

ARTÍCULOS ORIGINALES

IDENTIFICACIÓN POR PS-PCR DE ESPECIES DE *LEISHMANIA* Y SU CORRELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS EN SALTA, ARGENTINA

Identification by PS-PCR of Leishmania Species and its Correlation with Clinical, Epidemiologic, and Therapeutic Characteristics in Salta, Argentina

ALEJANDRA BARRIO*, MARÍA F. GARCÍA BUSTOS*, MARÍA C. MORA*, CECILIA M. PARODI*, FEDERICO RAMOS*, SONIA MORENO**, MIGUEL A. BASOMBRÍO*

RESUMEN. La Leishmaniasis es una enfermedad endémica en la provincia de Salta, Argentina, con cientos de casos anuales. La identificación de la especie de *Leishmania* es necesaria debido a diferencias de presentación clínica y de respuesta al tratamiento entre especies. La técnica PS-PCR ha sido validada con el método de isoenzimas para la identificación de especies de *Leishmania* en Argentina. OBJETIVOS: optimizar la técnica PS-PCR para identificar la especie de parásitos aislados por cultivo y en muestras clínicas de pacientes de Salta y correlacionarla con sus características clínicas y su respuesta al tratamiento. RESULTADOS: La PS-PCR permitió identificar la especie de *Leishmania* en las 24 muestras analizadas: 9 aislados de cultivo y 15 muestras clínicas de raspado de lesiones (100% de especificidad). Las especies halladas fueron: *L(V) braziliensis* (19/24; $p < 0,0001$), *L(L) amazonensis* (4/24) y *L(V) guyanensis* (1/24). La primera estuvo relacionada con todos los casos severos (8 con lesiones mucocutáneas y 1 con enfermedad diseminada), y con todas las fallas al tratamiento con Glucantime (4) observadas. En los casos de *L(L) amazonensis*, no se observó enfermedad grave ni resistencia al tratamiento. El caso de *L(V) guyanensis* no era autóctono de la zona. CONCLUSIONES: Este estudio demuestra que la técnica PS-PCR es apropiada para el diagnóstico específico de la leishmaniasis. El diagnóstico de *L(V) braziliensis* obliga a considerar tratamientos alternativos para los casos severos de la enfermedad.

ABSTRACT. *Leishmaniasis* is endemic in the province of Salta, Argentina, with hundreds of cases annually. Identifying the species of *Leishmania* is necessary due to differences in clinical presentation and treatment response between species. PS-PCR technique has been validated by the method of isozymes to identify *Leishmania* species in Argentina. OBJECTIVES: To optimize the PS-PCR technique to identify the species of parasites isolated by culture and in clinical specimens from patients of Salta and its correlation with clinical characteristics and response to treatment. RESULTS: The PS-PCR allowed us to identify the species of *Leishmania* in 24 samples analyzed: 9 isolated from clinical specimens and 15 culture swabs taken from lesions (100% specificity). The species found were: *L(V) braziliensis* (19/24, $P < 0.0001$), *L(L) amazonensis* (4/24) and *L(V) guyanensis* (1/24). The first one was related to all severe cases (8 with mucocutaneous lesions and 1 with disseminated disease), and to all failures to treatment with Glucantime (4) observed. In the cases of *L(L) amazonensis*, there were no serious disease or resistance to treatment. The case of *L(V) guyanensis* was not indigenous to the area. CONCLUSIONS: This study demonstrates that PS-PCR technique is suitable for specific diagnosis of leishmaniasis. The diagnosis of *L(V) braziliensis* undertakes to consider alternative treatments for severe cases of the disease.

PALABRAS CLAVES: Leishmaniasis - PCR - Diagnóstico molecular

KEY WORDS. *Leishmaniasis* - PCR - Molecular diagnosis

* Universidad Nacional de Salta (UNSa)

** Hospital del Milagro, Salta

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

Beca "Carrillo-Oñativia". Comisión Nacional Salud Investiga. Ministerio de Salud, Argentina.

FECHA DE ENVÍO: 30-octubre-2009

FECHA DE APROBACIÓN: 27-Noviembre-2009

CORRESPONDENCIA A:

Alejandra Barrio

E-mail: aleba05@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis afecta principalmente a poblaciones pobres y ocupa el tercer lugar entre aquellas causadas por vectores. Se estima que 350 millones de personas habitan en áreas de riesgo y 12 millones se encuentran infectadas en el mundo, con una incidencia de 500.000 casos de enfermedad visceral y 1,5-2 millones de cutánea.^{1,2} En la provincia de Salta, Argentina, la Leishmaniasis es endemo-epidémica, particularmente en los departamentos de Orán, Tartagal y Anta, donde produce cientos de casos anuales.^{3,4,5,6}

La enfermedad es causada por hemoflagelados del género *Leishmania* y se transmite por la picadura de un flebótomo. Según la especie, puede manifestarse en la forma cutánea, mucocutánea o visceral.⁷ En América Latina, las formas cutánea y mucocutánea se denominan Leishmaniasis Tegumentaria

Americana (LTA).³ La enfermedad puede ser inaparente o mostrar un amplio espectro clínico, desde lesiones localizadas de cura espontánea hasta una enfermedad cutánea difusa o mucosa mutilante.⁸ Este pleomorfismo ha sido relacionado con la especie de *Leishmania* infectante y con la respuesta inmune del hospedador. Esto complica el manejo clínico.⁹

La coexistencia de distintas especies en un área endémica es frecuente. En Salta, se han descrito hasta el presente, dos subgéneros de *Leishmania*: *Viannia* y *Leishmania*, y dentro de estos, tres especies: *L(V) braziliensis*, *L(V) guyanensis* y *L(L) amazonensis*, como agentes causales de Leishmaniasis humana.^{3,10,11} Hay evidencia de que la enfermedad causada por *L(V) braziliensis* difiere en su presentación clínica, métodos diagnósticos y respuesta terapéutica de la causada por *L(L) guyanensis*.^{12,13} Es por esto que la identificación de la especie tiene importancia epidemiológica y clínica.¹⁴

La determinación de la especie involucrada permite predecir la necesidad de terapias alternativas como una estrategia de control de la enfermedad. También es útil para diferenciar entre recaída de una enfermedad latente o reinfección con otra especie.

El método de referencia para la identificación de especies, es el análisis isoenzimático (MLEE), pero es complejo y lento. Por esto, se han desarrollado métodos alternativos basados en la técnica PCR (*Polimerasa Chain Reaction*).^{7,14} Entre ellos, la amplificación y secuenciación del gen citocromo-b y la PCR específica de polimorfismo (PS-PCR) se han validado con MLEE para identificación de especies y para estudios filogenéticos de *Leishmania*.^{15,16} Los beneficios de estas técnicas son: no requiere aislamiento ni cultivo masivo de parásitos y pueden aplicarse en muestras clínicas de lesiones, tejidos o en vectores.^{15,17}

Los objetivos de este estudio fueron: a) Laboratorio: optimizar la técnica PS-PCR para identificar la especie en parásitos aislados de cultivos y en muestras clínicas de pacientes; b) Clínica: correlacionar la especie con características clínicas, epidemiología y respuesta al tratamiento en los pacientes que contrajeron la enfermedad en la provincia de Salta.

MATERIALES Y MÉTODO

Para la optimización de la PS-PCR, se probaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (0,5 mM-3,5 mM; variando en 0,5) y de *primers* (0,1 uM-1 uM; variando en 0,1). Las bandas se consideraron óptimas si tenían tamaño e intensidad adecuados y si estuvieron entre dos concentraciones que hubieran amplificado bandas intensas.

Para la validación de la técnica, se usaron cepas de referencia OMS para verificar si los *primers* eran específicos para subgénero y especie. Se usaron controles negativos, positivos y blancos.

Una vez optimizada la técnica PS-PCR, se procedió a la identificación de subgénero y especie de *Leishmania* a partir dos tipos de muestras: a) parásitos aislados en cultivo de lesiones de pacientes con Leishmaniasis, y b) muestras obtenidas por raspado de lesiones y colocadas en solución TE.¹⁸

Los criterios de inclusión fueron: pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis por PCR convencional y que hayan sido tratados con Glucantime. Se registró el tipo de lesión y el lugar donde se contrajo la enfermedad. En las historias clínicas de los pacientes se

verificó la respuesta al tratamiento con Glucantime. El tratamiento se consideró exitoso si las lesiones se habían cerraron antes de los tres meses post-tratamiento.¹⁹ Finalmente, se correlacionó la especie con las características clínicas, epidemiológicas y la respuesta al tratamiento sólo para los casos de enfermedad contraída en la provincia de Salta.

UNIDADES DE ANÁLISIS

Cepas de referencia OMS: 1) Subgénero *Viannia*: *L(V) braziliensis*/HOM/BR/75/M2903, *L(V) panamensis*/MHOM/PA/71/LS94, *L(V) guyanensis*/MOHM/BR/75/M4147, *L(V) peruviana*/LC39. 2) Subgénero *Leishmania*: *L(L) amazonensis*, MHOM/BR/73/M2269, *L(L) mexicana*/MNYC/BZ/62/M379, *L. pifanoi*/LV135 y *L. chagasi*.

Parásitos de cultivo (n=9): se obtuvieron por aspirado de lesiones con jeringas con 0,5 ml de PBS, 100 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomocina y se mantuvieron a 25°C en medio NNN con sangre desfibrinada de conejo (20 %) y 1 ml de PBS como fase líquida. Para la extracción de ADN, los promastigotas fueron cultivados en RPMI.¹⁶

Muestras clínicas (n=15): se obtuvieron por raspado de lesiones cutáneas o mucocutáneas y se almacenaron en 300 µl de solución buffer TE. Las muestras fueron hervidas 10' en baño María y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.¹⁸

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Para la extracción de ADN de los parásitos cultivados, los cultivos amplificados fueron recogidos, lavados con PBS y lisados a 60°C con buffer de lisis conteniendo SDS (1 %), 100 µg/ml proteinasa K y 100 µg/ml ARNasa. Luego de la extracción con fenol-cloroformo y etanol, el ADN se resuspendió en buffer TE y se tomaron 5 ul para la PCR.

La extracción de ADN de las muestras clínicas se realizó con el kit WizardR Genomic DNA Purification Kit de Promega y se tomaron 10 µl para la PCR.

Luego se realizó PS-PCR con *primers* para identificación de subgéneros *Viannia* (V1 5'-GCTTCTCGTTTCGCTTGAAC-3' y V2 5'-AGACAAGAAAAAGGCGGC-3', amplifican 168 pb) y *Leishmania* (L1 5'-CACTCGGCATTTTTGC-3' y L2 5'-GTGCCCTGACTTGATGTCTA-3', amplifican 78 pb). Posteriormente se realizó la PS-PCR para identificación de especie por subgénero. Para Subgénero *Viannia*: *L(V) braziliensis* (B1 5'-GTGGCGTATCTGCTGATGAC-3' y B2 5'-CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA-3', amplifican 103 pb), *L(V) guyanensis* (G1 5'-GGTCGGATCTGCATGCATCAT-3' y G2 5'-CAAAAAGCGAGGGACTGCGGG-3', amplifican 79 pb) y *L(V) panamensis* (P1 5'-GGTCGGATCTGCGGG-3' y P2 5'-CAAAAAGCGAGGGACTGCGGG-3', amplifican 79 pb). Para Subgénero *Leishmania*: *L(L) amazonensis* (A1 5'-TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA-3' y A2 5'-GTGCCCTGACTGCATGTCTA-3', amplifican 62 pb).^{16,17}

Para el protocolo y programa de PS-PCR, se siguieron las condiciones descritas por Marco y col.¹⁵ y Mimori y col.¹⁶ con un volumen total de reacción de 50 µl que contenía: muestra, 1X buffer de enzima (Go taq - Promega); *primers*, dNTPs, $MgCl_2$, albúmina 1,6 % y Taq polimerasa 2 U (Go taq - Promega). Los productos de la PCR se corrieron electroforéticamente en geles

agarosa 2 % con Bromuro de etidio y fueron fotografiados con sistema Kodak EDAS.

PLAN DE ANÁLISIS: La correlación entre especie y las variables tipo de lesión, lugar de adquisición de la infección y respuesta al tratamiento se realizó con un test de Fisher con $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA PS-PCR

Las concentraciones óptimas de $MgCl_2$ resultaron: 2,5 mM para V1-V2 y 3 mM para L1-L2 y para todos los *primers* de especies. Las concentraciones óptimas de *primers* fueron: 0,7 μM para V1-V2; 0,6 μM para L1-L2; y 0,5 μM para B1-B2, G1-G2, P1-P2 y A1-A2.

2. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

Las especies M379, M2269, LV135 y *L. chagasi* amplificaron la banda de 78 pb con los *primers* L1-L2 y no con V1-V2. Las especies LS94, LC39, M4147 y M2903 amplificaron la banda de 168 pb con V1-V2 y no con L1-L2 (Figuras 1A y 1B). Esto demuestra un 100 % de especificidad para esos *primers*.

La especie M4147 amplificó la banda de 79 pb con los *primers* G1-G2 y no con B1-B2 ni con P1-P2. La especie M2903 amplificó la banda de 103 pb con B1-B2 y no con G1-G2 ni con P1-P2. La especie LS94 amplificó la banda de 79 pb con P1-P2 y no con B1-B2 ni con G1-G2. Por lo tanto, estos *primers* mostraron también un 100 % de especificidad (Figura 2).

3. IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS AISLADOS DE CULTIVOS

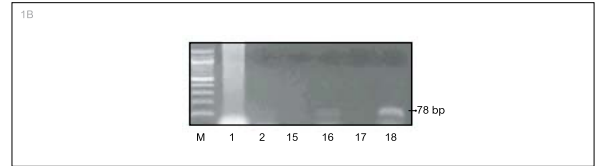
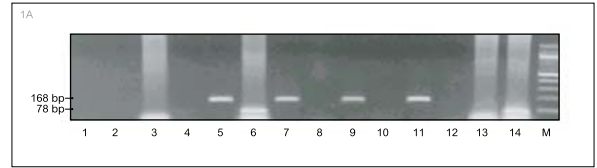
Las nueve muestras de parásitos aislados de cultivo amplificaron la banda de 168 pb con V1-V2 y no lo hicieron con L1-L2 (Subgénero *Viannia*). Con los *primers* de especies *Viannia*, 8 muestras amplificaron la banda de 103 pb con B1-B2 y no lo hicieron con G1-G2 ni con P1-P2; y sólo 1 amplificó con G1-G2 y no lo hizo con B1-B2 ni con P1-P2. Por lo tanto, los 8 primeros aislados corresponden a la especie *L(V) braziliensis* y el restante a la especie *L(V) guyanensis*. Este último aislado correspondía a un paciente que contrajo la enfermedad en el Amazonas, Brasil. (La Figura 3 muestra la amplificación de dos parásitos aislados).

4. IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS EN MUESTRAS CLÍNICAS

Se identificaron 15 muestras clínicas, 11 mostraron la banda de 168 pb con V1-V2 y la banda 103pb con B1-B2 y las 4 restantes amplificaron la banda de 78 pb con L1-L2 y la banda de 62 pb con A1-A2. Por lo tanto, las primeras 11 muestras correspondieron a *L(V) braziliensis* y las otras 4 a *L(L) amazonensis*.

5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS

En los 23 casos contraídos en la provincia de Salta, la especie predominante fue *L(V) braziliensis* con 19 casos ($p < 0,0001$) (ver Tabla 1). Esta especie fue la causante de todos los casos severos de Leishmaniasis registrados (lesiones mucocutáneas y enfermedad diseminada) y de falla terapéutica al Glucantime. Sin embargo, debido al escaso número de *L(L) amazonensis*, las diferencias no mostraron significación estadística ($p > 0,05$).



Figuras 1A y 1B: Prueba de especificidad con cepas de referencia OMS. 1: blanco; 2: blanco V; 3: M379 V; 4: LS94 L; 5: LS94 V; 6: M379 L; 7: LC39 V; 8: LC39 L; 9: M4147 V; 10: M4147 L; 11: M2903 V; 12: M2903 L; 13: M2269 V; 14: M2269 L. 15: LV 135 V; 16: LV 135 L; 17: L. chagasi V; 18: L. chagasi L. Primers: V (V1-V2) y L (L1-L2).

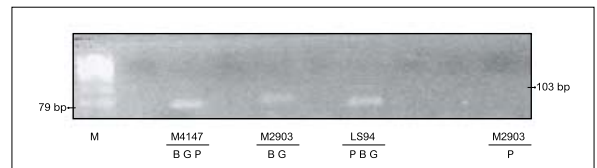


Figura 2: Especificidad con primers B (B1-B2), G (G1-G2) y P (P1-P2).



Figura 3: Identificación de parásitos de cultivos. Controles negativos (-); controles positivos (+): M2903(B), M4147(G) y LS94(P); Aislados: FE y AR. Primers: B (B1-B2), G (G1-G2) y P (P1-P2).

En las muestras de pacientes provenientes del departamento de Orán sólo se encontró *L(V) braziliensis*, mientras que en las de Tartagal y de Anta se encontraron ambas especies *L(V) braziliensis* y *L(L) amazonensis*, sin diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque 3/4 casos de esta última se contrajeron en Anta.

DISCUSIÓN

La LTA es endémica en Salta y cada año afecta a centenares de personas. La técnica usada en este estudio (PS-PCR) amplificó con un 100% de especificidad las cepas de referencia OMS y resultó adecuada para identificar muestras clínicas.

Las especies detectadas fueron: *L(V) braziliensis*, *L(L) amazonensis* y *L(V) guyanensis*, con claro predominio de la primera (19/24; $p < 0,0001$). La última, en tanto, no era autóctona de la zona (el paciente la contrajo en Brasil). Todos los casos severos y de falla terapéutica se observaron con *L(V) braziliensis*. Los casos de *L(L) amazonensis* presentaron solo lesiones cutáneas y 100% de sensibilidad al Glucantime.

En este estudio no se detectaron casos autóctonos de *L(V)*

Tabla 1. Tipo de lesión, respuesta al tratamiento y lugar de adquisición de la infección según especie de *Leishmania* en los casos contraídos en la provincia de Salta

Especie	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
Frecuencia (%)	19/23 - 82,6%	4/23 - 17,4%
Tipo de lesión		
Cutáneas	10/19 - 52,6 %	4/4 - 100%
Mucocutáneas	8/19 - 42,1 %	-
Diseminadas	1/19 - 5,3 %	-
Falla terapéutica	4/19 - 21 %	0/4 - 0 %
Lugar de adquisición		
Orán	11/19 - 57,8 %	0/4 - 0 %
Tartagal	4/19 - 21,1 %	1/4 - 25 %
Anta	4/19 - 21,1 %	3/4 - 75 %

guyanensis. En coincidencia con este estudio, Frank y col.³ aislaron solo *L(V) braziliensis* y *L(L) amazonensis* en Salta usando MLEE en parásitos aislados de cultivos. En cambio, Marco y col.^{11,16} encontraron casos de *L(V) guyanensis* en pacientes de Salta y de Corrientes. Sin embargo, el trabajo de Marco y col.¹¹ coincidió con el nuestro al relacionar a *L(V) braziliensis* con diferentes formas clínicas de Leishmaniasis y con resistencia al tratamiento con Glucantime.

Los estudios previos sobre falla terapéutica al Glucantime son contrastantes: Arévalo y col.⁹ mostraron que los pacientes

con *L(V) braziliensis* presentaban una probabilidad mayor de falla terapéutica que aquellos con *L(V) guyanensis*. En cambio, Azeredo-Countinho y col.²⁰ observaron una buena respuesta clínica al tratamiento en pacientes infectados con *L(V) braziliensis*, en coincidencia con los estudios de sensibilidad in vitro de sus aislados. Nuestro estudio muestra que la especie con mayor tendencia a presentar fallas al tratamiento con Glucantime es *L(V) braziliensis*, al igual que el primero. Sin embargo, en este estudio el número de muestras es demasiado pequeño como para extraer conclusiones. Los diferentes resultados de estos trabajos justifican la necesidad de realizar nuevos estudios sobre el parásito y el hospedador a fin de determinar los factores que influyen en la respuesta al tratamiento con Glucantime.

RELEVANCIA PARA POLÍTICAS E INTERVENCIONES

La PS-PCR es una opción eficiente para el diagnóstico de especie de *Leishmania*, con el beneficio de optimizar el tratamiento de los pacientes con *L(V) braziliensis*. La determinación de la especie infectante permite también diferenciar entre recaída de enfermedad latente y reinfección por otra especie.

RELEVANCIA PARA LA FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Este es un trabajo de colaboración entre la UNSa y los hospitales del Milagro y San Bernardo de Salta. En este último se ha perfeccionado la técnica de toma de muestras mucocutáneas para pruebas moleculares y en ambos hospitales se están estudiando terapias alternativas para los casos más severos.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: No hubo conflicto de intereses durante la realización del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. *Drug Resistance in Leishmaniasis*. Clinical Microbiology Reviews. Jan 2006; p. 111-126.
- Reithinger R, Dujardin JC. *Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications*. J Clin. Microbiol. Jan 2007, p. 21-25.
- Frank FM y col. *Characterization of human infection by Leishmania spp. In the Northwest of Argentina: immune response, double infection with T. cruzi and species of Leishmania involved*. Parasitology. 2003; 126:31-39.
- Chiaromonte M y col. *Estudio de casos de Leishmaniasis en la provincia de Salta. Evidencias de infección mixta por T. cruzi y Leishmania spp*. Medicina (Buenos Aires). 1996; 56:259-268.
- Segura EL y col. *Molecular and biologic characterization of Leishmania parasites implicated in an epidemic outbreak in northwestern Argentina*. Parasitol Res. 2000; 86: 504-8.
- Sosa Estani S y col. *Clinical characteristics and diagnosis of mucocutaneous Leishmaniasis in patients in an endemic area in Salta*. Medicina (Buenos Aires). 1998; 58: 685-691.
- Singh SS, Sivakumar RR. *Recent advances in the diagnosis of Leishmaniasis*. J Postgrad Med. 2003; 49:55-60.
- Mendonça MG y col. *Persistence of Leishmania Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure?*. JID. 2004; 189:1018-23.
- Arévalo J y col. *Influence of Leishmania (Viannia) Species on the response to Antimonial treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis*. JID. 2007; 195:1846-51.
- Córdoba Lanús E y col. *Detection of Leishmania braziliensis in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction*. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 2005; 100:187-192.
- Romero GA y col. *Comparison of cutaneous leishmaniasis due to L(V)*

braziliensis and *L(V) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. CID, 2001; 32:1304-1312.

¹² Marco JD y col. *Species Assignment of Leishmania from Human and Canine ATL Cases by Multilocus Enzyme Electrophoresis in North Argentina*. AJTMH. 2005; 72: 606-611.

¹⁵ Rotureau B y col. *Use of PCR-RFLP Analysis to Identify the main New World leishmania Species and Analyse Their Taxonomic Properties and Polymorphism by Application of the Assay to Clinical Samples*. JCM. 2006; 44(2):459-467.

¹⁴ Romero GA y col. *Comparison of cutaneous leishmaniasis due to L(V) braziliensis and L(V) guyanensis in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate*. AJTMH. 2001; 65:456-465.

¹⁵ Mimori T y col. *Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World*. Acta Trop. 2002; 81:197-202.

¹⁶ Marco JD y col. *Are Cytochrome B Gene Sequencing and Polymorphism-Specific Polymerase Chain Reaction as Reliable as Multilocus Enzyme Electrophoresis for Identifying Leishmania spp. From Argentina?*. AJTMH. 2006; 75(2): 256-260.

¹⁷ Kato H y col. *Detection and identification of Leishmania spp within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by PCR*. AJTMH. 2005; 72:87-93.

¹⁸ Barrio A y col. *Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina*. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77(4):636-9.

¹⁹ Llanos-Cuentas Ay col. *Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru*. Clin Infect Dis. Jan. 2008; 15;46(2):223-31.

²⁰ Azeredo-Countinho RB y col. *Sensitivity of Leishmania braziliensis promastigotes to meglumine antimoniate (Glucantime) is higher than that of other Leishmania spp. and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis*. J. Parasitol. 2007; 93(3):688-93.