



Trichomonas vaginalis, ontmaskering van een onderschatte pathogeen?

Philippe Willems

Promotor: Dr. R. Cartuyvels



Laboratoriumdiagnostiek T. vaginalis

- Inleiding
- Literatuurstudie: opties laboratoriumdiagnostiek
- Praktisch: optimalisatie in het Jessa ziekenhuis
- Klinisch: prevalentiestudie



Laboratoriumdiagnostiek T. vaginalis

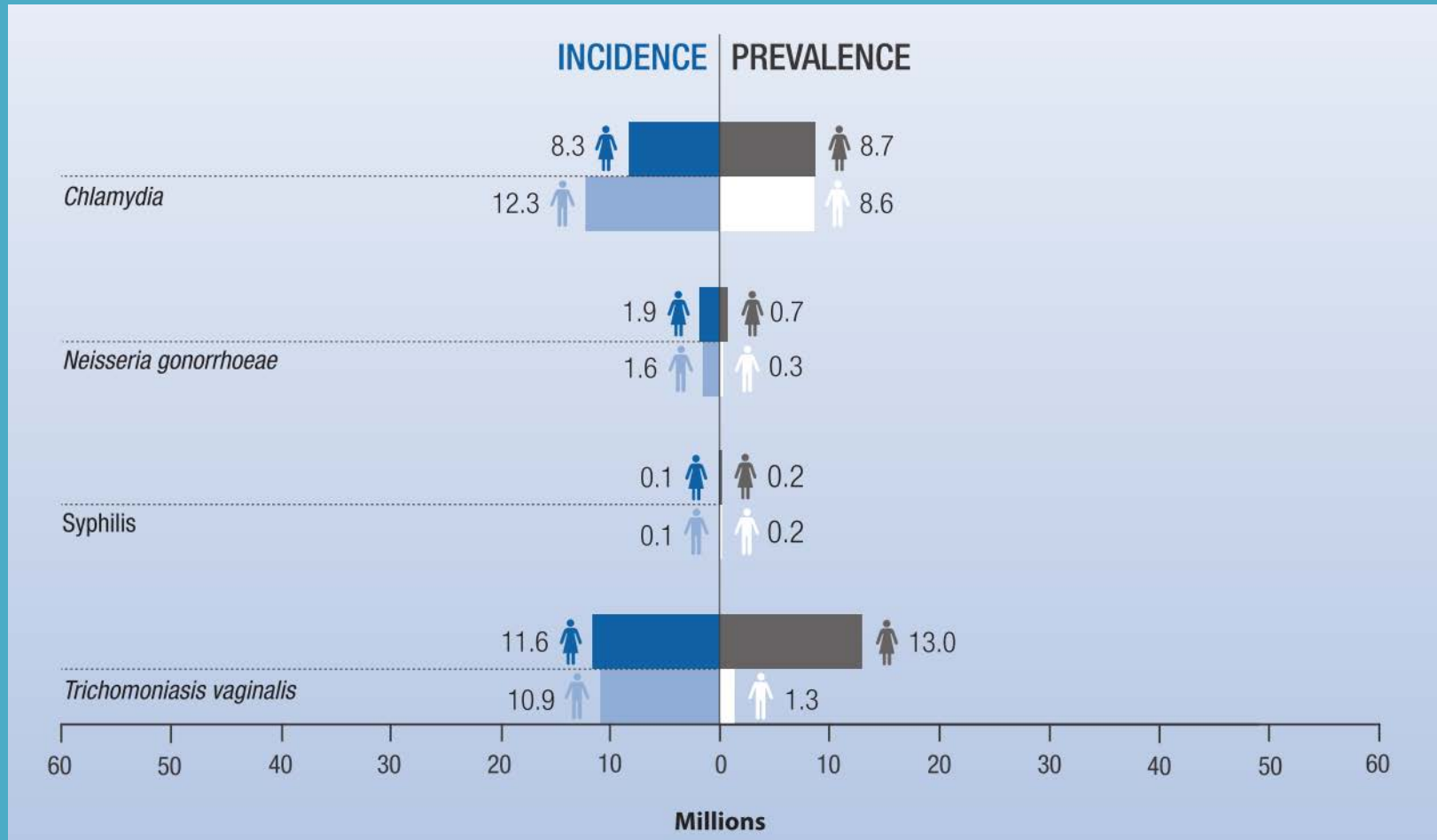
- Inleiding
- Literatuurstudie: opties laboratoriumdiagnostiek
- Praktisch: optimalisatie in het Jessa ziekenhuis
- Klinisch: prevalentiestudie



Inleiding

- Anaërobe parasiet
- Wereldwijd meest frequente verwekker van niet-virale SOA's (WHO rapport 2012)
- Klachtenpatroon varieert:
 - Vrouwen: vaak geelgroene, vaginale afscheiding met vulvaire irritatie
 - Mannen: urethrale irritatie, beperkte afscheiding, branderig gevoel na plassen of ejaculatie
 - Asymptomatisch

Europa (2008)



WHO, 2012: Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008.



Inleiding

- Facultatief anaërobe parasiet
- Wereldwijd meest frequente verwekker van niet virale SOA's
- Klachtenpatroon varieert
 - Vrouwen: vaak geelgroene, vaginale afscheiding met vulvaire irritatie
 - Mannen: urethrale irritatie, beperkte afscheiding, branderig gevoel na plassen of ejaculatie
 - Asymptotisch



Klachten





Belang van goede diagnostiek

- T. vaginalis als verwekker van complicaties:
 - Pelvic Inflammatory Disease
 - Zwangerschapscomplicaties
 - Co-factor voor transmissie HIV en HSV
 - ...
- Gemiste diagnose:
 - reservoir voor transmissie
 - kosten voor gezondheidszorg



Huidige diagnostiek

- Rechtstreeks microscopisch onderzoek



- Nieuwe, gevoeliger laboratoriumtechnieken



Laboratoriumdiagnostiek T. vaginalis

- Inleiding
- Literatuurstudie: opties laboratoriumdiagnostiek
- Praktisch: optimalisatie in het Jessa ziekenhuis
- Klinisch: prevalentiestudie

Vraag 1

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

Guidelines

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

Ellen Jo Baron,^{1,2} J. Michael Miller,³ Melvin P. Weinstein,⁴ Sandra S. Richter,⁵ Peter H. Gilligan,⁶ Richard B. Thomson Jr.,⁷ Paul Bourbeau,⁸ Karen C. Carroll,⁹ Sue C. Kehl,¹⁰ W. Michael Dunne,¹¹ Barbara Robinson-Dunn,¹² Joseph D. Schwartzman,¹³ Kimberle C. Chapin,¹⁴ James W. Snyder,¹⁵ Betty A. Forbes,¹⁶ Robin Patel,¹⁷ Jon E. Rosenblatt,¹⁷ and Bobbi S. Pritt¹⁷

Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010

Prepared by

Kimberly A. Workowski, MD^{1,2}

Stuart Berman, MD¹

¹*Division of STD Prevention*

National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention

²*Emory University, Atlanta, Georgia*

Literatuurstudie

- Karakteristieken van de verschillende testen
- Performantie van de verschillende testen beschreven in de literatuur
- Kostprijs van een analyse

Literatuurstudie

- Karakteristieken van de verschillende testen
- Performantie van de verschillende testen beschreven in de literatuur
- Kostprijs van een analyse



Literatuurstudie

➔ Rechtstreeks microscopisch onderzoek (RMO)
Cultuur

- InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

Sneltesten

- OSOM® Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- BD Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickinson)

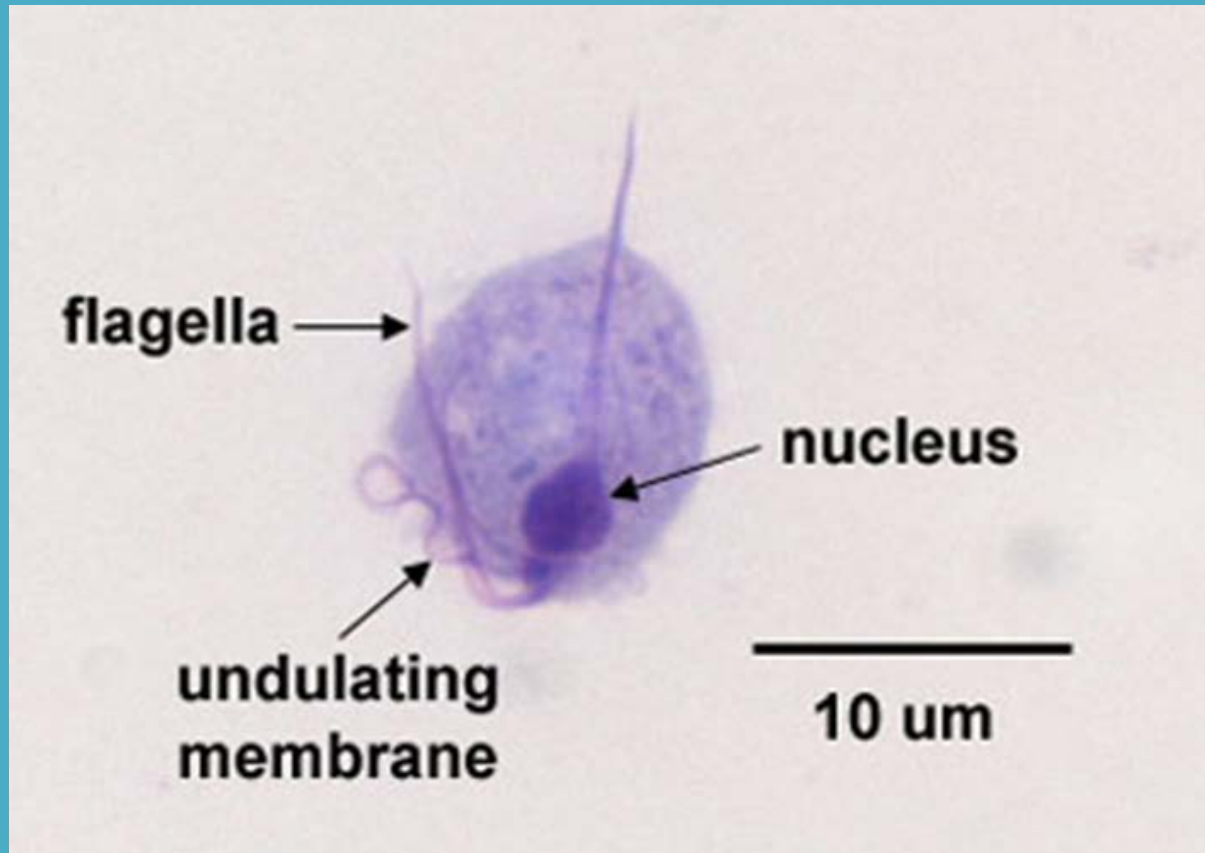
Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT analyses)

Rechtstreeks microscopisch onderzoek



- Voordelen
 - Goedkoop
 - Snel
- Nadelen
 - Levende kiemen nodig
 - wordt best binnen 30 min bekeken
 - Performantie afhankelijk van
 - Ervaring
 - Pre-analytische fase
 - Parasitaire lading

Rechtstreeks microscopisch onderzoek



Rechtstreeks microscopisch onderzoek



- Voordelen
 - Goedkoop
 - Snel
- Nadelen
 - Levende kiemen nodig
 - wordt best binnen 30 min bekeken
 - Performantie afhankelijk van
 - Ervaring
 - Pre-analytische fase
 - Parasitaire lading



Literatuurstudie

RMO

Cultuur



- InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

Sneltesten

- OSOM® Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickenson)

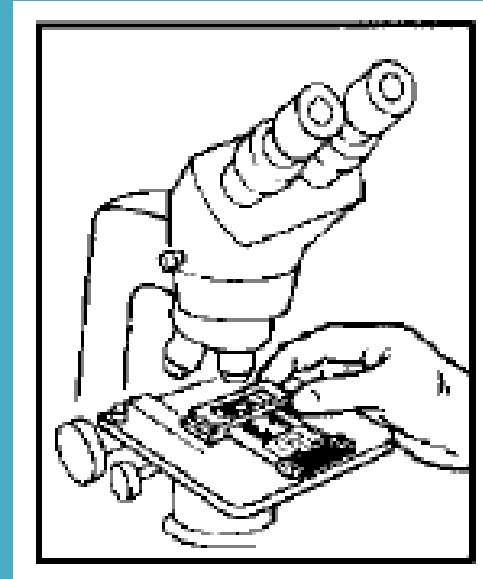
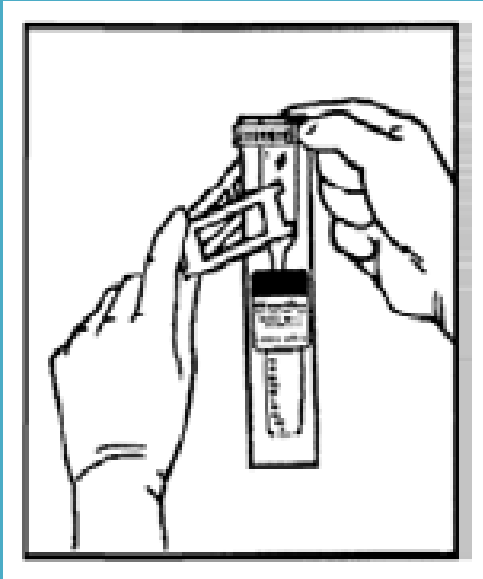
Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT analyses)

InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)



- Voordelen
 - Microscopie rechtstreeks op cultuur
- Nadelen
 - Arbeidsintensief
 - Levende kiemen vereist
 - moeten binnen 60 min geïnoculeerd worden

InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)



InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

- 2499 stalen getest met InPouch™ TV Culture System over periode van 13 jaar

TABLE 3 Positive *Trichomonas vaginalis* InPouch findings by day postinoculation

No. of days postinoculation	No. of positive cultures observed	% positive among total	Daily % positive rate
1	171	40.8	6.8
2	77	18.4	3.3
3	99	23.6	4.4
4–7	72	17.2	3.3
Total	419	100	

InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)



- Voordelen
 - Microscopie rechtstreeks op cultuur
- Nadelen
 - Arbeidsintensief
 - Levende kiemen vereist
 - moeten binnen 60 min geïnoculeerd worden



Literatuurstudie

RMO

Cultuur

- InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

Sneltesten



- OSOM® Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickinson)

Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT analyses)

OSOM[®] Trichomonas Rapid Test (Sekisui)



- Voordelen
 - Vereist geen levende organismen
 - Kan tot 36 u uitgesteld worden
 - Resultaten binnen 10 min
 - Relatief goedkoop
- Nadelen
 - Geen goede sensitiviteit voor asymptomatische patiënten
 - Subjectief om af te lezen



Literatuurstudie

RMO

Cultuur

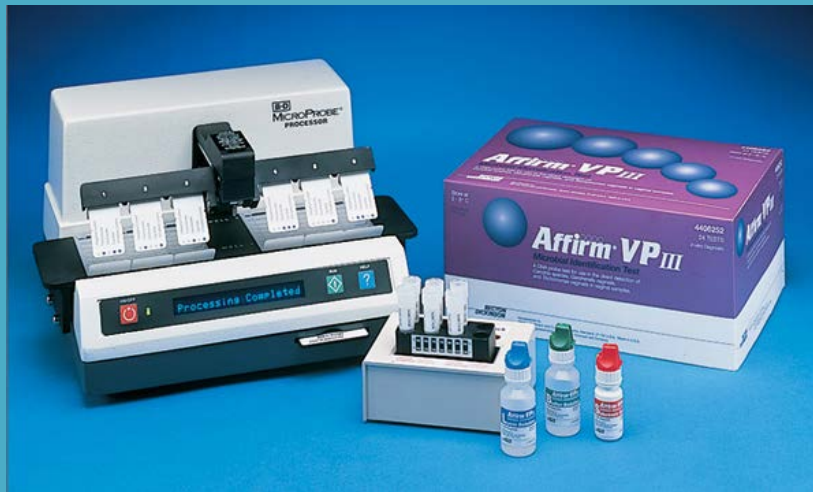
- InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

Sneltesten

- OSOM® Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickinson)

Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT analyses)

Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickinson)



- Voordelen
 - Vereist geen levende kiemen
 - kan tot 72 u uitgesteld worden
 - Gelijktijdige identificatie van 3 kiemen
- Nadelen
 - Vereist implementatie van analyseplatform
(BD MicroProbe™ Processor, Becton Dickinson, California, VS)
 - Geen goede sensitiviteit voor asymptomatische patiënten
 - Subjectief om af te lezen



Literatuurstudie

RMO

Cultuur

- InPouch™ TV Culture System (Biomed Diagnostics)

Sneltesten

- OSOM® Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- Affirm™ VPIII Microbial Identification Test (Becton Dickinson)

➡ Amplificatietesten van nucleïnezuren (NAAT analyses)

NAAT analyses



- Voordelen
 - Intrinsiek gevoeliger dan niet amplificerende testen
 - Vereist geen levende kiemen
 - Kunnen in batch uitgevoerd worden
- Nadelen
 - Kostprijs afhankelijk van HAT, aankoop van analyseplatformen, ...



NAAT analyses

- Grote variatie
 - TMA:
 - APTIMA Trichomonas vaginalis test (Gen-probe inc.)
→ TIGRIS en PANTHER platform van Hologic inc.
 - PCR:
 - Commerciële kits
 - In-house ontwikkelde PCR testen

NAAT analyses

- In-house ontwikkelde PCR testen

Comparison of culture and different PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in self collected vaginal swab specimens

T Crucitti, E Van Dyck, A Tehe, S Abdellati, B Vuylsteke, A Buve, M Laga

Sex Transm Infect 2003;79:393–398

BASIC SCIENCE: GYNECOLOGY

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

Melinda B. Nye, PhD; Jane R. Schwebke, MD; Barbara A. Body, PhD



Development of PCR Assays for Detection of *Trichomonas vaginalis* in Urine Specimens

Claudiu I. Bandea,^a Kahaliah Joseph,^a Evan W. Secor,^a Laurie A. Jones,^a Joseph U. Igietseme,^a Robert L. Sautter,^b Margaret R. Hammerschlag,^c Nancy N. Fajman,^d Rebecca G. Girardet,^e Carolyn M. Black^a

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA^a; Carolinas Pathology Group, Charlotte, North Carolina, USA^b; SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, New York, USA^c; Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA^d; The University of Texas—Houston Medical School, Houston, Texas, USA^e

Literatuurstudie

- Karakteristieken van de verschillende testen
- Performantie van de verschillende testen beschreven in de literatuur
- Kostprijs van een analyse

Performantie

Table 3. Differences in test sensitivity stratified by the presence or absence of vaginal symptoms.

Test method	Sensitivity, % (95% CI)		
	All patients (n = 330)	Vaginal symptoms present (n = 210)	Vaginal symptoms absent (n = 120)
Wet mount	50.8 (37.7–63.9)	57.5 (40.8–72.9)	38.1 (18.1–61.5)
Culture	75.4 (62.7–85.5)	77.5 (61.5–89.1)	71.4 (47.8–88.7)
Rapid test	82.0 (70.0–90.6)	92.5 (79.6–98.4)	61.9 (38.4–81.9)
TMA	98.4 (91.2–99.9)	97.5 (86.9–99.9)	100 (83.8–100)

NOTE. The comparator was any test result positive for *Trichomonas vaginalis* infection. TMA, transcription-mediated amplification.

Performantie

Table 3. Differences in test sensitivity stratified by the presence or absence of vaginal symptoms.

Test method	Sensitivity, % (95% CI)		
	All patients (<i>n</i> = 330)	Vaginal symptoms present (<i>n</i> = 210)	Vaginal symptoms absent (<i>n</i> = 120)
Wet mount	50.8 (37.7–63.9)	57.5 (40.8–72.9)	38.1 (18.1–61.5)
Culture	75.4 (62.7–85.5)	77.5 (61.5–89.1)	71.4 (47.8–88.7)
Rapid test	82.0 (70.0–90.6)	92.5 (79.6–98.4)	61.9 (38.4–81.9)
TMA	98.4 (91.2–99.9)	97.5 (86.9–99.9)	100 (83.8–100)

NOTE. The comparator was any test result positive for *Trichomonas vaginalis* infection. TMA, transcription-mediated amplification.

Performantie

Table 3. Differences in test sensitivity stratified by the presence or absence of vaginal symptoms.

Test method	Sensitivity, % (95% CI)		
	All patients (n = 330)	Vaginal symptoms present (n = 210)	Vaginal symptoms absent (n = 120)
Wet mount	50.8 (37.7–63.9)	57.5 (40.8–72.9)	38.1 (18.1–61.5)
Culture	75.4 (62.7–85.5)	77.5 (61.5–89.1)	71.4 (47.8–88.7)
Rapid test	82.0 (70.0–90.6)	92.5 (79.6–98.4)	61.9 (38.4–81.9)
TMA	98.4 (91.2–99.9)	97.5 (86.9–99.9)	100 (83.8–100)

NOTE. The comparator was any test result positive for *Trichomonas vaginalis* infection. TMA, transcription-mediated amplification.

Performantie

TABLE 3

Performance characteristics of diagnostic tests for TV in 296 female subjects

Diagnostic method and specimen	Number of specimens				Sensitivity		Specificity		Predictive value (%)	
	True positive	False positive	False negative	True negative	%	95% CI	%	95% CI	Positive	Negative
Molecular resolved algorithm										
Wet mount	48	0	40	208	54.6	43.6-65.1	100	97.7-100	100	83.9
Culture	66	0	22	208	75.0	64.4-83.4	100	97.7-100	100	90.4
PCR - Vaginal swab	73	0	15	208	83.0	73.1-89.8	100	97.7-100	100	93.3
PCR - Endocervical swab	71	0	17	208	80.9	70.6-88.0	100	97.7-100	100	92.5
PCR - Urine	67	0	21	208	76.1	65.6-84.3	100	97.7-100	100	90.8
ATV - Vaginal swab	85	0	3	208	96.6	89.7-99.1	100	97.7-100	100	98.6
ATV - Endocervical swab	79	0	9	208	89.8	81.0-94.9	100	97.7-100	100	95.9
ATV - Urine	77	0	11	208	87.5	78.3-93.3	100	97.7-100	100	95.0

ATV, APTIMA *Trichomonas vaginalis*; PCR, polymerase chain reaction.

Nye. 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.

Performantie

TABLE 2 Comparison of results obtained in Affirm VPIII and NAA for diagnosis of vaginitis in symptomatic women

Condition (no. of subjects)	Infection status ^a (no. of subjects)	No. of subjects with result			
		Affirm VPIII		NAA assay ^b	
		Positive	Negative	Positive	Negative
BV (<i>n</i> = 305)	Positive (<i>n</i> = 197)	179	18	191	6
	Negative (<i>n</i> = 108)	35	73	8	100
VVC (<i>n</i> = 102)	Positive (<i>n</i> = 43)	25	18	42	1
	Negative (<i>n</i> = 59)	0	59	4	55
TV (<i>n</i> = 320)	Positive (<i>n</i> = 54)	25	29	53	1
	Negative (<i>n</i> = 266)	0	266	0	266

^a Infection status determined based on results of conventional diagnostic tests (for BV and VVC); positive results in either Affirm VPIII *T. vaginalis* test or TVA test are considered diagnostic for TV.

^b NAA assays were BV-PCR, CAN-PCR, and ATV for diagnosis of BV, VVC, and TV respectively.

Literatuurstudie

- Karakteristieke van de verschillende testen
- Performantie van de verschillende testen beschreven in de literatuur
- Kostprijs van een analyse

Kostprijs

Bijlage 2: catalogusprijs (januari 2013) van de verschillende laboratoriumtesten voor de detectie van TV.

Test	Catalogusprijs (excl. BTW)	Prijs per test in euro (excl. BTW)	Erkenning
RMO	-	(< € 1) ¹	-
<u>InPouch</u> TV Culture System, BD	€ 586.38/100 <u>testen</u>	€ 5.86	CE FDA
OSOM® <u>Trichomonas</u> Rapid Test, Sekisui	€ 121.46/25 <u>testen</u>	€ 4.86	CE FDA ²
<u>Affirm</u> VPIII, BD ³	€ 304.95/24 <u>testen</u>	€ 12.61	CE FDA ²
APTIMA <u>Trichomonas vaginalis</u> test, Hologic ³	€ 600-1000/100 <u>testen</u>	€ 6-10 ⁴	CE FDA
<u>Cobas</u> ®Amplacor analyse, Roche ³	€ 1676/240 testen € 8576,10/960 testen	€ 6.98 – 8.9 ⁴	CE FDA ⁶
<u>Trichomonas vaginalis</u> Real-Time, Diagenode ³	€ 470/100 testen	€ 4.70 ⁵ + € 4.03 ⁷	CE
<u>Trichomonas vaginalis</u> Real-TM, Sacace ³	€ 637.5/100 testen	€ 6.38 + € 4.03 ⁷	CE

RMO = rechtstreeks microscopisch onderzoek, CT = Chlamydia trachomatis, NG = Neisseria gonorrhoeae, ¹Schatting van kosten voor draagglaasje, steriele pipet, dekglasje, ... ²FDA erkenning enkel voor symptomatische patiënten, ³De 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'. ⁴Prijs is afhankelijk van de omvang van de bestelling, ⁵Dit bedrag is inclusief mastermix (€ 100/100 testen) wat apart moet aangekocht worden. ⁶FDA erkenning enkel voor detectie CT en NG, ⁷Kostprijs van de DNA extractie per staal op de QIAsymphony in het Jessa Ziekenhuis in Hasselt.



Conclusie

- RMO te lage sensitiviteit
- Cultuur
 - Betere performantie maar lange HAT en TAT
- Sneltesten
 - Affirm VPIII: snel maar weinig gevoelig voor de detectie van 3 belangrijkste verwekkers van vaginose
 - OSOM test: goede performantie voor de detectie van TV bij symptomatische patiënten + relatief goedkoop
- NAAT analyses
 - Intrinsiek gevoelige testen voor symptomatische + asymptomatische patiënten
 - Grote variatie kostprijs, HAT, ...



Laboratoriumdiagnostiek T. vaginalis

- Inleiding
- Literatuurstudie: opties laboratoriumdiagnostiek
- Praktisch: optimalisatie in het Jessa ziekenhuis
- Klinisch: prevalentiestudie



Vraag 2

Hoe kan de diagnostiek van TV in het klinisch laboratorium van het Jessa ziekenhuis geoptimaliseerd worden?



Klinisch laboratorium

Jessa ziekenhuis: criteria

- Goede performantie
- Beperkte turnaround time en hands-on time
- Kosten
 - Prijs reagentia
 - Rekening houden met aanwezig instrumentarium in het labo
- Commercieel beschikbaar als solo test



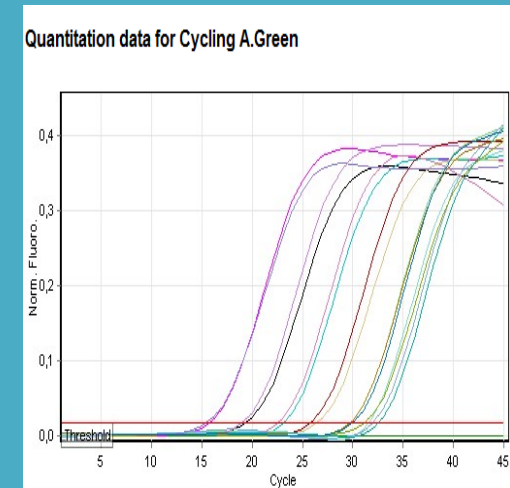
Klinisch laboratorium

Jessa ziekenhuis: optimalisatie?

- OSOM[®] Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
 - Performantie beschreven in de literatuur
- Trichomonas vaginalis Real-Time PCR kit (Diagenode)
- Trichomonas vaginalis Real-TM kit (Sacace)
 - Performantie niet beschreven in de literatuur



Klinisch laboratorium Jessa ziekenhuis





Vergelijkende validatie

	PCR kit Diagenode	PCR kit Sacace
LOD ₉₅	100 k/ <u>mL</u>	50 k/ <u>mL</u>
Juistheid	93%	100%
Specificiteit	100%	100%
Kruishybridisatie	uitgesloten	uitgesloten
Lineariteit	OK	OK
Reproduceerbaarheid	OK	OK
Bewaarcondities bij -20°C	minstens 8 dagen	minstens 8 dagen

Klinisch laboratorium

Jessa ziekenhuis: conclusie

- OSOM[®] Trichomonas Rapid Test (Sekisui)
- TV PCR kit van Sacace is gevoeliger dan die van Diagenode
 - PCR kit van Sacace heeft lagere LOD95
 - PCR kit van Diagenode heeft 1 positieve controle gemist
 - PCR kit van Diagenode is per test €1,7 goedkoper



Laboratoriumdiagnostiek T. vaginalis

- Inleiding
- Literatuurstudie: opties laboratoriumdiagnostiek
- Praktisch: optimalisatie in het Jessa ziekenhuis
- Klinisch: prevalentiestudie

Vraag 3

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



Studie

- Doel
 - Prevalentie van TV
 - symptomatische vrouwen
 - asymptomatische vrouwen
 - Verificatie van performantie OSOM test en PCR kit van Sacace op klinische stalen
- Populatie
 - Ambulante raadpleging gynaecologie

Populatie: inclusiecriteria

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

Studie design



Studie design



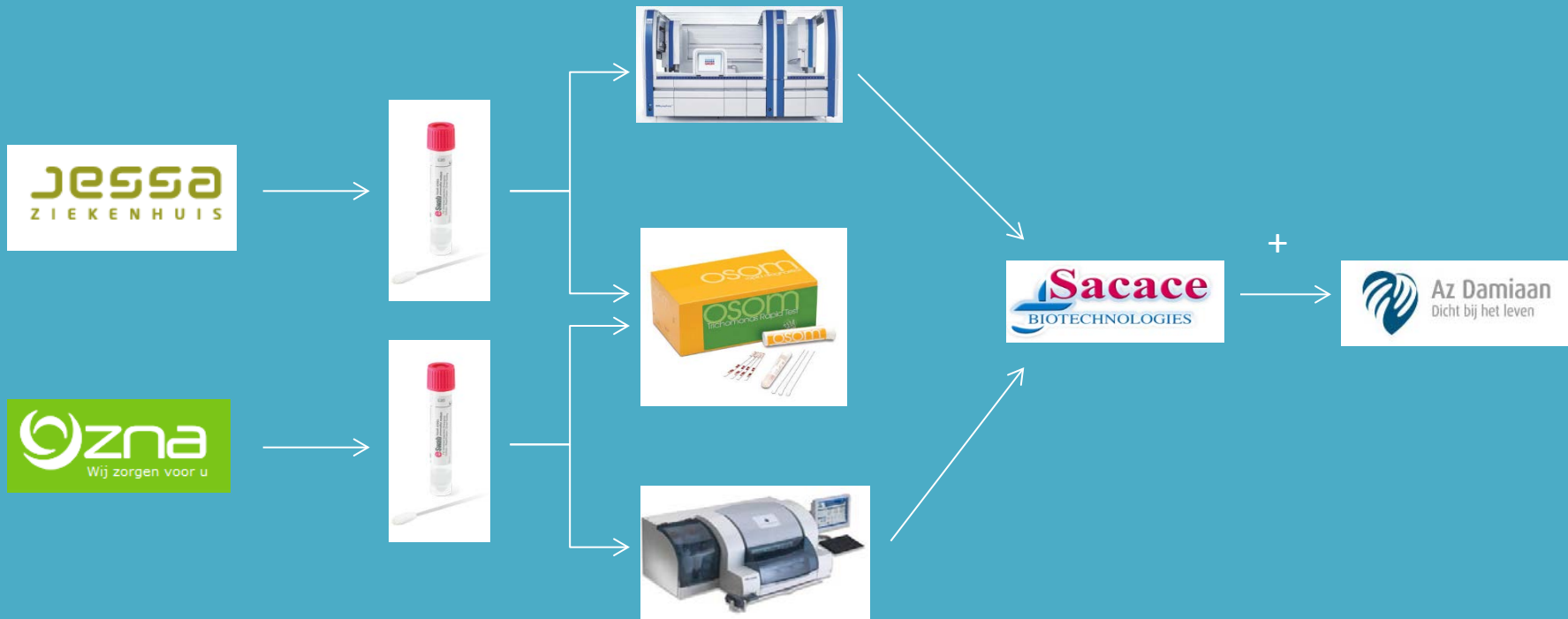
Vergelijking extractiemethodes

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

	PCR analyse met de kit van Saccace	
k/mL ¹	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).

Studie design



Voorlopige resultaten

Tabel 4: Eigenschappen van de verzamelde vaginale wissers

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

Voorlopige resultaten

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: positief predictieve waarde, NPV: negatief predictieve waarde, ¹Niet bepaald.

5,0 %

Vergelijking literatuur

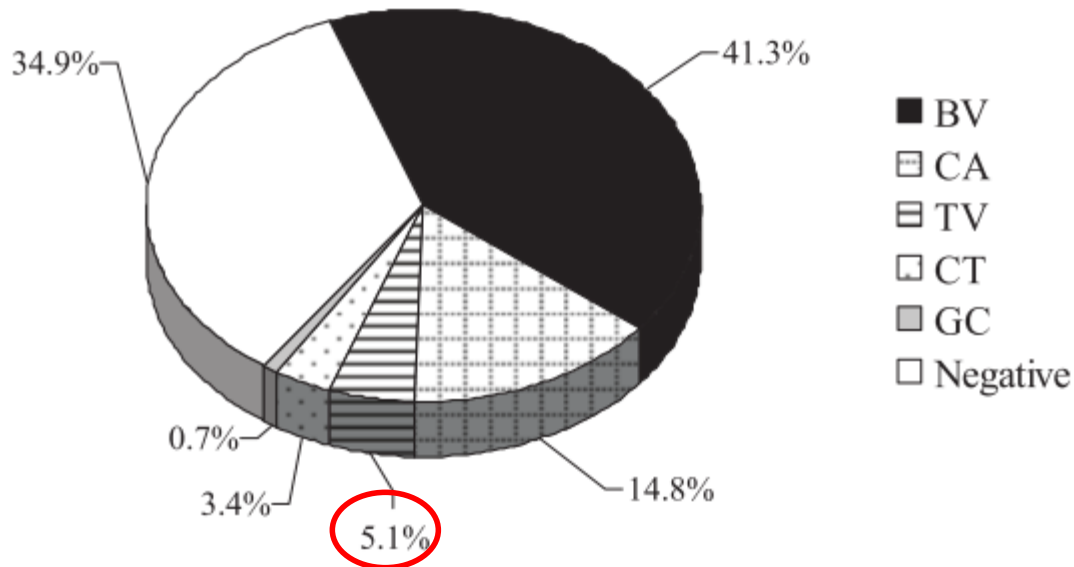
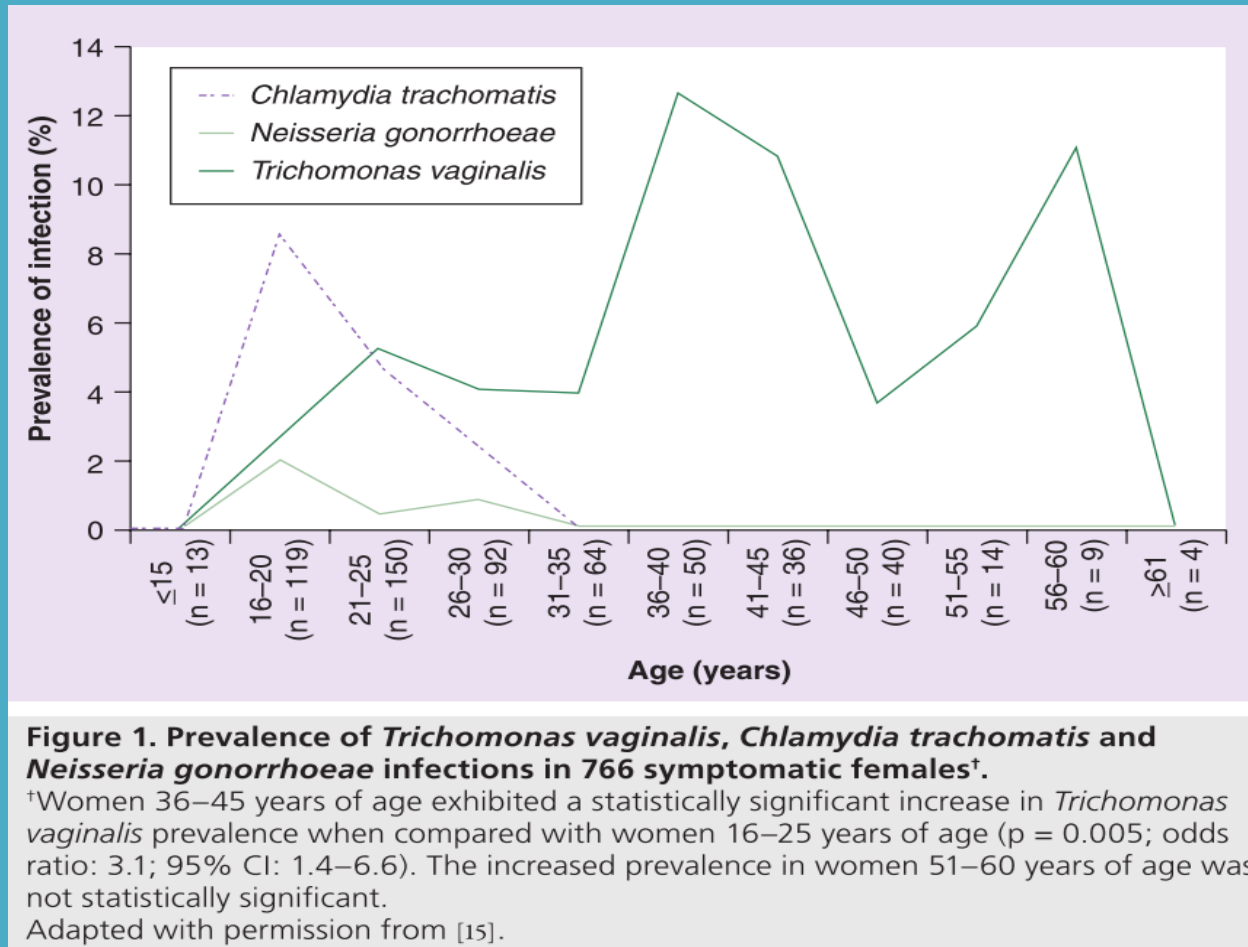


FIG. 1. Infections found in 766 symptomatic females using the Affirm and Aptima assays. BV, bacterial vaginosis (caused by *G. vaginalis*); CA, *C. albicans*; TV, *T. vaginalis*; CT, *C. trachomatis*; GC, gonococci (*N. gonorrhoeae*). GV and CA, tested by the Affirm assay; CT, GC, and TV, tested by the Aptima assay.

Vergelijking literatuur





Trichomonas vaginalis, ontmaskering
van een onderschatte pathogeen?



TO DO

- Meer patiënten rekruteren en statistiek herhalen op meer stalen
 - Doel:
 - ≥ 200 asymptomatische patiënten
 - ≥ 100 symptomatische patiënten
- Beslissen welke testen zullen worden ingevoerd
- Literatuur blijven nakijken voor ontwikkeling van nieuwe, meer performante technieken.