases: International scientific conference*. 2018: 612.

- kit de réactants pour la détection visuelle de *Trichomonas vaginalis* (DVT);
- kit de réactants pour la détection des gonocoques par la méthode des cultures (DVG);
- kit de réactants pour la détection et identification à un coup de *P. putida* et *P. aeruginosa* (PSEUDOMONAS APS);
- kit de réactants pour isolement et identification simultanées des bactéries du groupe des genres *Proteus*, *Providencia* et *Morganella* (PROTEUS PPM);
- kit de réactants pour isolement et identification simultanés des bactéries du genre *Klebsiella*: *K. oxitoca*, *K. pneumoniae*, *K. mobilis*.

5. Réaction d'hémagglutination passive (RHGP)

5.1. Elaborations scientifiques

A été élaboré le diagnosticum érythrocytaire tétanique sec pour la RHGP. L'élaboration a été effectuée sur la base de l'anatoxine tétanique purifiée. Pour le stade de sensibilisation des globules rouges de poulet sont optimisés les principaux paramètres physico-chimiques.

5.2. Produits commercialisés

Sur la base de ses propres élaborations conceptuelles faites auparavant, le département fabrique et commercialise les test-systèmes RHGP suivants:

- diagnosticum érythrocytaire antigénique sec de la rougeole pour la réaction d'hémagglutination passive (DER-90);
- diagnosticum érythrocytaire Vi-antigénique sec pour la réaction d'hémagglutination passive (DES).

6. Méthode de diffusion sur disque

6.1. Elaborations scientifiques

Il a été élaboré un ensemble de disques avec antibiotiques en cartouches correspondant aux critères modernes de référencement des résultats selon les Recommandations cliniques «Définition de la sensibilité des microorganismes aux produits antimicrobiens» du 02.05.2015 et EUCAST, Version 7.1, 2017.

6.2. Produits commercialisés

Sur la base de ses élaborations conceptuelles faites auparavant le département produit des disques de sensibilité aux produits antimicrobiens et antifongiques, de même que les disques d'identification:

- kit de disques pour évaluer la sensibilité aux produits antimicrobiens (KD-PAM-1) — au total 66 noms d'antibiotiques.

4. Vaganova A.N., Freilikhman O.A., Shabalina A.V., Zarucheynova O.V., Saveljeva E.L., Verbov V.N. Mutation in *parC* and *gyrB* genes in *Mycoplasma hominis* isolate with low sensitivity to fluorquinolones of II-III generations // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 754.
5. Vaganova A.N., Freilikhman O.A., Borisenko S.V., Roca V.V., Verbov V.N. Cases of *Ureaplasma diversum* DNA detection in cattle blood // *Veterinary, zootechnia and biotechnologies*. 2018; 9: 22–28.
6. Vaganova A.N., Freilikhman O.A., Borisenko S.V., Roca V.V., Verbov V.N. Frequency of *Ureaplasma diversum* carriage in different age groups of cattle // *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2018; 3: 17–22.

Le Centre de test de laboratoire

Le Centre de test de laboratoire est une subdivision structurale dans le cadre de l'Institut de recherche. En dehors de cela le Centre de test exerce une activité qui a une fonction commerciale. Le centre de test comprend un vivarium et les laboratoires spécialisés de l'Institut (virologiques et microbiologiques).

Les thématiques de recherche du Centre de test relèvent de la microbiologie clinique appliquée et de la parasitologie dans le domaine d'élaboration et de conception des différents moyens de prévention et de médication des infections, y compris celles dues à des plaies, visant au perfectionnement ultérieur du système de lutte contre les épidémies. Il s'agit notamment d'élaboration de nouveaux médicaments, des articles médicaux de prévention et traitement des infections dues à des plaies, de lutte contre les agents polymésistants des complications infectieuses chez les patients.

L'activité commerciale du Centre de test vise les recherches précliniques et cliniques menées sur un vaste éventail des produits:

- médicaments;
- articles médicaux;
- produits immuno-biologiques;
- désinfectants;
- antiseptiques;
- matériel de protection individuelle;
- produits cosmétiques;
- produits d'hygiène de la cavité buccale;
- droguerie.

Le développement du Centre de test est corrélé avec la perspective de ses équipements conformément aux requis de GLP (good laboratory practice).