

Cutaneous leishmaniasis

New developments in diagnosis and treatment evaluation

Thesis by **Wenda Frederika van der Meide**

promotor: Prof. dr. W.R. Faber,

co-promotor: Dr. H.D.F.H. Schallig

Faculty of Medicine. University of Amsterdam and Royal Tropical Institute, Department of
Parasitology, Amsterdam
The Netherlands

Date: 25 January 2008.

Summary

Currently, there is a clear and disturbing increase in the number of cutaneous leishmaniasis (CL) patients worldwide. CL ranges from single to many large skin ulcers to the development of mucosal lesions (muco-cutaneous leishmaniasis), leading to progressive destruction of the nasopharynx and invasion of the respiratory tract. Although CL is not lethal, CL control is very important to prevent serious morbidity. CL control currently depends on early and accurate diagnosis and treatment. However, the diagnosis of leishmaniasis remains problematic. Moreover, many, mostly uncontrolled, treatment schemes are employed with varying success. Up to this date the duration of treatment and definition of cure have been based on pure clinical criteria. Therefore, it is important to determine the number of parasites in a lesion before, during and after treatment as accurate as possible in order to assess the outcome of treatment. This thesis describes the development and evaluation of new tools for the diagnosis of CL, and for the determination of the duration and efficacy of treatment.

The Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (QT-NASBA) technology was developed and evaluated to detect and quantify *Leishmania* parasites in skin biopsies from CL patients. The assay is based on the detection of a small subunit ribosomal RNA (18S rRNA). The QT-NASBA assay was able to quantify 2 – 11,300,000 parasites per biopsy and test evaluation revealed that the assay had a sensitivity of 97.5% and a specificity of 100% [Chapter 2]. Furthermore, this assay proved to be a valuable instrument for monitoring therapy response of CL and could help in predicting clinical outcome. Positive QT-NASBA results 6 weeks after treatment were significantly associated with treatment failure/delayed healing up to 6 months after treatment [Chapter 3].

Additionally, the QT-NASBA assay was compared with two other molecular assays, the real-time Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR) and real-time PCR (qPCR). The qRT-PCR was developed on the basis of the same gene sequences as QT-NASBA. All three assay were compared for the detection and quantification of *Leishmania* parasites in *in vitro* parasite samples and skin biopsy samples from confirmed CL patients. Additionally, a cost, time efficiency and user-friendliness analysis was done. While the three assays performed equally well in skin biopsy samples from CL patients, QT-NASBA and qRT-PCR had a detection limit of 100 parasites/ml of blood, while qPCR detected 1,000 parasites/ml. Overall, the qRT-PCR was preferred over QT-

NASBA and qPCR, since it was highly sensitive and reproducible but also had a fast procedure time [Chapter 4].

As molecular tools may not be readily applicable under field conditions a serological tool for diagnostic purposes was also developed and evaluated. In Suriname and the north of Brazil > 90% of the patients are infected with *Leishmania (Viannia) guyanensis*, but serological assays for CL are often based on antigens from other species. In Chapter 8 *L. (V.) guyanensis* antigen was compared with different antigens in an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in proven *L. (V.) guyanensis* infected CL patients. The use of *L. (V.) guyanensis* antigen improved the assay significantly in comparison with other antigens, as *L. (V.) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* and *L. (L.) chagasi*. For this reason our data are of great importance to improve the efficacy of serological diagnostic tests for CL.

Another part of the research for this thesis was conducted in Suriname. In this country Pentamidine Isethionate (PI) is the only available drug for treatment of CL. Recently, local dermatologists have observed an increase in CL patients not responding adequately to standard treatment. With QT-NASBA, we measured parasite loads during and after treatment with PI. We found that treatment compliance was very low; half of CL patients were treated inadequately. Furthermore, a lower cure rate (76% - 78%) was estimated than previously observed between 1994 and 2000 (90%). For this reason, a much shorter treatment protocol was recommended to improve inadequate compliance and efficacy of treatment [Chapter 5].

In addition, risk factors seem to be increasing in Suriname due to deforestation, gold mining activities and migration of immigrant workers. While only *L. (V.) guyanensis* is described as causing species, different clinical manifestations are seen, suggesting that other *Leishmania* species are responsible for CL disease in Suriname. With PCR-RFLP (Restriction Fragment Lengths Polymorphism) the majority of the infecting *Leishmania* species was identified as *L. (V.) guyanensis*, while also *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) lainsoni* were found [Chapter 7]. The *L. (L.) amazonensis* infected patient did not respond to standard treatment with PI, and other medication was donated [Chapter 6]. Furthermore, the annual incidence rate over 2006 was estimated as 5.32 to 6.13 CL patients per 1,000 inhabitants for the forested hinterland and 0.64 to 0.74 patients per 1,000 inhabitants for the whole country.

Samenvatting

Wereldwijd is er een duidelijke en verontrustende toename in het aantal cutane leishmaniasis (CL) patiënten. CL kan variëren van een enkele tot meerdere huidzweren met uitbreiding naar de slijmvliezen (muco-cutane leishmaniasis), hetgeen kan leiden tot ernstige aantasting van het kraakbeen van neus en mond, en wat zich kan uitbreiden tot in de keelholte. Hoewel CL geen dodelijke ziekte is, is CL controle erg belangrijk voor het voorkomen van serieuze morbiditeit. Momenteel hangt dit af van snelle en nauwkeurige diagnose en behandeling. De diagnose van leishmaniasis blijft echter lastig. Bovendien worden veel, meestal ongecontroleerde, behandelingschema's toegepast met gevarieerd succes. Tot nu toe zijn de duur van behandeling en de definitie van genezing gebaseerd

op klinische criteria. Daarom is het van belang om zo nauwkeurig mogelijk het aantal parasieten vast te stellen in een huidlaesie voor, tijdens en na behandeling om de uitkomst van behandeling in te schatten. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en evaluatie van nieuwe technieken voor de diagnose van CL, en voor het vaststellen van de duur en effectiviteit van de behandeling.

De Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (QT-NASBA) techniek was ontwikkeld en geëvalueerd om *Leishmania* parasieten te detecteren en te kwantificeren in huidbiopten van CL patiënten. De techniek is gebaseerd op de detectie van de small subunit ribosomal RNA (18S rRNA). De QT-NASBA was in staat om 2 tot 11,300,000 parasieten per biopt vast stellen en test evaluatie liet zien dat de techniek een sensitiviteit van 97.5% en een specificiteit van 100% had [Hoofdstuk 2]. Verder bleek de techniek een waardevol instrument te zijn om een behandeling van CL te monitoren en te kunnen bijdragen aan het voorspellen van een klinische uitkomst. Positieve QT-NASBA resultaten 6 weken na behandeling waren significant gecorreleerd met falen van behandeling / onvolledige genezing tot 6 maanden na behandeling [Hoofdstuk 3].

Daarnaast is de QT-NASBA vergeleken met twee andere moleculaire technieken, de real-time Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR) en de real-time PCR (qPCR). De qRT-PCR is ontwikkeld op basis van dezelfde genen sequenties als de QT-NASBA. De drie technieken zijn met elkaar vergeleken voor de detectie en kwantificatie van *Leishmania* parasieten in *in vitro* parasieten verdunningen en in huidbiopten van bevestigde CL patiënten. Daarnaast is een kosten, tijd efficiëntie en gebruikersvriendelijkheid analyse gedaan. Terwijl de drie technieken vergelijkbare resultaten gaven in de huidbiopten van CL patiënten, hadden de QT-NASBA en qRT-PCR een lagere detectielimiet van 100 parasieten/ml bloed dan de qPCR, welke 1,000 parasieten/ml bloed kon detecteren. Alles bij elkaar genomen, werd de qRT-PCR geprefereerd boven de QT-NASBA en qPCR, omdat de test niet alleen gevoelig en reproduceerbaar was, maar ook een snellere tijdsprocedure had [Hoofdstuk 4].

Omdat moleculaire technieken niet snel kunnen worden gebruikt in veld situaties, is er ook een serologische test voor diagnostische doeleinden ontwikkeld en geëvalueerd. In Suriname en in het noorden van Brazilië is een groot deel van de patiënten (90%) geïnfecteerd met *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Serologische technieken voor CL zijn echter meestal gebaseerd op antigenen van andere soorten. In Hoofdstuk 8 is *L. (V.) guyanensis* antigeen vergeleken met antigenen van andere soorten in een Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in bewezen *L. (V.) guyanensis* geïnfecteerde CL patiënten. Het gebruik van *L. (V.) guyanensis* antigeen verbeterde de test aanzienlijk in vergelijking met andere antigenen van *L. (V.) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* en *L. (L.) chagasi*. Deze resultaten kunnen van groot belang zijn om de effectiviteit van serologische testen voor CL te verbeteren.

Een ander deel van het onderzoek in dit proefschrift is uitgevoerd in Suriname. In dit land is Pentamidine Isethionate (PI) het enig beschikbare medicijn voor de behandeling van CL. Momenteel observeren lokale dermatologen een toename in het aantal CL patiënten, die onvoldoende reageren op de standaard behandeling. Met QT-NASBA zijn de parasieten aantallen tijdens en na behandeling met PI gekwantificeerd. De mate waarin de voorgeschreven behandeling werd nageleefd bleek erg laag te zijn; slechts de helft van de CL patiënten ontving de volledige behandeling. Daarnaast leken minder patiënten te genezen (76% - 78%) dan voorheen, tussen 1994 en 2000, werd

geobserveerd (90%). Om deze redenen is een kortere behandelingschema aanbevolen om de naleving en de effectiviteit van de behandeling te verbeteren [Hoofdstuk 5].

In Suriname lijken risico factoren op een *Leishmania* infectie toe te nemen door ontbossing, goudmijn activiteiten en migratie van immigrante arbeiders. Tot op heden werd gedacht dat alleen *L. (V.) guyanensis* humane infectie veroorzaakt, maar er zijn verschillende klinische manifestaties van CL geobserveerd, wat suggereert dat andere *Leishmania* soorten ook verantwoordelijk zijn voor humane CL infecties in Suriname. Terwijl met PCR-RFLP (Restriction Fragment Lengths Polymorphism) het merendeel van de infecterende *Leishmania* soorten geïdentificeerd werd als *L. (V.) guyanensis*, werden ook *L. (L.) amazonensis* en *L. (V.) lainsoni* aangetoond [Hoofdstuk 7]. Omdat de *L. (L.) amazonensis* geïnfecteerde patiënt niet voldoende reageerde op de standaard behandeling met PI, werd andere medicatie gedoneerd [Hoofdstuk 6]. De jaarlijkse incidentie over 2006 is geschat op 5.32 tot 6.13 CL patiënten per 1,000 inwoners voor het binnenland en op 0.64 tot 0.74 patiënten per 1,000 inwoners voor het hele land.