



JÖNKÖPING UNIVERSITY  
*School of Health and Welfare*

# **Prevalens av *Trichomonas vaginalis* i STI-prover från Västra Götalands län med Aptima™ TV Assay på Panther™ System**

Samt utvärdering av Aptima™ TV Assay på Panther™ System med jämförelse mot Xpert® TV Kit på GeneXpert®

**Huvudområde:** Biomedicinsk Laboratorievetenskap  
**Författare:** Malin Isaksson, Linnéa Johansson  
**Handledare:** Caroline Lilja, Helena Enroth  
**Examinator:** Jan Dimberg  
**Jönköping** 2017 juni

## Sammanfattning

*Trichomonas vaginalis* är en parasit som sprids sexuellt och är den främsta sexuellt överförbara infektionen i USA och Europa. Prevalensen i Sverige är i dagsläget okänd då nationellt underlag saknas. Rutindiagnostik för identifiering av *Trichomonas vaginalis* är med våtpreparat. Dock har nukleinsyraamplifiering en högre specificitet och sensitivitet. Panther™ System och GeneXpert® är två system som använder sig av RNA respektive DNA vid analys. Syftet med studien var att primärt undersöka prevalensen av *Trichomonas vaginalis* i STI-prover i Västra Götalands län med Aptima™ TV Assay på Panther™ System och att sekundärt utvärdera Aptima™ TV Assay med jämförelse mot Xpert® TV Kit på GeneXpert®. Analys utfördes på Klinisk Molekylärbiologi, Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde april-maj 2017. Resultatet av utvärderingen visade att Aptima™ TV Assay är specifik för *Trichomonas vaginalis* samt att sensitiviteten faller inom angivna detektionsgränser för kitet. Kitet var därmed lämpligt att använda för prevalensstudien. Prevalensstudien visade positivt utfall på två av 606 analyserade patientprover, motsvarande 0.3%. Slutsatsen var att prevalensen är tillräcklig för framtida studier.

Nyckelord: Aptima, Panther™ System, prevalens, *Trichomonas vaginalis*, STI

## Abstract

### Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in STI-samples from Västra Götaland county with Aptima™ TV Assay on Panther™ System

Also, evaluation of Aptima™ TV Assay on Panther™ System with comparison with Xpert® TV Kit on GeneXpert®

*Trichomonas vaginalis* is a parasite that is spread by sexual contact, it is also the biggest sexually transmitted infection in both the United States and Europe. The prevalence in Sweden today is unknown as no national basic data exist. The routine procedure of identification is Wet-Smear although nucleic acid amplification enable a higher level of specificity and sensitivity. Panther™ System and GeneXpert® are two systems using RNA respectively DNA for analysis. The objective of the study was primarily to investigate the prevalence of *Trichomonas vaginalis* in STI-samples from Västra Götaland county with Aptima™ TV Assay on Panther™ System and secondarily to evaluate Aptima™ TV Assay with comparison to Xpert® TV Kit on GeneXpert®. The evaluation and prevalence study took place at Clinical Microbiology, Unilabs AB, Skaraborgs Hospital Skövde during the period of April-May 2017. The results of the evaluation indicate that Aptima™ TV Assay is specific for *Trichomonas vaginalis* and that the sensitivity falls within the detection limits for the kit. Therefore, the kit is suitable for use in the prevalence study. The prevalence study displayed a positive outcome on two out of 606 analyzed patient samples, corresponding to 0.3%. The conclusion is that the prevalence is enough for further studies.

Keywords: Aptima, Panther™ System, prevalence, *Trichomonas vaginalis*, STD

## Innehållsförteckning

<b>Bakgrund</b> .....	<b>1</b>
<b>Sexuellt överförbara infektioner</b> .....	<b>1</b>
<b>Trichomonas vaginalis</b> .....	<b>2</b>
Biologisk bakgrund .....	2
Smittvägar .....	2
Medicinsk bakgrund .....	2
Symtom och komplikationer .....	2
Diagnostik .....	2
<b>Panther™ System</b> .....	<b>3</b>
Target Capture .....	3
Transcription-Mediated Amplification .....	4
Hybridized Protection Assay .....	5
<b>GeneXpert®</b> .....	<b>5</b>
Polymeraskedjereaktion .....	5
Realtids-PCR .....	5
<b>Syfte</b> .....	<b>7</b>
<b>Material och metod</b> .....	<b>8</b>
<b>Studiedesign</b> .....	<b>8</b>
<b>Utvärdering av Xpert® TV Kit</b> .....	<b>9</b>
<b>Utvärdering av Aptima™ TV Assay</b> .....	<b>10</b>
<b>Prevalensstudie</b> .....	<b>10</b>
<b>Laboratorieutrustning och mätmetodik</b> .....	<b>11</b>
GeneXpert® .....	11
Panther™ System .....	11
<b>Dataanalys</b> .....	<b>12</b>
<b>Statistisk analys</b> .....	<b>12</b>
<b>Etiska överväganden</b> .....	<b>12</b>
<b>Resultat</b> .....	<b>13</b>
<b>Utvärdering av Xpert® TV kit</b> .....	<b>13</b>
<b>Utvärdering av Aptima™ TV Assay</b> .....	<b>13</b>
<b>Prevalensstudie</b> .....	<b>14</b>
Population .....	14
Sexuellt överförbara infektioner .....	15
<b>Diskussion</b> .....	<b>17</b>
<b>Resultatdiskussion</b> .....	<b>17</b>
Utvärdering av Xpert® TV kit samt Aptima™ TV Assay .....	17
Prevalensstudie .....	18

<b>Metoddiskussion .....</b>	<b>19</b>
Utvärdering av Xpert® TV kit samt Aptima™ TV Assay .....	19
Prevalensstudie .....	20
<b>Slutsats .....</b>	<b>22</b>
<b>Omnämningen .....</b>	<b>23</b>
<b>Referenser .....</b>	<b>24</b>

## Bakgrund

*Trichomonas vaginalis* är den vanligaste sexuellt överförbara infektionen i Europa, jämfört med klamydia, gonorré och syfilis, med mer än 20 miljoner nya smittade per år (1, 2). Prevalensen av *T. vaginalis* i Sverige är okänd då enstaka undersökningar endast genomförts i vissa delar av landet. Internationellt sker det en ökning med 143 miljoner smittade per år (3, 4).

Identifiering av *T. vaginalis* sker främst med våtpreparat där vaginal- alternativt uretrasekret studeras i mikroskop (5). Enligt World Health Organisation (WHO) är den rekommenderade metoden nukleinsyraamplifiering (NAAT, nucleic acid amplification techniques) (6). Polymeraskedjereaktion (PCR) samt transkriptionsmedierad amplifikation (TMA) är molekylärbiologiska metoder som faller inom kategorin NAAT där deoxiribonukleinsyra (DNA) respektive ribonukleinsyra (RNA) analyseras för parasiten. En högre sensitivitet och specificitet finns hos NAAT jämfört med mikroskopering av våtpreparat, men metoden används inte idag i rutindiagnostiken (7, 8). Exempel på diagnostiska instrument är GeneXpert® från företaget Cepheid som använder realtids-PCR för att detektera DNA från *T. vaginalis* samt instrumentet Panther™ System från företaget Hologic som använder TMA-teknik för detektering av RNA från *T. vaginalis* (9, 10).

## Sexuellt överförbara infektioner

Sexuellt överförbara infektioner (STI, sexually transmitted infection) är en kategori av bakterier, virus, parasiter och svampar som sprids sexuellt via kroppsvätskor och kan orsaka infektioner i genitalierna (1). Under STI-begreppet faller bland annat klamydia, gonorré, mycoplasma, syfilis och trichomoniasis som orsakas av *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum* och *T. vaginalis* (1, 8). Av nämnda lyder gonorré, klamydia och syfilis under smittskyddslagen i Sverige (11). I smittskyddslagen ingår smittspårning, vilket innebär att infekterade individer har en skyldighet att förmedla vilka partners som denne haft sexuellt umgänge med. Undersökning, vård, provtagning, utredning och behandling följer sedan kostnadsfritt (11, 12, 13).

Under 2015 anmäldes 37 819 fall av Klamydia, 1677 fall av Gonorré och 330 fall av Syfilis i Sverige. En ökning ses för varje år (14). I Sverige har Folkhälsomyndigheten inte rapporterat någon statistik om prevalensen av *T. vaginalis* då ej någon nationell studie inom landet har genomförts (3). En studie genomförd i Jönköpings län (2015) för screening av *T. vaginalis* i STI-prover visade 0,13% positiva resultat med realtids-PCR (n=1836) (15). I STI-prover analyserade för *T. vaginalis* i Örebro län för Universitetssjukhus i Örebro under år 2012 - 2013 med TMA-metod var prevalensen 0.09% (n=1121) (16).

*T. vaginalis* har en hög prevalens utanför Sverige. Rekommendationen i USA för screening av parasiten är för kvinnor med onormala vaginala flytningar och asymtomatiska kvinnor med hög risk för infektion (bland annat tidigare STI, många eller nya partners, betalar för samlag och injektion av droger) enligt Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (17). I Europa år 2008 var 22.6 miljoner smittade av *T. vaginalis*, 20.6 miljoner *C. trachomatis*, 3.4 miljoner *N. gonorrhoeae* och 0.2 miljoner Syfilis (2).

## ***Trichomonas vaginalis***

### **Biologisk bakgrund**

*T. vaginalis* är en eukaryot parasit som infekterar som en trofozoit, har en avsaknad av cyst-form och har en oval nukleol (18, 19, 20). Parasiten är 7-23µm lång och 5-15µm bred med förmåga att ändra sin morfologi (19, 21, 22). *T. vaginalis* är en parabaslid vilket innebär att den har en avsaknad av en mitokondrie. Istället används organellen hydrogenosomes för att producera energi delvis anaerobt (23, 24). *T. vaginalis* är en flagellat och har fyra flageller, ett vågformat membran på halva parasitens långsida och ett långt mikrotubulus (axostyle) som går centralt genom parasiten. Membranet bidrar till dess förmåga att snabbt förflytta sig (19, 21, 22). Förflyttningen sker längs med slemhinnor vid reproduktionsorganen och vid urinvägarna (24). Sekvensering av *T. vaginalis* genom påvisar över 1000 ytmolekyler och flertalet är involverade i dess patogenes (25). Tidigare studier har visat att parasiten genomgått horisontell genöverföring från andra vaginala bakterier för att få förmågan till förtäring av sekret, vilket ökar risken för vaginal infektion (24).

### **Smittvägar**

*T. vaginalis* infekterar främst vagina, cervix, uretra och vulva hos kvinnor och uretra hos män (1). Parasiten sprids främst mellan penis och vagina. Tidigare studier har visat att parasiten inte infekterar andra kroppsdelar som anus, mun och händer (26). Celler av *T. vaginalis* kan dock överleva på fuktiga ytor, i vatten, i urin och sädesvätska under en kortare tid vilket kan möjliggöra smittvägar från handdukar, toalettstolar och bastubänkar (1, 19).

### **Medicinsk bakgrund**

#### **Symtom och komplikationer**

*T. vaginalis* är svår att upptäcka då ca 70% av de drabbade inte uppvisar symtom. Inkubationstiden kan variera från 5–28 dagar från smittotillfället till senare innan symtom uppkommer. Symtomen för män är irritation och klåda i uretra, sveda vid urinering och flytningar. Kvinnor får liknande symptom såsom sveda, klåda, ömhet, rodnad, besvär vid urinering och förändrade flytningar ur vaginan (26). Vid misstanke om trichomoniasis studeras det vaginala sekretets odör, kvalité och mängd. Ett pH-värde på >6.0, vitt skummande sekret eller en cervix med små spröda punktat (motsvarande utseendet hos en jordgubbe) ökar misstanken för infektion orsakad av *T. vaginalis* (27).

Behandling av infektion orsakad av *T. vaginalis* utgörs av antibiotika, tinidazol eller metronidazole. Risker med att inte behandla en pågående infektion är att smittade löper en högre risk att drabbas av andra STI:er på grund av inflammationen i genitalierna (26). Andra komplikationer parasiten kan orsaka är infertilitet, cervixcancer och aggressiv prostatacancer (25). Hos en smittad gravid kvinna kan *T. vaginalis* även orsaka att barnet föds för tidigt och att barnet har en mycket låg födelsevikt (25, 26).

### **Diagnostik**

Primärt används direktmikroskopering för diagnostik. Provmaterialet består av vaginalsekret från bakre *fornix vaginae* (mellan livmoderhalstapp och slidvägg) hos kvinnor, urin och

uretraprov från män (5, 28). Med hjälp av mikroskopering sker en manuell sökning efter en rörlig, päronformad parasit med flageller (5, 29). Motiliteten, som är ett kännetecken för parasiten, kan tappas redan efter en kort tid vid mikroskopering och avsaknaden kan ge falskt negativt resultat (27). Ett positivt resultat verifierar trichomoniasis men ett negativt resultat utesluter inte en infektion. Med våtpreparat av vaginalsekret är frekvensen av identifierade parasiter 40–80% enligt Folkhälsomyndigheten (5, 27, 29). Odling av sekret är en referensmetod enligt Folkhälsomyndigheten som kan användas om parasiten inte påvisas vid mikroskopering. Odling har en känslighet på 80% men kan ta upp till sju dagar (28).

Diagnostik av *T. vaginalis* med NAAT går att genomföra med PCR som använder sig av DNA vid amplifiering alternativt TMA som använder sig av RNA (5, 10). Dock används inte PCR inom klinisk rutinverksamhet i Sverige. Metoden NAAT har en högre sensitivitet respektive specificitet gentemot metoder som våtpreparat, färgning med papanicolaou (PAP) eller odling (5, 7, 28).

## **Panther™ System**

Nukleinsyror, dubbelsträngade deoxiribonukleinsyror (dsDNA) och enkelsträngat RNA utgör cellernas arvs massa. I varje cell återfinns en kopia av DNA och fler än 1000 kopior av RNA. RNA finns i olika former; messenger-RNA (mRNA), transport-RNA (tRNA) och ribosomalt-RNA (rRNA). Olika regioner i rRNA används för analys av *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* och *T. vaginalis* på Panther™ System med Aptima Assays. Panther™ System är ett helautomatiserat system för Aptima Assays med probbearbetning, detektion samt databearbetning av resultat (10, 30).

I Aptima Assay teknikerna ingår Target Capture (TC), TMA, Hybridization Protection Assay (HPA) och i vissa fall Dual-Kinetic Assay (DKA). Teknikerna tillsammans innebär en effektiv probbearbetning där en eller flera amplifierade mål-rRNA kan analyseras samtidigt i instrumentet (30). *T. vaginalis* är möjligt att detektera med kitet Aptima™ TV Assay från Hologic. Aptima Urine Specimen Collection Kit, Aptima Unisex Swab Specimen Collection Kit samt Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit är de provtagningsmaterial som rekommenderas av Hologic för Aptima-analyser. För Aptima™ TV Assay är endast provmaterial från kvinnor verifierat av Hologic (10). Hållbarheten är 30 dagar för Aptima Urine Specimen Collection Kit och 60 dagar för övriga. Samtliga Aptima-rör innehåller lyseringsvätska, Aptima Transport Medium. Lyseringsvätskan är starkt basisk och har funktionen att lysera celler samt stabilisera mål-RNA (30).

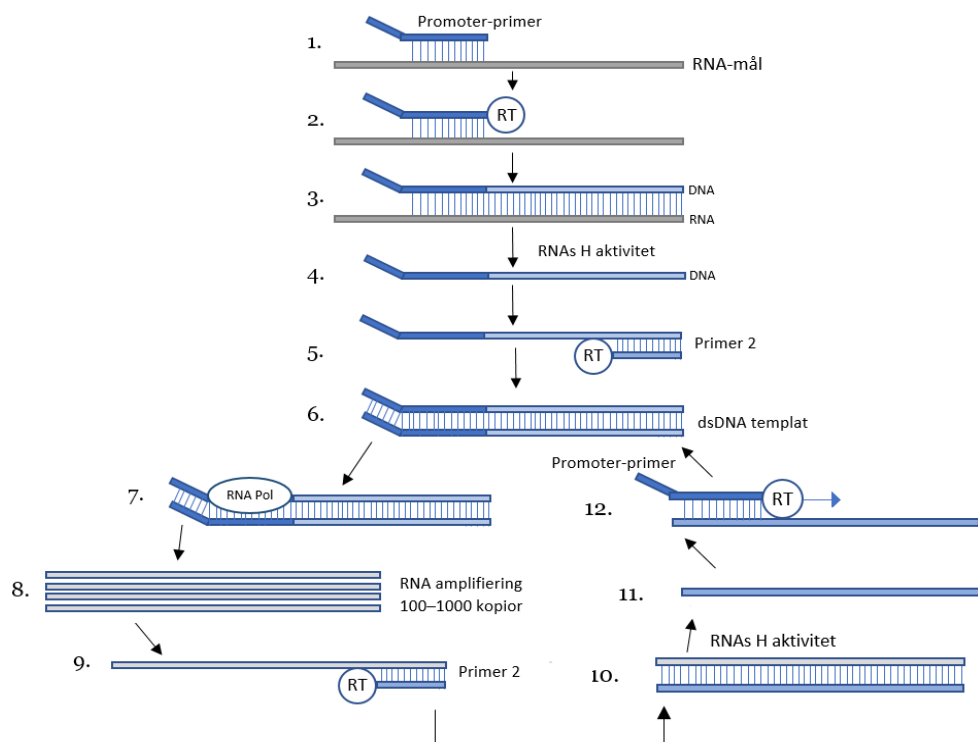
## **Target Capture**

Target Capture (TC) motsvarar en målsekvensinfångning där det sker både isolering och en rening av nukleinsyra för att kunna extrahera mål-RNA med magnetkulor. Magnetkulorna är inmärkt med en Capture Probe och en PolyA-oligonukleotid (30). Prov blandas med TC-reagens (TCR) och lösningen placeras i en inkubator där en hög temperatur startar en målsekvensinfångning. Oligonukleotiden fäster till målnukleinsyrasekvenser och hybridiseras sedan till magnetpartiklar. Magneter kan därefter fånga in de magnetiska TCR-mikrosfärerna och provet genomgår en tvätt. Slutprodukten är en ren målnukleinsyra av rRNA (30, 31).



## Transcription-Mediated Amplification

Vid TMA används enzymet RNA-polymeras i kombination med enzymet omvänt transkriptas (RT, Reverse Transcriptase) för att producera stora mängder amplifierat mål-RNA (31). Processen startas med att en startsekvens (primer) binder in till en målnukleinsyra. Därefter tillsätts enzymreagenser. Enzymet RT kommer sedan att skapa DNA-kopior av mål-RNA med hjälp av primers. Enzymet har en RNA:s H -aktivitet vilket leder till en degradering av det ursprungliga RNA:t. En ny primer binds till den nyskapade DNA-kopian och RT kan skapa ett dubbelsträngat DNA-templat (se figur 1) (31). Vid isothermal (konstant) temperatur sker en amplifiering där RNA-polymeras framkallar RNA från DNA (30). Mellan 100–1000 kopior av RNA amplifieras vid transkriptionen. Den första primern tillsätts igen och processen upprepas till en stor mängd RNA är tillverkad. Slutprodukten i processen är amplifierat RNA, även kallat amplikon. (30, 31, 32).



Figur 1. Schematisk cykel över transkriptionsmedierad amplifiering (TMA). Steg 1–3: En promoter-primer binder till RNA-målet och omvänt transkriptas (RT, reverse transcriptase) skapar DNA-kopior. Steg 4–5: RNA:s H-aktivitet degradererar RNA:t och en primer fäster till en DNA-kopia. Steg 6–8: Ett dubbelsträngat DNA (dsDNA) templat kopplas ihop med RNA polymeras (RNA Pol) och amplifiering av RNA sker. Steg 9–12: Kopior skapas och respektive kopia reagerar med RT, genomgår RNA:s H-aktivitet och kopplas ihop med en promoter-primer. Proceduren upprepas cykliskt.

(Figur reviderad från referens 32)

## Hybridized Protection Assay

Hybridiseringsskyddsassay (HPA) hybridiserar amplikonet för att det skall kunna detekteras med hjälp av ljusemitterande prober. Ohybridiserade och hybridiserade amplikoner särskiljs via applicering av en acridinumestermolekyl (AE) till de ohybridiserade amplikonerna. Under följande selektionsfas agerar AE och en inmärkning sker. Det skapas en kemiluminiscent signal vid applicering av en hybridiserad prob. Fotosignalerna är mätbara i en illuminometer och presenteras som relativa ljusenheter (RLU, relative light unit). I de fall det inte skett någon inbindning av AE avger inte sonda något ljus under detektion (30, 31). RLU-värden i Panther™ System erhålls i formen ”Total RLU” som multipliceras med faktor 1000. Styrkan av det utvunna RLU-värdet är inget kvantitativt mått på koncentrationen organismer (10).

## GeneXpert®

Realtids-PCR tillämpas i systemet GeneXpert® från Cepheid. Genomiskt DNA (gDNA) analyseras i en kassett under en automatisk process, med extraktion och pipettering integrerat i systemet. Xpert® TV Kit består av separata kassetter med integrerade reaktionskammare som genomgår en automatisk process i instrumentet med en kassett per patientprov. Rekommenderat provtagningsmaterial från Cepheid är Cepheid Sample Transport Reagent-A för urin respektive vaginalsekret. Både kvinnlig och manlig urin är möjlig att analysera. Provets hållbarhet i provtagningsmaterialet varierar från 14–28 dagar beroende på förvaring (9). På Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde, är även eSwab utvärderat och verifierat för analys på GeneXpert® (Personlig kommunikation, mars 2017, med C. Lilja funktionsansvarig Klinisk Molekylärbiologi, Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde).

## Polymeraskedjereaktion

Det som sker i en PCR är amplifiering av DNA-sekvenser. Metoden är uppbyggd med komponenter som target-DNA, oligonukleotider, DNA-polymeras och primers. DNA-polymeras agerar som ett nukleotid-länkande enzym. Primers, som består av korta DNA-sekvenser, väljer ut vilken del av DNA:t som skall amplifieras och DNA-polymeraset kan då syntetisera nya DNA-strängar (33). Upprepade cykler med höjd och sänkt temperatur ger en amplifiering av DNA (34). Den initiala temperaturhöjningen sker över smältpunkten för DNA-sekvenserna vilket leder till en separation av DNA-strängarna (denaturering). En sänkt temperatur låter de utvalda primers binda in till target-DNA (hybridisering). Hybridisering sker endast ifall sekvensens nukleotider matchar varandra (A binder till T, C binder till G). Processen upprepas och multipla kopior av DNA-kopior skapas. Resultatet redovisas traditionellt på en agarosgel (33).

## Realtids-PCR

Realtids-PCR går även under benämningen Kvantitativ Direktanalyserande PCR. Den största skillnaden mellan PCR och realtids-PCR är en fluorescerande reportertermolekyl i realtids-PCR. Reportertermolekylen ger ifrån sig ett fluorescerande ljus vid varje ny syntetisering av de eftersökta DNA-fragmenten. Resultatet går att följa i realtid (35).

Det resultat som ges ut av realtids-PCR är en elektronisk amplifieringskurva. Det sker en exponentiell ökning av PCR-kurvan tills en plåtafas är nådd. I respektive analysprocedur ställs ett tröskelvärde in byggt på fluorescensnivån som avgränsar negativa resultat mot positiva.

Amplifieringskurvan och tröskelvärdet möts vilket ger ett värde, benämnt som cykeltröskelvärde (CT, cycle threshold). CT-värden går linjärt mot dess koncentration i provet vilket möjliggör att koncentrationen i ursprungsprovet går att beräkna (33, 36).

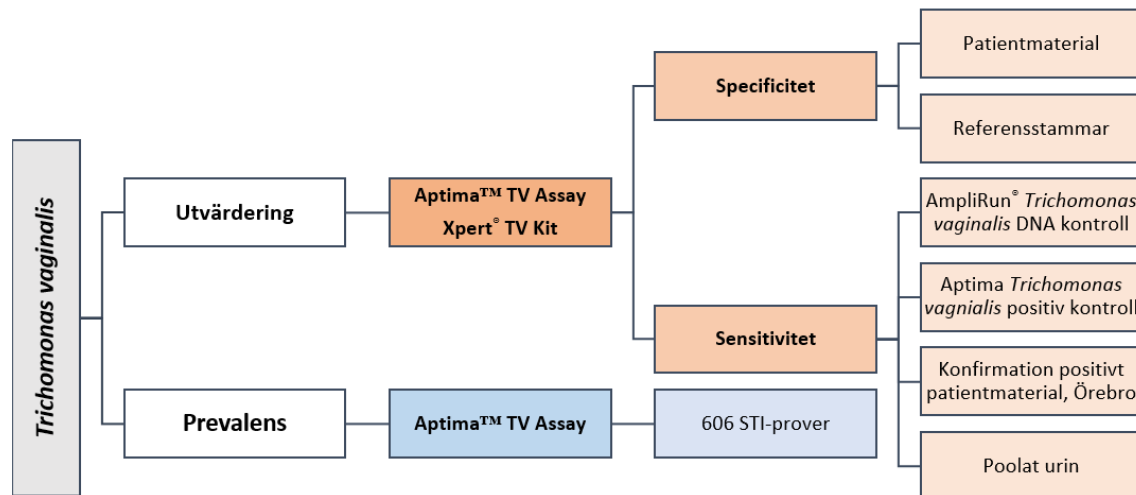
## Syfte

Syftet med studien är att primärt undersöka prevalensen av *Trichomonas vaginalis* i STI-prover i Västra Götalands län med Aptima™ TV Assay på Panther™ System och att sekundärt utvärdera Aptima™ TV Assay med jämförelse mot Xpert® TV Kit på GeneXpert®.

## Material och metod

### Studiedesign

I studien ingick en utvärdering av Aptima™ TV Assay (Hologic, Marlborough, USA) genom specificitet- och sensitivitetundersökning med jämförelse mot Xpert® TV Kit (Cepheid, Sunnyvale, USA) samt en prevalensstudie Aptima™ TV Assay på Panther™ System (Hologic, Marlborough, USA) (se figur 2).



Figur 2. Organisationsschema för utvärdering av Aptima™ TV Assay jämfört med Xpert® TV Kit samt prevalensstudie på Aptima™ TV Assay. Specificitet testades via patientmaterial samt referensstammar. Sensitivitet testades med angivna kontroller och poolat urin. Konfirmation skedde med positivt patientmaterial för *T. vaginalis*. Prevalensstudien genomfördes på 606 STI-prover.

Referensstammar och interna stammar som användes för specificitetsundersökningen var *Candida albicans* ATCC60193, *Gardnerella vaginalis* CCUG3717T, *Escherichia coli* ATCC25922, *Lactobacillus* spp 91-05-5962 (Intern stam Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde), *Streptococcus agalactiae* grupp B ATCC12386, *Stafylococcus aureus* ATCC2921, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 och *Neisseria gonorrhoeae* CCUG45591. Positivt patientmaterial erhöles för Herpes Simplex Virus (HSV) samt HPV.

Kontroller för sensitivitetsundersökningen var AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll MBC079 (Vircell, Granada, Spanien) med 18 000 kopior/μl och Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll (Hologic, Marlborough, USA) med lysat av hela celler motsvarande 13 celler/ml. För konfirmation av metoden användes ett starkt positivt patientprov från Örebro Universitetssjukhus, bestående av vaginalsekret i Aptima Transport Medium. Provet har i tidigare studier i Örebro verifierats positivt med Aptima™ TV Assay på Panther™ System. Utvärdering och analys utfördes april 2017 på GeneXpert® och Panther™ System.

Prevalensstudien genomfördes med Aptima™ TV Assay på Panther™ System (Hologic, Marlborough, USA). Studien är ett forsknings- och utvecklingsprojekt där ett samarbete mellan Unilabs AB Skövde, Smittskyddet och Kvinnokliniken på Skaraborgs Sjukhus Skövde möjliggjorde genomförandet på rutinkliniska prover med eftersökandet av *T. vaginalis* i Västra Götalands län på Panther™ System. Insamling och analys av totalt 606 patientprover skedde under april och maj 2017.

Patientprover för prevalensstudien tillhandahölls från öppenvård, exempelvis primärvård och ungdomsmottagning, samt slutenvård, exempelvis sjukhus från Västra Götalands län. Inget urval gjordes vad gäller kön eller ålder, dock exkluderades prover där kön inte gick att utläsa. Provmaterialet bestod av provrör Aptima Urine Specimen Collection Kit för urin, Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit för vaginalsekret och Aptima Unisex Swab Specimen Collection Kit för cervix och uretra enligt rekommendationer från Hologic.

## Utvärdering av Xpert<sup>®</sup> TV Kit

Specificiteten undersöktes genom spädning och analys av en svamp och tre bakterier. Referensstammar som användes var *C. albicans*, *G. vaginalis*, *E. coli* och *N. gonorrhoeae*. Samtliga stammar upparbetades till 0.5 MacFarland (MF), motsvarande  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml (Colony Forming Unit), i fysiologisk koksaltlösning och spädades sedan 1:10 000 ( $1.5 \times 10^4$  CFU/ml) i eSwab (Copan Diagnostics Inc, Murrieta, USA) med 100µl tillsatt urin. Patientprover positiva för HSV samt HPV analyserades utan spädning direkt från provtagningsrör till en Xpert<sup>®</sup> TV kassett. HSV provet bestod av två eSwab-rör, ett positivt för HSV1 och ett för HSV2, som sammanblandades. HPV bestod av ett patientprov positivt för HPV typ 16, typ 18 samt övriga högriskgrupper (typ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 och 68). HPV materialet erhöles från Thinprep PreservCyt (Hologic, Marlborough, USA) transportmedium avsett för vätskebaserad cytologi.

Urin för både specificitetsundersökningen samt sensitivitetsundersökningen bestod av fyra slumpmässigt utvalda urinprover från patienter som sammanblandades (poolades) till en lösning. Urinlösningen innehöll *Enterococcus faecalis*, *E. coli* samt blandflora med riklig växt (>100 000 kolonier) för respektive bakterie. Den poolade urinen analyserades med urinsticka, Multistix 8SG (Siemens, Erlangen, Tyskland), på en automatisk läsare, Clinitek Status+ (Siemens, Erlangen, Tyskland), där erythrocyter (2+), protein (2+) samt leukocyter (4+) påvisades. De påvisade substanserna kan leda till inhibition i molekylärbiologiska reaktioner. För att testa om substanserna inhiberade Aptima<sup>™</sup> TV Assay eller Xpert<sup>®</sup> TV Kit tillsattes positiva kontroller till det poolade urinet. En spädningsserie gjordes och analyserades på respektive kit. Poolat urin tillsattes endast för specificitetsundersökningen för att inbyggda kontroller i Xpert<sup>®</sup> TV Kit skulle gå igenom.

Sensitiviteten i Xpert<sup>®</sup> TV Kit undersöktes genom analys av två positiva *Trichomonas vaginalis* kontroller; Aptima<sup>™</sup> *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll och AmpliRun<sup>®</sup> *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll. Ett positivt patientprov från Örebro användes för konfirmation. Kontrollmaterial av Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll analyserades och spädades 1:10 samt 1:100 i eSwab. Samma kontroll spädades även i poolat urin 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000. Även nollprov för endast urin analyserades. AmpliRun<sup>®</sup> *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll spädades 1:10 och 1:100 i eSwab (se tabell I). Positivt patientmaterial analyserades från originalrör.

Tabell I. Sensitivitetsundersökning på Xpert® TV Kit samt Aptima™ TV Assay.

		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Xpert® TV Kit	Aptima <i>T. vaginalis</i> positiv kontroll (eSwab)	•	•	•		
	Aptima <i>T. vaginalis</i> positiv kontroll (poolat urin)	•*	•	•	•	•
	AmpliRun® <i>T. vaginalis</i> DNA kontroll (eSwab)		•	•		
	Positivt patientmaterial Örebro (Aptima Transport Medium)	•				
Aptima™ TV Assay	Aptima <i>T. vaginalis</i> positiv kontroll (Aptima Transport Medium)	•	•	•	•	•
	Aptima <i>T. vaginalis</i> positiv kontroll (poolat urin)	•*	•	•	•	•
	AmpliRun® <i>T. vaginalis</i> DNA kontroll (Aptima Transport Medium)			•		
	Positivt patientmaterial Örebro (Aptima Transport Medium)		•			

Varje punkt representerar vilka spädningar (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000) som genomfördes på vardera kontroll samt patientmaterial för respektive kit. 1:1 visar rent material av kontroll/urin. Inom parentes återfinns den lösning spädningarna genomfördes i.

\*endast urin

## Utvärdering av Aptima™ TV Assay

Specificiteten av Panther™ System undersöktes med sju bakteriestammar och en svamp. Referensstammar och interna stammar som användes var; *C. albicans*, *G. vaginalis*, *E. coli*, *Lactobacillus* spp, *S. agalactiae* grupp B, *S. aureus*, *K. pneumoniae* och *N. gonorrhoeae*. Stammarna upparbetades till 0.5 MF i fysiologisk koksaltlösning och späddes till 1:10 000 i Aptima Transport Medium.

Positivt patientmaterial för HSV, HPV, *C. trachomatis* och *M. genitalium* analyserades. HSV och HPV för analys på Aptima™ TV Assay användes från samma poolade patientmaterial som användes för analys på Xpert® TV kit. Poolat HSV späddes i Aptima Transport Medium till koncentrationen 1:5 och HPV späddes i samma medium till koncentrationen 1:2.

Sensitiviteten i Aptima™ TV Assay undersöktes genom analys av två olika kontroller. Kontrollmaterialet bestod av Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll samt AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll. Analys för konfirmation av kitet genomfördes även på positivt patientmaterial från Örebro.

Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll analyserades från originalrör (1:1) samt späddes 1:10, 1:100, 1:1000 och 1:10 000 i Aptima Transport Medium. Ännu en Aptima Transport Medium spädning 1:10, 1:100, 1:1000 samt 1:10 000 genomfördes där den tidigare poolade urinen tillsattes (se tabell I). AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll späddes 1:100 i Aptima Transport Medium. Från det positiva patientmaterialet från Örebro användes 200 µl för analys.

## Prevalensstudie

Respektive patientprov analyserades i den kliniska rutinverksamheten efter vad som var beställt och sparades därefter en vecka. Proverna avkodades och märktes upp med "TV+löpnummer". Information om patientens kön, ålder, provtyp (urin, vaginalsekret, cervix och uretra) och provets ursprung (sjukhus/öppenvård) registrerades. Resultat av *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* och *M. genitalium* dokumenterades. *T. vaginalis* analyserades med Aptima™ TV

Assay på Panther™ System. Innan proverna analyserades kontrollerades överensstämmelsen mellan provtyp och provtagningspinne samt avlägsnades eventuella bubblor.

Patientprover med positivt utfall för *T. vaginalis* analyserades även med Xpert® TV Kit på GeneXpert® för konfirmation av resultat. Material togs från orginalrör och tillsattes till Xpert® TV Kit för analys. Positivt och negativt utfall noterades samt CT-värden.

## Laboratorietrustning och mätmetodik

### GeneXpert®

Instrumentet som användes för analys med Xpert® TV Kit var GeneXpert® XVI-8 från Cepheid, tillverkad av Cepheid, Sunnyvale, USA och levererad av Diagen Sverige, Upplands-Väsby. Kitet var IVD/CE-godkänt. Xpert® TV Kits lägsta detektionsgräns i vaginalsvab samt urinprov är två respektive tre celler av *T. vaginalis* per milliliter. Tre typer av frystorkat material (Bead 1, Bead 2 och Bead 3) fanns i var kassett. Andra vätskor som ingick var lyseringsvätska (bestående av guanidintiocyanat), natriumhydroxid, tvättreagens, elueringsreagens samt ett bindande reagens. Kassetterna förvarades i 2–28°C. I Xpert® TV Kit för analys av *T. vaginalis* ingick tre inbyggda kontroller; en prov-bearbetningskontroll (SPC), verifieringskontroll av humant DNA (SAC) samt en prob-kontroll (PCC). Endast ett kvalitativt integrerat svar inom systemet erhöles för kontrollerna som PASS eller FAIL.

### Panther™ System

Instrumentet som användes var Panther™ System från Hologic, tillverkad av Hologic HUB LTD, Gent, Belgien och levererad av Hologic Sweden AB, Sollentuna. Mjukvaran som användes var PANTHER Software Copyright 2010 Hologic Incorporated. Kitet som användes var Aptima™ TV Assay med sensitiviteten 0.1 TV (*T. vaginalis*) celler per milliliter där 18S-rRNA eftersöktes. Kitet är IVD/CE-godkänt. I kitet ingick olika reagenser och lösningar som blandades innan användning. Alla reagenser och lösningar rumstempererades innan beredning. Arbetsytan rengjordes två gånger med natriumhypokloritlösning på 2.5–3.5% som fick verka i ca en minut innan ytan torkades av med vatten.

Reagenser och lösningar som ingick i kitet var amplifieringsreagens som blandades med amplifieringsrekonstruktionslösning, enzymreagens blandades med enzymrekonstruktionslösning, probreagens blandades med probrekonstruktionslösning och target capture reagens B (TCR-B) blandades med TCR-reagens. Även färdigblandad selektionsreagens användes. Samtliga reagenser var frystorkade och förvarades i kyla medan lösningarna förvarades i rumstemperatur.

Kontroller tillhörande Aptima™ TV Assay var Aptima *Trichomonas vaginalis* negativ kontroll och Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll (ej smittförande). Kontrollerna analyserades var 24:e timme, vid tillblandning av nytt reagens alternativt vid insättning av urladdade kit i instrument. Innan kontroller och patientprover analyserades fick de uppnå rumstemperatur.



## Dataanalys

Mjukvaran till GeneXpert<sup>®</sup> tolkade CT-värden samt värden på kontroller (PASS/FAIL) och angav kvalitativa resultat: TV DETECTED (positivt), TV NOT DETECTED (negativt), INVALID (ogiltigt), ERROR (ogiltigt), NO RESULT (inget resultat). Panther<sup>™</sup> Systemets mjukvara tolkade RLU-värden kvalitativt och angav om provet var TRICH POS (positivt), TRICH neg (negativt) eller Invalid (ogiltigt). Integrerad analytolkning av *T. vaginalis* med total-RLU (x1000) var negativt 0 till <100, positivt 100 till <2400 och ogiltigt 0 eller  $\geq$  2400.

## Statistisk analys

För statistiska beskrivningar användes IBM SPSS version 23 (IBM Svenska AB, Stockholm, Sverige). Beskrivande statistik och grafer bearbetades fram för prevalensstudien med SPSS. Övriga tabeller samt figurer bearbetades från Excel 2016 (Microsoft Office, Washington, USA).

## Etiska överväganden

Patientproverna i prevalensstudien avkodades innan analys av *T. vaginalis* och fick separata löpnummer. De uppgifter som samlades in var provtyp (urin, vaginalsekret, cervix och uretra), kön, ålder, provets ursprung (slutenvård/öppenvård), övriga analysresultat pos/neg för *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* och *M. genitalium*. STI-proverna var överblivet patientmaterial från klinisk rutindiagnostik och omfattas av Biobankslagen (2002:297). Ingen patientinformation var spårbar, inga patienter har påverkats av studien och medför att etiskt tillstånd ej bedömdes nödvändigt för prevalensstudien. Positivt resultat för *T. vaginalis* rapporterades ej vidare.

## Resultat

### Utvärdering av Xpert® TV kit

Specificiteten visade negativa resultat för samtliga sex analyserade prover. För undersökning av sensitiviteten för Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll erhöles resultaten ogiltigt för 1:1 samt 1:100 spädning, medan positivt utfall erhöles för 1:10 med CT-värde på 38.4. Resultat för kontroll spädd i urin gav negativt för originalrör 1:1 samt spädning 1:100, 1:1000, 1:10000 och positivt för spädning 1:10 med CT-värde 37,8. AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll gav positivt resultat för 1:10 med CT-värde 22.6 samt 1:100 med CT-värde 26.0. Patientmaterial från Örebro för *T. vaginalis* gav positivt resultat med CT-värde 21.0 (se sammanfattande tabell II).

### Utvärdering av Aptima™ TV Assay

För undersökning av specificiteten visade negativa resultat för samtliga 12 analyserade prover. Gällande sensitiviteten blev resultatet negativt för koncentrationen 1:10 000 (RLU 47) samt positivt för koncentrationerna 1:1, 1:10, 1:100 och 1:1000 (RLU 1406, 1375, 1331 och 510). Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll i urin gav negativt resultat för 1:1 (endast urin) och 1:10 000 (RLU 1 och 35) samt positivt resultat för 1:10, 1:100, 1:1000 (RLU 1313, 1063, 265). AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll 1:100 och positivt patientmaterial från Örebro 1:10 gav positivt resultat (RLU 1419 samt 1486) (se sammanfattande tabell II).

Tabell II. Resultat för sensitivitetsundersökning på Panther™ System respektive GeneXpert®.

1. Aptima <i>Trichomonas vaginalis</i> positiv kontroll (Konc. 13 TV celler/ml)					
Spädning	Celler/ml	Resultat Panther™ System	RLU	Resultat GeneXpert®	CT
Originalprov	13	positiv	1406	ogiltig	-
1:10	1,3	positiv	1375	positiv	38,4
1:100	0,13	positiv	1331	ogiltig	-
1:1000	0,013	positiv	510		
1:10 000	0,0013	negativ	47		

Spädning och koncentration av Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll. Spädning skedde i Aptima Transport Medium (Panther™ System) och i eSwab (GeneXpert®)

2. AmpliRun® <i>Trichomonas vaginalis</i> DNA kontroll (Konc. 18 000 kopior/μl)					
Spädning	Kopior/μl	Resultat Panther™ System	RLU	Resultat GeneXpert®	CT
1:10	1800	positiv	1419	positiv	22,6
1:100	180			positiv	26,0
1:1000	18			positiv	27,8
1:10 000	1,8			positiv	31,3

Spädning och koncentration av AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll. Spädning skedde i Aptima Transport Medium (Panther™ System) och i eSwab (GeneXpert®)

3. Aptima <i>Trichomonas vaginalis</i> positiv kontroll + urinpool (Konc. 13 TV celler/ml)					
Spädning	Celler/ml	Resultat Panther™ System	RLU	Resultat GeneXpert®	CT
Urinpool*	0	negativ*	1	negativ*	0,0
1:10	1,3	positiv	1313	positiv	37,8
1:100	0,13	positiv	1063	negativ	0,0
1:1000	0,013	positiv	265	negativ	0,0
1:10 000	0,0013	negativ	35	negativ	0,0

Spädning och koncentration av Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll i urinpool. Spädning skedde i urin för GeneXpert®, samt i urin och Aptima Transport Medium för Panther™ System \*endast urin

4. Positivt patientmaterial, Örebro (Konc. Okänd)					
Spädning	Koncentration	Resultat Panther™ System	RLU	Resultat GeneXpert®	CT
Originalprov	Okänt	positiv	1486	positiv	21,0
1:10	Okänt				

Spädning och koncentration av positivt patientmaterial, Örebro. Analys skedde från originalrör för GeneXpert® och späddes i Aptima Transport Medium på Panther™ System.

## Prevalensstudie

### Population

Av 606 analyserade prover utgjordes 70% från kvinnor (n=424) och 30% från män (n=182). Totalt 25.2% var från slutenvård (n=153) och 74.8% från öppenvård (n=453). Totalt 67.7% (n=287) kvinnor använde sig av öppenvård och 32.3% (n=137) av slutenvård. Av männen var 90.7% (n=165) av proverna från öppenvård och 9.3% (n=17) från slutenvård.

Provmaterialet bestod av 37.6% urinprover (n=228), 47% vaginalsekret (n=285), 15% cervixprov (n=91) samt 0.3% uretraprov (n=2). Vid jämförelse mellan öppen- samt slutenvård gällande användandet av provmaterial blev fördelningen av resultaten 15.7% urinprover (n=24), 30.7% vaginalsekret (n=47), 52.9% cervixprov (n=81) samt 0.7% uretraprov (n=1) inom slutenvård. För öppenvård erhöles resultaten 45% urinprov (n=204), 52.5% vaginalsekret (n=238), 2.2% cervixprov (n=10) samt 0.2% uretraprov (n=1).

Beskrivande statistik visar att variabeln födelseår inte var normalfördelad, med ett intervall mellan år 1947 - 2003. Medianfödelseåret var år 1991 för båda könen kombinerat (n=606). Medianfödelseåret för män var år 1989 (n=182) med ett intervall mellan år 1947–2001. För kvinnor var medianfödelseåret år 1991 (n=424) och intervallet mellan år 1949–2003.

## Sexuellt överförbara infektioner

Analys för *T. vaginalis* genomfördes på samtliga 606 prover med negativt resultat för 604 analyserade prover och positivt för två. Andelen positiva är därmed 0.3% för *T. vaginalis* (se tabell III). Positivt resultat kom från kvinnor födda 1970 och 1977. Provmaterialet bestod av ett vaginalsekret från öppenvård och ett cervixprov från slutenvård. Inga patientprover var positiva för mer än en undersökt STI-parameter.

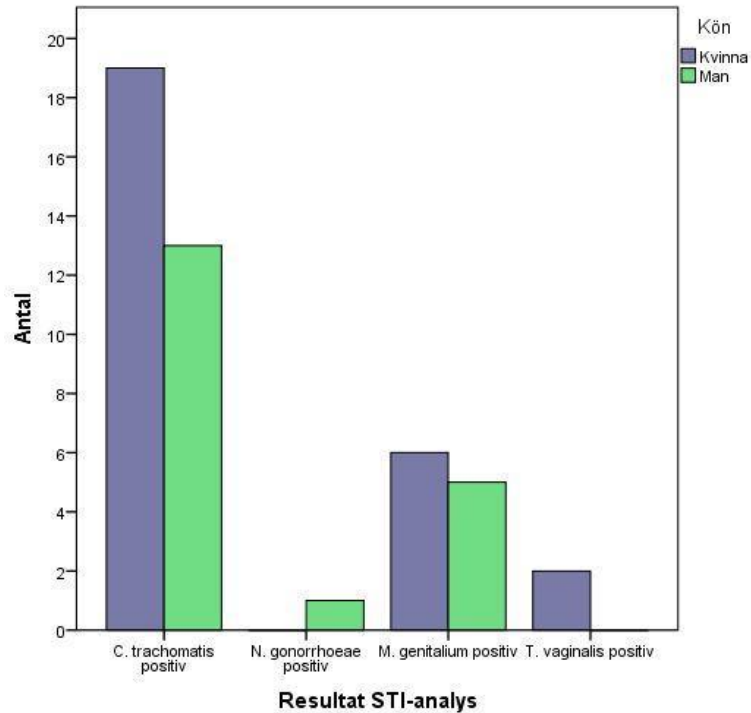
Andelen positiva för *C. trachomatis* var 5.4% (n=32) av totalt 592 rutinanalyser. Frekvensen av positiva resultat för *N. gonorrhoeae* var 0.2% (n=1) av 592 analyserade. Positiva resultat för *M. genitalium* motsvarade 9.4%(n=11) av totalt 117 analyserade inom klinisk rutin (se tabell III).

Tabell III. Fördelning av andel positiva resultat vid STI-analys av *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* samt *T. vaginalis*.

	Frekvens	Procent
<i>T. vaginalis</i>	2 (606)	0.3%
<i>C. trachomatis</i>	32 (592)	5.4%
<i>N. gonorrhoeae</i>	1 (592)	0.2%
<i>M. genitalium</i>	11 (117)	9.4%

Antal analyserade prover redogörs inom parentes.

Sammanlagt erhöles 46 positiva resultat inom STI-grupperingen. Fördelningen av totalen av de positiva resultaten presenteras i figur 3. Andelen kvinnor positiva för *C. trachomatis* var 4.5% (n=19) jämfört med män 7.1 % (n=13). Inga kvinnor visade positivt resultat för *N. gonorrhoeae*, dock 0.5% män (n=1). Fördelningen av positiva resultat för *M. genitalium* visade 2.5% (n=6) för kvinnor och 2.7% (n=5) för män. Andelen positiva för *T. vaginalis* var 0.5% (n=2) för kvinnor och 0% för män (n=0). Vid jämförelse mellan antalet STI-positiva män (n=19 av totalt 182) och kvinnor (n=27 av totalt 424) erhöles en högre procentenhet för män med 10.4% gentemot 6.4% hos kvinnor.



Figur 3. Fördelningen av totalen av 46 positiva STI-resultat mellan kvinnor och män. Andelen positiva för *C. trachomatis* var totalt n=32, *N. gonorrhoeae* totalt n=1, *M. genitalium* n=11 samt *T. vaginalis* n=2.

Positiva utfall för *T. vaginalis* gav RLU-värdena 1471 respektive 1305. Samma patientmaterial för analys på Xpert® TV Kit gav positivt utfall på båda proverna, med CT-värde 26.1 respektive 25.9.

## Diskussion

Syftet med studien är att primärt undersöka prevalensen av *Trichomonas vaginalis* i STI-prover i Västra Götalands län med Aptima™ TV Assay på Panther™ System och att sekundärt utvärdera Aptima™ TV Assay med jämförelse mot Xpert® TV Kit på GeneXpert®. Studien visar att Aptima™ TV Assay är specifik mot *T. vaginalis* samt att positiva resultat för sensitiviteten erhålls ner till koncentrationer som 0.013 celler/ml. Prevalensstudien visar att andelen positiva för *T. vaginalis* är 0.3% av 606 analyserade patientprover.

## Resultatdiskussion

### Utvärdering av Xpert® TV kit samt Aptima™ TV Assay

För specificitetundersökningen erhöles negativa resultat för samtliga bakterier, svamp och positiva patientmaterial med både Xpert® TV Kit och Aptima™ TV Assay. Resultaten var förväntade då ingen tillsats av *T. vaginalis* fanns i proverna. Resultaten styrker att respektive kit är specifika för analys av *T. vaginalis* och inte korsreagerar med andra organismer som kan förekomma i denna typ av prover.

Sensitivitetsundersökningen med Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll gav ett intressant resultat för båda kiten. Vad gäller resultatet i Xpert® TV Kit, där kontrollen späddes i eSwab, blev 1:1 och spädning 1:100 ogiltiga medan 1:10 blev positivt. Koncentrationen och därmed mängden Aptima lyseringsvätska är av vikt vid analys i Xpert® TV kit. En hög koncentration kan ge en inhiberande effekt, vilket speglar det ogiltiga resultatet som uppkom vid analys av ren Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll. När samma kontroll späddes i eSwab (1:10) erhöles däremot ett positivt resultat. Resultaten leder till att misstanken om en inhiberande faktor i provtagningsmediet bekräftas men att inhibitionen är möjlig att späda bort. När kontrollen sedan analyserades i Aptima™ TV Assay, där spädningen genomfördes i Aptima Transport Medium, blev resultatet positivt för samtliga utom 1:10 000 som blev negativt. Resultatet tyder på att Aptima™ TV Assay är känsligt ner till koncentration 1:1000, som motsvarar ca 0.013 TV celler/ml. Spädning 1:1000 och 1:10 000 genomfördes inte på Xpert® TV Kit då kitet inte har lika låg detektionsgräns som Aptima™ TV Assay, där spädning 1:10 kunde detekteras med en koncentration på ca 1.3 TV celler/ml.

Vid analys av Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll, spädd i urin, erhöles positivt resultat endast för spädning 1:10 vid analys i Xpert® TV Kit. När kontrollen späddes i urin i Aptima™ TV Assay erhöles positivt resultat för samtliga utom 1:1 (endast urin) och spädning 1:10 000 som blev negativt. Koncentrationen 1:1 var förväntat negativ då den endast innehöll urin. Spädning 1:10 000 blev negativ antagligen för att kitet inte är känsligt för den låga koncentrationen. Här visas även detektionsgränsen ligga på koncentrationen 0.013 TV celler/ml. Resultatet visar att urinen inte har en påverkan på sensitiviteten i något av kiten då resultaten är samma för samtliga koncentrationer oberoende av spädningsmedium.

AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll gav positivt resultat för båda kiten på samtliga spädningar. Det positiva resultatet för AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll analyserat i Aptima™ TV Assay var förvånande då Panther™ System analyserar RNA istället för DNA. Det positiva resultatet från Xpert® TV Kit var förväntat då systemet analyserar DNA.

Det positiva patientmaterialet från Örebro gav positivt resultat för båda kiten. Materialet var från ett Aptima Multitest Swab Specimen Collection kit för vaginalsekret och även här hade Aptima Transport Medium kunnat påverka resultatet med dess inhiberande effekt vid analys med Xpert® TV Kit. Varför det inte gjorde det kan bero på att provet innehöll en hög koncentration av *T. vaginalis*. För analys av materialet gjordes en 1:10 spädning i Aptima™ TV Assay, jämfört med originalrör (1:1) av samma material i Xpert® TV Kit. Detta genomfördes då mängden provmaterial var för liten för att kunna genomföra en analys 1:1 för båda kiten. På grund av detta går det inte dra några paralleller mellan de två parametrarna, dock konfirmerar båda ett positivt resultat vilket eftersöktes.

Samtliga kontroller och patientmaterial faller inom de detektionsgränser som respektive kit redogör för i kitmanualen. I resultatet redovisas positiva utfall för Xpert® TV Kit inom intervallet av CT-värden 21.0 upp till 38.4, där det lägsta positiva värdet erhöles för 1.3 TV celler/ml. Kitet, som redogör en sensitivitet på 2–3 celler/ml, motsvarar därmed förväntningarna. För Aptima™ TV Assay erhöles positiva resultat för RLU-värden mellan 265 - 1406. Lägsta kända koncentrationen av kontrollmaterial gavs av kontrollen Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll där 0.013 celler/ml gav positivt utslag. Därmed påvisas en lägre detektionsnivå än vad Aptima™ TV Assay redogör (0.1 celler/ml). En trend av RLU-värden som minskar går att observera i respektive kontrollspädning samtidigt som koncentrationen sjunker. Dock finns det ingen korrelation mellan RLU-värden och provets koncentration enligt produktspecifikationen för Aptima™ TV Assay, Hologic (10). Därmed kan ingen slutsats dras mellan RLU-värden och provets koncentration, däremot går det spekulera om instrumentets kit är känsligare än vad Hologic förespråkar. Slutsatsen av jämförelsen visar att Aptima™ TV Assay är känsligare än Xpert® TV Kit. En teori till utfallet är att de olika kiten analyserar olika komponenter, DNA respektive RNA.

## Prevalensstudie

De STI-prover som användes till prevalensstudien blev inte lika fördelat mellan kvinnor och män då kvinnorna var överrepresenterade. Fördelningen beräknades procentuellt till 70% kvinnor och 30% män. Inget urval skulle genomföras vid insamling av prover så fördelningen var inte planerad. Vad gäller resultatet tros det inte ha påverkats nämnvärt av den ojämna könsfördelningen då det ser ut på samma sätt i den kliniska rutinen.

I studien gjordes inte heller något urval vad gäller typ av provmaterial. Dock finns inget provmaterial verifierat för män vid analys i Panther™ System med Aptima™ TV Assay (10). Orsaken till att män trots detta inkluderades i studien var för att undvika ett urval. Möjligheten för falskt negativa resultat måste därmed redogöras. Det går inte med säkerhet garantera att ett negativt prov från en man verkligen är negativt. Positiva resultat för *T. vaginalis* kom från kvinnor, där materialet bestod av vaginalsekret och cervixprov. Ingen slutsats om Panther™ System verkligen kan hantera provmaterial från män kan därmed dras. Då ingen verifiering är genomförd för män på Aptima™ TV Assay hade ett alternativ varit att analysera provmaterial från män på GeneXpert® i Xpert® TV Kit, då det är verifierat för ändamålet.

Generellt sett ses en trend i populationen att mer kvinnor väljer att testa sig för olika könssjukdomar jämfört med män. Dock är andelen positiva av de som testar sig högre hos män än hos kvinnor. En orsak till fördelningen mellan kvinnor och män kan vara grundad i att kvinnor oftare erbjuds STI-provtagning. En spekulation är att symtom och besvär för kvinnor kan framföras hos gynekolog, barnmorska, ungdomsmottagning, medan män väljer att uppsöka

sjukvård först vid symtom eller vid smittspårning. Spekulationen kan även förklara den skeva könsfördelningen som uppstod i populationen.

I resultatet redovisas en mycket högre procentenhet av män som söker sig till öppenvård jämfört med slutenvård. För kvinnor är inte fördelningen lika avvikande. Att komma i kontakt med öppenvård anses vara lättare för patienterna, då det ofta krävs en remiss inom slutenvård. Dock ses en skillnad vid val av provtagningsmaterial inom öppen- eller slutenvård. Vaginalsekret, följt av urinprov, visade sig vara det vanligaste provtagningsmaterialet i öppenvård och cervix inom slutenvård. Skillnaden beror troligtvis på att vaginalprov och urinprov kan tas av patienten själv, medan ett cervixprov måste tas av barnmorska eller gynekolog.

Resultatet för analyserade STI-prover där en positiv *N. gonorrhoeae* kom från 592 analyserade patientprover och två positiva resultat för *T. vaginalis* där 606 patientprover analyserades. Resultatet tyder på att *T. vaginalis* är vanligare än *N. gonorrhoeae* i prevalensstudien. En slutsats om resultatet är dock svårt att fastställa då studien inte involverar en tillräcklig provmängd. Resultatet speglar dock att *T. vaginalis* möjligtvis är vanligare, alternativt lika vanlig, som *N. gonorrhoeae* i Västra Götalands län. För att kunna fastställa hypotesen om en större andel *T. vaginalis* än *N. gonorrhoeae* bör en större studie genomföras med fler antal kliniska prover. Andelen positiva resultat för *C. trachomatis* och *M. genitalium* ger däremot inga överraskande siffror och är därmed de två vanligaste förekommande könssjukdomarna i studien.

Den låga prevalensen av *T. vaginalis* i studien kan bero på många olika anledningar. En orsak till resultatet kan vara att parasiten inte finns i samma utsträckning i Sverige jämfört med i övriga delar av världen. Tidigare studier genomförda på Universitetssjukhuset i Örebro 2014 med Aptima™ TV Assay på Panther™ System visade en prevalens på 0.09% (av totalt 1211 analyserade patientprover). Det positiva patientprovet i studien var från en kvinna 38 år gammal (16). Trots en större population gavs en lägre procentenhet positiva jämfört med denna studies resultat på 0.3%. Vid jämförelse av ålder för positiva prover hamnar de ungefär i liknande åldersgrupp. Andra studier genomförda med realtids-PCR i Jönköping, 2015, påvisade en prevalens på 0.13% (av 1836 prover från STI-screen). Två patientprover blev positiva i studien från Jönköping, där båda proverna kom från kvinnor över 40 år (15). Jämfört med resultat från Jönköpings visar prevalensstudien fortfarande en högre procentenhet positivt med 0.3%. Ett samband kan visas mellan positiva resultat och en högre ålder hos kvinnor (15).

En teori om studiens låga prevalens är användandet av antibiotika. Samma typ av antibiotika kan användas mot flera typer av könssjukdomar, inklusive infektion orsakad av *T. vaginalis*. Det kan medföra att en dold infektion av *T. vaginalis* behandlas bort samtidigt som patienten behandlas för någon annan känd könssjukdom. Teorin skulle kunna passa in då patienter som har en pågående *T. vaginalis* infektion löper större risk att samtidigt drabbas av andra könssjukdomar (17, 26).

## Metoddiskussion

### Utvärdering av Xpert® TV kit samt Aptima™ TV Assay

Valet av referensstammar och interna stammar som användes representerar de bakterier som hör till normalfloran, som kan finnas i ett STI-prov. De kan orsaka problem vid analys med molekylärbiologiska metoder, såsom korsreaktion. Enligt de protokoll som redovisas av Hologic för Aptima™ TV Assay har även analys på andra arter av *Trichomonas* genomförts



(10). Anledningen till att *Trichomonas* arter inte valdes att studeras för korsreaktivitet var tillgången på material. Därmed var det endast av värde att analysera kända bakterier och svamp från normalflora för att kunna utvärdera kitens specificitet.

Vid analys i Panther™ System finns det en risk för kontamination vid höga koncentrationer, vilket kan ge falskt positiva resultat. Enligt protokoll av Hologic för Aptima™ TV Assay är kontaminationsrisken för *T. vaginalis* 0% (10). Dock kan en påverkan av bakteriers höga koncentrationer ske inom Panther™ Systemet. Det gäller framförallt stammar och isolat som har höga koncentrationer av DNA/RNA material. Enligt valideringsprotokoll för Panther™ System genomförda av Hologic är kontaminationen och korsreaktiviteten testad med bakteriell normalflora  $1 \times 10^6$  CFU/ml (10). För att minimera risken för bakteriell kontamination i studien späddes därmed respektive bakteriestam ner till 1:10 000 ( $1.5 \times 10^4$  CFU/ml) före analys. I GeneXpert® minimeras risken för kontamination då respektive prov analyseras i en separat kassett.

För sensitivitetundersökningen med Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll användes inte samma spädningar för båda kiten. Anledningen till att inte spädning 1:1000 och 1:10 000 analyserades med Xpert® TV Kit var för att kitet inte har tillräckligt hög känslighet och det ansågs inte relevant att analysera. Om det funnits fri tillgång till Xpert® TV Kit hade de två sista spädningarna varit intressanta för att se om känsligheten stämmer med vad Cepheid redovisar.

Aptima *Trichomonas vaginalis* positiv kontroll spädd i urin användes för att kunna utesluta att innehållet i urin kan påverka och inhibera analys för *T. vaginalis*. Urinen som användes innehöll därför växt av bakterier, där fyra patientprover valdes ut för att få tillräcklig mängd. Innehållet av erythrocyter, protein och leukocyter analyserades även när proverna poolats för att säkerställa att inhiberande faktorer fanns med.

Materialet av AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll var begränsat, därav kunde inte samma spädningar genomföras på båda kiten. Endas en spädning på 1:100 genomfördes på Aptima™ TV Assay då inget mer kontrollmaterial fanns tillhanda. Panther™ System kräver en större mängd material än vad som fanns tillgängligt. Ytterligare spädningar utöver 1:100 var ej planerat från start på Panther™ System, då kontrollen är av DNA-material och inte RNA som är den komponent som analyseras. Resultatet visar dock att kontrollen är möjlig att använda vilket innebär att dess innehåll bör vara både DNA och RNA, förslagsvis total nukleinsyra. Om mer material hade funnits att tillgå hade mer spädningar av AmpliRun® *Trichomonas vaginalis* DNA kontroll varit av intresse.

Det positiva patientmaterialet från Örebro räckte inte heller till båda instrumenten, därav analyserades materialet 1:1 i Xpert® TV Kit och i spädning 1:10 i Aptima™ TV Assay. Materialet användes endast som konfirmation för att säkerställa att kiten hittar *T. vaginalis* i patientprover. Koncentrationen på materialet var okänd, därav var fler spädningar ej aktuellt.

## Prevalensstudie

Aktuell vald analysmetod för prevalensstudien möjliggjorde ett stort antal prover för analys samtidigt. Om motsvarande studie hade genomförts på GeneXpert® med Xpert® TV Kit hade både materialkostnad och tidsåtgång påverkats negativt. Med Aptima Assays på Panther™ System var det genomförbart att utföra analys på redan inkommit material för klinisk rutindiagnostik på Klinisk Molekylärbiologi, Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde. Det innebär att tillgången på överblivet provmaterial var stor nog för att genomföra en studie under

en kort period. Valet av Panther™ System var därmed väl grundat och då systemet har en hög känslighet bidrog det till pålitliga resultat.

Anledningen till att inte en viss grupp av människor, kön eller ålder valdes ut till prevalensstudien var för att inte göra något specifikt urval. De prover som kom för analys till laboratoriet och som passade in på kriterierna om att komma från Västra Götalands län och där kön var känd användes i studien. Om studien skulle utökas hade mer fokus på kön och eventuella symtom kunnat räknas in vid urvalet av prover.

Inget urval gjordes gällande tidigare STI-infektioner eller utfall på resultat för *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* och *M. genitalium*. Orsaken till detta var för att kunna se tecken på dubbelinfektion i kombination med *T. vaginalis*. I framtida studier kan det vara av intresse att studera patientprover där ingen STI-infektion är påvisad trots symtom, vilket leder till ett urval av STI-positiva prover.

De två patientproverna från prevalensstudien som visade positivt resultat för *T. vaginalis* analyserades även i Xpert® TV Kit för verifiering och konfirmation. Resultatet blev positivt för de båda proverna. Det bekräftar att aktuella prover är sant positiva och att Aptima™ TV Assay är ett pålitligt kit.

## Slutsats

Utvärdering av Aptima™ TV Assay med jämförelse mot Xpert® TV Kit visar att kitet är specifikt för *T. vaginalis* samt att sensitivitetsnivån faller inom de intervall som leverantören anger.

Prevalensstudien ger indikationer att *T. vaginalis* potentiellt är av intresse vid framtida STI-utredningar där negativt utfall finns av *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* och *M. genitalium*. Procentuellt är *T. vaginalis* högre än *N. gonorrhoeae* i studien, dock kan det orsakas av slumpen. Underlaget för studien är begränsat och en slutsats om den låga prevalensen (0.3%) i Västra Götalands län kan inte dras. För att kunna dra en slutsats krävs vidare studier med en utökad population.

## **Omnämningen**

Ett tack till Klinisk Molekylärbiologi, Unilabs AB, Skaraborgs Sjukhus Skövde med personal för bistånd av instrument, material och expertis. Tack även till vår metodhandledare, Caroline Lilja, samt vår vetenskapliga handledare, Helena Enroth, för hjälp under projektets gång.

## Referenser

1. Madign M, Martinko J, Stahl D, Clark D. Brock Biology of Microorganisms. 13th ed. San Fransisco: Benjamin Cummings, 2012. p 593, 883, 909, 919, 965, 971.
2. World Health Organisation. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. [http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008\\_STI\\_estimates.pdf](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008_STI_estimates.pdf), 2008. [2017-03-14]
3. Folkhälsomyndigheten, Referensmetodik. Sjukdomsinformation om trikomonasinfektion. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittykydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/trikomonasinfektion>, 2013. [2017-03-14]
4. World Health Organisation (WHO). Sexually transmitted infections (STIs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en>, 2016. [2017-03-13]
5. Folkhälsomyndigheten, Referensmetodik. Trichomonas vaginalis-provtagning. [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Trichomonas\\_vaginalis-provtagning](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Trichomonas_vaginalis-provtagning), 2017. [2017-03-09]
6. World Health Organisation - Human Reproduction programme. Clinic-based Evaluation of Point-Of-Care Tests for the Diagnosis of Genital Chlamydial, Gonococcal and Trichomonas Infection in Women Presenting with Vaginal Discharge. [http://www.who.int/reproductivehealth/topics/rtis/Clinic-based-evaluation-POCT-NG\\_CT\\_TV\\_WOMENVVD.pdf](http://www.who.int/reproductivehealth/topics/rtis/Clinic-based-evaluation-POCT-NG_CT_TV_WOMENVVD.pdf), 2016. [2017-03-16]
7. Radonkic I, Dzamic A Mitrovic S, Arsic Arsenijevic V, Popadic D, Kranjcic Zec I. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006;126(1):116-120.
8. World Health Organisation. Report of the expert consultation and review of the latest evidence to update guidelines for the management of sexually transmitted infections. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75194/1/WHO\\_RHR\\_11.37\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75194/1/WHO_RHR_11.37_eng.pdf), 2011. [2017-03-13]
9. Cepheid. Xpert® TV Datasheet. [http://www.cephheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/6daa3141f2eec1c39d236980b6791103-Xpert-TV-Datasheet-CEIVD-3032-01.pdf](http://www.cephheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/6daa3141f2eec1c39d236980b6791103-Xpert-TV-Datasheet-CEIVD-3032-01.pdf), 2014. [2017-03-19]
10. Hologic. Aptima™ Trichomonas vaginalis Assay. [http://www.hologic.com/sites/default/files/package%20inserts/502536SV-IFU-PI\\_003\\_01.pdf](http://www.hologic.com/sites/default/files/package%20inserts/502536SV-IFU-PI_003_01.pdf), 2017. [2017-04-27]
11. Smittskyddslag (SFS 2004:168). Stockholm: Justitiedepartementet
12. Läkemedelsverket. Rekommendationer för behandling av sexuellt överförbara bakteriella infektioner. <https://lakemedelsverket.se/malgrupp/Allmanhet/Sjukdom-och-behandling/Behandlingsrekommendationer---listan/Sexuellt-overforbara-bakteriella-infektioner>, 2015. [2017-03-09]
13. STD. List of all STDs and their symptoms. [https://www.std.gov.org/stds/std\\_list.htm](https://www.std.gov.org/stds/std_list.htm), 2017. [2017-03-09]
14. Folkhälsomyndigheten. Fortsatt ökning av gonorré och syfilis. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/nyheter-och-press/nyhetsarkiv/2016/juni/fortsatt-okning-av-gonorre-och-syfilis>, 2016. [2017-03-09]
15. Gabrielsson L, Nilsson K. Detektion av *Trichomonas Vaginalis* samt *Mycoplasma genitalium* med multiplex realtids-PCR [examensarbete på internet]. Jönköping, Högskolan i Jönköping, 2015. [2017-03-18] <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:817209/FULLTEXT01.pdf>

16. Pellrud H, Golparian D, Steczkó Nilsson C, Falk M, Unemo M. *Trichomonas vaginalis* Infections are Rare Among Young Patients Attending an STI Clinic in Sweden. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(3):343-344. doi: 10.2340/00015555-1946.
17. Center for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/STD-Treatment-2010-RR5912.pdf>, 2010. [2017-03-07]
18. Petrin D, Delgaty K, Garber G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(2): 300–317.
19. Tille M P. *Baileys & Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th edition. Elsevier Mosby, St Louis 2014. p 649-651
20. Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E, Schreckenberger P, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017. p 1480-1481
21. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Sanders, 2013. p 750-751
22. Kusdian G, Woehle C, Martin WF, Gould SB. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell Microbiol.* 2013;15(10):1707-1721. doi: 10.1111/cmi.12144
23. Cudmore S, Delgaty K, Hayward-McClelland S, Petrin D, Garber G. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 783–793. doi: 10.1128/CMR.17.4.783-793.2004
24. Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R. *Campbell Biology*. 9th ed. San Fransisco: Benjamin Cummings, 2011. p 626-627.
25. Ryan C, Mehlert A, Richardson J, Ferguson M, Johnson P. Chemical Structure of *Trichomonas vaginalis* Surface Lipoglycan. *J Biol Chem.* 2011;286(47): 40494–40508. doi: 10.1074/jbc.M111.280578
26. Centers for Disease Control and Prevention. Trichomoniasis - CDC Fact Sheet. <https://www.cdc.gov/std/Trichomonas/STDFact-Trichomoniasis.htm>, 2017. [2017-03-09]
27. World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf), 2013. [2017-03-08]
28. Folkhälsomyndigheten Referensmetodik. *Trichomonas vaginalis-laboratoriediagnostik*. [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Trichomonas\\_vaginalis-laboratoriediagnostik](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Trichomonas_vaginalis-laboratoriediagnostik), 2017 [2017-03-09]
29. Folkhälsomyndigheten Referensmetodik. Bakteriell Vaginos Provtagning. [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Bakteriell\\_vaginos-provtagning](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Bakteriell_vaginos-provtagning), 2017. [2017-03-09]
30. Internt dokument Unilabs, Metodbeskrivning klinisk mikrobiologi: Metod för STI-analyser (Ct, Ng, Mh) på Panther. Dokument nr. NM24883-4
31. Panther 5.3 Operator's Manual, IVD, Swedish. Dokument nr. AW-12522-1601
32. Giachetti C, Linnen J, Kolk D, Gillotte-Taylor K, Park M, Ho-Sing-Loy M et al. Highly Sensitive Multiplex Assay for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2408-2419.
33. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013; 133(3).
34. Hong G, Lee S, Ge S, Zhou S. A Novel Low Temperature PCR Assured High-Fidelity DNA Amplification. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12853–12862. doi: 10.3390/ijms140612853
35. Lundberg G. *Grundläggande laboratoriemetodik*. 1st ed. Lund: Studentlitteratur AB, 2013. p 114.

36. Referensmetodik klinisk mikrobiologi. Realtids-PCR.  
<http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Realtids-PCR>, 2016. [2017-03-19]