

© Е. Шипицына¹,
Е. Золотоверхая¹,
А. Крысанова¹, И. Агне-
Стадлинг², О. Калитеевская¹,
А. Савичева¹, А. Бенькович³,
Е. Соколовский³,
М. Домейка⁴, М. Унемо²

ОЦЕНКА МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В РОССИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

УДК 616-076:579.882.11

¹ ГУ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-
Петербург, Россия

² Отделение клинической
микробиологии, госпиталь
университета Оребро, Оребро,
Швеция

³ Санкт-Петербургский
государственный медицинский
университет им. академика
И. П. Павлова, Санкт-Петербург,
Россия

⁴ Институт клинической
бактериологии, Уппсальский
университет, Уппсала, Швеция

■ Целью данного исследования было оценить диагностические характеристики методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), которые в настоящее время широко используются в России для выявления *Chlamydia trachomatis*. В исследование были включены 446 пациентов с симптомами урогенитальной инфекции (319 женщин и 127 мужчин). Пять тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и один тест, основанный на технологии NASBA (nucleic acid sequence-based amplification — амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот), разработанных тремя российскими компаниями, оценивались при исследовании цервикальных и вагинальных образцов, полученных у женщин, и уретральных образцов и первой порции свободно выпущенной мочи у мужчин. В качестве референс, метода была использована ПЦР Cobas Amplicor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Распространенность хламидийной инфекции в исследуемой популяции составила 12,6 %. Российские МАНК и Cobas Amplicor ПЦР показали высокий процент совпадения результатов (от 97,9 до 99,2 % для разных клинических образцов). Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительных и отрицательных результатов российских тестов в различных образцах варьировала от 86,1 до 100 %, 99,1 до 100 %, 92,3 до 100 % и 98,2 до 100 %, соответственно.

■ **Ключевые слова:** *Chlamydia trachomatis*; методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК); Roche Cobas Amplicor ПЦР; диагностические характеристики; чувствительность и специфичность.

Введение

Во всем мире хламидийная инфекция является одной из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) [15]. Внедрение методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), которые в течение последних лет практически полностью заменили культуру клеток, прямую иммунофлюоресценцию и некоторые другие методы выявления хламидий, позволило значительно улучшить диагностику хламидийной инфекции. В настоящее время существует несколько коммерческих тестов для диагностики хламидийной инфекции: Cobas Amplicor ПЦР и Cobas TaqMan48 (полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени соответственно; Roche Diagnostics), m2000 (ПЦР в реальном времени; Abbott Laboratories), BD ProbeTec ET (SDA — strand displacement amplification; Becton Dickinson), AMP-CT and Aptima Combo 2 (ТМА — transcription mediated amplification; Gen-Probe). Главное преимущество МАНК заключается в сочетании высокой чувствительности с высокой специфичностью. Кроме того, МАНК позволяют использовать неинвазивные клинические образцы, быстры в исполнении, в высокой степени автоматизированы и имеют высокую пропускную способность [2, 8, 30].

В России достоверная информация по заболеваемости и распространенности ИППП, в том числе хламидийной инфекции, остается крайне ограниченной. Эта ситуация характерна для многих восточноевропейских стран, главным образом, из-за недостаточно

Таблица 1 (окончание на след. странице)

Характеристики тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, разработанных и используемых в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции

Характеристика	Метод ¹							
	ПЦР-эф-Дт		ПЦР-рв-Дт		ПЦР-эф-Л		ПЦР-эф-ИЭ	
Генетическая мишень	Криптическая плазмида		Ген 16S рРНК		Криптическая плазмида		Криптическая плазмида	
Технология выделения нуклеиновых кислот	ДНК-экспресс (Литех)		ДНК-экспресс (Литех)		ДНК-экспресс (Литех)		ДНК-сорбА (ЦНИИ эпидемиологии)	
Внутренний контроль	Включен в реакционную смесь		Включен в реакционную смесь		Включен в реакционную смесь		Добавляется до выделения ДНК	
Объем реакции (объем ДНК/РНК)	35 (5) µl		35 (5) µl		25 (5) µl		25 (10) µl	
Прибор для амплификации	Терцик (ДНК-технология)		iQ iCycler (BioRad, США)		Терцик (ДНК-технология)		Терцик (ДНК-технология)	
Программа амплификации	Пауза:	94° C/90 с	Пауза:	80° C/60 с	Пауза:	93° C/30 с	Пауза:	95° C/5 мин
	5 циклов:	94° C/20 с 64° C/5 с 72° C/5 с	Пауза:	94° C/90 с	35 циклов:	93° C/10 с 60° C/10 с 72° C/10 с	42 цикла:	95° C/10 с 65° C/10 с 72° C/10 с
			5 циклов:	94° C/30 с 64° C/45 с				
	40 циклов:	94° C/5 с 64° C/5 с 72° C/5 с	2 цикла:	80° C/30 с ²	Пауза:	72° C/60 с	Пауза:	72° C/60 с
45 циклов:			94° C/10 с 64° C/45 с ²					
Флюорофоры (МАНК в реальном времени ³)			FAM/HEX					
Предел детекции в ПЦР (число копий на реакцию)	2–4		4–6		4–6		2–4	

¹ ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва; ПЦР-эф-Л, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «Литех», Москва; ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные ЦНИИ эпидемиологии, Москва.

² Этапы детекции флюоресценции.

³ Зонд специфический для *C. trachomatis*/Зонд специфический для внутреннего контроля.

эффективной диагностики и неоптимальной системы учета и контроля [10–12, 20, 21, 27]. Ни один из международных коммерческих МАНК, упомянутых ранее, не используется для рутинной диагностики хламидийной инфекции в России из-за их высокой стоимости, и только несколько лабораторий применяют некоторые из этих тестов исключительно для подтверждения сомнительных результатов. В последние годы было разработано и внедрено несколько российских тестов для диагностики хламидийной инфекции, однако никаких данных по оценке их диагностических характеристик, проведенной в сравнении с международными валидированными тестами, не опубликовано.

Цель работы

Оценка диагностических характеристик пяти методов, основанных на ПЦР и широко применя-

ющихся в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции, и недавно разработанного теста на основе технологии NASBA (nucleic acid sequence-based amplification — амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот).

Материалы и методы

Оцениваемые МАНК

Оценивались следующие МАНК: ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва (ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт), ПЦР с электрофорезной детекцией компании «Литех», Москва (ПЦР-эф-Л), ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в ЦНИИ эпидемиологии, Москва (ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ), и тест, основанный на технологии NASBA в реальном времени (bioMérieux, Boxtel,

Таблица 1 (окончание)

Характеристики тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, разработанных и используемых в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции

Характеристика	Метод ¹			
	ПЦР-рв-ИЭ		NASBA	
Генетическая мишень	Криптическая плаزمида		16S рPHK	
Технология выделения нуклеиновых кислот	ДНК-сорбА (ЦНИИ эпидемиологии)		NucliSens Isolation Reagents (bioMérieux)	
Внутренний контроль	Добавляется до выделения ДНК		Добавляется до выделения ДНК	
Объем реакции (объем ДНК/PHK)	25 (10) µl		20 (5) µl	
Прибор для амплификации	RotorGene (Corbett Research, Австралия)		NucliSens EasyQ (bioMérieux)	
Программа амплификации	Пауза:	95° C/ 5 мин	Пауза:	41° C/90 мин ²
	10 циклов:	95° C/20 с 65° C/20 с 72° C/20 с		
	35 циклов:	95° C/20 с 60° C/30 с ² 72° C/15 с		
Флюорофоры (МАНК в реальном времени ³)	FAM/JOE		FAM/JOE	
Предел детекции в ПЦР (число копий на реакцию)	2–4			

¹ ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва; ПЦР-эф-Л, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «Литех», Москва; ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные ЦНИИ эпидемиологии, Москва.

² Этапы детекции флюоресценции.

³ Зонд специфический для *C. trachomatis*/Зонд специфический для внутреннего контроля.

Нидерланды), с мишень-специфическими олигонуклеотидами, разработанными в ЦНИИ эпидемиологии (таблица 1). В качестве референс-метода была использована ПЦР Cobas Amplicor (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия).

Исследуемая популяция

Для участия в исследовании были приглашены пациенты трех молодежных центров Санкт-Петербурга, имевшие симптомы уrogenитальной инфекции (выделения из мочеполовых органов, дизурию и т. п.) и не принимавшие антибиотики в течение четырех недель до участия в исследовании. С ноября 2006 г. по январь 2007 г. в исследование было включено 446 пациентов (319 женщин и 127 мужчин). Все участники исследования заполнили анкеты относительно их возраста, пола и наличия симптомов заболевания. Средний возраст женщин составил 20,7 лет (диапазон от 15 до 30 лет), средний возраст мужчин — 20,8 лет (диапазон от 15 до 27 лет). Материалами для исследования служили соскобы из цервикального канала и отделяемое влагалища у женщин и соскобы из уретры и моча у мужчин. От 21 пациентки были получены только клинические материалы из цервикального канала. Таким образом,

в общей сложности был проанализирован 871 образец.

Настоящее исследование было одобрено этическим комитетом ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия.

Взятие образцов и пробоподготовка

Сбор образцов, выделение ДНК, анализ и интерпретация результатов проводились согласно инструкциям производителей. Цервикальные, вагинальные и уретральные образцы для исследования тест-системами ПЦР-эф-Дт, ПЦР-рв-Дт и ПЦР-эф-Л собирали с помощью дакроновых тампонов и помещали в 200 мкл реагента ДНК-экспресс («Литех»). Цервикальные, вагинальные и уретральные пробы для исследования тест-системами ПЦР-эф-ИЭ, ПЦР-рв-ИЭ, NASBA и ПЦР Cobas Amplicor собирали также с помощью дакроновых тампонов и помещали в 1 мл 2-SP среды (сахарозо-фосфатный буфер). Образцы мочи собирались в контейнеры объемом 25 мл и затем транспортировались при температуре окружающей среды в лабораторию микробиологии ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН. После тщательного перемешивания

на вортексе из каждого образца, содержащего клинический материал, полученный из цервикального канала, и каждого образца мочи были отобраны аликвоты объемом 500 мкл, которые в замороженном виде пересылались в Отделение клинической микробиологии университетского госпиталя Оребро (Оребро, Швеция) для анализа с помощью ПЦР Cobas Amplicor. С помощью ПЦР Cobas Amplicor также исследовали вагинальные и уретральные образцы, для которых были получены дискордантные результаты.

Выделение нуклеиновых кислот

ДНК-экспресс

Для ПЦР-эф-Дт, ПЦР-рв-Дт и ПЦР-эф-Л ДНК выделяли с использованием технологии ДНК-экспресс («Литех»), основанной на термокоагуляционном кондиционировании ДНК. Пробирки, содержащие генитальные пробы в реагенте ДНК-экспресс, перемешивали на вортексе в течение 15 секунд, инкубировали при 98°C в течение 10 минут и затем центрифугировали при 13000 × g в течение 15 секунд. Супернатант использовали для постановки ПЦР.

Образец мочи (10 мл) центрифугировали при 3000 × g в течение 15 мин, отбирали супернатант и 500 мкл осадка переносили в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Затем центрифугировали концентрированный образец мочи при 13000 × g 15 с, супернатант удаляли, добавляли 200 мкл ДНК-экспресс реагента, после чего образцы обрабатывали согласно процедуре, описанной выше для генитальных проб.

ДНК-сорбА

Для методов ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ ДНК была выделена с использованием сорбентного метода ДНК-сорбА (ЦНИИ эпидемиологии). Пробы перемешивали на вортексе и затем 100 мкл каждого образца смешивали с 300 мкл лизирующего буфера и 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО). После этого смесь инкубировали при 65°C в течение 5 мин, несколько секунд центрифугировали, затем добавляли 20 мкл силикагеля в каждый образец и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, встряхивая каждые 2 мин. После этого образцы центрифугировали при 12000 × g, осадок промывали дважды в 1 мл 70% этанола и сушили при 65°C в течение 10 мин. ДНК элюировали ТЕ-буфером (Tris-EDTA) и использовали для постановки ПЦР.

Образцы мочи (1 мл) центрифугировали при 12000 × g 15 мин, супернатант удаляли, и из 100 мкл осадка выделяли ДНК согласно процедуре, описанной выше.

Выделение нуклеиновых кислот для NASBA

Выделение нуклеиновых кислот из клинических проб проводили с применением набо-

ра NucliSens® Isolation Reagents (BioMerieux) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы встряхивали на вортексе, затем 100 мкл каждого образца смешивали с 900 мкл лизирующего буфера и 10 мкл ВКО. Смесь еще раз встряхивали и центрифугировали несколько секунд, после чего добавляли 50 мкл силики и инкубировали еще 10 мин, встряхивая каждые 2 мин. Осадок промывали один раз в 1 мл промывочного буфера, дважды в 1 мл 70%-го этанола и, последний раз, в 1 мл ацетона. После подсушивания при 56°C в течение 10 мин нуклеиновые кислоты элюировали в 50 мкл элюирующего буфера и использовали для постановки с помощью метода NASBA.

Образцы мочи (1 мл) центрифугировали при 12000 × g 15 мин., супернатант удаляли, а 100 мкл осадка подвергали процессу выделения ДНК, описанному выше.

Выделение ДНК для ПЦР Cobas Amplicor

ДНК выделяли из 200 мкл пробы в роботизированной системе MagNA Pure LC с использованием реагентов MagNA Pure LC DNA Isolation kit III (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Германия) согласно инструкции производителя. Выделенную ДНК хранили при 4°C и использовали в течение 1 дня.

МАНК

Российские тесты на основе ПЦР

В таблице 1 представлены основные характеристики исследуемых МАНК. В каждую реакцию были включены положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец.

Продукты амплификации анализировали путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В каждый электрофорез был включен маркер молекулярного веса Gene Ruler DNA Molecular Weight Marker (Fermentas, Kaunas, Литва) для определения размеров ампликонов.

В реакциях ПЦР-эф-Дт, ПЦР-рв-Дт и ПЦР-эф-Л ВКО входит в состав реакционной смеси. В случае ингибирования образцы обрабатывались согласно инструкциям производителей: 100 мкл образца добавляли в новую пробирку с ДНК-экспрессом, после чего реакционную смесь перемешивали на вортексе в течение 15 с, инкубировали при 98°C в течение 10 мин, центрифугировали при 13000 × g в течение 15 с и использовали супернатант в новой постановке ПЦР.

В реакциях ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ ВКО добавляется до выделения ДНК, что позволяет контролировать не только наличие ингибиторов, но и качество выделения ДНК. Если ВКО не амплифицировался, исследовали новую порцию

исследуемого образца после 10-кратного разведения 2-SP буфером.

NASBA в реальном времени

Анализ клинических проб методом NASBA проводили с применением тест-системы *Chlamydia trachomatis* NASBA-Real-time (ЦНИИ эпидемиологии), состоящей из базового набора NucliSens® Basic Kit (BioMerieux) и мишеньспецифических олигонуклеотидов (ЦНИИ эпидемиологии), в соответствии с инструкцией производителя. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл: 5 мкл препарата нуклеиновых кислот, 5 мкл смеси ферментов и 10 мкл амплификационной смеси. Смесь ферментов, состоящую из T7 РНК-полимеразы, обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц, РНКазы H и альбумина бычьей сыворотки, добавляли к реакционной смеси в ходе 2-минутной инкубации при 41°C, которую проводили после высокотемпературной денатурации мишени РНК (2 мин при 65°C). Реакцию NASBA с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени проводили в течение 90 мин при 41°C в анализаторе NucliSens® EasyQ Analyser (BioMerieux). Интерпретация результатов осуществлялась согласно инструкции по применению тест-системы. В качестве критерия определения клинического образца как положительного или отрицательного использовалось пороговое значение флуоресценции, установленное при анализе выборки отрицательных образцов.

ПЦР Cobas Amplicor

ПЦР Cobas Amplicor проводили согласно инструкции производителя. Кроме того, все пробы были также проанализированы методом ПЦР в реальном времени в анализаторе LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) с использованием тест-системы LightMix 480HT (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Германия), мишенью в которых является фрагмент гена *omp1* длиной 136 н. п. [13]. Целью данного анализа было убедиться, что отрицательный результат тестирования не был обусловлен присутствием в пробе недавно описанного шведского варианта *C. trachomatis* [13].

Интерпретация результатов

Все положительные образцы тестировали в дублях. Диагностические характеристики тестов российского производства для всех цервикальных образцов от женщин и всех образцов мочи от мужчин оценивали, используя ПЦР Cobas Amplicor в качестве «золотого стандарта». Дополнительно ПЦР Cobas Amplicor применили для анализа различающихся результатов тестирования вагинальных и мужских уретральных образцов. Клинические образцы принимали за истинно положительные, если положительный

результат был подтвержден референс-методом, или если хламидии выявлялись всеми российскими методами, несмотря на то, что ПЦР Cobas Amplicor давал отрицательный результат. Однако последний вариант в нашем исследовании не встречался.

Определение аналитической чувствительности ПЦР-тестов, разработанных в России

Аналитическую чувствительность ПЦР-тестов, разработанных в России, определяли с помощью ДНК-контроля *Chlamydia trachomatis* (VIRCELL, Santa Fe, Spain) в двукратном и десятикратном разведениях.

Результаты исследования

Согласно результатам референс-метода, 40 женщин (12,5%) и 16 мужчин (12,6%) были инфицированы *C. trachomatis*. По данным тестирования с использованием LightMix 480HT, ни один из отрицательных клинических образцов не являлся недавно описанным новым шведским штаммом *C. trachomatis*.

Все исследованные российские МАНК и Cobas Amplicor ПЦР показали высокий уровень совпадения результатов. Так, совпадение по цервикальным, вагинальным, уретральным образцам и образцам мочи составило 98,1, 97,9, 99,2 и 98,4% соответственно. Следовательно, только шесть цервикальных, шесть вагинальных, один уретральный и два образца мочи продемонстрировали различающиеся результаты. Российские МАНК при сравнении с ПЦР Cobas Amplicor дали три ложноположительных и двенадцать ложноотрицательных результатов (табл. 2).

Чувствительность российских тестов при исследовании различных клинических образцов варьировала в пределах 86,1–100% (табл. 3). При исследовании клинических образцов, полученных у женщин, самая высокая чувствительность наблюдалась при работе с тестами компании «ДНК-технология» (92,3 и 91,7% для цервикальных и вагинальных образцов соответственно) и NASBA (89,7% для цервикальных и 91,7% для вагинальных образцов). Чувствительность тестов при исследовании клинических образцов, полученных от мужчин, была несколько выше — 92,3–100%. Наиболее чувствительным методом при исследовании уретральных мазков и образцов мочи оказался метод NASBA. Тесты компании «Литех» и ЦНИИ эпидемиологии также показали 100% чувствительность при исследовании уретральных образцов. Прогностическая значимость отрицательных результатов варьировала в пределах 98,2–100%.

Таблица 2

Характеристики тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, разработанных и используемых в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции

Образцы	ПЦР-эф-Дт ¹	ПЦР-рв-Дт ¹	ПЦР-эф-Л ¹	ПЦР-эф-ИЭ ¹	ПЦР-рв-ИЭ ¹	NASBA ¹	ПЦР Cobas AmpliCor	Число образцов
Женщины								
Цервикаль- ный канал	+	+	—	—	—	+	+	1
	+	+	—	—	—	—	+	1
	+	+	+	—	—	—	—	1
	—	—	—	—	—	—	+	3
Вагина	+	+	—	—	—	+	+	2
	+	+	+	—	—	—	—	1
	—	—	—	—	—	—	+	3
Мужчины								
Уретра	—	—	+	+	+	+	+	1
Моча	—	—	—	—	—	+	+	1
	+	+	—	—	—	—	—	1

¹ ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва; ПЦР-эф-Л, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «Литех», Москва; ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные ЦНИИ эпидемиологии, Москва.
+ — положительный результат; — — отрицательный результат

У 35 женщин хламидии были обнаружены одновременно в материале из цервикального канала и вагинальном отделяемом. У одной женщины хламидии были обнаружены только в вагинальном материале. Следовательно, при исследовании только цервикальных или только вагинальных образцов чувствительность тестов для выявления инфицированных лиц составила 97,2 % (35 из 36) и 100 % (36 из 36) соответственно. У двух мужчин хламидии были выявлены только в моче и у трех мужчин — только в клиническом материале из уретры. Таким образом, когда уретральные пробы и моча исследовались отдельно, чувствительность тестов для выявления инфицированных пациентов составила 87,5 % (14 из 16) и 81,3 % (13 из 16) соответственно.

Специфичность российских тестов варьировала от 99,1 до 100 %, прогностическая значимость положительных результатов — от 92,3 до 100 % (таблица 3).

Образцы от восьми женщин и семерых мужчин содержали вещества, ингибирующие амплификацию (таблица 4). Самый высокий уровень ингибирования (25 из 871, или 2,9 %), особенно заметный в соскобах из уретры (5,5 %), наблюдали при выделении ДНК с помощью технологии ДНК-экспресс. В то же время ингибирование было редким при использовании технологии ДНК-экспресс для тестов ПЦР-рв-Дт. Наконец, ингибирование наблюдалось крайне редко при использовании сорбентных методов выделения ДНК, таких как ДНК-сорба и

NucliSens Isolation Reagents (таблица 4). Все образцы, содержащие ингибиторы амплификации, тестировали повторно после выделения ДНК из новой порции образца, разведенного в 10 раз. Все пробы, в которых наблюдалось ингибирование реакции, после повторного тестирования были подтверждены как отрицательные.

Предел детекции в ПЦР-эф-Дт, ПЦР-рв-Дт, ПЦР-эф-Л, ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ составил 2–4, 4–6, 4–6, 2–4 и 2–4 геномных копий на реакцию, соответственно.

Обсуждение

Настоящее исследование является первым исследованием, сравнивающим диагностические характеристики российских МАНК для выявления *C. trachomatis* с международным валидированным МАНК, таким как ПЦР Cobas AmpliCor (Roche Diagnostics). Все шесть оцениваемых тестов показали достаточно высокую чувствительность и специфичность для выявления хламидий при исследовании клинических материалов, полученных как инвазивными, так и неинвазивными способами. Лучшее сочетание чувствительности (от 89,7 до 100 %) и специфичности (100 % во всех образцах) было продемонстрировано новым тестом NASBA. Однако необходимы дальнейшие исследования с использованием большего количества клинических проб, полученных от пациентов с наличием и отсутствием симптомов урогенитальной инфекции.

Таблица 3

Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительных результатов (ПЗПР) и прогностическая значимость отрицательных результатов (ПЗОР) тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, разработанных и используемых в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции

Образцы	Тест ¹	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ПЗПР (%)	ПЗОР (%)
Женщины					
Цервикальный канал (n = 319)	ПЦР-эф-Дт	92,3	99,6	97,3	98,9
	ПЦР-рв-Дт	92,3	99,6	97,3	98,9
	ПЦР-эф-Л	87,2	99,6	97,1	98,2
	ПЦР-эф-ИЭ	87,2	100	100	98,2
	ПЦР-рв-ИЭ	87,2	100	100	98,2
	NASBA	89,7	100	100	98,6
Вагина (n = 298)	ПЦР-эф-Дт	91,7	99,6	97,1	98,9
	ПЦР-рв-Дт	91,7	99,6	97,1	98,9
	ПЦР-эф-Л	86,1	99,6	96,9	98,1
	ПЦР-эф-ИЭ	86,1	100	100	98,1
	ПЦР-рв-ИЭ	86,1	100	100	98,1
	NASBA	91,7	100	100	98,9
Мужчины					
Уретра (n = 127)	ПЦР-эф-Дт	92,9	100	100	99,1
	ПЦР-рв-Дт	92,9	100	100	99,1
	ПЦР-эф-Л	100	100	100	100
	ПЦР-эф-ИЭ	100	100	100	100
	ПЦР-рв-ИЭ	100	100	100	100
	NASBA	100	100	100	100
Моча (n = 127)	ПЦР-эф-Дт	92,3	99,1	92,3	99,1
	ПЦР-рв-Дт	92,3	99,1	92,3	99,1
	ПЦР-эф-Л	92,3	100	100	99,1
	ПЦР-эф-ИЭ	92,3	100	100	99,1
	ПЦР-рв-ИЭ	92,3	100	100	99,1
	NASBA	100	100	100	100

¹ ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва; ПЦР-эф-Л, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «Литех», Москва; ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные ЦНИИ эпидемиологии, Москва.

В настоящее время в нашей стране для диагностики хламидийной инфекции, главным образом, используются МАНК отечественных производителей, что обусловлено высокой стоимостью международных коммерческих тест-систем. В 2006 году нами были опубликованы данные, полученные при сравнении культурального метода диагностики, двух различных методов прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) и трех ПЦР-тестов, используемых в России для диагностики хламидийной инфекции [11]. Чувствительность культурального метода и ПИФ оказалась очень низкой, и поэтому эти методы не могут быть рекомендованы в качестве основных методов для диагностики хламидийной инфекции. Чувствительность ПЦР значительно

варьировала (от 79 до 100 %) в зависимости от используемых тест-систем, пола пациентов и типов исследуемых образцов. Специфичность всех ПЦР-тестов была очень высокой (от 97 до 100 %) [11].

Результаты настоящего исследования показали, что МАНК, используемые в России для диагностики хламидийной инфекции, обладают достаточно хорошими диагностическими характеристиками как для образцов, полученных инвазивными методами, так и для образцов, полученных неинвазивными методами. Чувствительность отечественных МАНК оказалась несколько выше при исследовании клинических образцов, полученных от мужчин (92,3–100 %), чем от женщин (86,1–92,3 %).

Таблица 4

Частота ингибирования в тестах, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, разработанных и используемых в России для рутинной диагностики хламидийной инфекции

Методы выделения нуклеиновых кислот	Тест ¹	Количество невалидных результатов (%)			
		Женщины		Мужчины	
		Цервикальный канал (n=319)	Вагина (n=298)	Уретра (n=127)	Моча (n=127)
ДНК-экспресс	ПЦР-эф-Дт	8 (2,5%)	8 (2,7%)	7 (5,5%)	2 (1,6%)
	ПЦР-рв-Дт	1 (0,3%)	2 (0,7%)	2 (1,6%)	0
	ПЦР-эф-Л	8 (2,5%)	8 (2,7%)	7 (5,5%)	2 (1,6%)
ДНК-сорбА	ПЦР-эф-ИЭ	0	2 (0,7%)	0	0
	ПЦР-рв-ИЭ	0	2 (0,7%)	0	0
NucliSens Isolation Reagents	NASBA	1 (0,3%)	1 (0,3%)	0	0

¹ ПЦР-эф-Дт и ПЦР-рв-Дт, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «ДНК-технология», Москва; ПЦР-эф-Л, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные в компании «Литех», Москва; ПЦР-эф-ИЭ и ПЦР-рв-ИЭ, ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, разработанные ЦНИИ эпидемиологии, Москва.

Кроме того, было показано, что вагинальные образцы были по меньшей мере не менее информативны для выявления хламидийной инфекции с помощью МАНК, чем цервикальные, что согласуется с данными других авторов [3, 14, 26, 32, 33]. Подобно этому, результаты анализа проб мочи от мужчин были практически идентичны результатам анализа соскобов из уретры, что также согласуется с результатами предыдущих исследований [1, 4, 5, 9, 22–25]. В целом диагностические характеристики российских тестов как ПЦР, так и NASBA не уступают диагностическим характеристикам международных коммерческих тестов (ПЦР, TMA и SDA), анализ которых приведен в недавнем систематическом обзоре [30].

Распространенность урогенитальной хламидийной инфекции в исследуемой популяции (посетителей молодежных центров, имеющих симптомы урогенитальной инфекции) составила 12,6% (56 из 446). Традиционно для выявления *C. trachomatis* используют материалы, полученные из цервикального канала у женщин и уретры у мужчин. В настоящее время большое внимание уделяется возможности тестирования клинического материала, полученного без инвазивного вмешательства — отделяемого влагалища у женщин и первой порции свободно выпущенной мочи у мужчин. В нашем исследовании при анализе только цервикальных или только вагинальных образцов у женщин чувствительность тестов для выявления инфицированных пациентов составила 97,2 и 100%, соответственно. При исследовании только уретральных мазков или только мочи у мужчин чувствительность тестов для выявления инфицированных пациентов составила 87,5 и 81,3% соответственно. В преды-

дущих работах было показано, что исследование нескольких образцов от одного пациента позволяет выявлять большее число инфицированных лиц [11, 22, 24, 31, 33]. В нашем исследовании одновременный анализ двух образцов привел к увеличению чувствительности выявления инфицированных пациентов на 2,8% у женщин и 18,7% у мужчин.

Все отечественные тесты, которые оценивались в данной работе, используют внутренний контроль для обеспечения контроля амплификации в каждом образце. Частота ингибирования в исследуемых тестах значительно варьировала в зависимости от типа образца и способа выделения ДНК/РНК и была несколько выше в уретральных (0–5,5%) и вагинальных (0,3–2,7%) образцах, чем в цервикальных соскобах (0–2,5%) и образцах мочи (0–1,6%), что в целом совпадает с данными других авторов [6, 7, 16, 18]. Частота ингибирования амплификации была значительно ниже в тестах, использующих сорбентные методы выделения нуклеиновых кислот. Кроме того, в тестах, разработанных в ЦНИИ эпидемиологии (ПЦР с электрофорезной детекцией и ПЦР в реальном времени, а также NASBA в реальном времени), внутренний контроль добавляется перед выделением нуклеиновых кислот, что позволяет контролировать не только ингибирование амплификации, но и эффективность выделения ДНК/РНК.

Основным недостатком сорбентных методов выделения ДНК по сравнению с технологией ДНК-экспресс является их относительная длительность и трудоемкость. Кроме того, с увеличением количества этапов выделения ДНК увеличивается риск перекрестной контаминации. В то же время, когда возникает подозрение

на контаминацию в ходе пробоподготовки, при использовании сорбентных методов можно выделить ДНК из новой порции образца, тогда как при использовании технологии ДНК-экспресс весь образец обрабатывается сразу. В качестве подтверждения этого можно привести слабоположительные результаты анализа проб, полученных от одной пациентки, с помощью ПЦР-тестов компаний «ДНК-технология» и «Литех» (таблица 2). Всеми остальными методами, включая Roche COBAS Amplicor, для этих проб были получены отрицательные результаты. Так как для ПЦР-анализа с использованием тестов компаний ДНК-технология и «Литех», основанных на разных генных мишенях, применялся один и тот же препарат ДНК, ложноположительные результаты в данном случае были, скорее всего, обусловлены не неспецифической амплификацией, а контаминацией в ходе пробоподготовки.

Многочисленные исследования показали, что МАНК могут быть использованы для скрининга хламидийной инфекции, так как их высокая чувствительность и специфичность позволяют использовать образцы, полученные неинвазивным способом [19, 25, 28, 29, 30]. После полноценной и всесторонней оценки отечественных тест-систем, основанных на МАНК, они могут быть использованы для широкомасштабных эпидемиологических исследований с целью получения достоверной информации о распространенности хламидийной инфекции в России, в том числе с применением технологии пулирования [17, 27].

Таким образом, все шесть российских тестов для диагностики хламидийной инфекции продемонстрировали достаточно высокую чувствительность и специфичность выявления *C. trachomatis* при использовании образцов, полученных как инвазивным, так и неинвазивным способом. Тем не менее, остается актуальным усовершенствование некоторых из них, особенно в отношении чувствительности. Более того, необходимы дальнейшие исследования по всесторонней оценке отечественных МАНК при обследовании больших популяций. Мы надеемся, что данное и последующие исследования послужат основой для разработки рекомендаций по эффективной диагностике хламидийной инфекции в России.

Благодарности

Мы благодарим всех врачей молодежных центров, принявших участие в сборе клинического материала и информации о пациентах. Мы особенно признательны Марине Федоровне Ипполитовой (Молодежный центр Петроградского района Санкт-Петербурга), Татьяне Евгеньевне Трубецкой (Молодежный центр Красногвардейс-

кого района Санкт-Петербурга) и Ольге Юрьевне Ландиной (Медицинский центр «Ювента») за организацию сбора и транспортировки клинических проб.

Настоящее исследование было проведено в рамках российско-шведского проекта по оптимизации качества диагностики ИППП в Восточной Европе и было организовано Восточно-Европейским обществом по охране репродуктивного здоровья на средства гранта Восточно-европейского комитета, Стокгольм, Швеция.

Литература

1. Ability of new APTIMA CT and APTIMA GC assays to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male urine and urethral swabs / Chernesky M. A., Martin D. H., Hook E. W 3rd. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2005. — Vol. 43. — P. 127–131.
2. Chernesky, M. A. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections / Chernesky M. A. // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. — 2005. — Vol. 16. — P. 39–44.
3. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test / Shafer M. A., Moncada J., Boyer C. B. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 4395–4399.
4. Comparison between the LCx Probe system and the COBAS AMPLICOR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands / Van Doornum G., Schouls L., Pijl A. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39. — P. 829–835.
5. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic / Jensen J. S., Björnelius E., Dohn B. [et al.] // Sex. Transm. Dis. — 2004. — Vol. 31. — P. 499–507.
6. Comparison of manual Amplicor PCR, Cobas Amplicor PCR, and LCx assays for detection of *Chlamydia trachomatis* infection in women by using urine specimens / Pasternack R., Vuorinen P., Pitkääjärvi T. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 402–405.
7. Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx, and COBAS AMPLICOR, for detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine / Goessens W., Mouton J., van der Meijden W. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 2628–2633.
8. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture and three nucleic acid amplification tests / Van Dyck E., Ieven M., Pattyn S. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39. — P. 1751–1756.
9. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay / Crotchfelt K., Welsh L., DeBon-

- ville D. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 1536–1540.
10. Diagnosis and treatment of genital Chlamydia trachomatis infection in St. Petersburg and Leningradskaya Oblast / Savicheva A., Smirnova T., Pavlova N. [et al.] // *Chlamydia trachomatis infection in Eastern Europe* / Ed. Domeika M., Hallén A. — Kaunas, 2000. — P. 84–91.
11. Diagnosis of Chlamydia trachomatis in Russia — in-house PCR assays may be effective but overall optimization and quality assurance are urgently needed / Shalepo K., Savicheva A., Shipitsyna E. [et al.] // *APMIS.* — 2006. — Vol. 114. — P. 500–507.
12. Diagnosis of non-viral sexually transmitted infections in Lithuania and international recommendations / Vagoras A., Butylkina R., Juseviciute V. [et al.] // *Euro Surveill.* — 2006. — Vol. 11. — P. 161–164.
13. Experiences with the new genetic variant of Chlamydia trachomatis in Örebro county, Sweden — proportion, characteristics and effective diagnostic solution in an emergent situation / Unemo M., Olcén P., Agné-Stadling I. [et al.] // *Euro Surveill.* — 2007. — Vol. 12. — P. E5–6.
14. Genital Chlamydia trachomatis infections in Lithuanian women invited for screening via newspaper advertisement: a pilot study / Domeika M., Hallén A., Drulyte O. // *Sex. Transm. Infect.* — 2000. — Vol. 76. — P. 216.
15. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs / Gerbase A. C., Rowley J. T., Heymann D. H. L. [et al.] // *Sex. Transm. Infect.* — 1998. — Vol. 74. — P. S12–S16.
16. High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of Chlamydia trachomatis in significantly more women by the APTIMA Combo 2 assay / Chernesky M. A., Jang D., Luinstra K. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44. — P. 400–405.
17. Home sampling and pooling of vaginal samples are effective tools for genetic screening of Chlamydia trachomatis among high school female students in Lithuania / Kucinskiene V., Juseviciute V., Valiukeviciene S. [et al.] // *Scand. J. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 40. — P. 88–93.
18. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing / Toye B., Woods W., Bobrowska M. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 2356–2358.
19. Kohl, K. S. Developments in the screening for Chlamydia trachomatis: a review / Kohl K. S., Markowitz L. E., Koumans E. H. // *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* — 2003. — Vol. 30. — P. 637–658.
20. Laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in St. Petersburg, Russia: inventory, performance characteristics and recommended optimisations / Unemo M., Savicheva A., Budilovskaya O. [et al.] // *Sex. Transm. Infect.* — 2006. — Vol. 82. — P. 41–44.
21. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections in Estonia in 2001–2002: shortcomings with impact on diagnostic quality and surveillance / Naaber P., Uuskula A., Naaber J. [et al.] // *Sex. Transm. Dis.* — 2005. — Vol. 32. — P. 759–764.
22. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of Chlamydia trachomatis / Van Der Pol B., Quinn T., Gaydos C. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 1105–1112.
23. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET system for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs / Van Der Pol B., Ferrero D. V., Buck-Barrington L. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 1008–1016.
24. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of Chlamydia trachomatis in urogenital specimens / Vincelette J., Schirm J., Bogard M. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 74–80.
25. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in female urine and endocervical swab specimens / Gaydos C. A., Quinn T. C., Willis D. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 304–309.
26. Performance of transcription-mediated amplification and ligase chain reaction assay for detection of chlamydial infection in urogenital samples obtained by invasive and noninvasive methods / Stary A., Schuh E., Kerschbaumer M. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 2666–2670.
27. Pooling samples: the key to sensitive, specific and cost-effective genetic diagnosis of Chlamydia trachomatis in low-resource countries / Shipitsyna E., Shalepo K., Savicheva A. [et al.] // *Acta Dermatovenereol.* — 2007. — Vol. 87. — P. 140–143.
28. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections—2002 / Johnson R. E., Newhall W. J., Papp J. R. [et al.] // *MMWR Recomm. Rep.* — 2002. — Vol. 51. — P. 1–38.
29. Skidmore, S. Testing specimens for Chlamydia trachomatis / Skidmore S., Horner P., Mallinson H. // *Sex. Transm. Infect.* — 2006. — Vol. 82. — P. 272–275.
30. Systematic review: noninvasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae / Cook R., Hutchison S., Østergaard L. [et al.] // *Ann. Intern. Med.* — 2005. — Vol. 142. — P. 914–925.
31. The effect of urine testing in evaluations of the sensitivity of the Gen-Probe Aptima Combo 2 assay on endocervical swabs for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: the infected patient standard reduces sensitivity of single site evaluation / Moncada J., Schachter J., Hook E. W. 3rd. [et al.] // *Sex. Transm. Dis.* — 2004. — Vol. 31. — P. 273–277.
32. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with Chlamydia trachomatis / Shafer M. A., Moncada J., Boyer C. B. [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 3784–3789.
33. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections / Schachter J., Chernesky M. A., Willis D. E. [et al.] // *Sex. Transm. Dis.* — 2005. — Vol. 32. — P. 725–728.

Статья представлена С. А. Сельковым
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

EVALUATION OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TESTS (NAATS) USED FOR DIAGNOSIS OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN RUSSIA

Shipitsyna E., Zolotoverkhaya E., Krysanova A.,
Agne-Stadling I., Kaliteevskaya O., Savicheva A.,
Benkovich A., Sokolovsky E., Domeika M., Unemo M.

■ **Summary:** The aim of the present study was to evaluate the performance characteristics of nucleic acid amplification tests (NAATs) currently widely used in the detection of *C. trachomatis* in Russia. Totally, 446 consecutive symptomatic patients (319 females and

127 males) were included. Five polymerase chain reaction (PCR) assays and one real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay, developed by three Russian companies, were evaluated on cervical and vaginal samples from females and on urethral and first voided urine samples from males. As reference method, the Roche Cobas Amplicor PCR was used. The overall prevalence of *C. trachomatis* infection was 12.6%. The Russian NAATs and the Cobas Amplicor PCR displayed a high level of concordance (97.9% to 99.2%). The sensitivities, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the Russian tests in different specimens ranged from 86.1% to 100%, 99.1% to 100%, 92.3% to 100% and 98.2% to 100%, respectively.

■ **Key words:** *Chlamydia trachomatis*; nucleic acid amplification tests (NAATs); Roche Cobas Amplicor; performance characteristics; sensitivity and specificity.

■ Адреса авторов для переписки

Шипицына Елена Васильевна — к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория микробиологии.

E-mail: shipitsyna@inbox.ru

Золотоверхая Екатерина Андреевна — научный сотрудник лаборатории микробиологии.

E-mail: shipitsyna@inbox.ru

Савичева Алевтина Михайловна — д. м. н., руководитель лаборатории микробиологии, профессор

E-mail: savicheva@mail.ru

ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН.
199034 Россия, Санкт-Петербург, Россия, Менделеевская линия д. 3

Соколовский Евгений Владиславович — д. м. н., профессор, проректор по научной работе, заведующий кафедрой дерматовенерологии с клиникой Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Унемо Магнус — отделение клинической микробиологии университетского госпиталя, Орбред, Упсала, Швеция.

Домейка Марюс — отдел медицинских наук Уппсальского университета, профессор, Упсала, Швеция. Восточно-европейский комитет шведского общества охраны здоровья, Стокгольм, Швеция.

Shipitsyna Elena¹ — senior researcher.

Zolotoverkhaya E., Krysanova A., Kaliteevskaya O. — D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, St. Petersburg, Russia.

Savicheva A. — Laboratory of Microbiology.
199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.

D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology.
199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.

Benkovich A., Sokolovsky E., — St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia.

Agne-Stadling I., Unemo M. — Department of Clinical Microbiology, Orebro University Hospital, Orebro, Sweden.

Domeika M. — Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala.