שם המחקר

השוואת רגישות פרומסטיגוטים של לישמניה טרופיקה לפרומומיצין וסודיום סטיבוגלוקונט בתנאי מעבדה

**תקציר**

**רקע:** לישמניאזיס של העור (Cutaneous leishmaniasis – CL, "שושנת יריחו") הוא מחלה זיהומית המועברת על-ידי זבובי חול נגועים ממין נקבה, ונגרמת על-ידי כמה זנים של טפילים חד-תאיים המשגשגים בתוך תאי המאכסן. היארעות לישמניאזיס של העור בעולם נעה בין 0.69 ל-1.21 מיליון מקרים בשנה, ומרבית המקרים המדווחים מגיעים מאמריקה הלטינית, אגן הים התיכון, המזרח התיכון ומרכז אסיה. בישראל, לישמניאזיס של העור נגרמת בעיקר על-ידי *L. major*, והיארעותה יציבה לאורך השנים, עם 0.2-7 מקרים לכל 100,000 איש. יחד עם זאת, בשנים האחרונות אירעו התפרצויות משמעותיות של CL עם מאות מקרים חדשים שדווחו בפרברי ירושלים, טבריה ובשטחי הגדה המערבית. הגורם הבלעדי למקרים חדשים אלה היה הטפיל L. tropica, והמחלה התאפיינה במהלך קליני אגרסיבי ועיקש יותר לנוכח הטיפול שניתן.

**מטרה:** להשוות את רגישות הפרומסטיגוטים של *L. tropica* לפרומומיצין וסודיום סטיבוגלוקונט.

**שיטות:** 18 דגימות קפואות של טפילי *L. tropica* הופשרו ותורבתו בצורה הפרומסטיגוטית שלהם. בחינת הרגישות לסודיום סטיבוגלוקונט ופרומומיצין התבצעה על-ידי ניתוח הפעילות המטבולית של הטפיל, כסמן לחיוניותו. פעילות זו נמדדה באמצעות כרומטוגרפיה.

**תוצאות:** ניתן היה לתרבת רק 11 מתוך 18 הדגימות שהופשרו לריכוזים המתאימים. עבור 8 מתוך 11 זנים, הרגישות לפרמומיצין הייתה גבוהה מן הרגישות לסודיום סטיבוגלוקונט.

**דיון:** בתנאים קליניים רגילים (*in vivo*), סודיום סטיבוגלוקונט יעיל יותר מפרמומיצין לטיפול בנגעי עור שנגרמו על-ידי *L. tropica*, והדבר נוגד את תוצאות המעבדה שלנו. משמעות הדבר היא שרגישות בתנאי מעבדה אינה מתואמת היטב עם רגישות קלינית אין ויוו.

**מבוא**

היארעות לישמניאזיס, על צורותיו השונות, בעולם הנה 12 מיליון מקרים בשנה, בעוד היארעות לישמניאזיס של העור לבדה הינה כ-2 מיליון מקרים בשנה. בשנים האחרונות, עלתה הימצאות הלישמניאזיס בשל חדירת בני-אדם לאזורי הגידול של בעלי-החיים נשאי הטפילים, והשתכנותם באזורים אלה כחלק ממאבקים פוליטיים באותם אזורים. לישמניאזיס של העור מופיעה לרוב באזורים טרופיים וסוב-טרופיים, כאשר זנים שונים אנדמיים לאזורים גאוגרפיים שונים. לישמניאזיס של "העולם הישן" מופיעה לרוב באפגניסטן, אלג'יר, עירק, איראן, ערב הסעודית, אתיופיה ובמזרח התיכון, בעוד זני לישמניה של "העולם החדש" מופיעים בברזיל, מקסיקו, בוליביה ופרו. הזנים הגורמים ללישמניאזיס של העולם הישן כוללים את *L. major*, *L. tropica* ו-*L. aethiopica*, בעוד לישמניאזיס של העולם החדש מסווגת לוויסצרלית (מערבת אברים פנימיים) ומוקו-קוטנאית (של העור והריריות). הסוג המוקו-קוטנאי נגרם על-ידי *L. mexicana*, *L. venezuelensis* ו-*L. amazonensis*, בעוד לישמניאזיס ויסצרלית נגרמת בעיקר על-ידי *L. donovani*, *L. infantum* (בעולם הישן) ו-*L. chagasi* (בעולם החדש), אשר עשויים, במקרים נדירים, לגרום גם ללישמניאזיס מוקו-קוטנאית.

**פתוגנזה**

**נשא:** לישמניה מועברת על-ידי קבוצה של נשאים פרוקי-רגליים המוכרים לציבור כזבובי-חול. לישמניה של העולם הישן מועברת על-ידי זבובים ממשפחת ה-*Phlebotomus*, בעוד לישמניה של העולם החדש מועברת על-ידי זנים שונים של *Lutzomyia*. אזורי המחיה של זבובים אלה מגוונים וכוללים מדבריות, יערות גשם, מישורים ואזורים הרריים. זבובי-חול הנם חרקים המעופפים למרחקים קצרים, ומשמעות הדבר היא שהם יכולים להתרחק רק מאות מטרים בודדות מאזורי הגידול שלהם. גודלם הקטן (2-3 מ"מ) מאפשר להם לעבור דרך רשתות חרקים, אך הם רגישים מאוד לקוטלי חרקים כימיים.

**מאגר**

מרבית זני הלישמניה הנם זואופיליים, והמאגרים העיקריים שלהם הנם חיות בר, כגון מכרסמים, שפני סלע וחיות כיס, אך גם כלבים מבויתים.

לישמניאזיס של העור בבני-אדם מופיעה בדרך-כלל כאשר בני-האדם חודרים לתוך אזורי המחיה הטבעיים של זבובי-חול נגועים. בדיקות לבני-אדם המתגוררים באזורים אנדמיים למחלה מציגות תבחיני עור חיוביים אצל 10% עד 32% מן האוכלוסייה. תבחין עור הזהה לתבחין טוברקולין מדגים חשיפה לטפיל.

זיהוי בעלי-חיים נגועים וטיפול בהם עשוי להוות אמצעי יעיל לשליטה במחלה.

**מחזור חיי הטפיל:**

מחזור חיים שלם של טפיל הלישמניה כולל מאגר – בעל-חיים יונק, ונשא – זבוב-חול. הטפיל מתקיים, לרוב, בשתי צורות עיקריות – בשלב הפרומסטיגוט, הטפיל חי בתוך זבוב-החול כטפיל חוץ-תאי, ולו שוטון ניעתי אופייני, בעוד האמסטיגוט התוך-תאי מצוי ביונקים ואין לו שוטון.

נקבת זבוב-החול נדבקת בצורה האמסטיגוטית של הטפיל בעודה ניזונה מדמו של יונק נגוע. בקיבתה האחורית של הזבובה, הטפיל מתמיין לצורה הפרומסטיגוטית שלו ומתחיל להתרבות במהירות. בשלב זה, הטפיל דוחף את עצמו אל הקיבה הקדמית, ואז מוזרק אל המאכסן החדש כאשר זבובת-החול מזינה את עצמה במנת דם נוספת.

**מאפיינים קליניים של לישמניאזיס עורית:**

אתר עקיצת זבוב-החול (לרוב בעור חשוף) מציג נגע פפולרי אדמדם בגודל 3-5 מ"מ, ואינו מאופיין בתסמינים נוספים. הנגע גדל באיטיות לאורך מספר חודשים עד שנים, ומתפתח לקשרית בגודל של 3-5 ס"מ, המותירה אחריה צלקת אופיינית.

תקופת הדגירה, המצג הקליני, מספר הנגעים ומהירות התפתחותם תלויים בזן הטפיל המסוים. לדוגמא, ל-*L. major* תקופת דגירה הנמשכת 2-8 שבועות לאחר העקיצה, בעוד ל-*L. tropica* תקופת דגירה ארוכה יותר של כ-8 חודשים.

**טיפול:**

הספרות מציעה אפשרויות טיפול רבות ללישמניאזיס עורית, אך המלצות אלה מבוססות על מספר קטן למדי של תיאורי מקרה. ישנם רק מחקרים מעטים שהנם מבוקרים, אקראיים ובסמיות כפולה. לעתים קרובות, הרופאים נאלצים לטפל במטופליהם תוך שימוש באמצעי טיפול, מינונים ומשכי טיפול המתאימים לאזורים גיאוגרפיים שונים לגמרי, ולעתים אפילו לזנים שונים מאלה שנחקרו בעבר, ולכן שיעורי התגובה, בהתאם, אינם עקביים.

שיטות הטיפול הזמינות כוללות אנטימון פנטאוולנטי, סודיום סטיבוגלוקונט, מגלומין אנטימוניט, הקסדצילפוספוכולין, אמפוטריצין בי, פנטמידין, דפסון, אזולים, פרומומיצין, אימיקווימוד, טיפול בהקפאה וטיפול פוטודינמי. מרביתם של טיפולים אלה מלווה בדיווחים על עמידות.

**מטרות:**

להשוות את רגישות הפרומסטיגוטים של *L. tropica* לפרומומיצין וסודיום סטיבוגלוקונט.

**שיטות:**

**טפילים:**

הטפילים נלקחו מדגימות מעבדה תקניות קפואות של *L. tropica* השמורות במרכז הלישמניאזיס הלאומי במרכז קובין לחקר מחלות טרופיות של המכון למחקר רפואי ישראל-קנדה ובית-הספר לרפואה של האוניברסיטה העברית והדסה בירושלים, ישראל. הדגימות הופשרו והטפילים תורבתו בטמפרטורה של 26 מעלות צלסיוס, במדיום המתאים, עד שריכוז הטפילים הגיע ל-2X107 פרומסטיגוטים למ"ל.

**מדיום גידול:**

מדיום-199 (סיגמא-אולדריץ', סט. לואיס, מונטנה, ארה"ב) בתוספת 2 מילימולר L-גלוטמין, 100 פיקומולר אדנוזין, 23 פיקומולר חומצה פולית, אנטיביוטיקה (100 יב"ל פניצילין G ו-100 פיקוגרם למיליליטר סטרפטומיצין), 1 X תערובת ויטמינים BME, 2 מיקרומולר 2-(N-מורפולינו)-אתנסולפונט (MES), 4.2 מיקרומולר סודיום ביקרבונט וסרום עגל עוברי מומת בחום (fcs, 10% v/v) המותאם לרמת pH 6.8.

**בדיקת רגישות:**

בדיקת רגישות הפרומסטיגוטים בוצעה באמצעות ניתוח הפעילות המטבולית של הטפיל. זהו סמן לחיוניות הטפיל, ולפיכך, סמן ליעילות הטיפול. הפעילות המטבולית נמדדה באמצעות כרומטוגרפיה, במדיומים הבאים:

1. מדיום גידול (נקי) – ביקורת
2. מדיום גידול עם פרומסטיגוטים – מכוון לייצג 100% פעילות מטבולית של הטפיל
3. מדיום גידול עם פרומסטיגוטים ואמפוטריצין-בי – מייצג 100% דיכוי של פעילות הטפיל
4. מדיום גידול, פרומסטיגוטים ו-5 ריכוזים שונים של פרומומיצין, לשם חישוב אחוז דיכוי הפעילות המטבולית של הטפיל
5. מדיום גידול, פרומסטיגוטים ו-5 ריכוזים שונים של סודיום סטיבוגלוקונט, לשם חישוב אחוז דיכוי הפעילות המטבולית של הטפיל

כל צלחת גידול כללה 3 תאים שונים, על-מנת לאפשר מדידה מדויקת יותר ולהוות ביקורת נוספת לניסוי.

**חישוב אחוז הדיכוי:**

אחוז דיכוי הטפיל חושב באמצעות הנוסחה הבאה לכל ריכוז של האנטימון:

 **Y = [(k-y)/k] \* 100**

מנוסחה זו נגזר ה-EC50 (חצי הריכוז האפקטיבי). ככל שה-EC50 נמוך יותר, כך רגישות הטפיל לאנטימון גבוהה יותר.

**תוצאות:**

18 דגימות *L. tropica* הופשרו ותורבתו במדיום המתאים. ניתן היה לתרבת רק 11 מתוך 18 הדגימות שהופשרו לריכוז הנדרש של 2x107 פרומסטיגוטים למ"ל – הריכוז המינימלי הנדרש לבדיקת רגישות.

טבלה 1 משווה את רגישויות 11 זני ה-*L. tropica* לסודיום סטיבוגלוקונט ופרמומיצין, על-ידי הצגת חצי הריכוז האפקטיבי הנדרש. עבור סודיום סטיבוגלוקונט, ערכי ה-EC50 נעו בין 22-250, ואילו עבור פרומומיצין הערכים נעו בין 17-250. ב-8 מתוך 11 הזנים, הרגישות לפרמומיצין הייתה גבוהה משמעותית מאשר הרגישות לסודיום סטיבוגלוקונט (p=0.013, מבחן ווילקוקסון למדגמים מזווגים).

טבלה 1. רגישות פרומסטיגוטים של *L. tropica* לסודיום סטיבוגלוקונט ופרומומיצין בערכי EC50.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | EC50 |
| דגימה  | זן | סודיום סטיבוגלוקונט | פרומומיצין |
| 1 | *L1638* | 67 | 18 |
| 2 | *L1504* | 55 | 56 |
| 3 | *L1534* | 69 | 48 |
| 4 | *L1566* | 53 | 17 |
| 5 | *L1567* | 60 | 30 |
| 6 | L1559 | 170.6 | 76.9 |
| 7 | L1579 | >250 | 152.1 |
| 8 | L1601 | 92.91 | 33.17 |
| 9 | L1607 | >250 | >250 |
| 10 | L1623 | 22 | >27 |
| 11 | L1558 | >80 | 68.96 |

**דיון:**

מטרת מחקר זה הייתה להשוות את רגישות הפרומסטיגוטים של *L. tropica* לפרומומיצין וסודיום סטיבוגלוקונט בתנאי מעבדה. ישנן אפשרויות טיפול רבות ללישמניאזיס, ובחירה באפשרות מסוימת מונעת לרוב משיקולים לא-ביולוגיים, כגון המיקום האנטומי של הנגע, משך הטיפול, דרך מתן הטיפול והעדפות המטופל. לכן, האפשרות להתאים את בחירת הטיפול לתוצאות בחינת רגישות הטפילים מעוררת עניין רב.

בניגוד לתוצאות הניסוי המעבדתי שלנו, הניסיון הקליני מראה בבירור כי סודיום סטיבוגלוקונט יעיל יותר מפרומומיצין לטיפול בנגעים עוריים הנגרמים על-ידי *L. tropica*.

משמעות הדבר היא שרגישות בתנאי מעבדה אינה מתואמת היטב עם רגישות אין ויוו. חוקרים אחרים אשר בדקו את רגישות *L. donovani* לסודיום סטיבוגלוקונט במעבדה ובקליניקה הגיעו למסקנות זהות.

הסברים אפשריים לחוסר התאימות בין רגישויות הטפילים בתנאי מעבדה ואין ויוו ניתן למצוא בסביבות הגידול השונות, כגון חסינות המאכסן, המשחקת תפקיד חשוב בקליניקה, אך אינה מהווה חלק מתנאי המעבדה. בנוסף, בדיקת המעבדה מתבצעת על הצורה הפרומסטיגוטית, בעוד ביצורים חיים הטפיל מתקיים בצורת אמסטיגוט תוך-תאי. ישנה בעייתיות בגידול הצורה האמסטיגוטית ובמדידת רגישותה לטיפול. שיטת בדיקת רגישות האמסטיגוטים לטיפול היא הדבקת תאים מאקרופגים בפרומסטיגוטים. יחד עם זאת, ישנם גורמים העשויים להטות תוצאות אלה, כגון השונות הרחבה ביכולת הטפיל להדביק מאקרופגים ולהתרבות בתוכם. בשנים האחרונות נעשו ניסיונות לשפר שיטות אלה, אך הם נכשלו.

חשיבותו של מחקר זה בהדגשת חשיבות השיפור של בחינת צורת הטפיל האמסטיגוטית.