

Meglümin Antimoniata Tedavisine Dirençli Dört Kutanöz Leishmaniosis Olgusu

Four Cutaneous Leishmaniosis Case Resistant to Meglumine Antimoniate Treatment

Erdal Polat¹, Zekayi Kutlubay²

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Meglümin antimoniate dirençli *Leishmania major*'un neden olduğu kutanöz leishmaniasisin *Lucilia sericata*'nın larvaları ile tedavisi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Hastaların lezyonlarının üzerindeki kabuk lanset ile kaldırıldıktan sonra alınan materyallerden yayma preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyanmış ve mikroskopta incelenmiş, Novy-Nicolle-McNeal (NNN) ve Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyerlerinde kültür yapılmıştır. *Leishmania*'nın amastigot şekli görülen hastalardan birine larva, üçüne ise Glucantime® tedavisi başlanmıştır. Glucantime® tedavisi uygulanan üç hastanın tedavisinden sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine üç hastadaki lezyonlardan tekrar örnek alınarak ITS1 bölgesi real time PCR yapılmış ve kutanöz leishmaniasis etkeninin *Leishmania major* olduğu ve Glucantime® dirençli olduğu belirlenmiştir. Glucantime® dirençli olan iki hastaya lipozomal amfoterisin B, bir hastaya ise larva tedavisi uygulanmıştır.

Bulgular: Mikroskopik incelemede hastaların ilk alınan örneklerinde *Leishmania*'nın amastigot şekilleri görülmüştür. Larva tedavisi uygulanan bir hasta kısa sürede tedavi edilirken, Glucantime® tedavisi uygulanan üç hastanın tedavisinden sonuç alınamamıştır. Real time PCR ile Glucantime® dirençli *Leishmania major*'ün etken olduğu kutanöz leishmaniasis hastalarının ikisi lipozomal amfoterisin B ile biri ise *Lucilia sericata*'nın larvaları ile tedavi edilmiştir. Kültürde *Leishmania* promastigotlarının üremediği görülmüştür.

Sonuç: *Lucilia sericata*'nın larvaları ile meglümin antimoniate dirençli *Leishmania major*'ün oluşturduğu kutanöz leishmaniasis 10 gün gibi kısa sürede başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. Tedaviden 2 ay sonra alınan örneklerden tekrar ITS1 bölgesi real time PCR yapılmış ve sonuçlar negatif bulunmuştur. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2014; 38: 177-80)

Anahtar Sözcükler: *Lucilia sericata*, larva, kutanöz leishmaniasis, glucantime direnci

Geliş Tarihi: 03.01.2014

Kabul Tarihi: 24.01.2014

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to treatment of cutaneous leishmaniasis caused by meglumine antimoniate resistant *Leishmania major* with *Lucilia sericata* larvae.

Methods: Samples obtained from patients' lesions were stained with Giemsa and examined under the microscope. The samples were also incubated to Novy-Nicolle-McNeal (NNN) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media. ITS1 region real time PCR was performed for identifying the *Leishmania* species. The patients were treated using Glucantime® or liposomal amphotericin B or *L. sericata* larvae according to their response to the treatment regimens.

Results: In the initial examination, amastigote forms of *Leishmania* were seen in the samples of all 4 patients under microscopic examination. Two of the patients with cutaneous leishmaniasis, which were caused by Glucantime resistant *L. major* were treated with liposomal amphotericin B, and two of them were treated with *L. sericata* larvae. *Leishmania* promastigotes were not grown in both cultures.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Erdal Polat, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. Tel: +90 212 472 86 96 E-posta: erdalp@istanbul.edu.tr
DOI:10.5152/tpd.2014.3410

©Copyright 2014 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

©Telif hakkı 2014 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

Conclusion: Cutaneous leishmaniasis, which was caused by Glucantime resistant *L. major* has been successfully treated with *L. sericata* larvae in a very short time, 10 days. PCR results from samples taken 2 months after the treatment were examined and the results were negative. (*Türkiye Parazitoloj Derg* 2014; 38: 177-80)

Key Words: *Lucilia sericata*, larvae, cutaneous leishmaniasis, meglumine antimoniate resistant

Received: 03.01.2014

Accepted: 24.01.2014

GİRİŞ

Dünyada kutanöz leishmaniasis (KL) ve visseral leishmaniasis (VL) şeklinde görülen hastalık, ülkemizde çoğunlukla KL şeklinde görülür. *Leishmania tropica* veya *Leishmania major*'ün etken olduğu KL klinik olarak sivilce şeklinde başlar ancak zamanla genişleyerek lezyon oluşur. Daha sonra lezyon ortasından ülserleşerek üzerine sıkıca yapışmış bir kabuk ile kaplanır. İlk sınıflandırmalarda *Leishmania tropica*'nın oluşturduğu lezyon "kuru tip", *Leishmania major*'ün oluşturduğu lezyon ise "yaş tip" olarak adlandırılmıştır. Bu sınıflandırmalar halen birçok parazitoloji kitabında yer almaktadır. Ancak KL kliniğine dayalı sınıflandırmalar ile *Leishmania* türünün tanımlanması kabul edilmemektedir (1, 2).

Dünyada ve ülkemizde KL ve VL'in tedavisinde birincil ilaç olarak kullanılan beş değerlikli antimon türevleri olan sodyum stibogluconat (Pentostam®) ve meglumin antimoniat (Glucantime®) 1940 yılında geliştirilmiştir (1-3). Ancak bu ilaçlara karşı direnç geliştiren değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (4, 5).

Lucilia sericata'nın 1. ve 2. dönem larvaları yaklaşık olarak 20 yıldan beri alttaki nedenlere bakılmaksızın değişik yaraların tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır (6, 7). Bu larvalar, ürettikleri enzimler ile yara üzerindeki ölü dokuyu eriterek çıkarttıkları gibi, yarayı dezenfekte eder ve dokuyu granülasyon oluşturması için uyarırlar. Bu özelliğinden dolayı Larva Debridman Tedavisi (LDT) diyabetik hastalarda yaraların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *L. sericata*'nın 2. evreden 3. evreye geçen larvaları bol miktarda proteolitik enzimler, anti-bakteriyel aktiviteye sahip salgılar ve nekrotik dokunun granülasyonunu geliştiren değişik maddeler üretirler. Bu maddeler ile yaradaki bakterileri eriterek, öldürerek veya üremesini durdurarak yarayı dezenfekte ederler (8, 9).

L. sericata'nın 2. ve 3. dönem larvalarının salgıladıkları enzimlerin ve maddelerin anti-bakteriyel etkisinden yola çıkarak yaptığımız çalışmada larva salgıları *L. tropica* üzerinde *in-vitro* ve *in-vivo* olarak etkili bulunmuştur (10). Bunun üzerine *L. sericata*'nın 1. evre larvaları direkt lezyon üzerine konarak, 2.evreden 3. evreye geçen larvaların salgıları lezyon içerisine verilerek KL tedavisinde kullanılmıştır.

YÖNTEMLER

Leishmaniasis şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen Mardin'in Aytepe köyünden 4 hastanın bileğindeki, kolundaki ve yüzündeki lezyonlar serum fizyolojik ile temizlenmiş ve üzerindeki kabuk lanset ile kaldırıldıktan sonra örnekler alınmıştır. Örneklerden yayma preparatları hazırlanarak Giemsa ile boyanması sonrasında 1000X immersiyon objektifinde incelenerek *Leishmania*'nın amastigot şekilleri araştırılmıştır. N.N.N. ve RPMI 1640 besiyerlerinde kültür yapılarak 27°C'lik etüvde haftada 1 kez kontrol edilerek 40 gün tutulmuştur (1-3).

Lezyonları yüzünde ve kolunda olan üç hastaya meglümin antimoniat (Glucantime®, Sanofi-Aventis, Fransa) ile, lezyonu el bileğinde olan bir hastaya ise *L. sericata*'nın 1. evre larvaları ile

tedavi başlanmıştır. Birinci evre steril larvaları 1 cm²'lik yaraya 6-7 adet direkt olarak konulmuştur (Şekil 1). Larvalar haftada 2 kez konularak yarada 48-72 saat tutulduktan sonra uzaklaştırılmıştır. Yaradaki nekrotik doku tamamen temizlenene kadar larva tedavisine devam edilmiştir (10, 11). Glucantime® haftada iki kez olmak üzere 5 doz kullanılmıştır. Tedavi tamamladıktan bir ay sonra hastaların kontrolü yapılmış ancak lezyonlarda bir iyileşme olmamıştır. Bunun üzerine ikinci kür tedavi yapılmış ancak cevap alınamamıştır. Daha sonra lezyonlardan materyal alınarak ITS1 bölgesi real time PCR (12) "Light Cycler Nano" (Roche) cihazı ile parazitin türü belirlenmiş, sekans analizi ile direnç genleri incelenmiş ve Giemsa ile boyanarak mikroskopta amastigot şekillerine bakılmıştır. Glucantime® tedavisine cevap vermeyen bir hastaya larva tedavisi, larva tedavisini kabul etmeyen iki hastaya ise lipozomal amfoterisin B tedavisi başlanmıştır. Tedaviden 2 ay sonra lezyon yerinden alınan örnekler ITS1 bölgesi real time PCR yöntemiyle tekrar leishmaniasis açısından değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Giemsa ile boyanan preparatlarda *Leishmania*'nın amastigot şekilleri görülmüştür. N.N.N. ve RPMI 1640 kültürlerinde ise promastigotlara rastlanılamamıştır.

Glucantime® tedavisine rağmen iyileşmeyen lezyonlardan hazırlanan preparatlarda *Leishmania*'nın amastigot şekilleri görülmüştür. Real time PCR ile parazitin sodyum stibogluconate dirençli *L. major* olduğu saptanmıştır (Şekil 1, 2). Hastaların ikisi lipozomal amfoterisin B ile ikisi de *L. sericata*'nın larvaları ile tedavi edilmiştir. Tedaviden sonra alınan örneklerde PCR yöntemiyle *Leishmania* görülmemiştir. Larva ile tedavi edilen hastaların 5-6 ay sonra yapılan kontrollerinde lezyon yerinde herhangi bir iz bırakmadan iyileştiği görülmüştür.

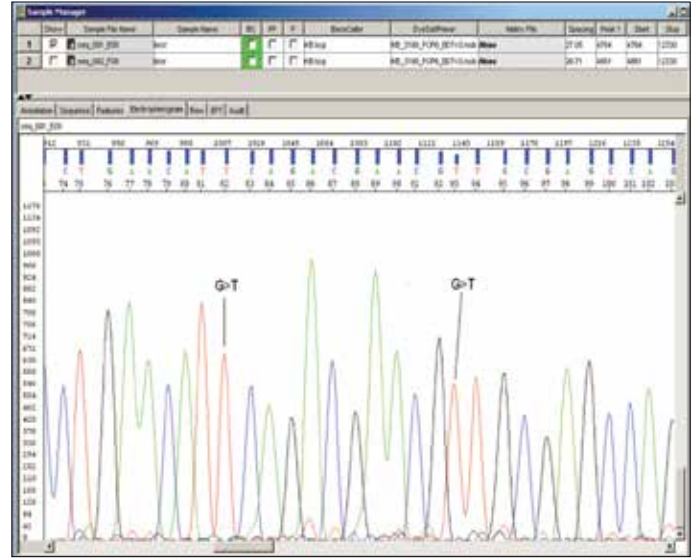
TARTIŞMA

Mumcuoglu'nun (10) 2001 yılında belirttiği ve laboratuvarımızda 2007 yılından beri üretilen *L. sericata*'nın larvaları her tür yaranın tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Larva tedavisi tamamen doğal olduğundan herhangi bir toksik yan etkisi yoktur. Buna göre kutanöz leishmaniasiste larva salgısı lezyon içine verilebilir veya larvalar direkt olarak lezyon üzerine konabilir. Bundan dolayı kutanöz leishmaniasis tedavisinde *L. sericata*'nın larvaları ve larva salgıları kullanılmaya başlanmıştır (11, 13-15).

Mardin'in Aytepe köyünden aynı aileye ait dört hastanın, birinin bileğindeki lezyona 2 kez I. evre larvalar direkt lezyon üzerine konarak 10 günde tedavi edilmiştir. Bu şekilde hareketli larvalar yaradaki tüm nekrotik alana tutunabilir ve nekrotik dokunun derinliklerine girerek lezyonun daha kısa sürede iyileşmesini sağlayabilir. Glucantime tedavisi uygulanan üç hastanın iyileşmeyen lezyonlarından alınan örneklerde real time PCR ile parazitin antimon dirençli *L. major* olduğu görülmüştür. Bunun üzerine bir hasta larva ile, larva tedavisini kabul etmeyen iki hasta ise lipozomal amfoterisin B ile tedavi edilmiştir.



Resim 1. Larva tedavisinin uygulanışı



Şekil 2. Real time PCR'de *L. major* görüntüsü

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
399 bits(216)	4e-108	224/228(98%)	0/228(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGGCTCTGGGGGGAGGAGCAGCTGGGCTGGGAATGCGGCTCAGSTTCTCTGGAACAT	60		
Sbjct 1281	GGGCTCTGGGGGGAGGAGCAGCTGGGCTGGGAATGCGGCTCAGSTTCTCTGGAACAT	1222		
Query 61	CAGAGGAACTTGGAGGACAGGATCAGGGGAATCAGGACAGACTGAGTGGTGAOCAGG	120		
Sbjct 1221	CAGAGGAACTTGGAGGACAGGATCAGGGGAATCAGGACAGACTGAGTGGTGAOCAGG	1162		
Query 121	GTAGCGGAGGCGTACAGGCTGGGCGGTGCTGATGTTGCCAAGCAGAGAACTTCTGGCT	180		
Sbjct 1161	GTAGCGGAGGCGTACAGGCTGGGCGGTGCTGATGTTGCCAAGCAGAGAACTTCTGGCT	1102		
Query 181	AATCATGTGGGAGCTGGCACCACATGAGCTGAGCACTGCGGTGGAA	228		
Sbjct 1101	AATCATGTGGGAGCTGGCACCACATGAGCTGAGCACTGCGGTGGAA	1054		

Şekil 1. Glucantime karşı oluşmuş direnç genleri

Sherman'a göre özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilerle infekte kronik yaraların tedavisinde LDT'si çoğu kez başarılı olmuştur. Canlı larvaların özellikle *S. aureus*, A ve B grubu streptokok gibi patojen bakterileri öldürdüğü ya da büyümelerini inhibe ettiği *in vitro* çalışmalarla ortaya konulmuştur (16).

DeneySEL olarak yaptığımız çalışmada *L. sericata*'nın 2. ve 3. dönem larvalarının salgıladıkları enzimlerin ve maddelerin *L. tropica* üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak etkili olduğu da gösterilmiştir (10). Bunun üzerine *L. sericata*'nın 1. evre larvaları direkt olarak, 2. evreden 3. evreye geçen larvalarının salgıları ise enzimler yoluyla KL tedavisinde kullanılmıştır (17, 18).

Dünyada ve ülkemizde antimona dirençli leishmaniasis olgularının tedavisinde amfoterisin B kullanılmakta olup başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Ancak bu ilacın toksisiteye neden olması nedeniyle amfoterisin B'nin lipozomal formu kullanılmakta, bu

da tedavi maliyetini oldukça artırmaktadır. VL tedavisinde bu ilaçlar intravenöz veya intramüsküler olarak uygulanmaktadır. KL'in tedavisinde ise lezyonun durumuna göre 12-15 gün parenteral veya haftada 1-2 kez olmak üzere toplam 5 doz lezyon içine uygulanmaktadır (1-3). Bizim çalışmamızda antimona dirençli *L. major*'ün etken olduğu KL, *L. sericata* larvaları ile kısa sürede tedavi edilmiştir. Tedaviden 2 ay sonra lezyon yerinden alınan örneklerde ITS1 bölgesi real time PCR yöntemiyle yapılan incelemede Leishmania DNA'sı saptanmamıştır. Larva ile tedavi edilen hastaların 5-6 ay sonra yapılan kontrollerinde lezyonların iz bırakmadan iyileştiği görülmüştür.

SONUÇ

Larva tedavisi Glucantime® ve lipozomal-amfoterisin B tedavisine göre oldukça ucuz ve hızlı iyileşme sağlayan bir tedavi yöntemidir. Bu çalışma dünyadaki ilk çalışma olması dolayısı ile de önemlidir.

Etik Komite Onayı: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (15.06.2005/14620).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastardan alınmıştır.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.P.; Tasarım - E.P.; Denetleme - E.P.; Kaynaklar - E.P.; Malzemeler - E.P.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - E.P.; Analiz ve/veya Yorum - E.P.; Literatür Taraması - E.P.; Yazıyı Yazan - E.P.; Eleştirel İnceleme - E.P., Z.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of İstanbul University Cerrahpaşa Medical Faculty.

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.P.; Design - E.P.; Supervision - E.P.; Funding - E.P.; Materials - E.P.; Data Collection and/or Processing - E.P.; Analysis and/or Interpretation - E.P.; Literature Review - E.P.; Writing - E.P.; Critical Review - E.P., Z.K.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Unat EK, Yaşarol S, Orhan V, Doğan F, Solak S, Gezen C, et al. Leishmaniasis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını 1981; 59-65.
2. Özbel Y, Töz SÖ. Leishmaniasis. In: Özcel MA. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını 2007; 196-244.
3. Unat EK. Tıp protozoolojisi. In: Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı; 1995. p. 564-600.
4. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Handjani F, Hatam GH, Habibi S, Sarkari B. Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2011; 42: 502-8.
5. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Khadem-Erfan MB, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H, et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. Exp Parasitol 2013; 135: 344-9. [CrossRef]
6. Sherman RA. A new dressing for use with maggot therapy. Plast Reconstr Surg 1997; 100: 451-6. [CrossRef]
7. Vistnes LM, Lee R, Ksander G. Proteolytic activity of blowfly larval secretions in experimental burns. Surgery 1981; 90: 835-41.
8. Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens R. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. Med Vet Entomol 2005; 9: 333-7. [CrossRef]
9. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Block C, Galun R. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. J Wound Care 2007; 16: 123-7. [CrossRef]
10. Mumcuoglu KY. Clinical applications for maggots in wound care. Am J Clin Dermatol 2001; 2: 219-27. [CrossRef]
11. Polat E, Cakan H, Aslan M, Sirekbasan S, Kutlubay Z, İpek T, et al. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: First work. Exp Parasitol 2012; 132: 129-34. [CrossRef]
12. Ozensoy Toz S, Culha G, Yıldız Zeyrek F, Ertabaklar H, Alkan MZ, Tetik Vardarlı A, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e2205. [CrossRef]
13. Polat E, Çakan H, Çalışkan R, Kondakçı G.O, Darı S, İpek T. *Lucilia sericata*'nın larvalarının kronik yaralarda uygulanması. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi; 1-7 Kasım, Adana-Türkiye: 2009. p. 83-5.
14. Polat E, Çakan H, İpek T. Larva debridman tedavisi. Türk Aile Hek Derg 2010; 14: 188-91. [CrossRef]
15. Polat E. Larva debridman tedavisi (LDT). In: Topalan M, Aktaş Ş. Güncel Yönleriyle Kronik Yara. İstanbul Tıp Fakültesi Kronik Yara Kongresi 2010; 181-193.
16. Sherman RA. Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. J Diabetes Sci Technol 2009; 3: 336-44. [CrossRef]
17. Polat E. *Lucilia sericata* larvaları ve larva sekresyonları ile kutanöz leishmaniasis'in tedavisi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi; 29 Eylül-5 Ekim, Denizli-Türkiye: 2013. p. 8-10.
18. Polat E, Kutlubay Z, Sirekbasan S. Treatment of cutaneous leishmaniasis with *Lucilia sericata* larvae. Fifth World Congress on Leishmaniasis (Worldleish5) May 13-17, Pernambuco - Brazil. 2013; 541-2.