

Köpeklerde Kanin Leishmaniasis Etkeni *Leishmania tropica*'da İlaç Dirençlerinin Araştırılması

Investigation of Drug Resistance in *Leishmania tropica* as Causative Agent of Canine Leishmaniasis

Nami Ege Perk[®], İbrahim Çavuş[®], Ahmet Özbilgin[®]

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Öz

Amaç: Leishmaniasis dünyada 98 ülkede endemik olarak görülmekte ve 1 milyar insan için risk oluşturmaktadır. Zorunlu hücre içi paraziti *Leishmania* spp.'nin köpeklerde oluşturduğu enfeksiyona ise Kanin Leishmaniasis (KanL) adı verilmektedir. Bu çalışmada, ülkemizdeki köpeklerden izole edilmiş *Leishmania tropica* suşlarının, leishmaniasis tedavisinde uygulanan amfoterisin B, meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonata karşı direnç durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Sıvı azottan çıkarılan *Leishmania* spp. promastigotları NNN besiyerine ekilmiş ve üreme-ye başlayan izolatların RPMI-1640 besiyerinde kültürasyonu yapılarak bol miktarda promastigot elde edilmiştir. *Leishmania* spp.'nin ITS-1 bölgesine özgü primer ve probalarıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle genotiplendirme gerçekleştirilen ve KanL etkeni *L. tropica* olduğu saptanan beş izolatta hemositometre ve XTT yöntemleriyle amfoterisin B, meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonata direnç durumu incelenmiştir.

Bulgular: Hemositometre yöntemi beş izolat için ortalama IC₅₀ değerleri meglumin antimonat için 10.60 mg/ml, sodyum stiboglukonata için 0.1471 mg/ml, amfoterisin B için 0.0328 µM/ml olarak saptanmıştır. XTT yöntemi ile saptanan ortalama IC₅₀ değerleri ise meglumin antimonat için 10.48 mg/ml, sodyum stiboglukonata için 0.1470 mg/ml, amfoterisin B için 0.0326 µM/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: Verilerimiz doğrultusunda KanL olgularından izole edilen ve köpeklerde çok ender olarak etken olan *L. tropica* suşlarında amfoterisin B ve sodyum stiboglukonata direnç geliştiği saptanmazken, parazitin meglumin antimonata karşı ilaç direnci geliştirdiği görülmektedir. İleride bu durumun insan kutanöz leishmaniasis olgularında tedavi sırasında bir sorun olarak karşımıza çıkacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kanin Leishmaniasis, *Leishmania tropica*, direnç, antiparaziter ilaç, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Leishmaniasis is endemic in 98 countries, and poses risk to 1 billion people in the world. The infection caused by obligatory intracellular parasite *Leishmania* spp. in dogs is called Canine Leishmaniasis (CanL). In this study, it was aimed to detect the resistance status of *Leishmania tropica* strains isolated from dogs in our country against amphotericin B, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate applied in leishmaniasis treatment.

Method: *Leishmania* spp. promastigotes, taken out from the liquid nitrogen were first cultured in NNN media, then the growing isolates were transferred to RPMI-1640 medium and abundant amount of promastigotes were obtained. Isolates were genotyped using real-time polymerase chain reaction method with primers and probes specific to the ITS-1 region of *Leishmania* spp. and in five isolates that were found to be *L. tropica* causing CanL, resistance status against amphotericin B, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate was investigated by hemocytometer and XTT methods.

Results: The mean IC₅₀ values were determined as 10.60 mg/ml for meglumine antimoniate, 0.1471 mg/ml for sodium stibogluconate, 0.0328 µM/ml for amphotericin B by hemocytometer method. Average IC₅₀ values determined by XTT method were 10.48 mg/ml for meglumine antimoniate, 0.1470 mg/ml for sodium stibogluconate, 0.0326 µM/ml for amphotericin B.

Conclusion: According to our data, while *L. tropica* strains which were isolated from CanL cases which are very rarely found causative agents in dogs, were not found to be resistant to amphotericin B and sodium stibogluconate, parasite developed drug resistance against meglumine antimoniate. In future, this situation is thought to be a problem during treatment in human cutaneous leishmaniasis cases.

Keywords: Canine Leishmaniasis, *Leishmania tropica*, resistance, antiparasitic drug, Turkey

Alındığı tarih / Received:

23.03.2020 / 23.March.2020

Kabul tarihi / Accepted:

27.07.2020 / 27.July.2020

Yayın tarihi / Publication date:

31.12.2020 / 31.December.2020

ORCID Kayıtları

N. E. Perk 0000-0002-6411-4096

İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146

A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ egeprk@gmail.com

Atf: Perk NE, Çavuş İ, Özbilgin A. Köpeklerde kanin Leishmaniasis etkeni *Leishmania tropica*'da ilaç dirençlerinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg. 2020;50(4):234-43.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

GİRİŞ

Leishmaniasis, eski dünyada *Phlebotomus* ve yeni dünyada *Lutzomyia* cinsi kum sineklerinin kan emmesi ile omurgalı konaklara bulaşan heteroksen hücre içi bir parazitten kaynaklanan tropikal ve subtropikal bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, leishmaniasis yedi önemli tropikal hastalıktan biridir ve ölümlerle sonuçlanabilen geniş bir klinik yelpazesi olan dünya halk sağlığı sorunudur. Parazit insanlarda kutanöz (KL), visseral (VL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç temel formda hastalık oluşturmaktadır. Parazitin doğada en önemli rezervuarı olan köpeklerde meydana gelen enfeksiyona ise kanin leishmaniasis (KanL) adı verilmektedir. Dünyada 98 ülkede endemik olarak görülen leishmaniasis Asya, Afrika, Amerika kıtaları ile Akdeniz havzasında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Hastalıkla enfekte yaklaşık 12-15 milyon insanın olduğu ve bu sayıya her sene 1-1.5 milyon yeni olgunun eklendiği tahmin edilmektedir. Leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısının 65 bine varan sayılarda olabileceği ve dünya çapında endemik bölgelerde yaşayan 1 milyar insanın risk altında olduğu düşünülmektedir^(1,2).

Leishmaniasis tedavisinde uzun yıllardır ilk seçenek olarak pentavalent antimon bileşiklikleri kullanılmaktadır. Antimon bileşikleri son derece toksik maddelerdir ve uzun kullanım sonucu miyalji, pansitopeni, karaciğer ve pankreas enzimlerinde yükselme, pankreatit, kardiyak aritmi ve hepatit gibi ciddi yan etkiler gösterebilmektedir. Ayrıca bu bileşiklere direnç gösteren olgular sıklıkla bildirilmektedir. Tedavide bir diğer seçenek amfoterisin B (AmpB)'dir. Çoğu zaman %95 etkinlik gösteren bu ilaç oldukça pahalıdır ve özellikle HIV/*Leishmania* koenfeksiyonunda başarısız olabilmektedir. Tedavide alternatif olarak miltefosin, paramomisin ve pentamidin gibi farklı bileşikler de kullanılmaktadır, ancak bu ilaçlar parazitin türüne, klinik forma ve bağışıklık durumuna göre değişken etkiler göstermektedir. Köpeklerde tedavi, parazitin tamamen elimine edilememesi nedeniyle insan olgularındaki tedaviye göre çok daha zorludur. Köpeklerde sıklıkla allopurinol kullanılmaktayken, özellikle

Akdeniz havzasında meglumin antimonat kullanımı da bildirilmektedir. KanL tedavisi daha çok klinik belirtileri hafifletmeye yöneliktir ve köpeklerde parazitin relapse olması ile sık karşılaşılmaktadır. İnsan olgularında kullanılan ilaçların köpeklerde çok daha toksik etki yaratması ve yine insan olgularında kullanılan ilaçlara olası bir direncin gelişmesine neden olabilmesi gibi riskler, KanL tedavisini kısıtlamaktadır⁽³⁾.

Geçtiğimiz 15 yılda dünyada antimon bileşiklerine karşı gelişen bir direnç söz konusudur. Özellikle Hindistan'da antimon direnci ciddi boyutlara ulaşmış ve Bihar bölgesinde olguların %60'ı antimon bileşikleriyle tedavi edilemez duruma gelmiştir. Dünyanın farklı bölgelerinde olduğu gibi ülkemizde de antimon dirençli olgular ile karşımıza çıkmaktadır⁽⁴⁾. Yüksek oranda etkili olan AmpB'nin tedavi de başarısız olduğu olgular Hindistan ve Avrupa'nın çeşitli ülkelerinden bildirilmektedir^(5,6).

Çalışmamızda, veteriner hekimlik ve halk sağlığı sorunu oluşturan leishmaniasis etkeni *Leishmania tropica* ile doğal yollardan enfekte olmuş köpeklerden elde edilmiş ve sıvı azotta saklanmış izolatlarda olası bir direnç durumunun araştırılması amaçlanmıştır. İzolatların her biri *in vitro* ortamda etken maddeler ile taranmış ve izolatlarda yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyon değerleri (IC₅₀) saptanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sıvı azotta muhafaza edilen KanL olgularından izole edilmiş 10 *Leishmania* spp. azot tankından çıkarılmış ve 37 °C'lik su banyosundan hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. Çözdürülen izolatlardan mikroskop altında canlılıkları kontrol edilmiştir. Promastigotlarında canlılık saptanan 10 izolat RPMI-1640 ve %15 FCS içeren NNN besiyerine ekilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen NNN besiyerleri 25°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ekim işlemini takip eden 3., 5., 7. ve 9. günlerde besiyerleri kontrol edilmiş ve üreyen promastigotlar RPMI-1640 besiyeri ile flaslara aktarılmıştır. Eş zamanlı olarak kontrol grubu amacıyla kullanılacak olan referans *L. tropica* (MHOM/A7/1974/SAF-K27)

izolatı da flasklarda üretilmiştir.

Flasklarda 10^7 promastigot/ml miktarda üreyen promastigotlar steril 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır. Falconlara eklenen serum fizyolojik ile iki kez yineleyen santrifüj işleminin ardından elde edilen pelletlerden 200 µl DNA izolasyonunda kullanmak amacıyla ependorf tüplerine aktarılmıştır. Ependorf tüplerinde bulunan materyallerden "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit" ticari kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA'lar ilk olarak, *Leishmania* türlerinin small subunit rRNA (SSU rRNA) ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genlerini ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS-1) bölgesine özgü primer ve probler ile çoğaltılmıştır^(7,8).

Forward primer; 5'-CTGGATCATTTCCGATG-3'

Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3'

Probe 1: 5'-CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT-Fluo-3'

Probe 2: 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'

Çalışmada, leishmaniasis tedavisinde uygulanan standart ilaçlar olan meglumin antimonat (Glucantime®), sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve AmpB'nin direnç durumları, mikroplak dilüsyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir.

Besiyeri ile homojen şekilde karıştırılan ilaçlı ilk kuyucuktan başlayarak sırasıyla tüm kuyucuklara mikropipet ile 100 µl alıp vererek dilüe edilmiş, son kuyucuktan alınan 100 µL karışım atılmıştır. Plakların ilk kuyucuklarına meglumin antimonat için 40.5 mg/ml, sodyum stiboglukonat için 50 mg/ml, AmpB için ise 1 µM/mL konsanrasyonda ilaç konmuş ve tüm kuyucuklara dilüe edilmiştir. Ardından kuyucuklardaki karışımların üzerine 100 µl promastigot süspansiyonu (10^6 promastigot/ml) eklenmiştir. Kör kuyucuklara parazit, pozitif kontrol kuyucuklarına ise ilaç eklenmemiştir. Plakların kapağı kapatılmış ve parafilm ile sıkı bir şekilde sarılarak 25°C etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kırk sekiz saat sonra etüvden çıkarılan plaklarda ilaçların, hemosi-

tometre ve XTT ((sodium 3,3',5,5'-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)) yöntemleri ile *in vitro* etkinlikleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Hemositometre yöntemi Neubauer'in Thoma lamı ile gerçekleştirilmiştir. Lamın iki ucunda bulunan çıkıntılar ıslatılmış ve bu çıkıntıların arasını kapatacak şekilde lamel yerleştirilmiştir. Ardından plaklar etüvden çıkarılmış, tüm kuyucuklardan alınan her bir örnek, farklı lamaların sayım kamaralarına damlatılmıştır. Lam üzerine yayılması ve hareketsizleşmesi beklenen sıvı materyal mikroskop altında 40x objektif ile incelenmiştir. Lamın köşelerindeki dört kare ve orta alanda bulunan karedeki canlı promastigotlar sayılarak 10.000 ile çarpılmıştır. Elde edilen sonuç sayılan kare sayısına bölünerek mililitredeki promastigot sayısı belirlenmiştir⁽⁹⁾.

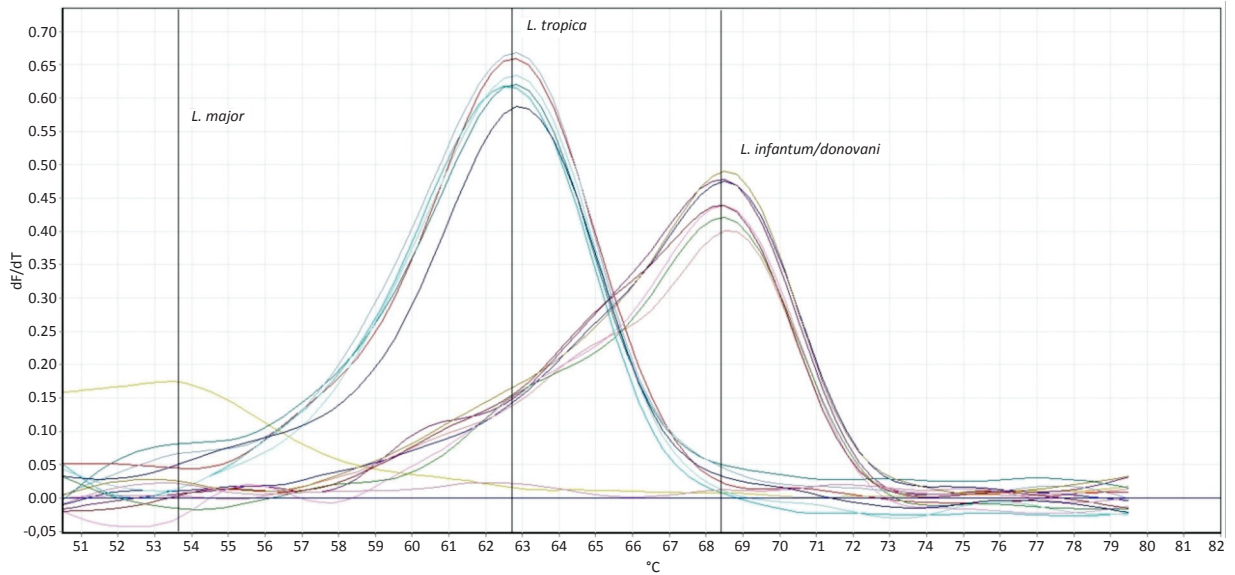
Hemositometre yöntemi sonrasında XTT yöntemi için, plak içerisindeki tüm kuyucuklardan alınan 100 µl materyal yeni bir 96'lık plağa aktarılmıştır. Steril bir küvette 0.1 ml electron coupling ve 5 ml reagent karıştırılmış, karışım plağın her bir kuyucuğuna 50 µl miktarda eklenmiştir. Plak 25°C etüvde dört saat inkübasyona bırakılmıştır. Dört saat sonunda etüvden çıkarılan plak 450 nm spektrofotometrede okunmuş ve absorbans değerleri elde edilmiştir. Canlılık yüzdeleri aşağıda paylaşılan formülasyon ile hesaplanmıştır⁽¹⁰⁾.

$$\text{Canlılık Yüzdesi (\%)} = \frac{(\text{Çalışma örneği absorbansı}) - (\text{Blank absorbansı})}{(\text{Kontrol absorbansı}) - (\text{Blank absorbansı})} \times 100$$

Bu araştırma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 21.05.2019-E.42583 tarih ve sayı ile onaylanmıştır.

BULGULAR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ – PZR) analizleri sonucunda 10 izolattan beşi *L. tropica*, diğer beşi ise *L. infantum/donovani* olarak genotipendirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kanin leishmaniasis olgularından izole edilen izolatlarda ITS-1 bölgesine özgü GZ-PZR 'de erime eğrileri.

Kullanılan MCBÜCAN3, MCBÜCAN6, MCBÜCAN7, MCBÜCAN8 VE MCBÜCAN10 izolatlarında meglumin antimonat için IC_{50} değerleri hemositometre yönteminde sırasıyla 7.362 mg/ml (6.768-8.007), 18.15 mg/ml (16.58-19.86), 14.78 mg/ml (12.66-17.23), 2.627 mg/ml (2.506-2.754), 10.06 mg/ml (9.875-10.25), XTT yönteminde ise 7.351 mg/ml (6.755-8.00), 17.55 mg/ml (16.18-19.03), 14.78 mg/ml (12.70-17.19), 2.621 mg/ml (2.498-2.749), 10.08 mg/ml (9.895-10.26) olarak saptanmıştır. Sodyum stiboglukonat için IC_{50} değerleri hemositometre yönteminde sırasıyla 0.0751 mg/ml (0.0731-0.0768), 0.1135 mg/ml (0.1096-0.1176), 0.2024 mg/ml (0.1932-0.2120), 0.2416 mg/ml (0.2314-0.2531), 0.1029 mg/ml (0.0992-0.1067) olarak hesaplanırken, XTT yönteminde 0.0754 mg/ml (0.0729-0.0772), 0.1128 mg/ml (0.1089-0.1169), 0.2019 mg/ml (0.1935-0.2107), 0.2417 mg/ml (0.2320-0.2525), 0.1033 mg/ml (0.0996-0.1070) olarak hesaplanmıştır. AmpB için hemositometre yönteminde IC_{50} değerleri 0.0263 μ m/ml (0.0230-0.02995), 0.0277 μ m/ml (0.02582-0.02977), 0.0474 μ m/ml (0.04373-0.05143), 0.0301 μ m/ml (0.02763-0.03269), 0.0317 μ m/ml (0.03019-0.03331) olarak belirlenirken, XTT yönteminde ise 0.0264 μ m/ml (0.02311-0.03006), 0.0277 μ m/ml (0.02579-

0.02967), 0.0470 μ m/ml (0.04332-0.05087), 0.0316 μ m/ml (0.03019-0.03334) olarak belirlenmiştir. Referans izolatu olarak kullanılan *L. tropica* (MHOM/A7/1974/SAF-K27) izolatının hemositometre yönteminde meglumin antimonat için IC_{50} değeri 1.129 mg/ml (0.9827-1.296) sodyum stiboglukonat için 0.1128 mg/ml (0.1072-0.1187), AmpB için ise 0.04278 μ M/ml (0.03934-0.04651) olarak hesaplanırken, XTT yönteminde bu değerler meglumin antimonat için 1.102 mg/ml (0.975-1.249), sodyum stiboglukonat için 0.1142 mg/ml (0.1085-0.1202), AmpB için ise 0.04337 μ M/ml (0.03963-0.04743) olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda kullanılan KanL izolatları, referans izolatının IC_{50} değerleri ile değerlendirildiğinde, izolatlar sodyum stiboglukonat ve AmpB'ye duyarlılık göstermektedir. Diğer bir yandan meglumin antimonat değerlerinde MCBÜCAN8 ilaca duyarlılık göstermekteyken, diğer izolatlar yüksek IC_{50} değerleri ile dirence işaret etmektedir. IC_{50} değerleri Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, www.graphpad.com) programı ve [log(inhibitor) vb. normalized response -Variable slope] denklemi ile hesaplanmıştır (Tablo 1, 2).

Çalışmamızda, hemositometre yöntemi beş izolatta ortalama IC_{50} değerleri meglumin antimonat için

Tablo 1. Hemositometre yöntemine göre IC₅₀ değerleri.

İzolat Kodu	Meglumin Antimonat (mg/ml)	Sodyum Stiboglukonat (mg/ml)	Amfoterisin B (µM/ml)
MCBÜCAN 3	7.362 (6.768-8.007)	0.0751 (0.0731-0.0768)	0.0263 (0.0230-0.02995)
MCBÜCAN 6	18.15 (16.58-19.86)	0.1135 (0.1096-0.1176)	0.0277 (0.0258-0.0298)
MCBÜCAN 7	14.78 (12.66-17.23)	0.2024 (0.1932-0.2120)	0.0474 (0.0437-0.0514)
MCBÜCAN 8	2.627 (2.506-2.754)	0.2416 (0.2314-0.2531)	0.0301 (0.0276-0.0327)
MCBÜCAN 10	10.06 (9.875-10.25)	0.1029 (0.0992-0.1067)	0.0317 (0.0302-0.0333)
<i>Leishmania tropica</i> (MHOM/A7/1974/SAF-K27) (Kontrol Grubu)	1.129 (0.9827-1.296)	0.1128 (0.1072-0.1187)	0.0428 (0.0393-0.0465)

Tablo 2. XTT yöntemine göre IC₅₀ değerleri.

İzolat Kodu	Meglumin Antimonat (mg/ml)	Sodyum Stiboglukonat (mg/ml)	Amfoterisin B (µM/ml)
MCBÜCAN 3	7.351 (6.755-8.00)	0.0754 (0.0729-0.0772)	0.0264 (0.0231-0.0301)
MCBÜCAN 6	17.55 (16.18-19.03)	0.1128 (0.1089-0.1169)	0.0277 (0.0258-0.0297)
MCBÜCAN 7	14.78 (12.70-17.19)	0.2019 (0.1935-0.2107)	0.0470 (0.0433-0.0509)
MCBÜCAN 8	2.621 (2.498-2.749)	0.2417 (0.2320-0.2525)	0.0301 (0.0276-0.0326)
MCBÜCAN 10	10.08 (9.895-10.26)	0.1033 (0.0996-0.1070)	0.0316 (0.0302-0.0333)
<i>Leishmania tropica</i> (MHOM/A7/1974/SAF-K27) (Kontrol Grubu)	1.102 (0.975-1.249)	0.1142 (0.1085-0.1202)	0.0434 (0.0396-0.0474)

Tablo 3. İzolatların Hemositometre ve XTT yöntemleri ile saptanan ortalama IC₅₀ değerleri.

İlaçlar	Hemositometre Ortalama IC ₅₀ Değerleri	XTT Ortalama IC ₅₀ Değerleri
Meglumin Antimonat (mg/ml)	10.60±6.1	10.48±5.9
Sodyum Stiboglukonat (mg/ml)	0.1471±0.07	0.1470±0.07
Amfoterisin B (µM/ml)	0.0328±0.008	0.0326±0.008

10.60±6.1 mg/ml, sodyum stiboglukonat için 0.1471±0.07 mg/ml, AmpB için 0.0328±0.008 µM/ml olarak saptanmıştır. XTT yöntemi ile saptanan ortalama IC₅₀ değerleri ise meglumin antimonat için

10.48±5.9 mg/ml, sodyum stiboglukonat için 0.1470±0.07 mg/ml, AmpB için 0.0326±0.008 µM/ml olarak bulunmuştur (Tablo 3).

TARTIŞMA

Geçtiğimiz 10 yılda görülme sıklığında artış gözlenen KL ile yaklaşık her 20 saniyede bir kişinin enfekte olduğu hesaplanmaktadır. Kırsal bölgelerden şehir merkezlerine göç, endemik bölgelere çalışmaya giden insanlar, yetersiz beslenme, sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ve HIV/*Leishmania* koenfeksiyonundaki artış, görülme sıklığının yükselmesine neden olmaktadır. Leishmaniasis ihmal edilen, gelişmemiş ülkelerde tanısının gerçekleştirilemediği ve bu nedenle rapor edilemeyen hastalıklar arasındadır. Dolayısıyla gerçek prevalansının resmi rakamların üzerinde olduğu düşünülmektedir. Leishmaniasis nedeniyle tıbbi bakım ve tedaviler ile birlikte iş gücü kaybına bağlı ekonomik zarar ciddi bir boyut almaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise HIV/*Leishmania* koenfeksiyonunda görülen artış ve koenfeksiyona bağlı tedavide başarısızlıklar, vektörün iklim değişikliği ile kuzey paralellerde ortaya çıkması sonucu gibi nedenlerle leishmaniasise ilgiyi artmaktadır^(1,11).

Leishmaniasis standart tedavisinde meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat 60 yıldan fazla bir süredir ilk seçenek olarak tercih edilmektedir. Ancak, geçtiğimiz 15 yılda dünyanın farklı bölgelerinden, çeşitli *Leishmania* türlerinin, bu bileşiklere direnç geliştirdiğini gösteren olgularla karşılaşmaktayız. Yapılan çalışmalarda VL'nin endemik olarak görüldüğü Hindistan'ın kuzeyinde bu ilaçlara karşı direnç gelişiminin arttığı bildirilmektedir⁽⁴⁾. Aynı zamanda Ortadoğu^(12,13), Avrupa⁽¹⁴⁾ ve Güney Amerika'da⁽¹⁵⁾ pantavalent antimon bileşiklerine karşı dirençli olgular bildirilmektedir. Hindistan'ın Bihar bölgesinde antimon bileşikleri ile tedavi %60 oranda başarısız olmakta ve dirençli parazitler ile enfekte hastalar artık tedaviye yanıt vermemektedir. Ülkemizde de yakın zamanda meglumin antimonata dirençli olgular bildirilmektedir⁽¹⁶⁾.

Tedavide 1960'lı yıllardan beri antileishmanial ilaç olarak kullanılan bir diğer seçenek AmpB'dir⁽¹⁷⁾. İntravenöz yolla verilen bu ilaç, böbrekler üzerinde toksisite göstermektedir ve yüksek maliyetlidir.

Laboratuvar ortamında, *in vitro* çalışmalarda *Leishmania* spp. suşlarına uygulanan AmpB'ye hem promastigot hem de amastigot formların direnç gösterebildiği bildirilmiştir^(18,19). İlaça direnç gösteren ilk olgular Hindistan'dan bildirilmektedir^(20,21). Fransa'da HIV/*Leishmania* koenfeksiyonunda ve İsviçre'de immün sistemi baskılanmış bir hastada AmpB'nin tedavide başarısız olduğu rapor edilmiştir^(22,23).

Kanin leishmaniasis tedavisinde günümüzde en sık uygulanan ilaçlar arasında allopurinol, miltefosin ve meglumin antimonat yer almaktadır. Bu ilaçların yanı sıra sodyum stiboglukonat ve AmpB ile deneysel ilaç çalışmaları da bildirilmektedir⁽²⁴⁻²⁷⁾. Bununla birlikte, Grandoni ve ark.'nın⁽²⁸⁾ yaptığı araştırma, meglumin antimonat tedavisi alan hasta köpeklerde klinik belirtilerin hafiflediğini ancak hastalığın relapse olduğunu ve birden çok ilaç tedavisi alan köpeklerin de kum sineklerini enfekte edebildiğini göstermektedir.

Eski Dünya'da *L. infantum*, Yeni Dünya'da ise *L. infantum*'un sinonimi olan *L. chagisi*, köpeklerde KanL hastalığını oluşturmakta ve etkenin köpeklerde rezervuar olarak bulunması ile zoonotik leishmaniasisin tekrarı sağlanmaktadır⁽²⁹⁾. Fakat çok ender olarak, *L. tropica* türü de köpeklerde KanL enfeksiyonu meydana getirebilmektedir⁽³⁰⁻³²⁾. İnsanlarda en sık KL oluşturan tür olan *L. tropica* türü bölgemizde beş köpekten izole edilmiştir. Bu çalışmada, zaman zaman karşımıza çıkan dirençli insan KL olgularının, rezervuar olan köpeklerdeki *L. tropica* türleri ile ilişkisi ve köpeklerden elde edilen beş ender *L. tropica* suşlarının direnç durumu ilk kez araştırılmıştır. Bu nedenle çalışmamız, *L. infantum* köpek suşları ile yapılan diğer çalışmalardan farklıdır. Çalışmamızda, köpeklerde ender olarak parazitlenen insan KL etkeni *L. tropica* türünün ülkemizdeki elde edilen ilk ender izolatlarıdır. Bu nedenle çalışma zoonotik *L. tropica*'ya odaklanmıştır.

Ülkemizin de içerisinde bulunduğu Akdeniz havzasında KanL etkeni sıklıkla *L. infantum*'dur. Köpeklerden izole edilmiş *L. tropica* suşları ile yapılmış bir çalışma olmaması, köpek suşlarında az sayıda *in vitro* ve

in vivo direnç testi çalışması yapılması gibi nedenlerden dolayı sonuçlarımızın oldukça değerli olduğunu düşünmekteyiz.

Altı sağlıklı köpeğin *L. infantum* ile enfekte edildiği bir çalışmada, köpeklere meglumin antimonat tedavisi uygulanmıştır. Klinik belirtileri kaybolan köpeklerin tedaviye başlanılan tarihten 20 hafta sonra total protein ve gamaglobülin seviyelerinde yeni bir artış gözlemlenmiş ve bu artış parazitin relapse olduğunu düşündürmüştür⁽³³⁾.

Moreno ve ark.'nın⁽³⁴⁾ çalışmalarında doğal yollardan enfekte olmuş 11 köpeğin tedavisinde AmpB uygulanmıştır. Tedaviden bir ay sonra klinik belirtilerin iyileştiği, antikor düzeylerinin düştüğü ve biyopsi materyallerinin kültüründe parazitin çoğalmadığı bildirilirken, tedaviden beş ay sonra bazı köpeklerde antikor düzeyleri tedavi öncesiyle benzer titrelere görülmüş ve biyopsi materyallerinin kültüründe parazitlerin çoğaldığı bildirilmiştir⁽³⁴⁾.

Lamothe⁽³⁵⁾ seropozitif KanL hastası 19 köpekte AmpB tedavisi uygulamıştır. Tedavinin ardından klinik seyri iyileşen köpeklere uygulanan serolojik testler sonucunda sekiz köpek pozitif sonuç vermiştir.

Ikeda-Garcia ve ark.⁽³⁶⁾ çalışmalarında, yedi evcil köpeğe derialtı meglumin antimonat tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında dalak ve karaciğer materyalleri 30 gün boyunca kültürde tutulan yedi köpeğin materyallerinden beşinde promastigotların çoğaldığı gözlemlenmiştir.

Gramiccia ve ark.⁽³⁷⁾, dört köpekten tedavi öncesi ve meglumin antimonat tedavisi sonrası *L. infantum* izolatları izole etmiştir. *In vivo* meglumin antimonat duyarlılık testlerinde, tedavi öncesi elde edilen izolatlarda ED₅₀ değerleri 0.1-0.2 mg/kg arasıdayken, tedavi sonrası elde edilen izolatlarda ED₅₀ değerlerinin 1.6-4.1 mg/kg aralığında olduğu bildirilmektedir. Tedavi alan köpeklerde etkili ilaç konsantrasyonunun yaklaşık 16-20 kat arttığı gözlemlenmektedir.

Carrio ve Portus⁽³⁸⁾, sekiz farklı izolatta *ex vivo* modellerde meglumin antimonat uygulamıştır. Araştırmacılar, izolatlar için sırasıyla 5.0, 4.9, 4.4, 6.7, 6.0, 9.7, 9.1 ve 6.9 mg/l IC₅₀ değerleri saptamıştır. Carrio ve Portus'un⁽³⁸⁾ yapıları çalışmada *ex vivo* ortamdaki amastigotlara etki eden ilaç konsantrasyonunu, çalışmamızda elde ettiğimiz en düşük konsantrasyonda meglumin antimonat etkinliğinin bile yaklaşık 270'de 1'i olarak bulunmuştur.

Vouldoukis ve ark.⁽³⁹⁾, köpekten izole edilerek RPMI-1640 besiyerinde kültürasyonu yapılmış bir *L. infantum* izolatında ve doğal yollardan enfekte olmuş beş köpekten elde edilerek kültürasyonu yapılmış kanin makrofajlarına marbofloxasin, meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat duyarlılığını test etmişlerdir. Elli µg/ml konsantrasyonda meglumin antimonat 48. saatte parazit sayısını yarıya indirirken, aynı konsantrasyonda sodyum stiboglukonatın parazitleri yarıya indirmesinin 72. saatte gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Vouldoukis ve ark.'nın⁽³⁹⁾ antimon bileşiklerinin etkinliğini test ettiği çalışmada, parazitlerin yarısını öldüren konsantrasyon (0.05 mg/ml), verilerimizdeki meglumin antimonat konsantrasyonlardan 52-351 kat, sodyum stiboglukonat konsantrasyonlarından ise 1.5-5 kat daha düşüktür.

Ordenez-Gutierrez ve ark.⁽⁴⁰⁾, bir köpekten izole edilen *L. infantum* promastigotlarda AmpB duyarlılığını test etmiş. Monomerik, dimerik ve polimerik sıvı AmpB çözeltileri ve kapsüllenmiş AmpB formüllerinin 0.2 µg/ml ve artan konsantrasyonlarında promastigotların önemli ölçüde elimine edildiği gözlemlenmiştir.

Ait-Oudhia ve ark.⁽⁴¹⁾, 24 köpekten elde edilen izolatlarda AmpB etkinliği için IC₅₀ değerlerini en yüksek 0.41±0.03 µg/ml, en düşük 0.1±0.01 µg/ml konsantrasyonlarında saptarken, meglumin antimonat için en yüksek 145±0.22 µg/ml, en düşük 18.9±0.06 µg/ml IC₅₀ değerleri saptamıştır.

Maia ve ark.⁽⁴²⁾, köpeklerde izole edilen iki farklı *L. infantum* izolatında (IMT373 ve IMT352) *in vitro* meglumin antimonat ve AmpB ilaç duyarlılığını test

etmişlerdir. IMT373 izolatının promastigot formlarında IC₅₀ değerleri, meglumin antimonat için 7.31 mg/ml ve AmpB için 0.04 µM/ml olarak belirlenmiştir. IMT352 izolatının promastigot formlarında ise IC₅₀ değerleri, meglumin antimonat için 11.81 mg/ml ve AmpB için 0.04 µM/ml olarak belirlenmiştir. Maia ve ark.'nın⁽⁴²⁾ bildirdiği verilerde *in vitro* promastigot formlarda, IMT373 izolatında etkili olan meglumin antimonat konsantrasyonu, çalışmamızdaki izolatlar ile paralellik gösterirken, IMT352 izolatında etkili olan meglumin antimonat konsantrasyonu, çalışmamızdaki izolatlar yakın değerlerde bulunmuştur. Her iki izolatın da AmpB'de etkili konsantrasyonu, çalışmamızdaki izolatlar ile paralellik göstermektedir.

Eddakra ve ark.'nın⁽⁴³⁾ 24 köpekten izole edilen suşlarda, *ex vivo* meglumin antimonat etkinliği çalışmasında ortalama IC₅₀ değerini 48.77±7.98 µg/ml olarak saptanmıştır. Araştırmacıların elde ettiği ortalama IC₅₀ değeri, çalışmamızdaki ortalama IC₅₀ değeri olan 10.48 mg/ml'den yaklaşık 22 kat daha düşüktür.

Çalışmamızda, *L. tropica* türü KanL izolatlarında meglumin antimonata karşı olan IC₅₀ değerleri diğer çalışmalardaki IC₅₀ değerlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak, Maia ve ark.'nın yaptığı çalışmada bulunan IC₅₀ değerleri ile birbirine benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Elde ettiğimiz XTT verileri doğrultusunda leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçlardan AmpB ve sodyum stiboglukonat neredeyse tüm izolatlarda benzer konsantrasyonlarda IC₅₀ değeri vermektedir. Meglumin antimonat etkinliği neredeyse tüm izolatlar arasında farklılık göstermektedir. MCBÜCAN8 izolatı bu ilaca 2.62 mg/ml IC₅₀ değeriyle en duyarlı izolat durumundayken, MCBÜCAN6 izolatı yaklaşık 8 kat yüksek konsantrasyonda 17.55 mg/ml'de etki göstermektedir. Bu sonuçlar tüm izolatlar arasında meglumin antimonata değişen oranlarda direncin varlığına işaret etmektedir.

Bugüne kadar yapılan bütün KanL çalışmalarında etken tür olarak *L. infantum* kullanılmıştır. Çalışmamız, *L. tropica*'nın etken olduğu KanL'li köpeklerden izole edilen suşlar ile ilaç direnç testlerinin yapıldığı ilk

çalışmadır. Köpeklerde bulunan KanL etkeni *L. infantum*'un *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* testlerde ve klinik denemelerde ilaca dirençli olduğu yukarıdaki literatür bilgilerinde de bildirilmiştir. Ayrıca tedavide kullanılan ilaçlara rağmen, köpeklerde KanL relapslarının görüldüğü de yine yukarıdaki literatürlerde bildirilmektedir. Bizim bulgularımızda da KanL etkeni *L. tropica*'ların AmpB ve sodyum stiboglukonata karşı duyarlı olduğu, meglumin antimonata karşı direnç geliştirdiği görülmüştür. Köpeklerden izole edilmiş *L. tropica* suşları ile yapılmış bir çalışma olmaması, köpek suşlarında *L. infantum* ile az sayıda *in vitro*, *in vivo* ve *ex vivo* direnç testi çalışması yapılması gibi nedenlerden dolayı sonuçlarımızın bu konudaki ilk veriler olduğu düşünülmüş ve bundan sonraki yapılacak çalışmalarda yol gösterici olacağı düşüncesine varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için 2019-097 No.lu projesi ile gerekli maddi desteği sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Leishmaniasis. 2020 [https://www.who.int/leishmaniasis/en/]. (Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020)
2. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7(9):581-96. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8
3. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2016;227:98-114. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011
4. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des. 2002;8(4):319-42. https://doi.org/10.2174/1381612023396258
5. Berenguer J, Moreno S, Cerenado E, Bernaldo de Quirós JC, García de la Fuente A, Bouza E. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). Ann Intern Med. 1989;111(2):129-32. https://doi.org/10.7326/0003-4819-111-2-129
6. Medrano FJ, Hernandez-Qure J, Jimenez E, et al.

- Visceral leishmaniasis in HIV-1 infected individuals: A common opportunistic infection in Spain? AIDS. 1992;6(12):1499-503.
<https://doi.org/10.1097/00002030-199212000-00013>
7. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, ve ark. 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(5):e2205.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
 8. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(5):575-9.
[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)
 9. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertaçlar H. *Leishmania tropica* üzerinde in vitro ve in vivo ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi: Pilot çalışma. Türkiye Parazit Derg. 2018;42(1):11-9.
<https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5554>
 10. Williams C, Espinosa O, Montenegro H, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. J Microbiol Methods. 2003;55(3):813-6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.013>
 11. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol. 2004;27(5):305-18.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
 12. Hadighi R, Mohebbi M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. PLoS Med. 2006;3(5):e162.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030162>
 13. Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, et al. Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. Parasitol Res. 2007;101(5):1319-22.
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0638-0>
 14. Carrio J, Riera C, Gallego M, Ribera E, Portes M. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIV-coinfected patients. J Antimicrob Chemother. 2001;47(1):120-1.
<https://doi.org/10.1093/jac/47.1.120>
 15. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, et al. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? J Infect Dis. 2006;194(8):1168-75.
<https://doi.org/10.1086/507710>
 16. Polat E, Kutlubay Z. Meglümün antimoniat tedavisine dirençli dört kutanöz leishmaniosis olgusu. Türkiye Parazit Derg. 2014;38(3):177-80.
<https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3410>
 17. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;68(2):151-62.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>
 18. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(2):352-7.
<https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.352>
 19. Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA. Production and characterization of stable amphotericin resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3274-80.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3274-3280.2005>
 20. Purkait B, Kumar A, Nandi N, et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(2):1031-41.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00030-11>
 21. Srivastava P, Prajapati VK, Rai M, Sundar S. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. J Clin Microbiol. 2011;49(8):3088-91.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00173-11>
 22. Morizot G, Jouffroy R, Faye A, et al. Antimony to cure visceral leishmaniasis unresponsive to liposomal amphotericin B. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(1):e0004304.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004304>
 23. Eichenberger A, Buechi AE, Neumayr A, et al. A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. BMC Infect Dis. 2017;17(1):81.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2192-4>
 24. Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. Ann Parasitol Hum Comp. 1979;54(3):277-95.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1979543277>
 25. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(4):566-7.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90510-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90510-x)
 26. Nicoletti P, Fruin J. Treatment of canine cutaneous

- leishmaniasis. Trop Anim Health Prod. 1974;6(2):85-8.
<https://doi.org/10.1007/BF02380543>
27. Groulade P. Clinique canine. Médecine, biologie clinique, petite chirurgie. Paris: Maloine, Fransa, 1979.
28. Gradoni L, Gramiccia M, Di Martino L, Nocerino A. A new *Leishmania infantum* enzymatic variant, agent of an urban visceral case unresponsive to drugs. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(6):927-8.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90354-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90354-3)
29. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Vet J. 2008;175(1):14-5.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.011>
30. Dereure J, Rioux JA, Gallego M, et al. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85(5):595.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90356-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90356-4)
31. Bamorovat M, Sharifi I, Dabiri S, et al. *Leishmania tropica* in stray dogs in Southeast Iran. Iran J Public Health. 2015;44(10):1359-66.
32. Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. Parasit Vectors. 2017;10(1):113.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2050-7>
33. Riera C, Valladares JE, Gállego M, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. Vet Parasitol. 1999;84(1-2):33-47.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00084-9)
34. Moreno J, Nieto J, Chamizo C, et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. Vet Immunol Immunopathol. 1999; 30;71(3-4):181-95.
[https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(99\)00096-3](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(99)00096-3)
35. Lamothe J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. J Small Anim Pract. 2001;42(4):170-5.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2001.tb01797.x>
36. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. Vet Parasitol. 2007;143(3-4):254-9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.019>
37. Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. Ann Trop Med Parasitol. 1992;86(6):613-20.
<https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812717>
38. Carrió J, Portús M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. BMC Pharmacol. 2002;2:11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2210-2-11>
39. Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pine P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Vet Parasitol. 2006;135(2):137-46.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.003>
40. Ordóñez-Gutiérrez L, Espada-Fernández R, Dea-Ayuela MA, Torrado JJ, Bolás-Fernandez F, Alunda JM. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(4):325-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.013>
41. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, et al. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. Vet Parasitol. 2012; 6;187(3-4):386-93.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.034>
42. Maia C, Nunes M, Marques M, Henriques S, Rolão N, Campino L. In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. Exp Parasitol. 2013;135(1):36-41.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.015>
43. Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Kherrachi I, et al. Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(3):e0006310.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006310>