



Současné problémy trichomonózy v ČR

RNDr. Erich Pazdziora, CSc.

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

**Národní referenční laboratoř
pro urogenitální trichomonózu**

Trichomonóza

- Sexuálně přenosné onemocnění vyvolané prvokem *Trichomonas vaginalis* s nejvyšší prevalencí na světě.
- Trichomonóza nepodléhá povinnému hlášení
- není sledována v databázi přenosných nemocí (EPIDAT)
- neexistují doporučení, která by určovala, kdo a jak by měl testování provádět

- většina těchto infekcí je diagnostikována přímo v ordinaci lékaře
- mnohé infekce jsou asymptomatické
- infekce *T. vaginalis* je příznakem vysoce rizikového sexuálního chování (ve světě koincidence s HIV a HPV)

Několik poznámek k výskytu a epidemiologii

- inkubační doba je 4 – 28 dní
- za 48 hodin po vniknutí trichomonád do těla hostitele vzniká infekce u 85 % žen a 70 % mužů
- již po dvou týdnech poklesne počet nakažených mužů na 33 %
- u mužů trichomonády perzistují méně než 10 dní a infekce může spontánně vymizet
- přítomnost zinku v prostatické tekutině – při vysokých hladinách Zn trichomonády hynou, kmeny rezistentní k zinku - těžké průběhy infekcí

- infekce přetrvává u žen asymptomaticky i několik let
- u téže ženy jsme prokázali v průběhu fertilního věku výskyt 17 x
- ve vzorcích moči jsou trichomonády životaschopné 30 minut
- trichomonády jsou schopné přežít kryokonzervaci spermatu - infekce přes inseminaci jsou možné
- trichomonády mohou přežívat krátkou dobu ve vlhkém prostředí v tělesných sekretech a v teplé bazénové vodě

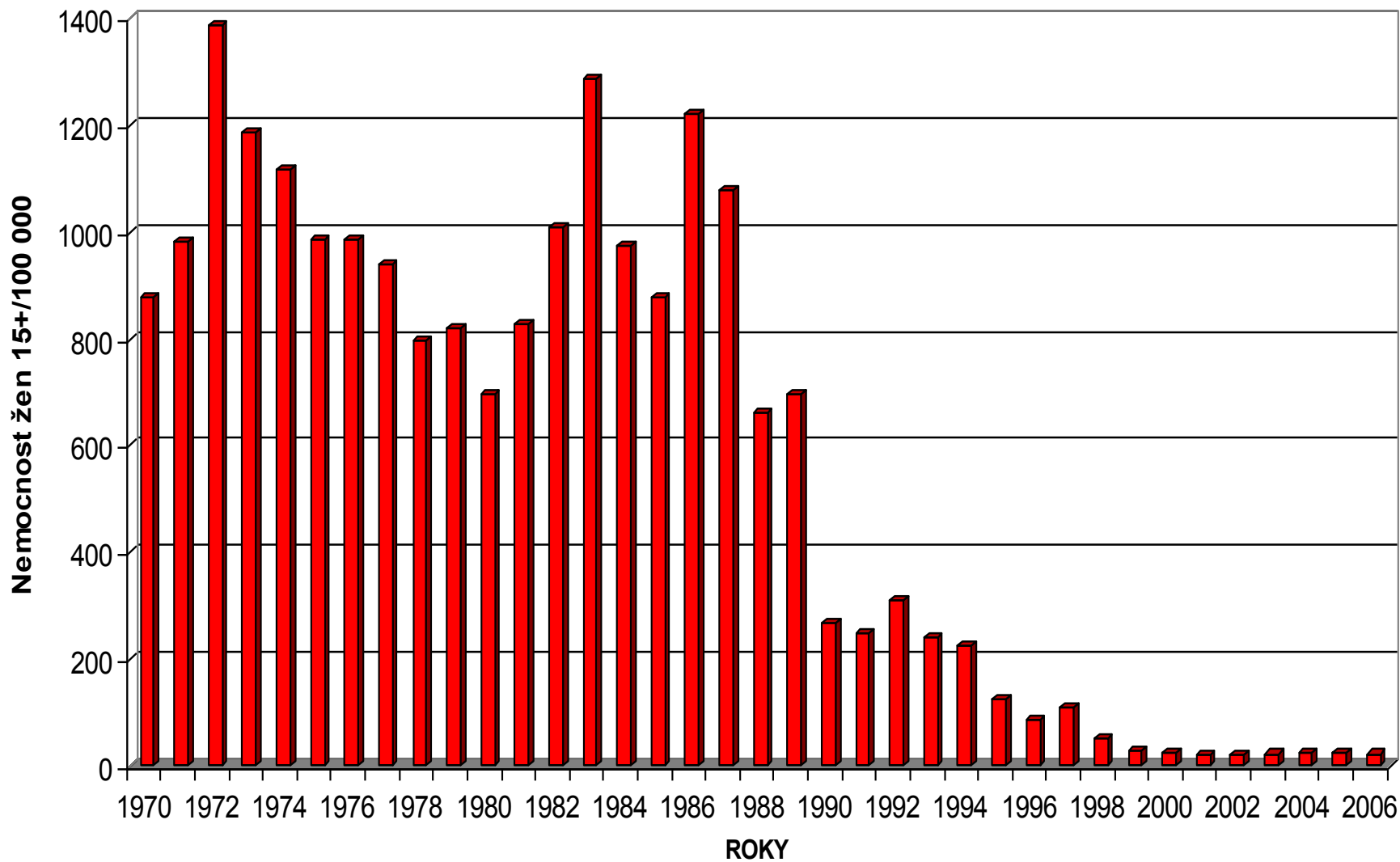
Výskyt trichomonózy v naší populaci

- Výskytu trichomonózy, zejména v populaci žen, se u nás v věnovala náležitá pozornost od šedesátých let minulého století
- diagnostikovala se z Giemsou barvených mikrobiálních obrazů poševních
- z kultivací pomocí v té době nové polotuhé Szenesovy transportní půdy

Výskyt trichomonózy v naší populaci

- ▶ *Trichomonas vaginalis* byla do konce 80. let prokazována až ve 20 % zaslaných vzorků vaginálního sekretu
- ▶ Specifická nemocnost žen se pohybovala v počtu 878 až 1385 na 100 000 žen ve věku 15+

Graf 2: Trichomonóza v modelovém okrese Nový Jičín v letech 1970 - 2006
(specifická nemocnost žen 15+/100 tisíc žen)



■ specifická nemocnost

Výskyt trichomonózy v populaci

- **Od 90. let došlo k výraznému poklesu výskytu trichomonózy v populaci**
- **V posledních 25 letech se záchytnost *Trichomonas vaginalis* v poševních sekretech pohybuje do 3 % z počtu vyšetřovaných**
- **Specifická nemocnost je mezi 63 až 81 případů na 100 tisíc žen 15+**

Pokles výskytu trichomonózy v populaci v 90. letech

– možné příčiny

- Široké používání Metronidazolu
- Změny ve způsobu diagnostiky a evidence – vznik soukromých laboratoří a pracovišť
- Zavedení komerčně připravovaných půd
- Příprava destilované vody pro kultivační půdy cestou reverzní osmózy
- Změny biologických vlastností – pokles manifestních forem

- **Za tohoto stavu výskytu nákazy v populaci a podílu inaparentních forem musí být kladeny vysoké nároky na laboratorní diagnostiku**

Srovnání diagnostických testů u žen

(podle Lawinga et al., JCM, 38(10):3585,2000)

Diagnostická metoda	Senzitivita %	Specificita %
Nativní prep. (vagina)	58,9	100
Kultivace (vagina)	94,3	100
PCR (vagina)	88,9	97,1
Nativní prep. (moč)	58,5	100
Kultivace (moč)	60,4	100
PCR (moč)	64,2	96.6

Srovnání dostupných diagnostických testů

Diagnostický test	Doba vyšetření	Senzitivita	Specificita
Nativní preparát	minuty	51 – 65 %	až 100 %
Kultivace	24 – 120 h	75 – 96 %	až 100 %
Imunochromatografický test	10 min	82 – 95 %	97 – 100 %
Nucleic acid	45 min	63 %	99,9 %
APTIMA TV Assay	hodiny	95 – 100 %	95 – 100 %
DNA amplifikace	hodiny	Není schváleno FDA	
PCR	hodiny	Není schváleno FDA	

Mikroskopická diagnostika v ordinaci

- **nativní preparát** – tvar a pohyb prvoků, senzitivita 59 %
- **mikroskopická diagnostika v zástinu**
- **barvení fixovaných preparátů:**
Giemsa - Romanowski, akridinová oranž, diferenciacie podle Schiffa a Fontana, Papanicolau - vysoká chybovost 48 %

Barvení fixovaných preparátů Giemsou

▶ TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.:

- Roztok Giemsy v hotovém pracovním ředění

Informace o výrobku:

- Roztok GIEMSA-ready slouží k barvení krevních nátěrů a je obzvláště vhodný pro vizualizaci krevních parazitů a protozoí
 - ▶ **Určen pro:**
 - ▶ **Krevní parazity: jádra jasně červená**
 - ▶ **V textu nejsou uvedeny trichomonády – barví se nedostatečně**
 - ▶ **Pro barvení trichomonád roztok Giemsy v koncentrovaném stavu (10 x) – ředí se fosfátovým pufrem 1: 10**

EHK – cesta ke zkvalitnění diagnostiky v laboratořích

- Externí hodnocení kvality mikroskopické diagnostiky trichomonád bylo zavedeno v roce 1996
- Vzorke k vyhodnocení jsou laboratořím zasílány 2 x ročně
- Do konce minulého roku proběhlo 40 kol

Poznámky k výsledkům barvených preparátů

- ▶ Výsledky ovlivňují počty trichomonád přítomných v preparátu na 100 zorných polí mikroskopu
- ▶ Většina laboratoří chybuje, obsahuje-li vzorek **méně než 13 – 17 prvoků na 100 zorných polí** při zvětšení 1000 x
- ▶ Bezchybné odečítání bylo při počtu 132 a 193 trichomonád na 100 zorných polí

Chybná diagnostika trichomonád v laboratořích

Roky	Procento laboratoří, které trichomonády v pozitivních vzorcích nenašly	Průměrné počty TV na 100 zorných polí v pozitivních vzorcích
2004 - 2007	7,9	111,3
2008 - 2011	16,3	76,0
2012 - 2014	9,5	93,0
Průměr	11,2	93,4

EHK – kolik laboratoří se zúčastňuje?

- V posledních 22 kolech průměrně 75 laboratoří
- Limit nesplnilo 5,9 % laboratoří
- **8,54 % laboratoří „diagnostikovalo“ trichomonády i ve vzorcích, v nichž prokazatelně nebyly**

Zhodnocení 22 kol EHK v letech 2004 – 2014:

- **Laboratoře při diagnostice negativních preparátů tápou a za trichomonády označují**
- leukocyty
- poškozené epiteliální buňky nebo jejich jádra
- artefakty způsobené barvením
- **Nejčastější příčinou chyb je nedostatečné barvení**

- **„Nález“ trichomonád v negativním vzorku je neshoda**
- Odečítání a hodnocení vzorků by měl provádět pouze zkušený odborník
- U morfologické mikroskopické diagnostiky budou hrát vždy rozhodující roli znalosti a zkušenosti diagnostikujícího odborníka

- Trvalým cílem externího hodnocení kvality je dosahovat srovnatelné diagnostické úrovně laboratoří
- Pravidelná účast v EHK má předcházet vzniku odchylek a neshod
- Gynekologové, kteří využívají diagnostiky v laboratořích, by se měli přesvědčit, **zda se laboratoř zúčastňuje Externího hodnocení kvality organizovaného SZÚ Praha**

Kontrola kvality půd

- NRL nabízí ověření růstu v půdách připravovaných ve varnách diagnostických laboratoří

Standardizace odběrových, transportních a kultivačních půd:

- Řešením by byly půdy vyráběné komerčně,
s nutným požadavkem dlouhodobou expirací
- Jsou však sterilizovány gama zářením

Standardizace odběrových, transportních a kultivačních půd:

- Prokázali jsme, že v takto sterilizovaných půdách vznikají rozkladem kyseliny L - askorbové produkty toxické pro trichomonády
- Potvrdilo se, že i naše připravené půdy podrobené radiační sterilizaci 25 kGy ztrácejí své původní vlastnosti a neumožňují růst kultury trichomonád

Laboratorní diagnostika

- Nejvyšší senzitivitu i specificitu má z dostupných metod kultivace trichomonád v dostatečně výživném médiu
- **Osvědčilo se médium fy Oxoid, Trichosel, Diamondovo médium TYM**
- Všechna s inaktivovaným koňským, případně beraním sérem
- **Nejvýživnější je bovinní precolostrální sérum**

Laboratorní diagnostika

- **K úspěšnému zahájení kultivace je třeba**
- **1 500 trichomonád v 5 mikrolitrech suspenze**
- V poševním sekretu odebraném tamponem nemusí být uvedený počet prvoků přítomen, takže ani odběr do kvalitní půdy nemusí vést k úspěšné kultivaci
- **Nutná je pravidelná kontrola kvality přípravy půd**

- Využívání nabídky NRL na ověření připravovaných půd - jedna z cest ke zvyšování kvality laboratorní diagnostiky

Diagnostika z kultivačních půd

- Dobře připravené půdy poskytují příznivé podmínky k růstu populace prvoků
- Exponenciální fáze růstu vrcholí u půd připravených ze základu Trichosel nejčastěji po 72 hodinách inkubace,
- v půdě Oxoid po 72 až 96 hodinách
- **Úspěšná kultivace je závislá na inokulační dávce**
- **Posuzujeme kvalitu diagnostických půd:**

**TESTOVÁNÍ PŮD – inokulační dávka 5 mikrolitrů (6 013 trichomonád)
počet prvoků při kultivaci v 1 mikrolitru půdy**

Kultivace v hodinách	Půda B 1 Trichosel 5 μ l	Půda B 2 Bio 5 μ l	Půda Ostrava Trichosel 5 μ l	Půda Ostrava Oxoid 5 μ l
24	0	7	155	26
48	8	0	635	403
72	0	0	4395	2290
96	0	0	2225	5055
120	0	0	1890	1425
144	0	0	885	530
168	0	0	90	358
192	0	0	8,5	80
216	0	0	0	0
240	0	0	0	0

**TESTOVÁNÍ PŮD – inokulační dávka 10 mikrolitrů (12 025 trichomonád)
počet prvoků při kultivaci v 1 mikrolitru půdy**

Kultivace v hodinách	Půda B 1 Trichosel 10 µl	Půda B 2 Bio 10 µl	Půda Ostrava Trichosel 10 µl	Půda Ostrava Oxoid 10 µl
24	17	14	80	26
48	2	905	370	560
72	0	4205	3525	3850
96	0	2015	2475	2765
120	0	870	530	535
144	0	486	50	210
168	0	480	14	57
192	0	126	3,3	0
216	0	35	0	0
240	0	15	0	0

**TESTOVÁNÍ PŮD – inokulační dávka 15 mikrolitrů (18 038 trichomonád)
počet prvoků při kultivaci v 1 mikrolitru půdy**

Kultivace v hodinách	Půda B 1 Trichosel 15 µl	Půda B 2 Bio 15 µl	Půda Ostrava Trichosel 15 µl	Půda Ostrava Oxoid 15 µl
24	49	12	43	59
48	115	1980	615	1450
72	99	4210	3480	4315
96	69	1660	855	5055
120	360	865	45	2035
144	389	610	8,5	435
168	735	729	0	40
192	833	753	0	0
216	482	692	0	0
240	337	701	0	0

Přímý průkaz antigenu *Trichomonas vaginalis*

Imunochromatografické testy

- Imunochromatografické testy neboli LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay) se staly fenoménem poslední doby pro detekci rozličných analytů
- **TRICHOMONAS CARD (Swab Specimen)**
Inter Medical, s. r. l., Italy
- C-95 One Step Trichomonas Test Device –
Imunochromatografické stanovení přítomnosti antigenu trichomonád

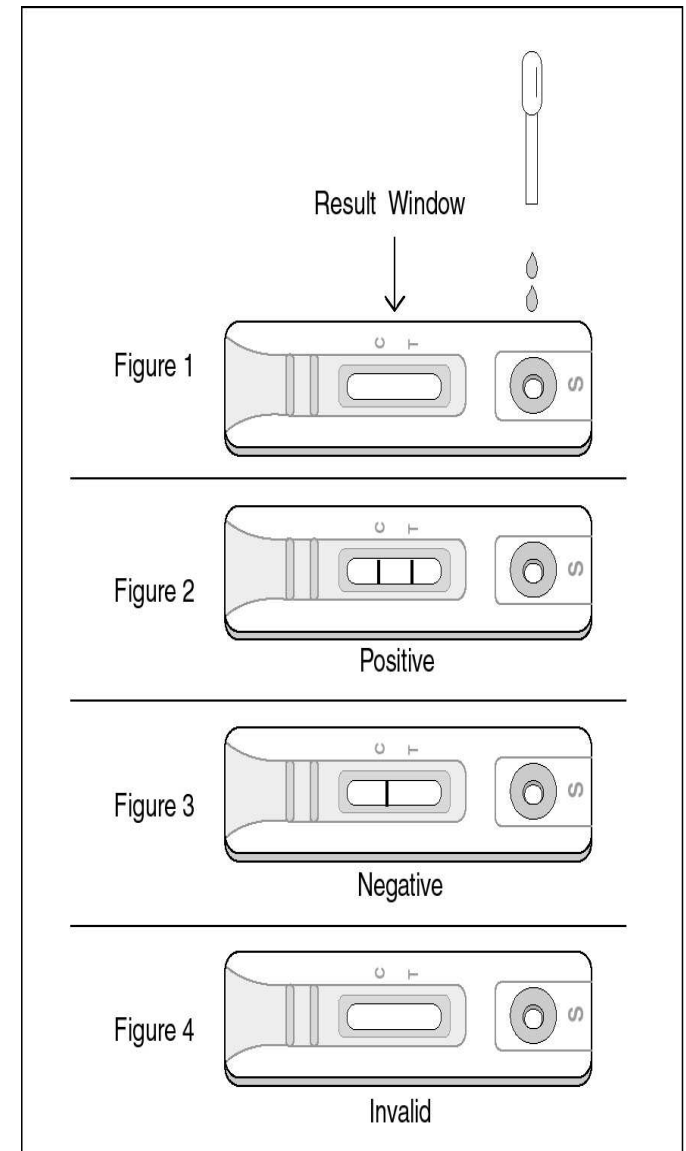
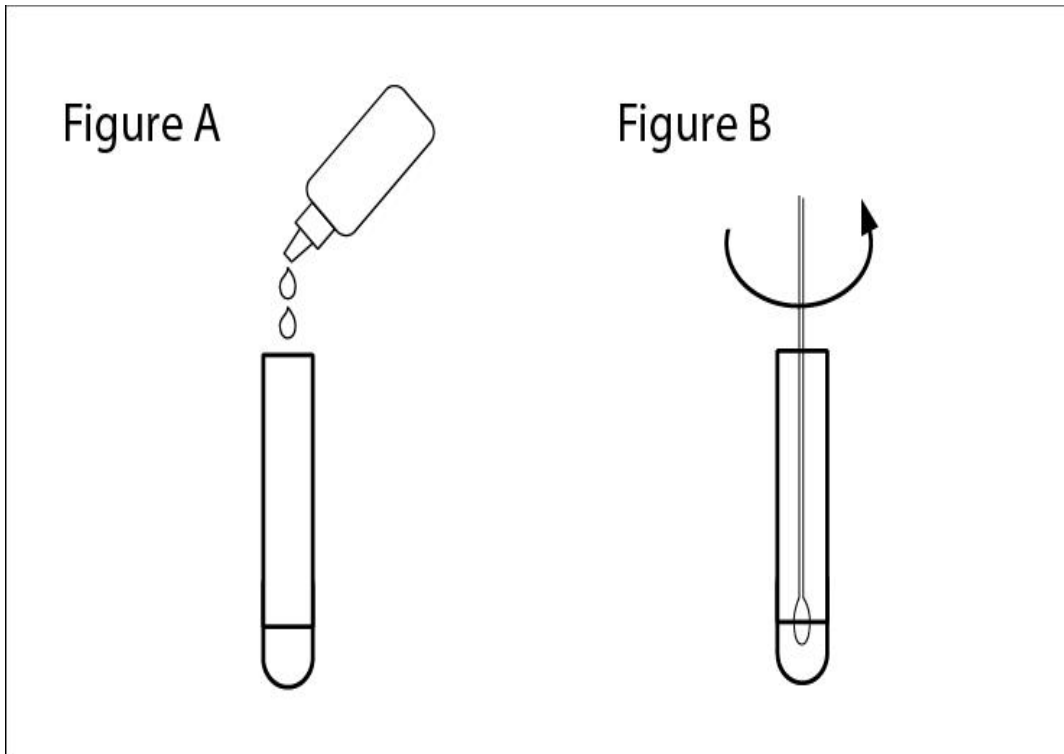
Imunochromatografický test

- Antigen přítomný ve vzorku reaguje s konjugátem za vzniku komplexu antigen-konjugát
- ten migruje směrem ke specifickému proteinu umístěnému na porézní membráně z nitrocelulózy
- **Je-li ve vzorku přítomen antigen, vznikne v místě navázání komplexu antigen-konjugát na imobilizovaný protein specifický band signalizující pozitivní výsledek**

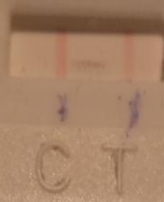
TRICHOMONAS CARD (Swab Specimen)

Inter Medical, s. r. l., Italy

Poševní sekret do extrakčního pufru



16.4.13
Kone
TV



3 1:10
A H2O
E. lipo



Senzitivita imunochromatografického testu

Trichomonády v neředěné kultuře počet v 1 μ l	Trichomonády v ředěné kultuře	Počet trichomonád v 1 μ l ředěné kultury	Průkaz antigenu Trichomonas vaginalis
4325	1:2	1900	pozitivní
	1:4	750	pozitivní
2245	1:3	748	pozitivní
	1:10	363	negativní
2155	1:5	149	negativní
1565	1:5	450	pozitivní
4770	1:10	805	pozitivní
	1:20	208	negativní
	1:30	23	negativní
4870	1:10	1295	pozitivní
4780	1:10	807	pozitivní

Závěr

- Problémy s barvením trichomonád limitují kvalitu mikroskopické diagnostiky v ordinacích i v našich laboratořích
- Nedostatky v přípravě kultivačních půd v řadě laboratoří významně snižují záchytnost trichomonád
- Průkaz antigenu imunochromatografickou metodou může mít zásadní přínos v dostupnosti diagnostiky, v jejím zjednodušení a ve zvýšení spolehlivosti používaných diagnostických metod v gynekologických ordinacích

Děkuji za pozornost

