

Kweek voor diagnostiek naar cutane leishmaniasis: klassiek maar actueel

Markus Starink, Myrna Bouman, Sandra Menting, Caspar Hodiament, Katja de Jong, Michele van Vugt, Henry de Vries, Rens Zonneveld

Samenvatting

Naast microscopie en PCR hoort in vitro-kweek van *Leishmania*-parasieten uit klinische huidbiopsen van oudsher bij de diagnostiek van cutane leishmaniasis. Sinds de introductie van PCR verliest deze techniek aan terrein. Aan de hand van casuïstiek wordt in dit artikel geïllustreerd dat in vitro-kweek nog steeds actueel en zinvol is voor de dagelijkse praktijk.

Summary

In addition to microscopy and PCR, in vitro cultivation of *Leishmania* parasites from clinical skin biopsies has traditionally been an integral component of the diagnostic process for cutaneous leishmaniasis. Since the introduction of PCR, the use of this technique has declined. Through illustrative cases, this article demonstrates that in vitro cultivation remains pertinent and valuable in routine clinical practice.

Inleiding

Cutane leishmaniasis (CL) is een parasitaire infectieziekte veroorzaakt door protozoa van het genus *Leishmania*. CL presenteert zich klassiek met een of meerdere pijnloze ulcera, maar ook papels, noduli, erytheem, en plaques zijn beschreven [1]. Hierdoor is klinische herkenning van CL vaak lastig. Microbiologische bevestiging op een biopsie van de afwijking is dan ook noodzakelijk. Voor betrouwbare diagnostiek is het essentieel dat dit biopsie uit de rand van de afwijking wordt afgenomen, waar de parasieten zich manifesteren. Met lichtmicroscopie kunnen vervolgens amastigoten worden aangetoond in een met Giemsa gekleurd direct preparaat, maar deze methode heeft een matige sensitiviteit [2]. PCR is zeer sensitief, maar detecteert ook DNA zonder dat er nog

sprake is van een actieve infectie, wat de interpretatie bemoeilijkt [3]. Dit is problematisch, omdat primair therapiefalen en recidieven bij CL vaak voorkomen [1]. Het aantonen van levende *Leishmania*-parasieten na kweek van een biopsie in specifiek medium kan behulpzaam zijn in dit soort situaties. Persisterende groei van vitale parasieten uit succesvol behandelde laesies is slechts sporadisch beschreven [3]. De specificiteit van het aantonen van levende parasieten in een biopsie voor een actieve infectie is daarom aanmerkelijk hoger dan detectie van *Leishmania*-DNA. Een positieve kweek na behandeling kan het therapeutisch beleid dan ook ondersteunen. Dit werd onlangs geïllustreerd in een casus, waarin bij blijvende klachten groei van *Leishmania*-parasieten in nieuwe biopsen herhaaldelijk bewijs van een actieve infectie gaf [4]. In onze praktijk wordt standaard een tweede biopsie genomen om deze kweek uit te voeren, tegelijk met het biopsie voor microscopie en PCR. Hieronder presenteren wij drie casus die de toegevoegde waarde van kweek voor diagnose en follow-up van CL onderstrepen.

Amsterdam UMC, Amsterdam, afdeling Dermatologie, drs. M. Starink, dermatoloog, prof. dr. H.J.C. de Vries, dermatoloog; afdeling Medische Microbiologie & Infectiepreventie, ing. M. Bouman, analist parasitologie, drs. S. Menting, analist parasitologie, dr. C.J. Hodiament, arts-microbioloog, dr. R. Zonneveld, arts-microbioloog; Centrum voor Tropische Geneeskunde en Reizigersgeneeskunde, dr. H.K. de Jong, internist-infectioloog, prof. dr. M. van Vugt, internist-infectioloog.
Correspondentieadres: dr. R. Zonneveld
(r.zonneveld@amsterdamumc.nl).

Casus

Casus 1

De eerste casus betrof een man met sinds een paar jaar een langzaam uitbreidende ulceratieve nodus op het oor. In een eerder biopt van deze afwijking werden elders bij pathologisch onderzoek structuren verdacht voor *Leishmania*-amastigoten gezien. Met directe microscopie op een met Giemsa gekleurd preparaat van een nieuw biopt kon dit niet worden bevestigd. De aanwezigheid van *L. tropica* wordt wel aangetoond via 18S-PCR en mini-exon repeat amplicon-sequentieanalyse. Vanuit het tweede biopt dat werd geïncubeerd in het bifasische Evans' Modified Tobie's (EMT)-medium, groeiden na 15 dagen vitale promastigoten. De patiënt werd lokaal behandeld met cryotherapie en intralesionale injecties met meglumine-antimonaat. Hierop verbeterde het beeld, maar na een half jaar was nog geen volledige resolutie bereikt. Er werd besloten om langer af te wachten. Wederom vier maanden later persisteerde de afwijking en was ook een laesie op het andere oor ontstaan. De patiënt werd achtereenvolgens oraal met fluconazol en itraconazol behandeld, waarna klinische remissie van beide afwijkingen optrad. Helaas ontstonden er negen maanden later opnieuw klachten. Zowel directe microscopie als PCR op een nieuw biopt waren negatief. In EMT-medium met het tweede biopt waren na 19 dagen echter vitale promastigoten aantoonbaar. Sequentieanalyse van de gekweekte parasieten toonde wederom *L. tropica* aan. Er werd besloten om opnieuw oraal te behandelen, ditmaal met miltefosine.

Casus 2

De tweede casus betrof een man met een ulceratieve nodus onder het oor. Er werd een biopt afgenomen waarin met directe microscopie geen amastigoten werden gezien. PCR en sequentieanalyse lieten aanwezigheid van DNA van *L. braziliensis* zien. Eventuele mucosale lokalisaties van de oro-of nasofarynx werden door de KNO-arts uitgesloten. Drie maanden na presentatie werd een lokale behandeling via cryotherapie en intralesionaal meglumine-antimonaat gestart. Na zes maanden follow-up was de afwijking vrijwel volledig in remissie. Een jaar later presenteerde patiënt zich echter opnieuw met zwelling en ulceratie van de plek. Met directe microscopie werden in een nieuw biopt geen amastigoten gezien, terwijl PCR positief was. In EMT-medium met daarin

het tweede biopt waren echter na zes dagen vitale promastigoten aantoonbaar. Er werd opnieuw lokaal behandeld met meglumine-antimonaatinjecties met tot op heden gunstig resultaat.

Casus 3

Deze casus betrof een man met een ulcus op het scheenbeen. Elders werd met moleculaire diagnostiek vastgesteld dat er sprake was van een soort uit het *Leishmania* (*Viannia*)-subgenus. Volledige determinatie tot op speciesniveau was echter niet gelukt. Vier maanden voor presentatie in ons centrum werd hij systemisch behandeld met intraveneus liposomaal amfotericine B, om ook een potentiële *L. (V.) braziliensis*, met risico op mucocutane verspreiding, zo adequaat mogelijk te behandelen. Hierop ontwikkelde patiënt een milde nierfunctiestoornis. Bij presentatie was er nog steeds sprake van een groot ulcus. Microscopie en PCR lieten geen aanwijzingen voor CL zien in een nieuw biopt. In een banale kweek werd *Staphylococcus aureus* vastgesteld, waarna flucloxacilline werd gestart. Hierop verbeterde het beeld slechts matig. Na 21 dagen werden in het EMT-medium met het tweede biopt vitale *Leishmania*-promastigoten gevonden. Met PCR en sequentieanalyse van de gekweekte parasieten werd DNA van *L. (V.) lainsoni* aangetoond. Dit is een zeldzame sylvatische soort die bij mensen CL met een mild of zelfs self-limiting beloop lijkt te veroorzaken [5]. In overleg met de patiënt werd besloten tot afwachtend beleid, waarop het ulcus na twee maanden vanzelf heelde met littekenvorming.

Bespreking

Cutane leishmaniasis

Cutane leishmaniasis (CL) is de meest voorkomende klinische presentatie van leishmaniasis en komt endemisch voor in ten minste 100 landen in Azië, Afrika, Amerika en Europa [1]. Naar schatting worden jaarlijks meer dan twee miljoen mensen geïnfecteerd [1]. In Nederland wordt CL gezien als importziekte bij reizigers, migranten en militairen [6]. Omdat er momenteel geen surveillance bestaat, is de incidentie van geïmporteerde CL in Nederland niet goed bekend, maar waarschijnlijk gaat het om tientallen gevallen per jaar [7]. Van 2020 tot en met 2025 werden in het Amsterdam UMC meer dan 90 bevestigde gevallen geregistreerd, waarvan vier met mucosale betrok-

kenheid.

CL is een vectoroverdraagbare, meestal zoönotische, protozoaire infectieziekte. Vrouwelijke zandvliegen van de genera *Phlebotomus* en *Lutzomyia* dragen infectieuze *Leishmania*-promastigoten tijdens een bloedmaal over op de mens. Bij de mens differentiëren deze promastigoten zich voornamelijk in macrofagen tot strikt intracellulaire amastigoten, die zich door binaire deling voortplanten. Het klinisch beeld wordt bepaald door zowel de infecterende *Leishmania*-soort, als door de immuunrespons van de gastheer. Afhankelijk van deze immuunrespons kunnen ook zeldzame diffuse, gedissemineerde en recidiverende vormen van CL voorkomen. Wanneer de slijmvliezen van de oro- en/of nasofarynx zijn aangedaan, spreekt men van mucosale (ML) of mucocutane leishmaniasis (MCL). ML en MCL worden met name veroorzaakt door soorten uit het *Leishmania* (*Viannia*)-subgenus die voorkomen in Midden- en Zuid-Amerika, zoals *L. (V.) braziliensis*. Recent is aangetoond dat ML ook kan voorkomen bij *L. infantum*, die endemisch voorkomt in Zuid-Europa [8]. Dit is belangrijk, omdat *L. infantum* als verwekker van CL in Europese landen relatief vaak voorkomt [9]. Daarnaast is deze soort, samen met *L. donovani*, de veroorzaker van viscerale leishmaniasis (VL). Bij CL veroorzaakt door *L. infantum* bestaat daarom vaak zorg over disseminatie vanuit de huid naar de organen met VL als gevolg. Dit is slechts sporadisch beschreven bij immuungecompromitteerde patiënten en komt in de praktijk zeer zelden voor [10].

De plaats van in vitro-kweek van Leishmania-parasieten in de diagnostiek van CL

Het kweken van *Leishmania*-promastigoten is een klassieke techniek. *Leishmania* was de eerste humane parasiet die in 1904 succesvol in vitro werd gekweekt uit bloed afkomstig uit de milt van een patiënt. Na optimalisaties werd in 1908 het Novy-McNeal-Nicolle (NNN)-medium geïntroduceerd door Charles Nicolle [11]. Dit bifasische medium bestaat uit een agarlaag met konijnenbloed met voedingsstoffen en daarboven een vloeibare laag met supplementen voor de differentiatie van amastigoten tot promastigoten en voor hun replicatie [12]. Mede door de slechte beschikbaarheid van konijnenbloed van goede kwaliteit is dit medium door ons en anderen verlaten. Het bifasische EMT-medium, ontwikkeld in 1983, is gebaseerd op hetzelfde principe als het NNN-medium,

maar met paardenbloed [13]. Tussen 2021 en medio 2022 werd dit medium door het laboratorium voor klinische parasitologie van het Amsterdam UMC technisch en klinisch gevalideerd, waarna de *Leishmania*-kweek weer standaard kon worden uitgevoerd bij patiënten met een verdenking op CL.

Bifasische kweekmedia werden decennialang wereldwijd gebruikt voor de diagnostiek van alle vormen van leishmaniasis, maar hebben sinds de introductie van PCR aan terrein verloren [14]. Bovenstaande casuïstiek laat echter zien dat bij blijvende of hernieuwde klachten na behandeling van CL de PCR geen toegevoegde waarde heeft. In dit soort situaties is de kracht van een positieve kweek het meest uitgesproken. In casus 1 leverde een positieve kweek bewijs van actieve CL en primair therapiefalen. Uiteindelijk was dit zelfs het enige concrete bewijs van een recidief na langdurige en veelvuldige behandeling, zoals eerder beschreven [4]. Ook casus 2 toonde de toegevoegde waarde van kweek bij het aantonen van een recidief van CL door een virulente *Leishmania braziliensis*. In casus 3 duidde een positieve kweek op primair therapiefalen van systemische therapie. Bovendien werd in deze casus de infecterende soort definitief bepaald op de gekweekte parasieten, met grote relevantie voor het therapeutisch beleid. Deze casus laat ook zien dat een positieve kweek na behandeling niet altijd tot behandeling leidt.

Sinds de validatie van het EMT-medium was de kweek positief op nagenoeg 80 procent van de biopten van patiënten met cutane leishmaniasis in onze praktijk. Dit is redelijk in lijn met 83 procent gevoeligheid van het NNN-medium dat voorheen werd gebruikt in onze setting [6]. In biopten die in het kader van primair therapiefalen of een recidief werden afgenomen was de kweek in alle gevallen positief (n = 7). Bovendien kon in tien gevallen de infecterende soort alleen met amplicon-sequentieanalyse van DNA van gekweekte parasieten worden bepaald. Het merendeel van alle kweken was positief binnen de eerste of tweede week nadat deze werden ingezet, wat bijdraagt aan vlotte keuzes in het therapeutisch beleid. Wij benadrukken hierbij dat multidisciplinair overleg tussen arts-microbioloog, dermatoloog en internist-infectioloog, alsmede shared decision making met de patiënt, zeer nuttig kan zijn voor het beleid.

Concluderend is in vitro-kweek van *Leishmania*-parasieten nog steeds een actuele techniek met klinische relevantie. De techniek blijft een waardevolle

aanvulling op microscopie en PCR, kan helpen bij soortbepaling, en is in sommige gevallen ondersteunend als bewijs voor een actieve infectie en bepalend voor het therapeutisch beleid van CL. Daarnaast biedt de verscheidenheid aan gekweekte stammen een substraat voor fenotypische resistentiebepaling, kwaliteitsbewaking, validatie van moleculaire technieken, surveillance en wetenschappelijk onderzoek.

Referenties

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951-70. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
2. de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol*. 2022;23(6):823-40. doi: 10.1007/s40257-022-00726-8.
3. Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 2004;189(6):1018-23. doi: 10.1086/382135.
4. Kuijpers S, Zonneveld R, Siegenbeek van Heukelom ML, Goorhuis A, Starink MV. Ernstige mucocutane leishmaniasis bij een gezonde vrouw: leerpunten voor kliniek, diagnostiek en therapie. *Nederlands Tijdschrift voor Dermatologie en Venerologie*. 2024;34(5):14-7.
5. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. Leishmania (Viannia) lainsoni (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent Leishmania of the Viannia subgenus—a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):587-92. doi: 10.1590/s0074-02762005000600014.
6. Bart A, van Thiel PP, de Vries HJ, Hodiament CJ, Van Gool T. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. *Euro Surveill*. 2013;18(30):20544. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20544.
7. Molendijk EBD, Delfos NM, den Hartog WCE, Anten S. Koorts uit onverwachte hoek. *Tijdschr Infect*. 2019;14:188-193.
8. Guery R, Walker SL, Harms G, et al. Clinical diversity and treatment results in Tegumentary Leishmaniasis: A European clinical report in 459 patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(10):e0009863. doi: 10.1371/journal.pntd.0009863.
9. Van der Auwera G, Davidsson L, Buffet P, et al. Surveillance of leishmaniasis cases from 15 European centres, 2014 to 2019: a retrospective analysis. *Euro Surveill*. 2022;27(4):2002028. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.4.2002028
10. van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):286-99. doi: 10.1111/1469-0691.12556.
11. Nicolle CH. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C. R. Acad. Sci*. 1908;146:842-3.
12. Paun A. Culture of Cutaneous Leishmania from Skin Biopsy Specimens. *Curr Protoc*. 2022;2(2):e367. doi: 10.1002/cpz1.367.
13. Taylor AER, Baker JR. In vitro methods for parasite cultivation. Academic Press. 1987: p58.
14. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):21-5. doi: 10.1128/JCM.02029-06