

CAT Critically Appraised Topic

***Trichomonas vaginalis*: ontmaskering van een onderschatte pathogeen?**

Author: Dr. Philippe Willems
Supervisor: Dr. Reinoud Cartuyvels
Date: 20 maart 2014

CLINICAL BOTTOM LINE

Rechtstreek microscopisch onderzoek (RMO) is één van de oudste en meest gebruikte technieken voor de detectie van *Trichomonas vaginalis* (TV) in het laboratorium. Door de ontwikkeling van nieuwe, meer gevoelige laboratoriumtesten is gebleken dat RMO een onaanvaardbaar lage gevoeligheid heeft voor de laboratoriumdiagnostiek van trichomoniasis. Cultuur met de InPouch™ TV Culture System (InPouch TV cultuur; Biomed Diagnostics, White City, Oregon, VS) heeft een betere performantie, maar heeft als grootste nadeel de lange 'turnaround time' en 'hands on time'. Voor de OSOM® *Trichomonas* Rapid Test (OSOM test; Sekisui Diagnostics, Tokyo, Japan) worden in de literatuur goede resultaten gerapporteerd voor de detectie van TV bij symptomatische patiënten. Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT testen) komen uit een literatuurstudie naar voor als de meest sensitieve technieken voor de detectie van TV bij zowel symptomatisch als asymptomatische patiënten, hoewel de performantie tussen de NAAT testen onderling sterk varieert. Uit de resultaten van een vergelijkende validatie tussen de *Trichomonas vaginalis* Real-Time PCR kit van Diagenode (PCR kit van Diagenode; Diagenode, Luik, België) en de *Trichomonas vaginalis* Real-TM kit van Sacace (PCR kit van Sacace; Sacace, Como, Italië) blijkt dat van beide PCR analyses de PCR kit van Sacace een betere performantie heeft voor de detectie van TV in vaginale wissers (ESwabs™, Copan Diagnostics inc., Brescia, Italië). In het kader van deze CAT werd door de dienst microbiologie van het Jessa Ziekenhuis in Hasselt een klinische studie opgezet om de prevalentie van trichomoniasis na te gaan bij vrouwen met vaginale klachten, verdacht op trichomoniasis. Omwille van het klein aantal verzamelde stalen kunnen op basis van de huidige resultaten nog geen conclusies getrokken worden, maar de voorlopige bevindingen liggen in de lijn van de verwachtingen.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Trichomonas vaginalis (TV) is wereldwijd de meest frequente verwekker van niet-virale seksueel overdraagbare aandoeningen (SOA) [1]. In een rapport van de WHO wordt geschat dat in 2008 wereldwijd ongeveer 276 miljoen nieuwe besmettingen met deze parasiet zijn opgetreden [28]. Hoewel het klachtenpatroon sterk kan variëren, vertonen symptomatische vrouwen vaak een slecht ruikende, geelgroene vaginale afscheiding met vulvaire irritatie. Klachten bij mannen worden gekenmerkt door tijdelijke urethrale irritatie, beperkte afscheiding en een branderig gevoel na plassen of ejaculatie. Er wordt geschat dat dragerschap bij 50% van de vrouwen asymptomatisch verloopt en bij mannen ligt dit percentage waarschijnlijk nog hoger [2, 3]. Onbehandeld kan trichomoniasis onder andere leiden tot 'pelvic inflammatory disease' (PID) en zwangerschapscomplicaties zoals preterm geboorten en een laag geboortegewicht [1]. Verder zou TV ook een rol hebben als co-factor voor de transmissie van HIV en Herpes Simplex Virus (HSV) [4-7].

Momenteel wordt TV in het klinisch laboratorium van het Jessa Ziekenhuis opgespoord met rechtstreeks microscopisch onderzoek (RMO) op vaginale wissers. Dit is één van de oudste en meest gebruikte technieken voor de detectie van TV [8]. De laatste jaren zijn er echter verschillende nieuwe laboratoriumtesten ontwikkeld die gevoeliger zouden zijn voor de diagnostiek van trichomoniasis. In deze CAT wil ik het gebruik van RMO voor de detectie van TV kritisch evalueren en nagaan hoe de laboratoriumdiagnostiek van trichomoniasis in het klinisch laboratorium kan geoptimaliseerd worden.

QUESTION(S)

- 1) Vraag 1: Welke testen zijn er beschikbaar voor de detectie van TV en wat is hun performantie?
- 2) Vraag 2: Hoe kan de diagnostiek van TV in het klinisch laboratorium van het Jessa Ziekenhuis geoptimaliseerd worden?
- 3) Vraag 3: Wat is de prevalentie van TV bij patiënten met en zonder klachten, verdacht op trichomoniasis?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: ("Trichomonas vaginalis"[Mesh]) AND "diagnosis" [Subheading]"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters: "Trichomonas vaginalis", "trichomoniasis", "diagnosis", "microscopy", "BD Affirm VP8", "Affirm VP8", "InPouch culture system", "Diagenode", "Sacace", "Aptima", "Transcription mediated amplification", "PCR", "Polymerase Chain Reaction", "OSOM", "Sekisui"
- 3) Guidelines: Centers for Disease Control and Prevention 2010 (<http://www.cdc.gov/>), Infectious Diseases Society of America 2013 (<http://www.idsociety.org/Index.aspx>), National Institute for Health and Care Excellence 2009 (<http://cks.nice.org.uk/trichomoniasis>), World Health Organisation 2012 (<http://www.who.int/en/>)
- 4) UpToDate Online version (2013,2014)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- *Guidelines and Recommendations*
 - Infectious Diseases Society of America (IDSA) 2013: A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis for Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Microbiology (ASM).
 - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2010: Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010.
- *Reviews*
 - CHAPIN, K.; ANDREA, S. APTIMA® Trichomonas vaginalis, a transcription-mediated amplification assay for detection of Trichomonas vaginalis in urogenital specimens. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 11, n. 7, p. 679-88, Sep 2011.
 - COLEMAN, J. S.; GAYDOS, C. A.; WITTER, F. Trichomonas vaginalis vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies. *Obstet Gynecol Surv*, v. 68, n. 1, p. 43-50, Jan 2013.
 - HOBBS, M. M.; SEÑA, A. C. Modern diagnosis of Trichomonas vaginalis infection. *Sex Transm Infect*, v. 89, n. 6, p. 434-8, Sep 2013.
 - JOHNSTON, V.J. and D.C. Mabey, Global epidemiology and control of Trichomonas vaginalis. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. 21(1): p. 56-64.
 - MUZNY, C.A. and J.R. Schwebke, The clinical spectrum of Trichomonas vaginalis infection and challenges to management. *Sex Transm Infect*, 2013. 89(6): p. 423-5.
- *Original Articles*
 - ANDREA, S. B.; CHAPIN, K. C. Comparison of Aptima Trichomonas vaginalis transcription-mediated amplification assay and BD affirm VP8 for detection of T. vaginalis in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 3, p. 866-9, Mar 2011.
 - BANDEA, C. I. et al. Development of PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in urine specimens. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 4, p. 1298-300, Apr 2013.
 - CAMPBELL, L., et al., Evaluation of the OSOM Trichomonas rapid test versus wet preparation examination for detection of Trichomonas vaginalis vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(10): p. 3467-9.
 - CARTWRIGHT, C. P. et al. Comparison of nucleic acid amplification assays with BD affirm VP8 for diagnosis of vaginitis in symptomatic women. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 11, p. 3694-9, Nov 2013.
 - Choe, H.S., et al., Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis*, 2013. 17(12): p. e1134-40.
 - CRUCITTI, T. et al. Comparison of culture and different PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in self collected vaginal swab specimens. *Sex Transm Infect*, v. 79, n. 5, p. 393-8, Oct 2003.
 - DRAPER, D. et al. Detection of Trichomonas vaginalis in pregnant women with the InPouch TV culture system. *J Clin Microbiol*, v. 31, n. 4, p. 1016-8, Apr 1993.
 - GINOCCHIO, C.C., et al., Prevalence of Trichomonas vaginalis and coinfection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in the United States as determined by the Aptima Trichomonas vaginalis nucleic acid amplification assay. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(8): p. 2601-8.
 - HARDICK, A., et al., Comparison between the Gen-Probe transcription-mediated amplification Trichomonas vaginalis research assay and real-time PCR for Trichomonas vaginalis detection using a Roche LightCycler instrument with female self-obtained vaginal swab samples and male urine samples. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(11): p. 4197-9.

- HOBBS, M.M. and A.C. Seña, Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect*, 2013. 89(6): p. 434-8.
 - HUPPERT, J. S. et al. Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clin Infect Dis*, v. 45, n. 2, p. 194-8, Jul 2007.
 - HUPPERT, J.S., et al., Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(2): p. 684-7.
 - KIRKCALDY, R.D., et al., *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 2012. 18(6): p. 939-43.
 - NOËL, J.C., et al., High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. 282(5): p. 503-5.
 - NYE, M. B.; SCHWEBKE, J. R.; BODY, B. A. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. *Am J Obstet Gynecol*, v. 200, n. 2, p. 188.e1-7, Feb 2009.
 - PATIL, M.J., J.M. Nagamoti, and S.C. Metgud, Diagnosis of *Trichomonas Vaginalis* from Vaginal Specimens by Wet Mount Microscopy, In Pouch TV Culture System, and PCR. *J Glob Infect Dis*, 2012. 4(1): p. 22-5.
 - RAYMAEKERS, M. et al., Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *J Clin Lab Anal*, 2009. 23(3): p. 145-51.
 - RIVERS, C. A.; MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. Diagnostic rates differ on the basis of the number of read days with the use of the InPouch culture system for *Trichomonas vaginalis* screening. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 11, p. 3875-6, Nov 2013.
 - SCHIRM, J., et al., *Trichomonas vaginalis* detection using real-time TaqMan PCR. *J Microbiol Methods*, 2007. 68(2): p. 243-7.
 - SCHWEBKE, J. R. et al. Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective U.S. clinical trial. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 12, p. 4106-11, Dec 2011. ISSN 1098-660X.
 - VAN DER POL, B.; KRAFT, C. S.; WILLIAMS, J. A. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhea to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 2, p. 366-73, Feb 2006. ISSN 0095-1137.
- Reference Works, Handbooks and Databases
 - *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3th edition 2010. Garcia L.S. ASM Press Washington, DC.
 - *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edition 2011. Versalovic, J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. ASM Press Washington, DC.
 - Posters, "grey literature", presentations
 - CHAPIN, K., presentatie nr. 153 op ASM general meeting 2013: Trichy Business: The Epidemiology, Sequelae, Diagnostics and Issues for Public Health Reporting of *T. vaginalis*.

Vraag 1: Welke testen zijn er beschikbaar voor de detectie van TV en wat is hun performantie?

Ik start mijn bespreking met een beschrijving van de verschillende laboratoriumtesten die momenteel gebruikt worden voor de diagnostiek van trichomoniasis. Voor de selectie van deze testen heb ik mij gebaseerd op de meest recente richtlijnen van de Infectious Diseases Society of America en de Centers for Disease Control and prevention [4][27]. De testen worden onderverdeeld in rechtstreeks microscopisch onderzoek, sneltesten, cultuur en amplificatietesten van nucleïnezuuren (NAAT). Vervolgens ga ik de performantie van deze testen bespreken aan de hand van een literatuurstudie. Naast deze diagnostische testen voor TV, hebben vrouwen met trichomoniasis typisch een vaginale pH groter dan 4.5 en zet het vaginaal sereet een karakteristieke visgeur vrij na toevoeging van 10% kaliumhydroxide [4]. Deze eigenschappen zijn echter niet specifiek voor TV en kunnen dus niet gebruikt worden om trichomoniasis met zekerheid te diagnosticeren.

Verskillende beschikbare laboratoriumtesten voor de detectie van TV

- Rechtstreeks microscopisch onderzoek

RMO is een van de oudste en meest gebruikte technieken om trichomoniasis op te sporen in genitale wissers en uitstrijkjes voor cytologisch onderzoek [4, 8]. TV kan microscopisch herkend worden als een peervormige, geflagelleerde structuur welke qua vorm en grootte vergelijkbaar is met een witte bloedcel. Het onderscheid tussen beiden kan gemaakt worden op basis van de typisch draaiende bewegingen van TV [5]. Voor een optimale performantie zou de analyse binnen 30 minuten na staalafname uitgevoerd moeten worden, aangezien levende kiemen nodig zijn om de beweeglijkheid te kunnen evalueren [4]. RMO is een snel en goedkoop onderzoek maar de performantie van de techniek is afhankelijk van de parasitaire lading, de ervaring van de microscopist en de tijd en bewaarcondities tussen staalafname en analyse in het klinisch laboratorium [5, 9].

- Cultuur

Het InPouch™ TV Culture System (InPouch TV cultuur; Biomed Diagnostics, White City, Oregon, VS) is het enige commercieel beschikbaar cultuurmedium voor TV dat in de richtlijnen van de IDSA en CDC vermeld wordt [4]. Het vloeibaar medium is selectief voor TV en zit in een doorzichtige verpakking waarop rechtstreeks microscopisch onderzoek kan uitgevoerd worden. De InPouch TV cultuur wordt gebruikt voor de detectie van TV in stalen, afgenomen bij mannen (urine en urethrale wissers) en vrouwen (urine en vaginale wissers) [bijsluiter fabrikant]. Aangezien levende kiemen vereist zijn, wordt het medium best binnen 60 minuten na staalafname geïnoculeerd. Het grootste nadeel van cultuur is de lange 'turnaround time' (TAT) en 'hands on time' (HAT). De fabrikant adviseert om de stalen dagelijks microscopisch te onderzoeken en de cultuur pas als negatief te interpreteren als er na 3 dagen nog geen kiemen waargenomen worden. Een studie van Rivers et al. (2013) toonde bovendien aan dat 72 van 419 positieve stalen (17.2%) nog na 3 dagen incubatie met de InPouch TV cultuur positief werden [10]. Bij therapiefalen of persisterende infecties is het wel mogelijk om vanuit cultuur een gevoeligheidsbepaling van TV uit te voeren [9, 11].

- Sneltesten

De OSOM® Trichomonas Rapid Test (OSOM test; Sekisui Diagnostics, Tokyo, Japan) en de BD Affirm™ VP11 Microbial Identification Test (Affirm VP11 test; Becton Dickenson, California, VS) zijn twee sneltesten die gebruikt worden voor de detectie van TV bij patiënten met genitale klachten, verdacht op trichomoniasis. De OSOM test is een immuunchromatografische test voor de detectie van specifieke antigenen van TV in vaginale wissers [12]. De analyse kan tot 36 uur na staalafname uitgevoerd worden en het resultaat is gekend binnen 10 minuten na het starten van de test [bijsluiter fabrikant]. De OSOM test is relatief goedkoop, vereist geen levende organismen en kan als point of care test gebruikt worden [13]. De Affirm VP11 test is een sneltest die gelijktijdig de meeste frequente verwekkers van vaginose detecteert in het medium van vaginale wissers. De test maakt gebruik van probes die hybridiseren met specifieke DNA-sequenties van TV, Gardnerella vaginalis en Candida albicans, zonder deze DNA-sequenties te amplificeren. De Affirm VP11 test is niet afhankelijk van levende kiemen en kan resultaten genereren binnen 60 minuten. In de praktijk worden stalen echter vaak in batch verwerkt aangezien ze tot 72 uur na staalafname op kamertemperatuur bewaard kunnen worden [9]. In tegenstelling tot de OSOM test vereist de implementatie van de Affirm VP11 test de aankoop van een specifiek analyseplatform (BD MicroProbe™ Processor, Becton Dickenson, California, VS).

- NAAT analyses

NAAT analyses die beschikbaar zijn voor de detectie van TV, maken gebruik van PCR of transcriptie-gemedieerde amplificatie (TMA). Aangezien een veelvoud gecreëerd wordt van het microbiologisch materiaal dat oorspronkelijk in het staal aanwezig is, zijn deze analyses intrinsiek gevoeliger dan niet amplificerende labotesten [5]. Dit is de reden waarom deze moleculaire testen in aanmerking komen voor het opsporen van trichomoniasis bij mannen en asymptomatische vrouwen, waarbij de parasitaire lading doorgaans lager is dan bij vrouwen met vaginale klachten [9]. NAAT analyses verschillen onderling onder andere in amplificatietechniek, moleculair platform en commerciële beschikbaarheid. Bij het berekenen van de totale kostprijs van een NAAT analyse, moet naast de prijs van de desbetreffende kit en HAT van de laboranten dan ook rekening gehouden worden met de aankoopprijs van een moleculair platform. De APTIMA *Trichomonas vaginalis* test (Aptima analyse; Gen-probe inc., San Diego, Californië, VS) maakt gebruik van TMA voor het screenen en diagnosticeren van vrouwen met trichomoniasis en is ontwikkeld voor het TIGRIS en PANTHER platform van Hologic (Hologic Inc., Bedford, Massachusetts, VS) [14]. De Cobas®Amplificor (Amplificor analyse, Roche Diagnostic corp., Indianapolis, VS) is een geautomatiseerd systeem dat volgens Van Der Pol et al., mits toevoeging van specifieke primers en probes, ook gebruikt kan worden om TV op te sporen met PCR [15]. Verder zijn er ook verschillende commerciële PCR kits op de markt zoals de *Trichomonas vaginalis* Real-Time PCR kit van Diagenode (PCR kit van Diagenode; Diagenode, Luik, België) en de *Trichomonas vaginalis* Real-TM kit van Sacace (PCR kit van Sacace; Sacace, Como, Italië) die gebruikt kunnen worden op de Rotor-gene®Q analyzer van Qiagen (Qiagen inc., Hilden, Duitsland) en andere real-time PCR platformen. In de literatuur worden ook verschillende in-house PCR testen beschreven [16-20]. Afhankelijk van de gebruikte test kunnen verschillende staalsoorten geanalyseerd worden zoals urine, vaginale, endocervicale en urethrale wissers. Er bestaat nog onduidelijkheid over de optimale preanalytische bewaarcondities van deze stalen. In een studie van Van Der Pol et al. kon wel worden aangetoond dat vaginale wissers gedurende 7 dagen stabiel blijven op kamertemperatuur, alvorens ze te analyseren met de Amplificor analyse [15]. Gezien de detectie van TV met NAAT analyses op DNA niveau gebeurt, vereisen deze moleculaire testen geen levende kiemen.

Performantie van de verschillende laboratoriumtesten voor de detectie van TV

Een studie van Huppert et al. onderzocht de performantie van RMO, de InPouch TV cultuur, de OSOM antigeen test en de Aptima analyse voor de detectie van TV [21]. Tijdens de studie werden vaginale wissers verzameld van 330 patiënten (vrouwen; met en zonder genitale klachten) tussen 14 en 21 jaar oud. De sensitiviteit werd onder andere berekend door het aantal positieve stalen met een bepaalde test te vergelijken met het totaal aantal stalen dat positief testte met minstens 1 van de 4 analyses (samengestelde referentiestandaard). Voor de gemengde populatie van symptomatische en asymptomatische patiënten (n = 330), rapporteerden de auteurs gevoeligheden van respectievelijk 50.8%, 75.4%, 82% en 98.4%. Voor de patiënten met genitale klachten (n = 210) waren de OSOM test en de TMA de meest sensitieve testen met een gevoeligheid van respectievelijk 92.5% en 97.5%. In de populatie zonder genitale klachten (n = 120) was de TMA de meest gevoelige test met een sensitiviteit van 100% (Huppert et al., 2007). In een gelijkaardige studie van Nye et al. werd de performantie vergeleken tussen rechtstreeks microscopisch onderzoek van TV, de InPouch TV cultuur, een niet nader gespecificeerde PCR analyse voor TV en de Aptima TMA analyse. De sensitiviteit werd berekend aan de hand van een samengestelde standaard, waarbij positieve resultaten geconfirmeerd werden met een extra gevoelige Aptima TMA (AltTMA; Gen-probe inc., San Diego, CA, VS), die enkel voor onderzoek gebruikt wordt. Verder werd ook nagegaan in welke staalsoorten (urine, vaginale of endocervicale wissers) TV het best kon worden opgespoord met de PCR analyse en Aptima test. De resultaten zijn weergegeven in bijlage 1. Voor alle staalsoorten, afgenomen bij 296 vrouwen met en zonder genitale klachten, was de Aptima TV test het gevoeligst, gevolgd door de PCR analyse. Voor beide moleculaire testen werden de beste resultaten gerapporteerd met vaginale wissers. Bij mannen werden de beste resultaten gerapporteerd voor de Aptima TV analyse, uitgevoerd op urethrale wissers [17]. In een studie van Cartwright et al. werd de performantie van de Affirm VPIII voor de detectie van TV op vaginale wissers vergeleken met de Aptima analyse bij 323 vrouwen met symptomen van vaginitis. Van 54 vrouwen die positief waren met de Aptima analyse of Affirm VPIII, waren er 25 (46.3%) positief met de Affirm VPIII ten opzichte van 53 (98.1%) met de Aptima test [22]. Andrea et al. rapporteerden op basis van een studie met 766 symptomatische vrouwen gelijkaardige resultaten voor de Affirm VPIII en Aptima analyse met gevoeligheden van respectievelijk 63.4% en 100% [23]. Stalen met een positief resultaat voor de Aptima test werden bevestigd met de Alt TMA. Patiënten werden als geïnfecteerd beschouwd van zodra een staal positief testte met minstens 2 technieken. De resultaten van de besproken studies en de catalogusprijs van de verschillende testen zijn respectievelijk weergegeven in bijlage 1 en 2.

Conclusie

Uit deze literatuurstudie blijkt dat rechtstreeks microscopisch onderzoek ten opzichte van nieuwere laboratoriumtesten een onaanvaardbaar lage gevoeligheid heeft voor de detectie van TV. Cultuur met de InPouch IV test heeft een betere performantie, maar heeft als grootste nadeel de lange TAT en HAT. Bij therapiefalen of persisterende infecties biedt cultuur wel de mogelijkheid om een gevoeligheidsbepaling van TV uit te voeren [9]. De Affirm VPIII is een snel maar weinig gevoelig alternatief om de verschillende verwekkers van vaginose te onderscheiden. Voor de OSOM test daarentegen worden in de literatuur goede resultaten gerapporteerd voor de detectie van TV bij symptomatische patiënten. NAAT testen komen uit de literatuurstudie naar voor als de meest sensitieve technieken voor de detectie van TV bij zowel symptomatisch als asymptomatische patiënten, hoewel de performantie tussen de NAAT testen onderling sterk varieert. Moleculaire testen kunnen uitgevoerd worden op verschillende staalsoorten, maar de beste resultaten worden gezien met vaginale wissers. In tegenstelling tot de andere testen vereisen NAAT analyses een investering in dure moleculaire platformen. Voor de diagnose van trichomoniasis bij mannen zijn er geen antigen testen beschikbaar. De InPouch TV Cultuur is een diagnostische optie maar de NAAT testen hebben ook hier een betere performantie voor de detectie van TV.

Vraag 2: Hoe kan de diagnostiek van TV in het klinisch laboratorium geoptimaliseerd worden?

Er zijn verschillende laboratoriumtesten die voor de detectie van TV een betere performantie hebben dan rechtstreeks microscopisch onderzoek (zie vraag 1). Welke laboratoriumtest uiteindelijk het best tegemoet komt aan de eisen van een laboratorium, hangt af van het belang dat aan de verschillende eigenschappen van deze testen gegeven wordt (bv. performantie, kostprijs, HAT, TAT). Verder moet er ook rekening gehouden worden met de platformen die voor bepaalde analyses vereist zijn en het reeds beschikbaar instrumentarium in het laboratorium. In wat volgt zal de optimalisatie van de laboratoriumdiagnostiek van TV beschreven worden voor het klinische laboratorium van het Jessa Ziekenhuis.

Uit een literatuurstudie blijkt dat NAAT analyses de meest gevoelige laboratoriumtesten zijn voor de detectie van TV in vaginale wissers (zie vraag 1). Rekening houdend met de aanwezigheid van een Rotor-Gene®Q platform in het klinisch laboratorium van het Jessa Ziekenhuis en de commerciële beschikbaarheid als 'solo' test, komen de *Trichomonas vaginalis* Real-Time PCR kit van Diagenode en de *Trichomonas vaginalis* Real-TM kit van Sacace het meest in aanmerking voor implementatie in het laboratorium voor moleculaire biologie [24]. Verder toont een studie van Huppert et al. aan dat de OSOM test een goede performantie heeft voor de detectie van TV bij vrouwen met genitale klachten, verdacht op trichomoniasis [21]. In tegenstelling tot voor de OSOM test, werden geen wetenschappelijke artikelen teruggevonden waarin de performantie van de PCR kits van Diagenode of Sacace beschreven werd. Enkel in de bijsluiters van de PCR kit van Sacace worden voor de performantie volgende parameters gerapporteerd: sensitiviteit 100% in stalen met minstens 500 k/mL TV DNA, specificiteit 100% en afwezigheid van kruishybridisatie [bijsluiters fabrikant]. Om die reden werd eerst een vergelijkende validatie van beide PCR kits uitgevoerd, om vervolgens de meeste performante PCR kit samen met de OSOM test te gebruiken om klinische stalen te analyseren (zie vraag 3) [29].

Materiaal en methode

Voor de vergelijkende validatie van de PCR kit van Diagenode en Sacace, werden 15 positieve en 10 negatieve vaginale wissers opgestuurd vanuit het klinisch laboratorium van het AZ Damiaan ziekenhuis in Oostende (AZ Damiaan). Deze klinische stalen waren cervicale wissers in het vloeibaar cytologie medium ThinPrep® PreservCyt® medium (PreservCyt medium; Cytec Corporation, Boxborough, Massachusetts, VS) die in het AZ Damiaan geanalyseerd werden met een in-house gevalideerde PCR methode voor TV [25]. De LOD₉₅ van deze PCR analyse is 4000 kopieën/mL. De CT waarden van de positieve stalen, gerapporteerd door het AZ Damiaan, zijn weergegeven in bijlage 3. Verder werd ook commercieel beschikbaar, gekwantificeerd TV DNA aangekocht (Amplirun® *Trichomonas vaginalis* DNA control, Vircell, Granada, Spanje). Het DNA van alle stalen werd in het moleculair laboratorium van het Jessa Ziekenhuis geëxtraheerd met de QiaSymphony SP extractie-automaat met de QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Mini kit van Qiagen (Qiagen, Hilden, Duitsland). De extractie van het DNA gebeurde volgens het QiaSymphony Pathogen Mini complex 200 protocol met startvolume 200 µL en elutievolume 90 µL. Per staal werd 10 µL interne controle en 3 µL carrier RNA toegevoegd. Voor de PCR analyse werd 5 µL geëxtraheerd DNA toegevoegd aan de PCR mix. De PCR mix van Diagenode was per staal samengesteld uit 10 µL DNase en RNase vrij water, 5 µL geïsoleerd DNA, 5 µL mastermix, 2.5 µL primers en double-dye probes [FAM] (DIA-EIC/DNA[FAM]-050) en 2.5 µL primers en double-dye probes [yellow dye] (DIA-EIC/DNA[YD]-050) (*Trichomonas vaginalis* Real-Time PCR kit, Diagenode, Luik, België). De PCR mix van Sacace was per staal samengesteld uit 10 µL PCR-mix-1-FRT, 5 µL PCR-mix-2-FRT, 5 µL DNase en RNase vrij water, 5 µL geïsoleerd DNA en 0.5 µL TaqF DNA polymerase (*Trichomonas vaginalis* Real-TM kit, Sacace, Como, Italië). De primers en probes van de kit PCR kit van Diagenode zijn beschreven in een publicatie van Schirm et al. [25]. In de bijsluiters van de PCR kit van Sacace worden de gebruikte primers en probes niet gespecificeerd. Alle stalen werden geanalyseerd met de Rotor-gene®Q analyzer (Qiagen inc., Hilden, Duitsland). Tijdens de PCR analyse werd gebruik gemaakt van 2 fluorescentiekanalen: FAM voor de detectie van het target en VIC voor de amplificatiecontrole. Het temperatuurprofiel van beide PCR analyses werd gevolgd zoals beschreven in de bijsluiters.

Resultaten

- Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werden eerst de 15 hoger genoemde positieve stalen van het AZ Damiaan met de PCR kits van Diagenode en Sacace geanalyseerd. De CT waarden zijn weergegeven in bijlage 3. De PCR kits van Diagenode en Sacace detecteerden TV in respectievelijk 14 (93%) en 15 (100%) stalen. Het vals negatief

resultaat van het staal 14 met de PCR kit van Diagenode werd verder onderzocht. Inhibitie tijdens de PCR reactie door andere factoren in het PreservCyt medium kon worden uitgesloten aangezien de interne controles steeds efficiënt mee geamplificeerd werden. Het DNA, geëxtraheerd met de PCR kit van Diagenode, werd niet gedetecteerd met de PCR analyse van Sacace. Omgekeerd werd het geëxtraheerde DNA met de PCR kit van Sacace wel gedetecteerd met de PCR analyse van Diagenode. Hierdoor kan vermoed worden dat de limiterende stap bij de extractie van Diagenode lag. Na extractie zonder interne controle van Diagenode kon met de PCR analyse van Diagenode ook geen TV DNA gedetecteerd worden. Hierdoor kon interferentie door de aanwezigheid van de interne controle van Diagenode niet uitgesloten worden. Voorlopig is het dus nog onduidelijk of het negatief resultaat van staal 14 met de PCR kit van Diagenode te wijten was aan de lage concentratie van het TV DNA in dit staal, of aan een probleem bij de extractie met de PCR kit Diagenode. De verschillende moleculaire testen uitgevoerd op staal 14 worden schematisch weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Resultaten voor de verschillende combinaties van interne controle en gebruikte reagentia voor de PCR analyses uitgevoerd op staal 14.

Interne controle	PCR mix	Resultaat <i>Trichomonas vaginalis</i>	Resultaat interne controle
Diagenode	Diagenode	Negatief	Positief
	Sacace	Negatief	Nvt ¹
Sacace	Sacace	Positief	Positief
	Diagenode	Positief	Nvt ¹
Niet toegevoegd	Diagenode	Negatief	Nvt ²
	Sacace	Negatief	Nvt ²

¹Niet van toepassing aangezien interne controle van andere kit werd toegevoegd, ²Niet van toepassing aangezien interne controle niet werd toegevoegd

- Specificiteit

De specificiteit werd beoordeeld door 10 negatieve controlestalen van het AZ Damiaan met beide PCR kits te analyseren. Verder werd kruishybridisatie met andere kiemen beoordeeld door ATCC stammen en externe kwaliteitscontroles van 7 vaginale pathogenen (*Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex virus* en *Humaan papillomavirus*) te analyseren met beide PCR kits. De specificiteit van de PCR kit van Diagenode en Sacace was 100% aangezien er voor geen van de PCR analyses een vals positief resultaat voor TV bekomen werd.

- Lineariteit

De lineariteit geeft de verhouding weer tussen de log waarde van de concentraties van DNA en de bekomen CT waarden in de exponentiële fase van de PCR reactie. Dit werd getest door na te gaan of de amplificatie van het TV DNA in stalen met hoge concentraties even efficiënt verloopt als bij lage concentraties. Om de lineariteit te evalueren werd commercieel beschikbaar, gekwantificeerd DNA van TV (Amplirun®) aangekocht. Hiervan werd een verdunningsreeks gemaakt van 10 000 tot 0.2 kopieën/μL. Vervolgens werden van elke verdunningsstap 2 aliquots met de PCR van Diagenode en Sacace geanalyseerd. De lineariteit werd geëvalueerd aan de hand van de bekomen efficiëntie, helling en correlatiecoëfficiënt. Voor beide PCR kits lagen de verschillende parameters van de lineariteitsbepaling binnen het vooropgestelde referentie-interval [29]. De resultaten en bijhorende referentiewaarden zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2: Efficiëntie, correlatiecoëfficiënt en helling van de lineariteitsbepaling van de TV PCR kit van Diagenode en Sacace.

PCR kit	Parameter	Resultaat	Referentiewaarde
Diagenode	Efficiëntie	0.90391	≥ 0.90
	m	-3.57594	-3.6 > m > -3.1
	R ²	0.99764	≥ 0.99
Sacace	Efficiëntie	0.93977	> =0.90
	m	-3.47524	-3.6 > m > -3.1
	R ²	0.99503	≥ 0.99

R² = correlatiecoëfficiënt, m = helling

Op basis van de resultaten van de lineariteitsbepaling werd een ijklijn opgesteld om retrospectief de parasitaire lading van de positieve stalen, afkomstig van AZ Damiaan, semi-kwantitatief te bepalen. De resultaten van deze kwantificatie dienen met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden aangezien de ijklijn opgesteld

werd op basis van PCR analyses van aangekocht DNA, zonder voorafgaandelijke extractie. Om die reden werd de parasitaire lading van de stalen uitgedrukt in kopieën/mL. Verder was er een verschil tussen het medium van de stalen van het AZ Damiaan (PreservCyt medium) en de vaginale wissers die gebruikt worden in het Jessa ziekenhuis (ESwab™ medium; Copan Diagnostics inc., Brescia, Italië). Er werden echter geen laboratoria gevonden die positieve stalen voor TV in ESwab™ medium konden opsturen.

- Detectielimiet

De detectielimiet werd met een 95% betrouwbaarheidsinterval (Limit Of Detection; LOD₉₅) bepaald door van een positieve staal van AZ Damiaan een verdunningsreeks te maken tot 10 kopieën/mL. Eerst werden de verschillende verdunningsstappen met beide PCR kits geanalyseerd om een idee te krijgen waar de LOD₉₅ zich ergens situeerde. Vervolgens werden van verdunningsstap 500, 100, 50, 25 en 10 kopieën/mL, 10 aliquots geanalyseerd op 3 verschillende dagen (dag 1, 5 en 8). De aliquots werden tussentijds bewaard bij -20°C. Op basis van de resultaten werd besloten dat de LOD₉₅ van de PCR kit van Diagenode en Sacace respectievelijk op 100 k/mL en 50 k/mL lag. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Aantal aliquots per verdunningsstap waarin TV gedetecteerd werd.

Verdunningsstap	Aantal positieve aliquots (n = 10)	
	Diagenode	Sacace
500 k/mL	10	10
100 k/mL	10	10
50 k/mL	7	10
25 k/mL	2	5
10 k/mL	1	1
Negatieve controle ¹	0	0

k/mL = kopieën per mL, n = aantal geanalyseerde stalen, ¹De negatieve controle was samengesteld uit 300 µL van negatief controlestaal nummer 5 en 9700 µL phosphate buffered saline.

- Reproduceerbaarheid en bewaarcondities

De reproduceerbaarheid en bewaarcondities werden getest met dezelfde verdunningen als deze gebruikt voor het bepalen van de detectielimiet. De verdunningen werden op dag 0, 4 en 7 geëxtraheerd. De aliquots van de verdunningen werden voor extractie bewaard bij -20°C. Vervolgens werden op dag 1, 5 en 8 van alle verdunningen respectievelijk 3, 3 en 4 aliquots met beide PCR analyses geanalyseerd. Na dag 8 werd TV DNA in alle stalen met respectievelijk minstens 100 k/mL en 50 k/mL nog opgespoord met de kit van Diagenode en Sacace. Hiermee werd ook aangetoond dat de LOD₉₅ na bewaren van de stalen gedurende 8 dagen in de diepvries bij -20°C gegarandeerd kan worden. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.

Conclusie

Uit de validatie blijkt dat de PCR kit van Sacace gevoeliger is voor het opsporen van TV dan de PCR kit van Diagenode. De PCR kit van Sacace heeft een lagere LOD₉₅ dan de kit van Diagenode en 1 positief staal werd vals negatief beoordeeld met de PCR kit van Diagenode. De specificiteit van beide kits was 100%. Hoewel de reagentia van een PCR analyse met de kit van Diagenode per test 1.7 euro goedkoper zijn dan die van Sacace, werd op basis van deze resultaten beslist om klinische stalen in het Jessa ziekenhuis met de PCR kit van Sacace te analyseren.

Vraag 3: Wat is de prevalentie van TV bij patiënten met en zonder klachten, verdacht op trichomoniasis?

In samenwerking met het ZiekenhuisNetwerk Antwerpen (ZNA), werd door het laboratorium microbiologie van het Jessa Ziekenhuis in Hasselt een klinische studie opgezet om een beeld te krijgen van de prevalentie van TV bij asymptomatische patiënten en bij patiënten met klachten, verdacht op trichomoniasis.

Depuydt et al. onderzochten al eerder de prevalentie van trichomoniasis bij Vlaamse vrouwen tussen 14 en 97 jaar oud. In deze studie werden cervicale wissers (Cervex-Brush®Combi, Rovers Medical Devices B.V., Oss, Nederland), afgenomen voor cytologisch onderzoek, geanalyseerd met een in-house PCR analyse. Van de 57 876 onderzochte stalen waren er 107 (0.29%) positief voor TV [26]. Er werd hierbij geen onderscheid gemaakt tussen patiënten met en zonder vaginale klachten. In een studie van Andrea et al. werd de prevalentie van TV, Chlamydia trachomatis (CT) en Neisseria gonorrhoeae (NG) bestudeerd bij Amerikaanse vrouwen tussen 13 en 88 jaar oud met vaginale klachten, verdacht voor een seksueel overdraagbare aandoening. Tijdens deze studie werd per patiënt 1 vaginale wisser (BD Affirm™ VP11 Ambient Temperature Transport System, Becton Dickenson, Californië, VS) getest met de BD Affirm VP11 Microbial Identification Test (Becton Dickenson, Californië, VS) en 1 cervicale wisser (Aptima® Cervical Specimen Collection and Transport Kit, Gen-probe inc., San Diego, Californië, VS) of urinestaal (Aptima® Urine Specimen Transport Tube, Gen-probe inc., San Diego, Californië, VS) met de APTIMA *Trichomonas vaginalis* test (Gen-probe inc., San Diego, Californië, VS). TV werd gedetecteerd bij 39 van 766 patiënten (5.1%). NG en CT werden tijdens de studie enkel gedetecteerd bij vrouwen jonger dan 30 jaar. TV daarentegen werd het frequentst opgespoord bij vrouwen tussen 36 en 45 jaar oud (11.9%), gevolgd door de leeftijdsgroep tussen 51 en 60 jaar oud (7.7%). Bij vrouwen jonger dan 30 jaar werd trichomoniasis slechts bij 4% vastgesteld [23]. In figuur 1 wordt de prevalentie van TV, CT en NG, gedetecteerd tijdens deze studie, weergegeven per leeftijdsgroep [13].

Figuur 1: prevalentie van TV, CT en NG per leeftijdsgroep in een populatie van 766 patiënten met vaginale klachten, verdacht voor een SOA naar Andrea et al., *Journal of Clinical Microbiology*, 2011.

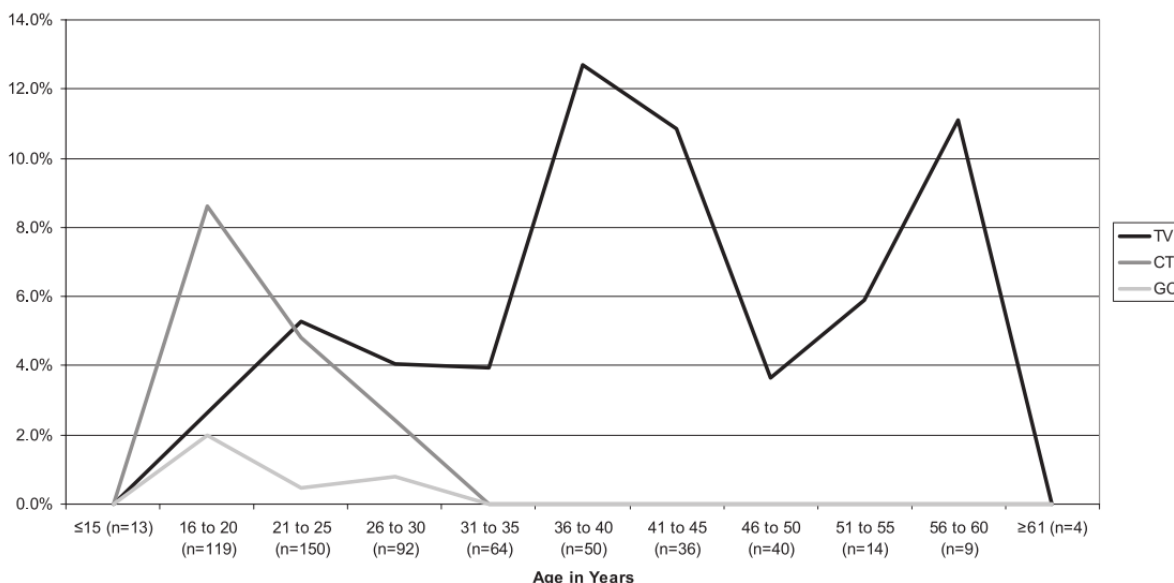


FIG. 2. Age-dependent STI prevalences in 766 symptomatic females. TV, *T. vaginalis*; CT, *C. trachomatis*; GC, gonococci (*N. gonorrhoeae*).

Materiaal en methode

- Geïnccludeerde stalen

De patiënten werden gerekruteerd op de raadpleging gynaecologie van het Jessa Ziekenhuis en het ZNA. De inclusiecriteria zijn weergegeven in figuur 2. Er werd gekozen om vaginale wissers (ESwab™) af te nemen aangezien met deze stalen voor zowel de OSOM test als NAAT analyses de beste resultaten gerapporteerd worden [bijsluiters OSOM antigenetest][17]. Rekening houdend met de bevindingen van Depuydt et al., werd als doel vooropgesteld om vaginale wissers te verzamelen bij minstens 200 asymptomatische en 100 symptomatische vrouwen [26]. Er werd gestart met het verzamelen van stalen na goedkeuring van de studie door de ethische commissies van het Jessa Ziekenhuis (14/01/2014) en ZNA (12/02/2014).

Figuur 2: inclusiecriteria van symptomatische en asymptomatische patiënten

- Symptomatische patiënten
 - minstens 18 jaar
 - seksueel actief
 - tenminste 1 symptoom van vaginitis/cervicitis/urethritis:
 - slechtruikend vaginaal verlies
 - jeuk
 - postcoïtale bloeding
 - dyspareunie
 - dysurie
 - geen behandeling met metronidazole de afgelopen 4 weken
- Asymptomatische patiënten
 - Minstens 18 jaar
 - Seksueel actief
 - geen symptomen van vaginitis
 - geen behandeling met metronidazole de afgelopen 4 weken

- Analyses

Alle vaginale wissers werden getest met de *Trichomonas vaginalis* Real-TM PCR kit van Sacace. In het moleculair laboratorium van het Jessa Ziekenhuis werden de DNA extracties uitgevoerd met de kit van Sacace op de QIASymphony SP extractie automaat zoals eerder beschreven in vraag 2. In het moleculair laboratorium van ZNA gebeuren DNA extracties met de NucliSENS easyMag® (easyMag; bioMérieux, Durham, North Carolina, VS). Daarom werd eerst een experiment opgezet om te onderzoeken of de PCR analyse na extractie met de easyMag minstens even gevoelig was als na extractie met de QIASymphony. Tijdens de validatie van de PCR kit van Sacace in het klinisch laboratorium van het Jessa Ziekenhuis werd aangetoond dat stalen, voor DNA extractie, 8 dagen bij -20°C bewaard kunnen worden. Alle PCR-analyses gebeurden in het moleculair laboratorium van het Jessa Ziekenhuis met de PCR kit van Sacace op het Rotor-Gene®Q platform. De stalen werden na DNA extractie bij -20°C ingevroren zodat ze in batch konden geanalyseerd worden. Vaginale wissers afgenomen bij patiënten met klachten, verdacht op trichomoniasis, werden in het Jessa Ziekenhuis en ZNA ook geanalyseerd met de OSOM® *Trichomonas* Rapid Test. In afwachting van de analyse werden de stalen tot maximaal 36u na afname in de koelkast bewaard [bijsluiters fabrikant]. Stalen met positieve resultaten met PCR analyse van Sacace of OSOM antigentest en stalen met discordante resultaten tussen beide analyses werden opnieuw geanalyseerd in het klinisch laboratorium van het AZ Damiaan in Oostende, met een gevalideerde in-house PCR methode [25].

Resultaten

- Geïnccludeerde stalen

Tijdens de studie werden vaginale wissers verzameld van 6 asymptomatische vrouwen en van 40 vrouwen met vaginale klachten, verdacht op trichomoniasis. De gemiddelde leeftijd van de symptomatische en asymptomatische populatie was respectievelijk 30 en 29 jaar. De karakteristieken van de verzamelde stalen zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Eigenschappen van de verzamelde vaginale wissers

	Symptomatische patiënten	Asymptomatische patiënten
Totaal aantal stalen	40	6
Stalen Jessa	40	6
Stalen ZNA	0	0
Gemiddelde leeftijd [minimum- en maximumleeftijd]	30 [16-50]	29 [21-42]

- Analyses

De mogelijkheid om stalen met de easyMag in het ZNA te extraheren werd gevalideerd door een verdunningsreeks te maken van een staal dat positief was met TV. Vervolgens werd op dezelfde dag een DNA extractie verricht op 5 aliquots van 100, 50 en 25 k/mL met de easyMag in het ZNA en met de QIAAsymphony in het Jessa Ziekenhuis. De volgende dag werden alle extracten met de PCR kit van Sacace geanalyseerd. De resultaten van de vergelijking tussen de extractiemethodes van het Jessa Ziekenhuis en ZNA zijn weergegeven in bijlage 4. Hieruit blijkt dat de PCR analyse met de kit van Sacace na extractie met de easyMag minstens even gevoelig is als na extractie met de QIAAsymphony. De easyMag kon dus gebruikt worden voor de DNA extractie van vaginale wissers, verzameld in het ZNA.

Twee van de 40 klinische stalen, verzameld bij symptomatische patiënten, waren positief met de OSOM test én PCR analyse van Sacace. Het positief resultaat van beide testen werd bevestigd met de in-house PCR analyse in het AZ Damiaan. In één van de 2 'echt positieve' stalen werd TV DNA met RMO gedetecteerd. Verder was er één staal positief met de PCR analyse en negatief met de OSOM antigenetest. De aanwezigheid van TV in dit staal kon niet bevestigd worden in het AZ Damiaan. De PCR analyse werd vervolgens in het Jessa Ziekenhuis in duplo herhaald vanaf het geëxtraheerde DNA wegens gebrek aan staal. Tijdens deze analyse kon het TV DNA niet meer in het extract aangetoond worden. Mogelijks was dit staal gecontamineerd aangezien het gelijktijdig met een sterk positief staal geanalyseerd werd. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat dit negatief resultaat na herhaling te wijten was aan vries-dooi effecten of probe degradatie. Indien we dit staal als vals positief beschouwen, werd TV teruggevonden bij 5.0% van de symptomatische populatie. Dit komt overeen met de bevindingen van Andrea et al., die een prevalentie van 5.1% rapporteren in een populatie van vrouwen met vaginale klachten, verdacht voor een SOA [23]. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5. De 2 positieve stalen waren afgenomen bij vrouwen van 43 en 50 jaar oud. Dit is in overeenstemming met de bevindingen van Andrea et al. die, in tegenstelling tot CT en NG, trichomoniasis vooral detecteerden bij vrouwen ouder dan 30 jaar [23]. De sensitiviteit, specificiteit, positief predictieve waarde (PPV) en negatief predictieve waarde (NPV) van de PCR analyse van Sacace voor symptomatische patiënten was respectievelijk 100%, 97.4%, 66.7% en 100%. Voor de OSOM test, uitgevoerd op stalen van symptomatische vrouwen, waren deze parameters allen 100%. Deze resultaten moeten uiteraard met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden omwille van het beperkt aantal geanalyseerde stalen. Voor asymptomatische patiënten werden deze parameters niet bepaald omwille van het klein aantal verzameld stalen.

Tabel 5: Statistische berekeningen

Parameter	OSOM antigenetest symptomen	PCR kit Sacace	
		geen symptomen	symptomen
N	40	6	40
Positief	2	0	3
Sensitiviteit	100%	- ¹	100%
Specificiteit	100%	- ¹	97.4%
PPV	100%	- ¹	66.7%
NPV	100%	- ¹	100%

n = aantal geanalyseerde stalen, Positief: aantal stalen met een positief resultaat, PPV: positieve predictieve waarde, NPV: negatieve predictieve waarde, ¹Niet bepaald.

Conclusie

Op basis van het beperkt aantal verzamelde stalen in deze studie werd TV gedetecteerd bij 5.0% van 40 vrouwen met vaginale klachten, verdacht voor een SOA. Deze bevindingen liggen in de lijn van de verwachtingen. In beide 'echt positieve' stalen werd TV gedetecteerd met de OSOM antigenetest en PCR analyse van Sacace. Met RMO daarentegen kon TV slechts in één van de twee sterk positieve stalen gedetecteerd worden. Verder was er 1 staal waarin TV met de PCR kit van Sacace 1 keer gedetecteerd werd. Dit positief resultaat kon in het AZ Damiaan en tijdens latere analyses met de PCR kit van Sacace niet bevestigd worden. Dit zou verklaard kunnen worden door probe degradatie, vries-dooi effecten of door contaminatie door een ander sterk positief staal. Omwille van de beperkte omvang van deze studiep populatie, moeten de voorlopige resultaten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Deze studie zal nog verder gezet worden tot het vooropgesteld aantal stalen verzameld is.

To do/ACTIONS

- Extra patiënten rekruteren in de prevalentiestudie en statistiek herhalen op meer stalen.
- Beslissen welke testen geïmplementeerd zullen worden om de laboratoriumdiagnostiek van TV in het klinisch laboratorium van het Jessa Ziekenhuis te optimaliseren.
- De wetenschappelijke literatuur blijven verkennen voor de ontwikkeling van nieuwe, meer performante laboratoriumtesten voor de detectie van *Trichomonas vaginalis*.

|

ATTACHMENTS

Bijlage 1: Sensitiviteit van verschillende testen voor de detectie van TV, gerapporteerd door verschillende studies

Studie	Populatie	Test	Sensitiviteit (%)
Hupert et al. (2007)	n = 210, vrouwen met genitale klachten	Microscopisch onderzoek	57.5
		InPouch TV cultuur	77.5
		OSOM test	92.5
		ATV	97.5
	n = 120, vrouwen zonder genitale klachten	Microscopisch onderzoek	38.1
		InPouch TV cultuur	71.4
		OSOM test	61.9
		ATV	100
Nye et al. (2009)	n = 296, vrouwen met en zonder genitale klachten	Microscopisch onderzoek	54.6
		InPouch TV cultuur	75.0
		PCR – vaginale wissers	83.0
		PCR – endocervicale wisser	80.9
		PCR - urine	76.1
		ATV – vaginale wisser	96.6
		ATV – endocervicale wisser	89.8
		ATV - urine	87.5
	n = 298, mannen met en zonder genitale klachten	Microscopisch onderzoek	28.6
		InPouch TV cultuur	ND
		PCR – urethrale wisser	54.8
		PCR – urine	47.6
		ATV – urethrale wisser	95.2
		ATV - urine	73.8
Cartwright et al. (2013)	n = 323, vrouwen met genitale klachten	Affirm VPIII	46.3
		ATV	98.1
Andrea et al. (2011)	n = 766 vrouwen met genitale klachten	Affirm VPIII	63.4
		ATV	100

n = aantal patiënten, ATV = Aptima analyse.

Bijlage 2: Catalogusprijs (januari 2013) van de reagentia van de verschillende laboratoriumtesten voor de detectie van TV

Test	Catalogusprijs (excl. BTW)	Prijs per test in euro (excl. BTW)	Erkenning
RMO	-	(< € 1) ¹	-
InPouch TV Culture System, BD	€ 586.38/100 testen	€ 5.86	CE FDA
OSOM® Trichomonas Rapid Test, Sekisui	€ 121.46/25 testen	€ 4.86	CE FDA
Affirm VPIII, BD ²	€ 304.95/24 testen	€ 12.61	CE FDA
APTIMA <i>Trichomonas vaginalis</i> test, Hologic ²	€ 600-1000/100 testen	€ 6-10 ³	CE FDA
Cobas®Amplificor analyse, Roche ²	€ 1676/240 testen	€ 6.98 – 8.9 ³	CE
<i>Trichomonas vaginalis</i> Real-Time, Diagenode ²	€ 8576,10/960 testen	€ 4.70 ⁴ + € 4.03 ⁶	FDA ⁵ CE
<i>Trichomonas vaginalis</i> Real-TM, Sacace ²	€ 470/100 testen	€ 6.38 + € 4.03 ⁶	CE

RMO = rechtstreeks microscopisch onderzoek, CT = Chlamydia trachomatis, NG = Neisseria gonorrhoeae, ¹Schatting van kosten voor draagglasje, dekglasje, ... ²De implementatie van deze testen vereist de aankoop van een platform voor analyse en/of extractie. De aankoopprijs van deze platformen is niet meegenomen in de berekening van de 'prijs per test'. ³Prijs is afhankelijk van de omvang van de bestelling, ⁴Dit bedrag is inclusief mastermix (€ 100/100 testen) wat apart moet aangekocht worden. ⁵FDA erkenning enkel voor detectie CT en NG, ⁶Kostprijs van de DNA extractie per staal op de QIASymphony in het Jessa Ziekenhuis in Hasselt.

Bijlage 3: CT waarden voor de verschillende positieve controlestalen gerapporteerd door het AZ Damiaan ziekenhuis in Oostende het Jessa Ziekenhuis in Hasselt

Staalnummer	CT waarden		
	AZ Damiaan ¹	Jessa Ziekenhuis	
		Diagenode ²	Sacace ³
1	20.24	19.81	13.07
2	21.75	20.34	12.84
3	17.92	20.12	14.25
4	17.71	21.28	14.29
5	25.00	28.06	23.66
6	27.97	32.53	29.93
7	18.80	22.20	15.05
8	23.34	21.53	15.15
9	18.80	22.17	16.02
10	16.32	18.64	12.37
11	24.76	31.42	25.07
12	25.66	29.27	23.26
13	19.75	21.29	14.80
14	28.06	Negatief	27.35
15	21.74	20.42	13.85

¹PCR analyse met een in-house gevalideerde PCR techniek van het klinische laboratorium van het AZ Damiaan ziekenhuis in Oostende, ²PCR analyse met de *Trichomonas vaginalis* Real-Time PCR kit van Diagenode; ³PCR analyse met de *Trichomonas vaginalis* Real-TM kit van Sacace.

Bijlage 4: Resultaten van de vergelijking van de extractiemethodes tussen het moleculair laboratorium van het Jessa Ziekenhuis (QIASymphony) en het ZNA (easyMag)

k/mL ¹	PCR analyse met de kit van Saccace	
	Extractie QIASymphony ³	Extractie easyMag ⁴
100 aliquot 1	27.81	30.28
100 aliquot 2	29.56	28.26
100 aliquot 3	26.59	30.10
100 aliquot 4	28.86	30.15
100 aliquot 5	28.61	30.09
50 aliquot 1	28.31	31.25
50 aliquot 2	30.37	31.18
50 aliquot 3	30.56	31.22
50 aliquot 4	30.03	22.74
50 aliquot 5	30.08	31.08
25 aliquot 1	31.42	30.36
25 aliquot 2	Negatief	31.82
25 aliquot 3	32.12	31.98
25 aliquot 4	31.29	31.86
25 aliquot 5	30.85	32.47
Negatieve pool ²	Negatief	Negatief

¹k/mL = kopieën/mL, ²de negatieve pool was samengesteld uit 4 verschillende negatieve controles, ³QiaSymphony SP extractie-automaat (Qiagen, Hilden, Duitsland), ⁴NucliSENS easyMag® (bioMérieux, Durham, North Carolina, VS).

REFERENCES

1. Schwebke, J.R., et al., *Molecular testing for Trichomonas vaginalis in women: results from a prospective U.S. clinical trial*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4106-11.
2. Muzny, C.A. and J.R. Schwebke, *The clinical spectrum of Trichomonas vaginalis infection and challenges to management*. Sex Transm Infect, 2013. **89**(6): p. 423-5.
3. Hobbs, M.M., et al., *Methods for detection of Trichomonas vaginalis in the male partners of infected women: implications for control of trichomoniasis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 3994-9.
4. Baron, E.J., et al., *A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a)*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(4): p. e22-e121.
5. Coleman, J.S., C.A. Gaydos, and F. Witter, *Trichomonas vaginalis vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies*. Obstet Gynecol Surv, 2013. **68**(1): p. 43-50.
6. Johnston, V.J. and D.C. Mabey, *Global epidemiology and control of Trichomonas vaginalis*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(1): p. 56-64.
7. Noël, J.C., et al., *High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with Trichomonas vaginalis infection on monolayer cytology*. Arch Gynecol Obstet, 2010. **282**(5): p. 503-5.
8. Chapin, K. and S. Andrea, *APTIMA® Trichomonas vaginalis, a transcription-mediated amplification assay for detection of Trichomonas vaginalis in urogenital specimens*. Expert Rev Mol Diagn, 2011. **11**(7): p. 679-88.
9. Hobbs, M.M. and A.C. Seña, *Modern diagnosis of Trichomonas vaginalis infection*. Sex Transm Infect, 2013. **89**(6): p. 434-8.
10. Rivers, C.A., C.A. Muzny, and J.R. Schwebke, *Diagnostic rates differ on the basis of the number of read days with the use of the InPouch culture system for Trichomonas vaginalis screening*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(11): p. 3875-6.
11. Kirkcaldy, R.D., et al., *Trichomonas vaginalis antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(6): p. 939-43.
12. Huppert, J.S., et al., *Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of Trichomonas vaginalis in vaginal specimens*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 684-7.
13. Campbell, L., et al., *Evaluation of the OSOM Trichomonas rapid test versus wet preparation examination for detection of Trichomonas vaginalis vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3467-9.
14. Ginocchio, C.C., et al., *Prevalence of Trichomonas vaginalis and coinfection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in the United States as determined by the Aptima Trichomonas vaginalis nucleic acid amplification assay*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(8): p. 2601-8.
15. Van Der Pol, B., C.S. Kraft, and J.A. Williams, *Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhea to detect Trichomonas vaginalis in urogenital specimens*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 366-73.
16. Crucitti, T., et al., *Comparison of culture and different PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in self collected vaginal swab specimens*. Sex Transm Infect, 2003. **79**(5): p. 393-8.
17. Nye, M.B., J.R. Schwebke, and B.A. Body, *Comparison of APTIMA Trichomonas vaginalis transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(2): p. 188.e1-7.
18. Bandea, C.I., et al., *Development of PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in urine specimens*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(4): p. 1298-300.
19. Hardick, A., et al., *Comparison between the Gen-Probe transcription-mediated amplification Trichomonas vaginalis research assay and real-time PCR for Trichomonas vaginalis detection using a Roche LightCycler instrument with female self-obtained vaginal swab samples and male urine samples*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 4197-9.
20. Patil, M.J., J.M. Nagamoti, and S.C. Metgud, *Diagnosis of Trichomonas Vaginalis from Vaginal Specimens by Wet Mount Microscopy, In Pouch TV Culture System, and PCR*. J Glob Infect Dis, 2012. **4**(1): p. 22-5.
21. Huppert, J.S., et al., *Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of Trichomonas vaginalis in young women*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(2): p. 194-8.
22. Cartwright, C.P., et al., *Comparison of nucleic acid amplification assays with BD affirm VPIII for diagnosis of vaginitis in symptomatic women*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(11): p. 3694-9.
23. Andrea, S.B. and K.C. Chapin, *Comparison of Aptima Trichomonas vaginalis transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of T. vaginalis in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(3): p. 866-9.
24. Choe, H.S., et al., *Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods*. Int J Infect Dis, 2013. **17**(12): p. e1134-40.
25. Schirm, J., et al., *Trichomonas vaginalis detection using real-time TaqMan PCR*. J Microbiol Methods, 2007. **68**(2): p. 243-7.

26. Depuydt, C.E., et al., *Epidemiology of Trichomonas vaginalis and human papillomavirus infection detected by real-time PCR in flanders*. Gynecol Obstet Invest, 2010. **70**(4): p. 273-80.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2010: *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010*.
28. World Health Organization 2012: *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008*
29. Raymaekers, M. et al., *Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays*. J Clin Lab Anal, 2009. 23(3): p. 145-51.