

## 10. Samenvatting

Laura van Dommelen

In dit proefschrift worden een aantal aspecten van de *Chlamydia trachomatis* (Ct) en *Treponema pallidum* (Tp) diagnostiek onder de loep genomen met als doel deze te verbeteren in verschillende opzichten.

In [hoofdstuk 1](#) wordt op basis van beschikbare literatuur uiteengezet wat de impact is van seksueel overdraagbare aandoeningen (SOA) in globaal opzicht en gefocust op de Nederlandse setting. Tevens wordt er dieper ingegaan op de ziektebeelden veroorzaakt door Ct en Tp. De WHO schatte dat in 2008 wereldwijd bijna een half miljard mensen besmet zijn geraakt met Tp, *Neisseria gonorrhoeae* (Ng), Ct en *Trichomonas vaginalis* (Tv). Dit zijn allemaal behandelbare infecties.<sup>1</sup> In dit proefschrift ligt de nadruk op Tp, de veroorzaker van syfilis (lues) en Ct. Syfilis tijdens de zwangerschap kan leiden tot foetaal en neonataal overlijden. Dit is een groot probleem in ontwikkelingslanden, terwijl screening en behandeling van syfilis tezamen slechts \$1.5 per persoon kost.<sup>2</sup> Ook Ct infecties kunnen zorgen voor gecompliceerde aandoeningen, zoals ‘pelvic inflammatory disease’ (ontsteking van de baarmoeder en eierstokken). Een ander probleem is dat een infectie met Ct vaak asymptomatisch verloopt. Desondanks kan er sprake kan zijn van een (chronische) infectie welke kan leiden tot onvruchtbaarheid.<sup>3</sup> Het asymptomatisch verloop is tevens een reden waarom Ct zich zo makkelijk verspreidt. Bij seksueel contact raakt gemiddeld 70% van de partners besmet met Ct.<sup>4-6</sup>

Ook in Nederland komen SOA veel voor, met name bij jongeren onder de 25 jaar oud, mannen die seks hebben met mannen (MSM) en bij van oorsprong Surinaamse en Antilliaanse Nederlanders.<sup>7</sup> Ct is de meest voorkomende bacteriële SOA in Nederland. Bij de GGD werd in 2011 gemiddeld 11.5% van de cliënten positief getest voor Ct infectie. Bij Ng lag dit percentage op 3.2%. Syfilis is relatief zeldzaam met slechts 476 gerapporteerde infecties in 2011 en wordt voornamelijk gevonden bij MSM (90% van het totaal aantal infecties).<sup>7</sup> De meeste SOA gerelateerde consulten vinden plaats bij de huisarts (63%) en de overigen bij de GGD.<sup>8</sup> In Nederland wordt er op de SOA polikliniek van de GGD standaard getest op Ct, Ng, syfilis en humaan immunodeficiëntie virus (HIV). Bij jongeren onder 25 jaar zonder risicofactoren wordt er alleen op Ct getest.

Er is veel onderzoek gedaan naar welk materiaal bij vrouwen het meest geschikt is om Ct te diagnosticeren.<sup>9-14</sup> Inmiddels is helder dat een zelf afgenomen vaginale uitstrijk (SVS) even geschikt is als een cervicale uitstrijk genomen door een zorgverlener. Daarnaast kan urine gebruikt worden, maar dit is wat minder gevoelig ten opzichte van eerder genoemde materialen voor het diagnosticeren van een Ct infectie bij vrouwen. Desalniettemin blijft de vraag of er bij vrouwen mogelijk een Ct urethritis (urineweginfectie) kan worden gemist als er enkel op cervicaal of vaginaal materiaal wordt getest. Aangezien het testen van een SVS en urine niet kosteneffectief is<sup>15</sup>, hebben wij gekeken of het combineren van een SVS met urine in een enkele test een toegevoegde waarde heeft ten opzichte van een SVS. In [hoofdstuk 2](#) laten we zien dat het combineren van urine met een SVS bij vrouwen niet resulteert in een hogere gevoeligheid: de sensitiviteit is in beide gevallen 94%. Een SVS blijft bij vrouwen dus het materiaal van keuze voor het diagnosticeren van een Ct infectie.

[Hoofdstuk 3](#) behandelt een bijzonder deel in de geschiedenis van Ct detectie, namelijk de detectie van de ‘Swedish variant’ Ct (swCt) of ‘new variant’ Ct. In Halland County, Zweden, werd in 2006 vermoed dat er een nieuwe Ct stam in omloop was nadat er een 25% afname in incidentie was geconstateerd.<sup>16</sup> Deze stam bleek niet te worden opgepikt door de

commerciële nucleïne zuur amplificatie testen (NAAT) die op dat moment het meest gebruikt werden, vanwege een deletie in het 'cryptic' plasmide, en daarom was een gerichte NAAT voor de betreffende stam nodig. Wij hebben een 'real-time' polymerase ketting reactie (PCR) ontwikkeld die gericht is op het gebied rondom de betreffende deletie. Met gebruikmaking van deze nieuwe NAAT zijn verschillende materialen uit Nederland en Rusland getest, maar er werd geen swCt gedetecteerd. Ook in andere studies wordt, buiten Scandinavië, nauwelijks de swCt gezien.<sup>17,18</sup>

In [hoofdstuk 4](#) hebben we de Ct Detection and genoTyping Kit (Ct-DT; Labo Bio-medical Products B.V., Rijswijk, Nederland) en de COBAS Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics Systems, Basel, Zwitserland) vergeleken ten aanzien van de detectie van Ct bij vrouwen. De COBAS Amplicor CT/NG grijpt aan op 1 punt van een mobiel stuk DNA van Ct ('cryptic plasmid'). De Ct-DT daarentegen grijpt aan op 2 verschillende punten in het genetisch materiaal van Ct: de 'cryptic' plasmide en het *Omp1* gen. Ook kunnen met de Ct-DT dubbelinfecties met verschillende typen Ct worden gedetecteerd. Dit kan van belang zijn om bijvoorbeeld onderscheid te kunnen maken tussen een persisterende en een nieuwe Ct infectie. Tevens zouden met de Ct-DT eventuele stammen zonder plasmide kunnen worden aangetoond, welke zijn beschreven in de literatuur.<sup>19,20</sup> Uit onze evaluatie bleek dat de Ct-DT een hele gevoelige test is, vergelijkbaar met de COBAS Amplicor CT/NG, en dat er inderdaad dubbelinfecties worden opgepikt. Er zijn geen Ct stammen zonder plasmide aangetoond in onze studie.

Hoewel binnen de medische microbiologie in sommige gevallen de tijd lijkt stil te staan, gaan anderzijds de ontwikkelingen heel hard. Een voorbeeld van dat laatste zijn de sneltesten of 'point-of-care' testen die meestal binnen een kwartier aan kunnen geven of iemand wel of niet een infectie heeft. In [hoofdstuk 5](#) laten we de resultaten zien van de evaluatie van verschillende Ct sneltesten. Deze waren bij aanvang van de studie (deels) vrij verkrijgbaar via internet en hadden allemaal een CE-markering (Conformitée Européenne). Een goede sneltest zou een bijdrage kunnen leveren aan het verminderen van de verspreiding van Ct, omdat geïnfecteerde patiënten meteen behandeld kunnen worden. Tevens kan een sneltest overal worden uitgevoerd, ook op plekken waar bijvoorbeeld geen elektriciteit is, en dit zou dus een enorme impact kunnen hebben op de diagnostische mogelijkheden in ontwikkelingslanden waar nu geen Ct diagnostiek plaatsvindt. Hoewel niet geheel onverwacht, waren de resultaten helaas dramatisch slecht: de gevoeligheid van de Ct sneltesten liep uiteen tussen de 12% en 27%. Volgens de WHO moet een sneltest minimaal een gevoeligheid hebben van 43% om toegevoegde waarde te hebben in een klinische setting. Tot nu toe is er geen overtuigend bewijs dat er een Ct sneltest is die hier aan voldoet.<sup>21-24</sup>

In [hoofdstuk 6](#) wordt de evaluatie van een syfilis sneltest en een aantal ‘enzyme-linked immunoassays’ (ELISA) geëvalueerd. Al deze testen detecteren antilichamen tegen Tp en kunnen geen onderscheid maken tussen een actieve, een latente of een reeds behandelde syfilis infectie. Daarvoor is aanvullende diagnostiek vereist (e.g. ‘non-treponemale’ testen). De sneltest bleek een gevoeligheid van 92% en een specificiteit van 79% en voldoet daarmee niet aan de criteria die de WHO stelt (namelijk een specificiteit van minimaal 93%). In de praktijk bleek het resultaat van de sneltest ook soms moeilijk te interpreteren: er werd enkel een dubieus streepje gezien en geen duidelijke lijn. De ELISA kwamen er in de evaluatie goed uit ten opzichte van de agglutinatie test die voorheen werd gedaan. Het voordeel van een ELISA is de mogelijkheid om deze uit te voeren op een apparaat, hetgeen minder arbeidsintensief en foutgevoelig is dan het handmatig inzetten van een test.

De sera die zijn gebruikt voor de studie beschreven in [hoofdstuk 6](#) komen uit een biobank: een collectie vriezers waarin allerlei patiëntenmateriaal en micro-organismen kunnen worden opgeslagen ten behoeve van wetenschappelijk onderzoek. Bij de evaluatie van een diagnostische test wordt er vaak gebruik gemaakt van opgeslagen materialen omdat dit makkelijker is dan prospectief materiaal te verzamelen. In de in hoofdstuk 6 beschreven evaluatie werd er gebruik gemaakt van sera van patiënten waarvan bekend was of ze wel of geen syfilis hadden (doorgemaakt) en van patiënten die geen syfilis hadden, maar wel een aandoening die zou kunnen storen in de syfilis diagnostiek, zoals de ziekte van Lyme, een HIV infectie of een autoimmuunaandoening. Door de gebruikte strategie, was het percentage syfilis positieve samples in de studie 44%, terwijl de prevalentie onder de Nederlandse bevolking slechts 0.2% is bij zwangeren, tot 2.3% bij MSM.<sup>7</sup>

Na implementatie van de Biolisa Syphilis 3.0 (Biokit SA, Barcelona, Spain), een van de ELISA geëvalueerd in hoofdstuk 6, werden er veel vals positieve resultaten gezien, terwijl dit niet werd gezien in de initiële evaluatie. Daarom is besloten om de verzamelde resultaten na implementatie van de nieuwe test, te vergelijken met de resultaten in de eerste evaluatie en de resultaten daarvan staan in [hoofdstuk 7](#). Bij elke diagnostische test komen vals positieve resultaten voor, bijvoorbeeld door kruisreactiviteit. Het aantal vals positieve resultaten staat los van het aantal echt positieve resultaten (“true positives”). Dit betekent dat bij een lage prevalentie van een ziekte, zoals bij syfilis, de positief voorspellende waarde van een test over het algemeen lager is dan bij een test voor een aandoening die veel voorkomt. Wat onze studie liet zien, was dat de specificiteit van de test die we geïmplementeerd hadden heel stabiel was bij verschillende aannames en bij verschillende patiëntengroepen. De relatief lagere positief voorspellende waarde gevonden bij de herevaluatie is dus inderdaad te wijten aan een lagere syfilis prevalentie in de geteste populatie. De eerder gevonden specificiteit van de test werd bevestigd.

Hoofdstuk 8 behandelt de stabiliteit van Ct DNA. Zoals aangegeven in de voorgaande alinea wordt er bij de evaluatie van diagnostische testen vaak gebruikt gemaakt van materiaal uit een biobank. Met betrekking tot *Chlamydia* spp. is er in het verleden enkel gekeken naar de levensvatbaarheid van het micro organisme (e.g. de mogelijkheid tot opkweken)<sup>25-28</sup>, het is echter niet bekend hoe stabiel Ct DNA is als het opgeslagen wordt onder verschillende omstandigheden. Dit kan echter wel de uitkomst van een evaluatie van een NAAT bepalen indien een nieuwe test op reeds langdurig ingevroren materiaal wordt uitgevoerd en wordt vergeleken met een NAAT die op ‘vers’ materiaal gedaan is. In onze studie opzet bleek dat Ct relatief stabiel in bij verschillende bewaarcondities en voor langere duur (2 jaar). Desalniettemin kan niet uitgesloten worden dat materialen met een lage hoeveelheid Ct DNA na langer bewaren negatief worden, terwijl initieel positief getest.

De bestrijding van SOA is volgens het Centers for Disease Control and Prevention (CDC) gebaseerd op 5 pijlers: educatie en counseling van risicopopulaties om risicogedrag te voorkomen; identificatie van (asymptotisch) geïnfecteerde personen; adequate diagnostiek en behandeling van SOA; partnerwaarschuwing, behandeling en counseling; vaccinatie van populaties tegen SOA die met vaccinatie voorkomen kunnen worden.<sup>29</sup> T.a.v. syfilis is de grootste uitdaging het bereiken van de populatie die het meeste risico loopt, m.n. in ontwikkelingslanden.<sup>1,2</sup> Bij Ct is het probleem meer complex. Ondanks alle inspanningen stijgt de prevalentie van Ct in Westerse landen, waaronder in Nederland.<sup>7</sup> Het blijkt dat de mensen die het meeste risico lopen op Ct, het moeilijkst te bereiken zijn voor de gezondheidszorg en dat actief screenen op Ct geen effect heeft op de prevalentie.<sup>30,31</sup> Desondanks blijft het belangrijk om de populatie ‘at risk’ te identificeren, te testen op SOA en te behandelen.

Ondanks dat er reeds heel veel bekend is Ct, is er nog veel wat niet bekend is. Waarom krijgen sommige vrouwen bijvoorbeeld wel klachten en andere vrouwen niet? Het immuunsysteem speelt hierbij een grote rol en het verschil in klachten kan dus mogelijk verklaard worden op basis van ons (humaan) erfelijk materiaal.<sup>32-34</sup> Door ‘whole genome sequencing’, komen we ook steeds meer te weten over Ct, wat inzicht kan geven in de pathogenese en epidemiologie.<sup>35</sup> Ook de microbiële flora van het menselijk lichaam wordt steeds beter in kaart gebracht en de vraag is welke rol bijvoorbeeld het vaginale microbioom speelt bij een Ct infectie.<sup>36</sup> Naast deze zijn er nog tal van andere onbeantwoorde vragen. Goede diagnostische testen en de juiste interpretatie ervan zijn een belangrijk gereedschap om meer inzicht te krijgen in de verschillende infecties om ze daarmee uiteindelijk te kunnen bestrijden.

## REFERENTIES

1. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008 World Health Organization, 2012.
2. Advancing MDG 4, 5 and 6: impact of congenital syphilis elimination: World Health Organization, 2010.
3. Carey AJ, Beagley KW. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):576-86.
4. Markos AR. The concordance of *Chlamydia trachomatis* genital infection between sexual partners, in the era of nucleic acid testing. *Sex Health* 2005;2(1):23-4.
5. Rogers SM, Miller WC, Turner CF, Ellen J, Zenilman J, Rothman R, et al. Concordance of *chlamydia trachomatis* infections within sexual partnerships. *Sex Transm Infect* 2008;84(1):23-8.
6. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, Bobo L, Hook EW, 3rd, Viscidi R, et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. *Jama* 1996;276(21):1737-42.
7. S.C.M. Trienekens FDHK, I.V.F. van den Broek, H.J. Vriend, E.L.M. Op de Coul, M.G. van Veen, A.I. van Sighem, I. Stirbu-Wagner, M.A.B. van der Sande. Sexually transmitted infections, including HIV, in the Netherlands in 2011: National Institute for Public Health and the Environment, 2012.
8. van Bergen JE, Kerssens JJ, Schellevis FG, Sandfort TG, Coenen TJ, Bindels PJ. Prevalence of STI related consultations in general practice: results from the second Dutch National Survey of General Practice. *Br J Gen Pract* 2006;56(523):104-9.
9. Hoebe CJ, Rademaker CW, Brouwers EE, ter Waarbeek HL, van Bergen JE. Acceptability of self-taken vaginal swabs and first-catch urine samples for the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with an amplified DNA assay in young women attending a public health sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis* 2006;33(8):491-5.
10. Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, Fine PM, Martin DH, Fuller D, et al. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis* 2005;32(12):725-8.
11. Michel CE, Sonnex C, Carne CA, White JA, Magbanua JP, Nadala EC, Jr., et al. *Chlamydia trachomatis* load at matched anatomic sites: implications for screening strategies. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1395-402.
12. Skidmore S, Horner P, Herring A, Sell J, Paul I, Thomas J, et al. Vulvovaginal-swab or first-catch urine specimen to detect *Chlamydia trachomatis* in women in a community setting? *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4389-94.
13. Shafer MA, Moncada J, Boyer CB, Betsinger K, Flinn SD, Schachter J. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4395-9.
14. Schoeman SA, Stewart CM, Booth RA, Smith SD, Wilcox MH, Wilson JD. Assessment of best single sample for finding *chlamydia* in women with and without symptoms: a diagnostic test study. *Bmj* 2012;345:e8013.
15. Blake DR, Maldeis N, Barnes MR, Hardick A, Quinn TC, Gaydos CA. Cost-effectiveness of screening strategies for *Chlamydia trachomatis* using cervical swabs, urine, and self-obtained vaginal swabs in a sexually transmitted disease clinic setting. *Sex Transm Dis* 2008;35(7):649-55.
16. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006;11(11):E061109 2.
17. Fieser N, Simnacher U, Tausch Y, Werner-Belak S, Ladenburger-Strauss S, von Baum H, et al. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany. *Infection* 2013;41(1):159-66.
18. Shipitsyna E, Hadad R, Ryzhkova O, Savicheva A, Domeika M, Unemo M. First reported case of the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) in Eastern Europe (Russia), and evaluation of Russian nucleic acid amplification tests regarding their ability to detect nvCT. *Acta Derm Venereol* 2012;92(3):330-1.

19. An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, et al. Infection with a plasmid-free variant *Chlamydia* related to *Chlamydia trachomatis* identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *J Clin Microbiol* 1992;30(11):2814-21.
20. Magbanua JP, Goh BT, Michel CE, Aguirre-Andreasen A, Alexander S, Ushiro-Lumb I, et al. *Chlamydia trachomatis* variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterisation and failure of single dose azithromycin. *Sex Transm Infect* 2007;83(4):339-43.
21. Saison F, Mahilum-Tapay L, Michel CE, Buttress ND, Nadala EC, Jr., Magbanua JP, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among low- and high-risk Filipino women and performance of *Chlamydia* rapid tests in resource-limited settings. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):4011-7.
22. Nadala EC, Goh BT, Magbanua JP, Barber P, Swain A, Alexander S, et al. Performance evaluation of a new rapid urine test for *chlamydia* in men: prospective cohort study. *Bmj* 2009;339:b2655.
23. Mahilum-Tapay L, Laitila V, Wawrzyniak JJ, Lee HH, Alexander S, Ison C, et al. New point of care *Chlamydia* Rapid Test--bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study. *Bmj* 2007;335(7631):1190-4.
24. van der Helm JJ, Sabajo LO, Grunberg AW, Morre SA, Speksnijder AG, de Vries HJ. Point-of-care test for detection of urogenital *chlamydia* in women shows low sensitivity. A performance evaluation study in two clinics in Suriname. *PLoS One* 2012;7(2):e32122.
25. Eley A, Geary I, Bahador A, Hakimi H. Effect of storage temperature on survival of *Chlamydia trachomatis* after lyophilization. *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2577-8.
26. Maass M, Dalhoff K. Transport and storage conditions for cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1793-6.
27. Mahony JB, Chernesky MA. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985;22(5):865-7.
28. Tjiam KH, van Heijst BY, de Roo JC, de Beer A, van Joost T, Michel MF, et al. Survival of *Chlamydia trachomatis* in different transport media and at different temperatures: diagnostic implications. *Br J Vener Dis* 1984;60(2):92-4.
29. Workowski KA, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59(RR-12):1-110.
30. Op de Coul EL, Gotz HM, van Bergen JE, Fennema JS, Hoebe CJ, Koekenbier RH, et al. Who participates in the Dutch *Chlamydia* screening? A study on demographic and behavioral correlates of participation and positivity. *Sex Transm Dis* 2012;39(2):97-103.
31. van den Broek IV, van Bergen JE, Brouwers EE, Fennema JS, Gotz HM, Hoebe CJ, et al. Effectiveness of yearly, register based screening for *chlamydia* in the Netherlands: controlled trial with randomised stepped wedge implementation. *Bmj*;345:e4316.
32. Agrawal T, Gupta R, Dutta R, Srivastava P, Bhengraj AR, Salhan S, et al. Protective or pathogenic immune response to genital *chlamydial* infection in women--a possible role of cytokine secretion profile of cervical mucosal cells. *Clin Immunol* 2009;130(3):347-54.
33. Bailey RL, Natividad-Sancho A, Fowler A, Peeling RW, Mabey DC, Whittle HC, et al. Host genetic contribution to the cellular immune response to *Chlamydia trachomatis*: Heritability estimate from a Gambian twin study. *Drugs Today (Barc)* 2009;45 Suppl B:45-50.
34. Morre SA, Karimi O, Ouburg S. *Chlamydia trachomatis*: identification of susceptibility markers for ocular and sexually transmitted infection by immunogenetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55(2):140-53.
35. Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HM, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 2012;44(4):413-9, S1.
36. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One* 2012;7(6):e37818.