

**מבוא:** איתה) ח"כים התחילו ליישם את חוקי הגנת הסביבה, אך נחלקו על גודל המיסוי. **אפידמיולוגיה:** במקרה הזה ישנם שני מקרים קטגוריים: מחלה נגיפית וזיהום שיעור ההיארעות של לשמניאזיס בעולם, על סוגיה השונים, עומד על 12 מיליון מקרים. השכיחות של ל"ע הוא כ-2 מיליון מקרים חדשים בשנה(1). בשנים 2011-2012 האחרונות השכיחות של ל"ע הולכת ועולה עקב פלישת האדם לאזורי המחיה של בעלי החיים, המשמשים כמעבירים השונים של הטפיל, אם לצורכי מחייה ואם בשל עימותים פוליטיים(2). ישנם שני מקרים קטגוריים: מחלה נגיפית ומחלה זיהומית. ל"ע מצויה באזורים טרופיים ותת-טרופיים. לרוב זנים שונים של הטפיל מצויים באזורים גאוגרפים מוגדרים. כך נוצר מצב ש-90% מל"ע של ה"עולם הישן" צומח מצויים באפגניסטן, אלג'יר, עיראק, אירן, ערב הסעודית, אתיופיה והמזרח הרחוק התיכון. בעוד שרוב המקרים של ל"ע של ה"עולם החדש" מופיעים בברזיל, ארגנטינה, מקסיקו, בולביה ופרו. חוקרים הסטטיסטיים חשבו כי ישנה התאמה בין הטפילים שגורמים לל"ע של העולם הישן כוללים בעיקר: ל.מיגו"ר, ל.טרופיקה ול.אטיופיה. הטפילים שגורמים ללשמניאזיס של העולם החדש מתחלקים לפיזור ההסתמנות הקלינית לסוג המוקו-קוטנאי ולויסרלי. הטפילים שגורמים ללשמניאזיס מוקו-קוטנאי כוללים ל.מקסיקנה, ל.ונזולנאזיס ול.אמזונאזיס. ל.אינפנטום ול.דונובני(מהעולם הישן), ל.שיגסי(מהעולם החדש) הם הסיבה העיקרית למחלה הויסרלית ורק לעיתים גורמות למחלה עורית. מקסיקנה גורמת לזיהום עורית וזיהום קטגוריים לזיהום חמור של העיניים והאוזניים. ל.אינפנטום גורמת לזיהום חמור של העיניים והאוזניים. ל.שיגסי גורמת לזיהום חמור של העיניים והאוזניים. ל.מקסיקנה גורמת לזיהום חמור של העיניים והאוזניים. ל.אמזונאזיס גורמת לזיהום חמור של העיניים והאוזניים.

מטרת עבודה זו היא לבחון את הרגישות של הטפיל לשמניה מיגו"ר (השכיח ביותר בארץ) לטיפול בפרומיציין (לשקוטן) בתנאי מעבדה ולקבוע האם יש חשיבות לאזור בו נרכשה המחלה.

שיטות: 20 טפילי לשמניה מיגור הופשרו וגודלו בתרביות בצורה הפרומסטיגוטית, בדיקת רגישות הפרומיסטוגוטים לפרומיציין בוצעה על ידי חישוב הפעילות המטבולית של הטפיל. הפעילות המטבולית של הטפיל היא מדד לחיותו ולחלופין ליעילות טיפול תרופתי כנגד הטפיל. הפעילות נמדדה בתאים בעזרת כרומטוגרפיה

תוצאות: מתוך 20 טפילי הלשמניה מיגו"ר שהופשרו, רק 10 דגימות טפילים הצליחו להתרבות ולהגיע לריכוז מתאים. הצלחנו לגדל לריכוז המתאים גם 2 דגימות של ל. טרופיקה. המספר הנמוך של הזנים שהצלחנו להעמיד לניסוי, אינו מאפשר השוואה בעלת משמעות סטטיסטית בין אזורים שונים בארץ. תוצאות הניסוי הדגימו כי טפילי ל. טרופיקה היו באופן כללי רגישים יותר לפרומיציין בהשוואה לל. מיגו"ר.

דיון: מטרת עבודה זו הייתה לבחון את הרגישות של הטפיל לשמניה מיגו"ר לטיפול בפרומיציין בתנאי מעבדה, ולקבוע האם ישנו קשר בין האזור בו נרכש הזיהום למידת הרגישות לפרומיציין. מטרה זו לא הושגה, כיוון שלא התקבלו תוצאות מספיקות, וכיוון שהתוצאות שהתקבלו סותרות ידע מוקדם. הניסיון הקליני מלמד כי ל. טרופיקה עמידה יותר לטיפול בפרומיציין בהשוואה לל. מיגו"ר, אולם תוצאות הניסוי הפוכות. חשיבות עבודה זו הינה בהדגשת הצורך בבדיקת רגישות ל. מיגו"ר לפרומיציין בצורה האמיסטוגוטית.

פתוגנזה: קוסמוס (אמו יאחז צוח) סניטוס גורם - זבוב החול (פיליפס) לזני גורם מעביר (וקטור): "אליו שים קוח" ינעומו גורם מעביר (פיליפס) לזני גורם מעביר (וקטור) הטפיל של לשמניה נישא בעזרת גורם מעביר -זבוב החול. בעולם הישן הגורם המעביר נמנה על זני ה-PHLEBOTOMUS. בעולם החדש זני המעביר מתקיימים ה-LUTZOMYIA מעברים את הטפיל. קטן של המעביר (פיליפס) המעביר את הטפיל. אזורי המחיה של זבובי החול נרחבים וכוללים מדבריות, יערות גשם, ערבות ורמות.

זבובי החול נחשבים בעלי מעוף קצר ולכן הם עפים מאות ספורות של מטרים מאזור מחיתם. הם מסוגלים לעוף דרך רשתות הודות לגודלם הקטן כ- 2-3 מ"מ, אולם הם מאוד רגישים לחומרי הדברה של מזיקים (3). מטפיל של זני המעביר (פיליפס) מאגר (חרוואר): זני המעביר (פיליפס) מאגר (חרוואר) רוב זני הלשמניאזיס הם זואופילים. חיות פרא כגון מכרסמים, שפני סלע וחיות כיס, וכן חיות בית (כגון כלבים), מהווים את המאגר של טפיל הלשמניה. זיהום בני אדם בל"ע הוא לרוב מקרי ונובע מכניסת האדם לאזור אנדמי וחשיפה לזבוב החול הנגוע. לאוכלוסית בני האדם המתגוררת באזורים אנדמים יש מבחן עורי חיובי ללשמניאזיס ב-10-32% מהמקרים. המבחן העורי, בדומה למבחן טוברקולין, מעיד על חשיפה לטפיל. (4)

זיהוי וטיפול בבעלי החיים הנגועים עשויים לאפשר שליטה טובה במחלה. מחזור החיים: זני המעביר (פיליפס) מאגר (חרוואר) על מנת לקיים מחזור חיים מלא לטפיל הלשמניאזיס יש צורך בזבוב החול כגורם מעביר וביונק כמאגר. באופן פשטני ניתן לומר כי הטפיל מתקיים בשתי

צורות. צורה אחת הינה צורת פרו-אמיסטוגוט (חוץ תאי ובעל שוטון) בתוך זבוב החול. צורה נוספת היא צורת אמיסטוגוט (תוך תאי וללא שוטון) ביונק(5). צורה נקבת זבוב החול מודבקת ע"י אמיסטוגוטים בעת ארוחת הדם של יונק נגוע. בקיבתה האחורית מתמין הטפיל לצורת הפרואמיסטוגוט ומתחיל להתחלק בתה במהירות רבה. בתקופה זו הטפיל נע קדימה לעבר הקיבה הקדמית ובארוחת הדם הבאה של זבובת החול מוזרק למאחסן הבא. (6-7)

**ביטוי קליני של לשמניאזיס בעור:**

באזור העקיצה שהוא לרוב אזור חשוף, מופיע נגע קשרי(פפולרי) אדום בקוטר 3-5 מ"מ ללא תסמינים. באופן איטי הנגע הולך וגדל והופך לקשר (נודולה) בקוטר 3-5 ס"מ עם כיב במרכזה, ועל גבי הכיב גלד והפרשות. רוב הנגעים חולפים בצורה עצמונית תוך מספר חודשים עד שנים, ומותרים אחריהם צלקת אופיינית. זמן הדגירה, המראה הקליני, מספר הנגעים, משך הזמן של התפתחות הנגעים וההחלמה תלויים בין היתר בזן הלשמניה. לדוגמא זמן הדגירה של לשמניה מיגו"ר הוא 2-8 שבועות לאחר העקיצה, בעוד שללשמניה טרופיקה זמן דגירה ממושך יותר, כ-8 חודשים(8).

**טיפול:**

בספרות קיימים טיפולים רבים המוצעים לל"ע(9), אולם לרוב מדובר בדווחים על מקרים ספורים בלבד ולא התבצעו מחקרים אקראיים כפולי סמיות עם בקרה. (10)

כמו כן הרופא מוצא את עצמו לא פעם מסתמך על טיפול, מינון ומשך זמן טיפול אשר מתאים לאזור גאוגרפי שונה מהאזור בו החולה רכש את הזיהום, וממילא יתכן אף מזן שונה של לשמניאזיס, עם ביטוי קליני ותגובה שונה לטיפול.

הטיפולים העומדים לבחירה הם: Pentavalent antimony, Sodium

Stibgluconate(11), Meglumine antimonite(11),

Hexadecylphosphocholine(12), Amphotericin B(13)

Pentamidine(14), Dapsone(15), Azoles(16-18), Paromomycin(19),

Imiquimod, Cryotherapy(20), Photodynamic therapy(21-22)

קימיים דיווחים על מקרים עמידים של לשמניאזיס לרוב הטיפולים המוצעים

כאן(23-30).

עבודה זו תתמקד בטיפול בפרומיצין. פרומיצין (לשקוטן) הינה תרופה שפותחה

ע"י קבוצה ישראלית תוך שיתוף פעולה בין בית החולים הדסה למחלקה

לפרזיטולוגיה באוניברסיטה העברית(19). המשחה נחשבת כיעילה בעיקר כנגד

לשמניה מיגו"ר. יחד עם זאת 3 שנים לאחר פרסום הטיפול בלשקוטן הופיעו

מחקרים אשר לא מצאו יעילות(31-33). לדעתנו הדבר מצביע על שוני ברגישות

לטיפול בלשקוטן, התלוי באזורים גאוגרפיים שונים.

למיטב ידיעתנו לא בוצע עד היום מחקר מעבדתי הבודק עמידות לשמניה

מייג'ור מאזורים גאוגרפיים שונים לטיפול בפרומיצין.



## מטרות העבודה:

1. לבחון את רגישות הטפיל לשמניה מיגו"ר לטיפול בפרומיציין (לשקוטן) בתנאי מעבדה.
2. לקבוע האם ישנו קשר בין האזור בו נרכש הזיהום למידת הרגישות לפרומיציין.

## שיטות:

### טפילים:

נלקחו טפילים אשר נשתמרו במעבדה בהקפאה, מפצעים של חולים שאובחנו בעבר כסובלים מל"ע מסוג לשמניה מיגו"ר.

הטפילים הופשרו וגודלו בתרביות בטמפרטורה של 26 מעלות צלזיוס במצע גידול מתאים עד אשר ריכוזם הגיע ל  $2 \times 10^7$  פרואמיסטוגוטים למ"ל.

### מצע גידול:

Medium-199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ M adenosine, 23  $\mu$ M folic acid, antibiotics (100 IU penicillin G and 100  $\mu$ g/ml streptomycin), 1 $\times$ BME vitamin mix, 25 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), 4.2mM NaHCO<sub>3</sub> and heat-inactivated fetal calf serum (fcs, 10% v/v) adjusted to pH 6.8.

### בדיקת רגישות:

בדיקת רגישות הפרואמיסטוגוטים לפרומיציין בוצעה על ידי חישוב הפעילות המטבולית של הטפיל. הפעילות המטבולית של הטפיל היא מדד לחיותו

ולחלופין ליעילות טיפול תרופתי כנגד הטפיל. הפעילות נמדדה בתאים בעזרת כרומטוגרפיה במצעים הבאים:

1. מצע גידול – ישמש כביקורת.
2. מצע גידול עם פרומיסטוגוטים – ישמש כ100% פעילות מטבולית של הטפיל.
3. מצע גידול עם פרומיסטוגוטים ואמפוטריצין ביי – ישמש כדיכוי מלא (100%) של פעילות הטפיל.
4. מצע גידול, פרומיסטוגוטים ו-5 ריכוזים שונים של פרמומיצין ישמש לביצוע חישוב אחוז דיכוי הפעילות המטבולית של הטפילים.

לכל מצע גידול יש 3 תאים, דבר המאפשר דיוק רב יותר במדידה ומשמש כביקורת נוספת בניסוי.

**חישובי אחוזי דיכוי:** חישוב אחוזי דיכוי משמש לחישוב דיכוי של תאים אחוז הדיכוי של הפרזיט חושב בעזרת הנוסחה הבאה בריכוזים שונים של פרמומיצין:

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

בעזרת אחוזי הדיכוי ניתן יהיה לחלץ את ה-EC50 של התרופה עבור אותו תנאי הטפיל. טפיל אשר EC50 שלו יהיה גדול באופן משמעותי מהמוצע יחשב לטפיל טפיל עמיד לפרומיציין.

החישובים יבוצעו באופן אוטומטי באמצעות תוכנת מחשב.

## תוצאות:

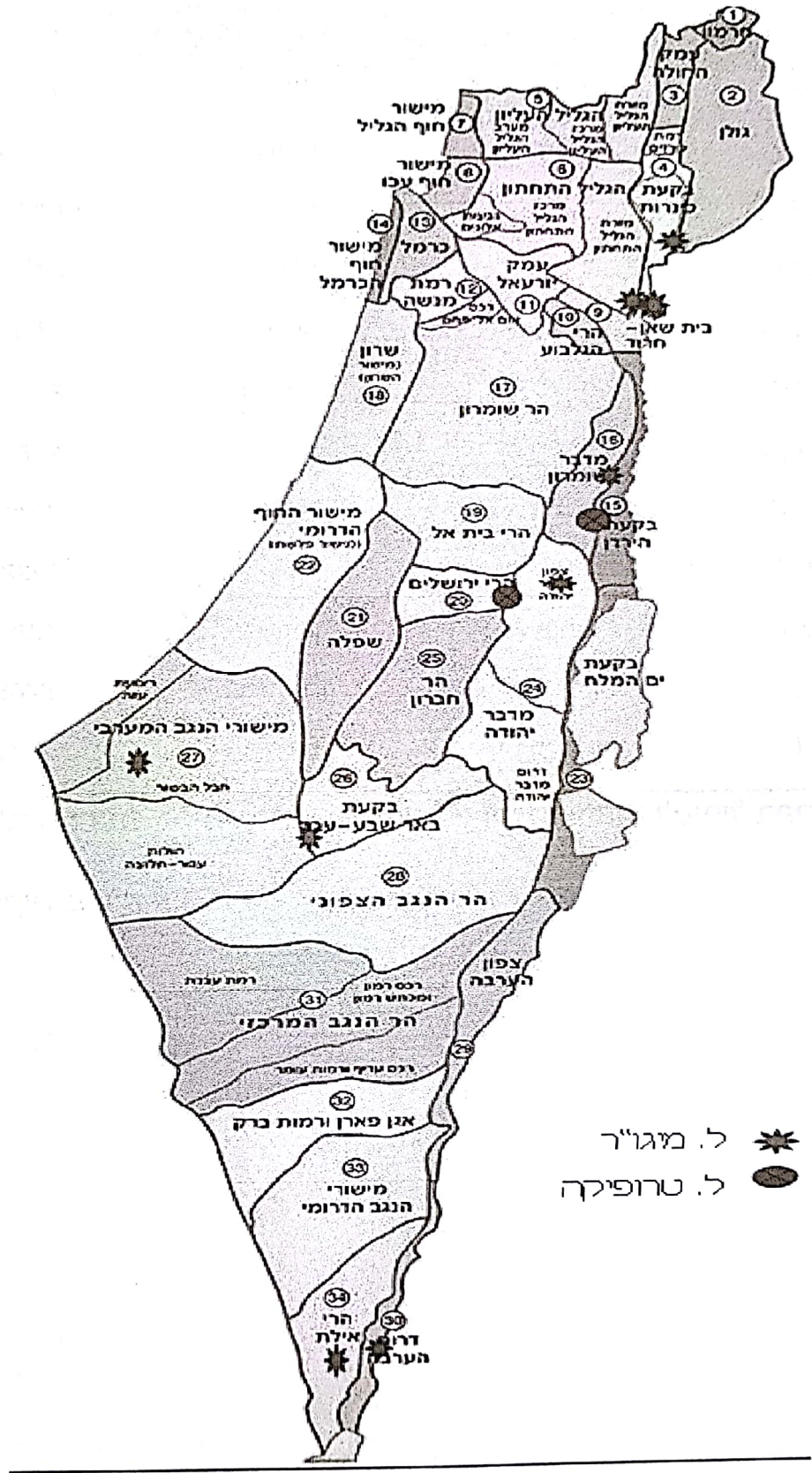
20 טפילי ל. מיגו"ר מחולים שונים מאזורים שונים בארץ, הופשרו וגודלו באופן  
בתרבויות עם מצע גידול מתאים. רק 10 דגימות טפילים הצליחו להתרבות  
ולהגיע לריכוז מתאים של  $2 \cdot 10^7$  פרומיסטוגוטים למ"ל. ניסיונות חוזרים לגדל  
את הטפילים מהפשרות שונות, והכנות חדשות של מצעי גידול, לא עלו יפה ולא  
הצליחו להביא לגידול דגימות נוספות.  
הצלחנו לגדל לריכוז המתאים גם 2 דגימות של ל. טרופיקה.  
בטבלה מובאות תוצאות הניסוי ברגישות הטפיל ל. מיגו"ר ול. טרופיקה  
לפרומיציין. רגישות הטפיל מבוטאת בעזרת EC50. טפיל אשר ה-EC50 שלו  
נמוך יותר, נחשב רגיש יותר לטיפול בפרומיציין. תחום הרגישות של הטפיל  
לשמניה מיגו"ר הוא 0.019-0.259mM, ללא קשר לאזור גאוגרפי (איור). כפי  
שניתן לראות באיור התקבלו דגימות מייצגות מאזורים שונים בארץ. החל בצפון  
הארץ, הכינרת ובית שאן, ועד דרומה, שיזפון והערבה, במערב צאלים ובמזרה  
בקעת הירדן. המספר הנמוך של הדגימות שהצלחנו להעמיד לניסוי, אינו  
מאפשר השוואה בעלת משמעות סטטיסטית בין אזורים שונים בארץ.  
תחום הרגישות של הטפיל ל. טרופיקה לפרומיציין הוא 0.021-0.025. הדגימות  
של ל. טרופיקה הגיעו מאזור השומרון והרי ירושלים. ניתן לראות כי לא היה  
הבדל משמעותי בין תחומי הרגישות של ל. מיגו"ר לל. טרופיקה, אולם טפילי ל.  
טרופיקה היו באופן כללי בתווך הגבוה יותר של רגישות לפרומיציין בהשוואה לל.  
מיגו"ר.



EC50 (mM)	זן	מקור	דגימה
0.259	ל. מיגו"ר	יריחו	L137
0.202	ל. מיגו"ר	בית שאן	בית שאן 1
0.118	ל. מיגו"ר	בית שאן	בית שאן 2
0.0497	ל. מיגו"ר	כינרת	P2317
0.0426	ל. מיגו"ר	ירחם	P2777
0.0413	ל. מיגו"ר	שביל ישראל*	P2855
0.0408	ל. מיגו"ר	צאלים	P2783
0.0388	ל. מיגו"ר	גיתית	P2399
0.037	ל. מיגו"ר	ערבה	P2374
0.019	ל. מיגו"ר	שיזפון	P2805
0.025	ל. טרופיקה	מעלה אדומים	P2858
0.021	ל. טרופיקה	מעלה אפרים	P2400

טבלת תוצאות בחינת רגישות ל. מיג"ר ול. טרופיקה לטיפול בפרומיצין.

\*מיקום מדויק אינו ידוע



איור

דיון: שיטת חובנית ללא היסטוריה רגישות בין האזור בו נרכש הזיהום למידת הרגישות לפרומיצין. מטרה זו לא הושגה, כיוון שלא התקבלו תוצאות מספיקות וכיוון שהתוצאות שהתקבלו סותרות את הניסיון הקליני. הניסיון הקליני מלמד כי ל. טרופיקה עמידה יותר לטיפול בפרומיצין בהשוואה ל. מיגו"ר, אולם תוצאות הניסוי הפוכות. מכך עלינו להסיק כי אין התאמה בין הבדיקה המעבדתית למידת רגישות הטפיל לפרומיצין. חשוב להדגיש כי למסקנות דומות הגיעו חוקרים אחרים אשר חקרו את רגישות הטפיל ל. דאנובי לטיפול בפנטוסטם בתנאי מעבדה(34).

הסברים אפשריים לחוסר ההתאמה בין בדיקת המעבדה למידת רגישות הטפיל לפרומיצין, עשויים לנבוע מהעובדה כי סביבת העבודה בתנאי מעבדה שונה מהסביבה הטבעית, בה מצוי מאכסן ולו מערכת חיסון וכיוצא בזה. בנוסף בדיקת הרגישות IN VITRO מתבצעת על הצורה הפרומסטיגוטית, ואילו הצורה הקיימת IN VIVO, ושה מטפלים היא התוך תאית, דהיינו אמיסטוגוט. תנאי הגידול של הטפילים, ובחינת העמידות לטיפול, בצורה האמיסטוגוטית בעייתיים. הדרך לבחון רגישות לטיפול של אמיסטוגוטים, היא הדבקה של מאקרופגים בעזרת פרומיסטוגוטים. אולם תוצאות בדיקת הרגישות בשיטה זו מושפעים ע"י גורמים שונים, בין היתר לאור העובדה כי קיימת שונות גבוהה ביכולת ההדבקה וההתרבות של הטפיל בתוך המאקרופגים(35,36). אם כן שיטת בדיקת הרגישות בצורה האמיסטוגוטית לוקה בחסר. בשנים האחרונות נעשה ניסיון לשפר שיטה זו ללא הצלחה משמעותית(37). לאור זאת החלטנו

שלא להשתמש בבחינת הרגישות בצורה האמיסטוגוטית, אלא לנסות לראשונה

לבחון את רגישות הטפיל לשמניה מיגו"ר בצורה הפרומסטיגוטית לטיפול

בפרומיצין. חשיבות עבודה זו הינה בהדגשת הצורך בבדיקת רגישות בצורה

האמיסטוגוטית. יש צורך להמשיך ולנסות לפתח את שיטות המעבדה אשר

יאפשרו בחינת רגישות עם אמיסטוגוטים.



1. Choi, CM, Lerner, EA. *Leishmaniasis as an emerging infection. J Invest Dermatol Symp Proc* 2001; 6:175.
2. Update: *Cutaneous leishmaniasis in U.S. military personnel-- Southwest/Central Asia, 2002-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53:264.
3. Feliciangeli MD. *Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol.* 2004;18:71-80.
4. Weigle KA, Valderrama L, Arias Al et al. *Leishmaniasis skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. Am J Trop Med Hyg* 1991;44:260-71.
5. Murray, HW, Berman, JD, Davies, CR, et al. *Advances in leishmaniasis. Lancet* 2005; 366:1561.
6. Kamhawi S. *Phlebotomine sand flies and leishmania parasites: friends or foes? Trends Parasitol.* 2006;22:439-45.
7. Sacks D, Kamhawi S, *Molecular aspects of parasite vector and vector host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol.* 2001;55:453-83.
8. Melby, PC. *Experimental leishmaniasis in humans: review. Rev Infect Dis* 1991; 13:1009.
9. Lee SA, Hasbun R. *Therapy of cutaneous Leishmaniasis. Int J Infect Dis* 2003;7:86-93.
10. Khatami A, Firooz A, Gorouhi F et al. *Treatment of acute old world cutaneous leishmaniasis: a systematic review of randomized controlled trials. J Am Acad Dermatol.* 2007;57:329-35.
11. Davidson RN. *Practical guide for the treatment of leishmaniasis. Drugs* 1998;56:1009-18.
12. Soto J, Toledo J, Gutierrez et al. *Treatment of american cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. Clin Infect Dis* 2001;33:E57-61.
13. Evans TG. *Leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am.* 1993;7:527-46.
14. Soto-Mancipe J, Grogl M, Berman JD. *Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Clin Infect Dis.* 1993;16:417-25.
15. Dogra J. *A double blind study on the efficacy of oral dapsone in cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991;85:212-3.
16. Weinrauch L, Livshin R, Elon J. *ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. Br J Dermatol.* 1987;117:666-8.
17. Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M et al. *Treatment of cutaneous leishmaniasis with itraconazole. Randomized double blind study. Arch Dermatol.* 1996;132:784-6.
18. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB et al. *Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major. N Engl J Med.* 2002;346:891-5.
19. El ON J, Halevy S, Grunwald MH et al. *Topical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major: a double blind control study. J Am Acad Dermatol.* 1992;27:227-31.
20. Al Gindan Y, Kubba R, Omer AH et al. *Cryosurgery in old world cutaneous leishmaniasis. Br J Dermatol.* 1988;118:851-4.

21. Enk CD, Fritsch C, Jonas F et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 2003;139:432-4.
22. Gardlo K, Horska Z, Enk CD et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:893-6.
23. Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop.Med. Int. Health* 6, 654–849.
24. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. 2006 Feb-Apr;9(1-2):26-39.
25. Coroft SL, Sandar S. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):111-26.
26. Berman, J. D., J. D. Chulay, L. D. Hendricks, et al. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982; 31:459–465.
27. Escobar, P., S. Matu, C. Marques, et al. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002; 81:151–157.
28. Basselin, M., H. Denise, G. H. Coombs, et al. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:3731–3738.
29. Rangel, H., F. Dagger, A. Hernandez, A. et al. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40:2785–2791.
30. Navin, T. R., B. A. Arana, F. E. Arana, J. D. et al. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J. Infect. Dis.* 1992; 165:528–534
31. Neal, R. A., S. Allen, N. McCoy, P. Olliaro, et al. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995;35:577–584.
32. Asilian A, Jalayer T, Whitworth JA et al. A randomized placebo controlled trial of a two week regimen of aminosidine ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Irna. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53:648-51.
33. Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A et al. A randomized placebo controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53:162-6
34. Sharief AH, Gasim Khalil EA, Theander TG, et al. *Leishmania donovani*: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Exp Parasitol.* 2006 Dec;114(4):247-52. Epub 2006 May 23.
35. Carrió J, de Colmenares M, Riera C. *Leishmania infantum* stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. *Exp Parasitol.* 2000 Jul;95(3):209-14.
36. Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001 Nov;6(11):899-905
37. da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin JC et al. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5197-203