

Recenti sviluppi nella terapia delle leishmaniosi

Luigi GRADONI

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - L'accresciuto interesse sulle leishmaniosi è dovuto ad una sempre maggiore importanza della medicina dei viaggi e al ruolo opportunistico di *Leishmania* in pazienti immunodepressi, oltre che al persistere dei tradizionali focolai di endemia. Nell'ultimo decennio vi sono stati significativi sviluppi nella terapia, che includono: a) nuovi dosaggi e combinazioni di farmaci tradizionali, derivati da studi clinici controllati; b) nuove formulazioni, che ne hanno accresciuto la biodisponibilità e diminuito la tossicità; c) nuove molecole, sviluppate per altre patologie ma rivelatesi efficaci nei confronti di *Leishmania*. Tuttavia, mentre da un lato è ora possibile curare una grave leishmaniosi con 3-5 infusioni di un farmaco di nuova generazione, il costo proibitivo rischia di precludere l'accesso dei paesi in via di sviluppo alle nuove terapie.

Parole chiave: *Leishmania*, leishmaniosi, terapia.

Summary (*Recent advances in the chemotherapy of leishmaniasis*). - The increased interest in leishmaniasis is due to the importance of travel medicine and the demonstration of *Leishmania* as an opportunist agent in immunosuppressed individuals, besides the persistence of traditional endemic foci. During the past ten years there have been important developments in therapy, which include: a) new dosages/combinations of old drugs, resulted from controlled clinical trials; b) new formulations, which have increased the bioavailability and decreased the toxicity of traditional drugs; c) new molecules, developed for other diseases but found effective against *Leishmania*. However, while it is now possible to cure severe forms of leishmaniasis with 3-5 infusions of new-generation drugs, the prohibitive costs will preclude the access of developing countries to new therapies.

Key words: *Leishmania*, leishmaniasis, therapy.

Introduzione

Le leishmaniosi sono un complesso di malattie causate dall'infezione con protozoi parassiti del genere *Leishmania*. Le forme flagellate (promastigoti) sono trasmesse tramite la puntura di ditteri flebotomini (pappataci) e si moltiplicano come forme aflagellate (amastigoti) all'interno di cellule macrofagiche. Tre manifestazioni cliniche principali, leishmaniosi viscerale (LV), leishmaniosi cutanea (LC) e leishmaniosi mucocutanea (LMC) sono largamente diffuse in aree tropicali, subtropicali e temperate del Vecchio e Nuovo Mondo, e sono costituite per la maggior parte da infezioni di natura zoonotica. Solo per alcune specie di *Leishmania* l'uomo costituisce l'unico o il principale serbatoio (leishmaniosi antroponotiche) [1]. Per lo stato tassonomico di questi parassiti e le relative sindromi, si rimanda ad una recente rassegna pubblicata su questa rivista [2]. L'accurata identificazione dell'agente eziologico è di grande importanza nel trattamento farmacologico di un paziente affetto da leishmaniosi, perché specie diverse che infettano lo stesso tessuto possono presentare differente suscettibilità ad un determinato farmaco; allo stesso modo, l'efficacia di un regime adottato nei confronti di una specie viscerotropa di *Leishmania* in un dato territorio non assicura che tale regime presenti la stessa efficacia verso specie dermatotrope presenti nello stesso territorio.

Secondo stime recenti, l'incidenza globale annuale delle leishmaniosi è di circa due milioni di casi, dei quali 1,5 milioni di LC/LMC e 0,5 milioni di LV. Degli 88 paesi dove la parassitosi è endemica, 72 sono paesi in via di sviluppo [3]. In Italia la LV zoonotica causata da *Leishmania infantum* è endemica in tutte le regioni tirreniche della penisola, nelle regioni del basso Adriatico e nelle isole. La Campania (40-80 casi/anno) e la Sicilia (30-50 casi/anno) sono attualmente le regioni più colpite [4, 5]. Ceppi dermatotropi di *L. infantum* sono gli agenti dei casi italiani di LC, patologia benigna che si manifesta attualmente in maniera sporadica nelle aree interessate da LV zoonotica. Tuttavia sono numerosi i casi importati di LC da aree del Vecchio e Nuovo Mondo, soprattutto in turisti e lavoratori. Negli anni '90 l'epidemia da HIV ha provocato un numero notevole di coinfezioni, con un'incidenza superiore al 2% in pazienti AIDS residenti in zone italiane endemiche per leishmaniosi [6]. Nei pazienti immunocompromessi la parassitosi si manifesta sempre in forma di grave LV recidivante, anche quando la parassitosi è causata da ceppi dermatotropi normalmente poco virulenti [7].

Negli ultimi anni l'interesse sulle leishmaniosi è andato aumentando nei paesi industrializzati per via di una sempre maggiore importanza della medicina dei viaggi, per l'inclusione della LV come complicanza dell'infezione da HIV, e per il ruolo opportunistico di *Leishmania* in pazienti organo-trapiantati.

Manifestazioni cliniche

Leishmaniosi viscerale

La LV (kala-azar) è una grave sindrome dovuta alla replicazione incontrollata di *Leishmania* nei fagociti del sistema reticoloendoteliale. La LV antroponotica è causata da *L. donovani* in India, Est Africa e nella penisola Arabica; la LV zoonotica, a serbatoio canino, è causata da *L. infantum* nelle regioni mediterranee, Medio Oriente, Asia centrale e Cina, e da *Leishmania chagasi* in America Latina. Queste due specie, tuttavia, sono virtualmente identiche alla tipizzazione genotipica.

In un focolaio endemico di LV sono stimate circa 30-100 infezioni subcliniche autorisolventi per ogni caso di malattia conclamata [8, 9]. La guarigione spontanea è associata all'apparizione temporanea di un basso titolo di anticorpi specifici seguita dalla positivizzazione del test intradermico alla leishmanina (leishmanin skin test, LST), rilevabile probabilmente per tutta la vita. Il rapporto tra casi di malattia e infezioni subcliniche può dipendere dalla forza di infezione nel focolaio, dal numero assoluto di individui esposti a punture infettanti e, soprattutto, dal grado di suscettibilità generale della popolazione. Questa aumenta di gran lunga con la denutrizione (situazioni di estrema povertà, oppure in occasione di carestie, guerre, ecc.) e può dare luogo ad eventi epidemici di malattia acuta, come quelli causati periodicamente da *L. donovani* in Sudan e India [10, 11].

Una LV classica si manifesta con febbre, epatosplenomegalia, pancitopenia e ipergammaglobulinemia. Il periodo di incubazione clinica varia da 3 settimane ad oltre due anni, con una media di 2-4 mesi. Il paziente riferisce una storia di febbre resistente agli antibiotici, generalmente rilevabile alla prima visita. All'esame obiettivo la milza si presenta palpabile, mediamente 5-15 cm al di sotto del margine costale sinistro. Se non viene trattata farmacologicamente, una LV sintomatica può risultare fatale in oltre il 90% dei casi. La leishmaniosi dermica post-kala-azar (PKDL), una complicazione dermatologica caratterizzata da macule, papule o noduli diffusi in tutto il corpo, può svilupparsi alcuni mesi o anni dopo trattamento di una LV indiana o africana, molto più raramente mediterranea [12].

Oltre alla forma classica, sono state descritte altre presentazioni cliniche di LV. Una forma attenuata, non ingravescente, è stata riportata in militari statunitensi al ritorno delle operazioni note come Desert Storm nella penisola arabica [13]. Erano poco frequenti febbre ed organomegalia, e raramente era presente anemia. Il sintomo più frequente era malessere generale, affaticamento e dolori addominali. Nei paesi del sud Europa, le coinfezioni HIV-*L. infantum* registrate da un apposito sistema di sorveglianza sono state oltre 1600 [14]. In generale le manifestazioni cliniche sono comparabili a quelle di una LV, tuttavia sono comuni un interessamen-

to del tratto gastrointestinale e la presenza di lesioni cutanee secondarie, mentre può essere assente l'epatosplenomegalia.

Leishmaniosi cutanea

La LC è una sindrome benigna dovuta alla replicazione di *Leishmania* nei fagociti del derma. La LC antroponotica è causata da *Leishmania tropica* nel Vecchio Mondo; la LC zoonotica è causata da *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* e ceppi dermatotropi di *L. infantum* nel Vecchio Mondo, e da membri dei complessi *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* nel Nuovo Mondo. Il decorso classico della malattia è caratterizzato dalla comparsa di una lesione papulare non dolente che si manifesta nel sito della puntura infettante. La papula può progredire come lesione ulcerativa oppure nodulare, che tende poi a guarire spontaneamente nel corso di mesi o anni, lasciando una cicatrice deturpante. Il periodo di incubazione varia da una settimana a 8 mesi; le lesioni causate da alcune specie (per es. *L. major* e *L. mexicana*) tendono ad essere a più rapida evoluzione e risoluzione, mentre quelle dovute ad altre specie (per es. *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. infantum* dermatropa) possono presentare lunghi periodi sia di incubazione che di risoluzione spontanea.

Leishmaniosi mucocutanea

La LMC è una grave sindrome dovuta a metastasi parassitarie che si localizzano nella mucosa nasale e che possono estendersi all'orofaringe e alla laringe. Tali disseminazioni possono originare da lesioni cutanee primitive causate da membri del complesso *L. braziliensis*. Caratteristicamente, la LMC non guarisce spontaneamente e presenta una lenta evoluzione (in media 3 anni) prima di manifestarsi in maniera grave.

Aspetti immunologici

Le leishmaniosi presentano una tipica polarità immunologica: la resistenza clinica o la guarigione sono associate ad una robusta risposta immune di tipo cellulare, mentre fasi di malattia acuta o cronica sono associate ad assenza di tale risposta e alla presenza di un alto livello di anticorpi specifici non protettivi [15]. La LC autorisolvente è caratterizzata da LST positivo e da alti indici di linfoproliferazione *in vitro* indotta da antigeni di *Leishmania*. La LV classica non guarisce spontaneamente, e sia LST che saggi linfoproliferativi risultano negativi in corso di malattia conclamata. Entrambi i test immunologici, tuttavia, convertono a positivi dopo un trattamento farmacologico efficace. A dispetto di questa evidente polarità, l'analisi delle citochine secrete dalle immunocellule di pazienti affetti dalle di-

verse forme di leishmaniosi rivela una situazione meno marcata. Infatti, entrambi i pattern di citochine caratteristici di risposta Th1 e Th2 vengono generalmente messi in evidenza con l'analisi di leucociti mononucleati da sangue periferico, o di campioni da lesione cutanea (nei casi di LC o LMC), midollo osseo e linfonodi (nei pazienti con LV in fase acuta) [16]. Solamente per due citochine, l'interleuchina (IL) 12 (citochina di tipo Th1) e IL-10 (citochina di tipo Th2), può essere fatta un'associazione tra livelli di secrezione e decorso clinico della malattia.

Terapia

L'approccio terapeutico alle leishmaniosi ha presentato significativi sviluppi negli ultimi anni [17-21]. Questi includono: a) nuovi dosaggi e combinazioni di farmaci tradizionali, derivati da studi clinici controllati e non più da esperienze su piccole casistiche individuali; b) nuove formulazioni, che hanno accresciuto la biodisponibilità e diminuito la tossicità di vecchi farmaci; c) nuove molecole, sviluppate per altre patologie più diffuse ma rivelatesi efficaci nei confronti di *Leishmania*.

Il gruppo principale dei farmaci anti-*Leishmania* è tuttora costituito da prodotti attivi per somministrazione parenterale.

Antimonio pentavalente

I sali organici dell'antimonio pentavalente (Sb^v) costituiscono tuttora la terapia di riferimento per tutte le forme cliniche di leishmaniosi. Tuttavia, i limiti messi in evidenza negli ultimi anni circa l'efficacia, sicurezza e durata di somministrazione di questi farmaci hanno indotto alla ricerca di prodotti alternativi per il trattamento delle forme più gravi o farmacoresistenti. Attualmente in molti paesi ad economia avanzata (Italia inclusa) gli antimoniali vengono considerati prodotti di seconda linea.

Sono disponibili due preparazioni, lo stibogluconato di sodio (Pentostam), contenente 100 mg di Sb^v per ml, e l'antimoniato di N-metil glucammina (Glucantim), contenente 85 mg di Sb^v per ml. Entrambi i farmaci possono essere somministrati per via intramuscolare o endovenosa, e presentano eguale efficacia e tossicità quando vengono usati secondo dosi Sb^v equivalenti. La dose raccomandata di Sb^v per tutte le forme cliniche di leishmaniosi è di 20 mg/kg die per 21-28 giorni, mentre la durata è di 40 giorni nel caso di LV acquisita in aree (India, Est Africa) dove è stata documentata un'alta frequenza di Sb^v-resistenza [1]. Originariamente fu raccomandata anche una dose massima giornaliera di Sb^v pari a 850 mg, ma è stato rilevato che adulti dal peso corporeo superiore a 42 kg potevano ricevere dosi sub-ottimali di farmaco; attualmente vi è la tendenza ad ignorare un

limite nella dose giornaliera [22]. Casi di LC non complicata possono essere trattati con la stessa dose giornaliera ma per 10 giorni [23]. Con l'obiettivo di ridurre la tossicità dose-correlata del Sb^v, una dose giornaliera più bassa (5 mg/kg) per 30 giorni è stata impiegata in pazienti con LC da *L. braziliensis*, risultando efficace nell'84% dei casi [24].

La risposta clinica agli antimoniali è molto rapida nei casi di LC, tuttavia solo in un terzo dei pazienti è possibile osservare la completa riepitelizzazione delle lesioni al termine di un ciclo di trattamento di 3 settimane. Nei pazienti con LV causata da parassiti sensibili al farmaco si osserva defervescenza entro 4-5 giorni dall'inizio del trattamento, uno stato generale di benessere entro una settimana, ma la milza rientra nella norma solo 1-2 mesi dopo la terapia. Quindi, per entrambe le forme cliniche di leishmaniosi il trattamento con Sb^v non necessariamente deve proseguire fino a quando tutti i parametri clinici si normalizzano. In una bassa percentuale (3-5%) dei pazienti che hanno ricevuto una dose corretta, possono avvenire recidive entro 2-8 mesi dalla fine del trattamento di una LC o LV. Nelle co-infezioni HIV-VL, invece, la frequenza di recidive dopo un primo trattamento è prossima al 100%.

La tossicità sistemica causata dagli antimoniali è normalmente correlata alla dose totale somministrata ed include anoressia, dolori muscoloscheletrici, modeste variazioni dell'onda T e del segmento ST rilevabili all'ECG, ed un leggero rialzo degli enzimi epatici. Più recentemente la pancreatite (dimostrata da un innalzamento dei livelli serici di amilasi o lipasi) si è rivelata come l'effetto indesiderato più comune di una terapia a base di Sb^v, e probabilmente un'inflammazione del pancreas è alla base della nausea e dolore addominale riferiti da molti pazienti [25]. Quando si superano dosi giornaliere di 20 mg Sb^v/kg è richiesto frequente monitoraggio all'ECG, in particolare per rilevare eventuali prolungamenti dell'intervallo Q-T che può precedere una pericolosa aritmia. Casi di morte inattesa sono descritti in adulti con LV in corso di trattamento con Sb^v, mentre apparentemente il farmaco è meglio tollerato in pazienti pediatriche [5].

Amfotericina B e associazioni lipidiche dell'amfotericina B

E' noto da tempo che l'amfotericina B, un classico farmaco antifungino, esercita anche una potente azione leishmanicida. Tale attività si esplica su un target specifico costituito dal gruppo degli ergosteroli, che costituiscono i principali steroli della membrana citoplasmatica di *Leishmania* oltre che dei funghi. Tuttavia l'amfotericina B ha avuto scarso utilizzo nel passato a causa di effetti collaterali che si manifestano all'atto dell'infusione (febbre, brividi e dolori alle ossa) e a più lungo termine (tossicità renale) alle dosi usuali di 1-1,5

mg/kg die. Per gli evidenti limiti della terapia antimoniale, e soprattutto grazie alla messa a punto di dosaggi e formulazioni molto meno tossici del farmaco, l'amfotericina B è stata impiegata sempre più di frequente nella LV e attualmente costituisce il principale progresso consolidato nella chemioterapia della leishmaniosi avvenuto negli ultimi anni.

La formulazione convenzionale (amfotericina B deossicolato, Fungizone) è stata somministrata al basso dosaggio di 0,5 mg/kg i.v. a giorni alterni per 28 giorni (dose totale di 7 mg/kg) ed ha permesso la guarigione completa nel 98-100% di pazienti indiani affetti da LV resistente a Sb^v, con effetti collaterali trascurabili [26]. Una dose totale molto più alta (0,7 mg/kg die per 28 giorni) è risultata invece inefficace per il trattamento della LV in pazienti HIV positivi, producendo solo il 62% di cura iniziale e provocando eventi avversi nel 36% dei pazienti [27].

Una formulazione liposomiale dell'amfotericina B (AmBisome) si è dimostrata altamente efficace e priva di tossicità a dosaggi giornalieri di 2-4 mg/kg i.v. nel trattamento sperimentale della LV da *L. infantum* in un modello murino [28]. Uno studio clinico a ricerca di dose di tipo aperto e multicentrico, condotto principalmente in Italia, ha dimostrato un'efficacia prossima al 100% di una dose totale di circa 20 mg di AmBisome/kg, somministrata in 6 dosi nell'arco di 10 giorni [29, 30]. Questo regime si è rivelato di alto costo/beneficio soprattutto nei casi pediatrici, richiedendo poca quantità di farmaco e solamente 5-6 giorni di ospedalizzazione contro le 3-4 settimane necessarie per un trattamento con antimoniali [31-33]. Sulla base dei dati riportati in questi studi, l'AmBisome è stato il primo farmaco approvato per il trattamento della LV dal Food and Drug Administration degli Stati Uniti [34]. Uno studio successivo condotto in Brasile ha confermato che la stessa dose totale di farmaco (20 mg/kg), ma somministrata in 10 dosi giornaliere, era necessaria per curare individui affetti da LV causata da *L. chagasi* [35]. Questo regime di AmBisome si è però mostrato inefficace in pazienti HIV positivi co-infetti da *L. infantum*, ed uno studio ha messo in evidenza che persino una dose totale doppia (40 mg/kg), somministrata nell'arco di un mese, non impedisce il verificarsi di ripetute recidive di LV in questi soggetti immunodepressi [36].

Ulteriori ricerche sull'AmBisome hanno confermato la necessità di verificare l'efficacia di un dosaggio di un farmaco in forme cliniche causate da specie diverse di *Leishmania*. Infatti, studi a ricerca di dose condotti su pazienti indiani e africani affetti da LV antroponotica, hanno indicato per l'AmBisome una efficacia del 100% a dosi totali molto basse, comprese tra 6 e 10 mg/kg e somministrate in sole 3-5 infusioni [35]. L'insieme delle ricerche suggerisce quindi che il trattamento della LV causata da *L. infantum* e *L. chagasi* (organismi virtualmente identici) richiede almeno il doppio della dose di

AmBisome rispetto al trattamento della LV dovuta a *L. donovani*, probabilmente a causa di una differente suscettibilità dei parassiti al farmaco.

Una seconda formulazione lipidica dell'amfotericina B, costituita da una dispersione colloidale in colesterolo (Amphocil), è stata impiegata per la prima volta nel trattamento della LV in Brasile, dimostrando elevata efficacia al basso dosaggio di 2 mg/kg/die i.v. per 5-7 giorni, per una dose totale di 10-14 mg/kg [37, 38]. Tuttavia, a differenza dell'AmBisome questo farmaco si è rivelato moderatamente tossico, tanto da essere sconsigliato per la terapia della LV pediatrica potendo provocare problemi respiratori in pazienti al di sotto di 6 anni. Uno studio condotto su adulti italiani ha confermato l'efficacia dell'Amphocil alle dosi sopra riportate anche per la terapia della LV mediterranea [39].

Una terza formulazione lipidica dell'amfotericina B (lipid complex, Abelcet) è stata utilizzata alla dose di 3 mg/kg/die i.v. per 5 giorni (per una dose totale di 15 mg/kg) per la terapia di LV resistente a Sb^v in pazienti indiani [40]. Mentre l'attività parassiticida è risultata eccellente (100% di cura), gli effetti collaterali riportati sono stati di una certa entità.

Oltre che negli studi clinici sopra riportati, che sono stati di tipo non comparativo, l'attività leishmanicida *in vivo* delle diverse formulazioni dell'amfotericina B è stata saggiata in maniera comparata utilizzando modelli murini di VL [41, 42]. L'insieme dei risultati ha mostrato in generale il seguente ordine di efficacia basato sugli indici di ED₅₀: AmBisome > Amphocil > Abelcet > Fungizone. Tale sequenza può essere letta al contrario per ciò che riguarda la tossicità e (purtroppo) il costo.

Amminosidina (Paromomicina)

L'amminosidina, un antibiotico amminoglicoside strutturalmente identico alla paromomicina (Humatin), mostra una spiccata attività leishmanicida quando viene somministrata per via parenterale in modelli murini di LV e nel cane [43, 44]. Tale attività si esplica in maniera sinergica quando il farmaco viene dato in combinazione con antimoniali. Una preparazione iniettabile dell'amminosidina (Gabbromicina) è stata utilizzata in regime di monoterapia in Kenia, su pazienti che mostravano una LV da *L. donovani* Sb^v resistente. Un dosaggio di 14-16 mg/kg die per una media di 19 giorni ha permesso la guarigione nel 79% degli individui [45]. Un recente studio di tipo comparativo condotto in India ha mostrato che la monoterapia con 20 mg di amminosidina/kg die per 21 giorni era significativamente più efficace di un trattamento con 20 mg Sb^v/kg per 30 giorni, con indici di guarigione rispettivamente del 93% e del 63% [46]. Se questo farmaco può essere un'alternativa valida in aree di forte Sb^v-resistenza come l'Est Africa e il nord dell'India, esso è poco competitivo in termini di efficacia, tossicità e durata del trattamento in aree dove *Leishmania* è suscettibile agli antimoniali.

Altri farmaci ad uso parenterale

In caso di LV Sb^v-resistente, viene talvolta utilizzata pentamidina isetonato (Pentacarinat) alla dose di 4 mg/kg, 3 volte alla settimana per 4-9 settimane [19]. A questo dosaggio, tuttavia, sono comuni effetti collaterali come mialgia, nausea, cefalea ed ipoglicemia. Un dosaggio inferiore, 2 mg/kg a die alterni per 7 giorni, si è dimostrato efficace e meno tossico per il trattamento di LC del Nuovo Mondo [47].

Una terapia a base di citochine è limitata a studi sull'interferone- γ umano ricombinante (Imukin). Questa citochina si è dimostrata solo parzialmente efficace se usata in monoterapia su pazienti affetti da LV; in combinazione con 10-20 mg Sb^v/kg per 20-30 giorni, invece, l'interferone- γ somministrato alla dose di circa 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{die}$ ha mostrato di favorire più rapidamente l'eliminazione del parassita in diverse forme cliniche di leishmaniosi, come la LV in pazienti sudamericani, africani e indiani, o LC e LMC Sb^v-resistente [48, 49]. Oltre il 30% dei pazienti, tuttavia, ha presentato effetti collaterali di una certa entità.

Farmaci ad uso orale

Come per tutte le patologie, l'obiettivo primario della ricerca terapeutica per le leishmaniosi è quello di sostituire gli attuali farmaci moderatamente tossici e che richiedono somministrazioni prolungate per via parenterale, con una terapia orale, meno tossica e che preveda brevi cicli di trattamento. Ciò è tanto più importante nei paesi in via di sviluppo, dove l'accesso a presidi sanitari in grado di somministrare farmaci "difficili" è molto spesso negato alla maggior parte della popolazione.

In questo senso, un progresso importante è stata la recente dimostrazione che un trattamento orale a base di miltefosina (MilteX) può portare a totale guarigione oltre il 90% di pazienti affetti da una LV antroponotica. Questa scoperta ha avuto l'onore di un editoriale su *N. Engl. J. Med.* [50], cosa abbastanza inusuale per una patologia considerata "orfana" fino a pochi anni orsono. Il farmaco, sviluppato inizialmente come antitumorale, è chimicamente una esadecilfosfocolina, cioè un analogo della fosfocolina e come tale in grado di interferire su segnali metabolici cellulari e sulla sintesi di membrane. La sua efficacia come leishmanicida orale fu dimostrata sperimentalmente agli inizi degli anni '90 [51], ma solo recentemente sono stati condotti studi clinici controllati sull'uomo [52]. Una dose di circa 2,5-3 mg/kg somministrata giornalmente per 28 giorni a pazienti indiani ha prodotto una percentuale di cura parassitologica del 97%. Purtroppo il farmaco presenta significativi effetti collaterali di tipo gastrointestinale (nausea, vomito e diarrea), tanto più gravi quando si supera la dose giornaliera totale di 150 mg. Ulteriori studi sono in corso sulla LV mediterranea e in pazienti HIV positivi.

Prima della miltefosina, studi condotti con altri farmaci orali hanno avuto scarso successo nel trattamento della LV. L'atovaquone (Wellvone) è stato utilizzato alla dose giornaliera di 30 mg/kg per 15-30 giorni in monoterapia o in combinazione con un altro farmaco orale, il fluconazolo (Diflucan), alla dose di 12 mg/kg. La percentuale dei pazienti curati non ha superato il 7% [53].

Alcuni farmaci orali che agiscono interferendo sulla biosintesi delle purine sono stati utilizzati per il trattamento di LV e LC. L'allopurinolo (Zyloric) è stato usato estesamente in associazione con gli antimoniali per il trattamento della LV [54], tuttavia un suo ruolo in questa patologia rimane ancora da confermare (questo farmaco sta riscuotendo un certo successo in campo veterinario per il trattamento della leishmaniosi viscerale del cane [55]). Una monoterapia di allopurinolo alla dose di 20 mg/kg die per 28 giorni si è rivelata totalmente inefficace nei confronti di forme di LC latinoamericana e, probabilmente, lo è altrettanto per la LC del Vecchio Mondo [56].

Il ketoconazolo (Nizoral) sembra avere una certa azione, ad una dose di 600 mg/die per 28 giorni, nei confronti di forme cutanee a rapida autorisoluzione, come quelle dovute a *L. mexicana* o *L. major*, ma non nei confronti di LC che tendono a cronicizzare, come quelle causate da *L. braziliensis*, *L. tropica* o *L. infantum* dermatropa [57]. L'itraconazolo (Sporanox) appare più tollerato del ketoconazolo ma probabilmente è meno efficace.

Farmaci ad uso topico

Questi farmaci sono diretti ad una azione locale in forme non complicate o diffuse di LC. Il metodo tradizionale consiste nell'inoculo intralesionale di Sb^v, somministrato in maniera intermittente nell'arco di 2-3 settimane. In genere il successo di un primo ciclo si aggira intorno al 75% dei casi. L'uso di questa tecnica è però sconsigliato in caso di lesioni multiple, o quando queste si manifestano in parti delicate del viso (palpebre, labbra) o, infine, quando per motivi di scarsa accessibilità al presidio sanitario non è possibile seguire un intero ciclo di trattamento, l'interruzione del quale può procurare pericolose recidive resistenti al farmaco in uso.

Con l'obiettivo di sviluppare un preparato adatto all'autotrattamento, sono state studiate creme ad uso topico contenenti farmaci in grado di diffondere nei tessuti. Alcune formulazioni a base di amminosidina sono state oggetto di studi clinici controllati. Lesioni causate da *L. major* sono state trattate due volte al giorno, per 10 giorni, con un unguento di paraffina contenente il 15% di amminosidina e il 12% di cloruro di metilbenzetonio [58]. Le lesioni risolvevano più rapidamente delle lesioni non trattate dello stesso paziente. La stessa efficacia clinica non è stata però evidente in uno studio condotto su pazienti infetti da parassiti del complesso *L.*

braziliensis [19]. Una formulazione simile dell'amminossidina, ma contenente urea al 10%, non ha dimostrato efficacia significativa nei confronti di LC da *L. major* in studi controllati [59, 60].

Un recente approccio è quello costituito da prodotti topici che sviluppano ossido nitrico (NO), un potente leishmanicida naturale prodotto all'interno del macrofago. In una piccola serie di pazienti affetti da LC causata da *L. braziliensis* è stato ottenuto il 100% di cura dopo trattamento con una crema contenente la dose appropriata di un donatore di NO, applicata sulla lesione 5 volte al giorno per 10 giorni [61]. Uno studio simile condotto su pazienti infetti da *L. tropica*, impiegando un unguento contenente un diverso donatore di NO, non ha prodotto invece risultati incoraggianti (12% di cura) [62].

La difficoltà di un successo terapeutico con l'uso di unguenti topici applicati a lesioni da *Leishmania* è probabilmente legata alla formulazione del prodotto, piuttosto che al principio attivo, unitamente al tipo di lesioni istopatologiche caratteristiche della parassitosi. In una LC, i macrofagi infetti risiedono in profondità nel derma, per cui un trattamento locale non può essere affrontato come per patologie dermatologiche superficiali, come quelle da dermatofiti. La ricerca in questo campo deve essere perciò rivolta a migliorare la biodisponibilità di farmaco all'interno del tessuto cutaneo.

Criteri per il monitoraggio di efficacia della terapia

Come già accennato brevemente in una precedente sezione, la completa normalizzazione dei parametri clinici e di laboratorio viene osservata solo qualche tempo dopo l'interruzione di una terapia efficace. Può risultare quindi utile monitorare una serie di parametri che possano fornire indicazioni precoci sulla risposta al farmaco. Nel caso di terapie sperimentali, il rilievo parassitologico diretto effettuato al termine del trattamento è considerato quale condizione necessaria per valutare l'efficacia di un nuovo farmaco e/o di nuovi dosaggi.

Nella terapia pratica della LV il monitoraggio clinico della febbre e della splenomegalia, e dei dati di laboratorio relativi a leucociti, piastrine, emoglobina e VES possono fornire valutazioni significative già entro 7-10 giorni dall'inizio del trattamento. La rapidità di risposta clinica dipende dal tipo di farmaco; i complessi lipidici dell'amfotericina B hanno mostrato finora la migliore attività in questo senso [30, 39]. Nel caso di una valutazione più a lungo termine, attualmente vi è la tendenza ad evitare un nuovo esame microscopico e/o colturale dell'aspirato midollare (che veniva effettuato entro un mese dall'inizio della terapia), in quanto tale procedura è considerata troppo invasiva. Se l'evoluzione dei parametri clinici appare favorevole, è sufficiente monitorare

l'andamento del titolo anticorpale antileishmania mediante una tecnica sierologica specifica e sensibile (immunofluorescenza indiretta, ELISA) [63]. In genere, il titolo si dimezza ogni 2-3 mesi dall'inizio di una terapia efficace, tendendo a negativizzarsi entro 6-12 mesi. Solo in caso di una mancata risposta clinica immediata o di una sospetta recidiva a distanza di tempo, può rendersi necessario un nuovo esame parassitologico diretto. Nei soggetti HIV positivi la sierologia per *Leishmania* è molto spesso negativa già al momento della diagnosi di LV. Per questi pazienti è stata proposta l'analisi periodica del sangue periferico mediante test di PCR come metodo non invasivo di monitoraggio della terapia [64].

Nella terapia delle diverse forme di LC il monitoraggio precoce è prevalentemente di tipo clinico, non essendo disponibili parametri di laboratorio aspecifici o specifici (anticorpi) affidabili. La persistenza o ricomparsa di lesioni attive è criterio sufficiente per determinare il fallimento di una terapia.

Conclusioni

Nel corso del passato decennio l'approccio terapeutico alle leishmaniosi ha subito una rapida evoluzione. Se si consultano manuali pratici di terapia disponibili alla fine degli anni '80 notiamo infatti che l'unico trattamento consigliato era a base di antimoniali, con dosaggi giornalieri troppo elevati (rischio di tossicità cardiaca) e brevi cicli ripetuti (rischio di farmacoresistenza). In Tab. 1 vengono riportati in maniera sintetica i regimi farmacologici attualmente disponibili e validati in Italia per il trattamento delle diverse forme endemiche di leishmaniosi.

Le ragioni dello sviluppo e ampliamento dell'armamentario farmacologico vanno ricercate in: a) una maggiore comprensione del complesso quadro eziologico che ha portato ad un differenziamento dei regimi terapeutici; b) lo sviluppo di biotecnologie che hanno permesso la sintesi e produzione di nuove formulazioni; c) la crescita quasi esponenziale in numero e qualità delle ricerche. Si consideri, infatti, che le referenze bibliografiche riportate in questa rassegna costituiscono solo una piccola parte dei lavori scientifici di tipo sperimentale e clinico nel campo della terapia delle leishmaniosi prodotti nell'ultimo decennio.

Di pari passo con questi progressi, tuttavia, è andato aumentando il divario esistente tra i paesi ad economia avanzata e quelli in via di sviluppo, nei quali l'impatto delle leishmaniosi è di gran lunga maggiore. Mentre "l'antimonio per tutti", magari prodotto a basso costo come in India, garantiva uno stesso trattamento per un paziente affetto da leishmaniosi, i nuovi farmaci

Tabella 1. - Regimi farmacologici attualmente disponibili e validati in Italia per il trattamento delle diverse forme endemiche di leishmaniosi

Farmaco	Indicazione ^(a)	Regime	Rif. Bibl.
Meglumina antimonioato (Glucantim)	Leishmaniosi viscerale (P, A, HIV)	20 mg ^(b) Sb ^v /kg/die i.m. x 21-28 gg	[1, 17-22]
	Leishmaniosi cutanea (P, A, HIV)	15-20 mg Sb ^v /kg/die i.m. x 10-15 gg 1 ml intralesionale ogni 3 g x 2-3 settimane	[1, 23]
Meglumina antimonioato (Glucantim) + Allopurinolo (Zyloric)	Leishmaniosi viscerale (P, A, HIV?)	15 mg Sb ^v /kg/die i.m. x 21 gg + 15 mg/kg/die <i>per os</i>	[54]
Amfotericina B dessossicolato (Fungizone)	Leishmaniosi viscerale (P?, A, HIV)	0,5 mg/kg/die i.v. a giorni alterni x 28 gg	[26, 27]
Amfotericina B liposomiale (Ambisome)	Leishmaniosi viscerale (P,A)	3 mg/kg/die i.v. nei giorni 1-5 e 10	[29-33]
	Leishmaniosi viscerale (HIV) Leishmaniosi dermica post kala-azar (A)	4 mg/kg/die i.v. nei giorni 1-5, 10, 17, 24, 31, 38	[12, 36]
Amfotericina B dispersione colloidale (Amphocil)	Leishmaniosi viscerale (A, HIV?)	2 mg/kg/die i.v. x 7 gg	[39]
Pentamidina isetonato (Pentacarinat)	Leishmaniosi viscerale multiresistente (P?, A, HIV)	4 mg/kg/die i.v. a giorni alterni per 30-60 gg	[19]

(a) Non necessariamente riportata nella confezione; (b) corrispondenti a circa 60 mg del sale organico; P: pazienti pediatrici; A: pazienti adulti; HIV: pazienti HIV-positivi; ?: efficacia e/o effetti collaterali non documentati.

antileishmania hanno un costo proibitivo per le povere economie del Sud del mondo, e sono utilizzati esclusivamente in Europa e Stati Uniti. A ciò si aggiunga che alcuni farmaci, come la Gabbromicina, non sono più disponibili in commercio perché poco remunerativi. La World Health Organization, attraverso l'agenzia per la ricerca in malattie tropicali (TDR), dovrà avere un ruolo primario per consentire l'accesso per tutti ad un dignitoso trattamento di questa parassitosi.

Ricevuto il 13 febbraio 2001.
Accettato il 15 marzo 2001.

BIBLIOGRAFIA

- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *WHO Tech Rep Ser* 1990;793:1-158.
- Gramiccia M. Le leishmaniosi del Vecchio Mondo. *Ann Ist Super Sanità* 1997;33:231-9.
- Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996;14:417-23.
- Gradoni L, Pizzuti R, Scalone A, Russo M, Gramiccia M, di Martino L, Pempinello R, Gaeta GB. Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:234-5.
- Cascio A, Gradoni L, Scarlata F, Gramiccia M, Giordano S, Russo R, Scalone A, Cammà C, Titone L. Epidemiologic surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:75-8.
- Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS* 1996;10:785-91.
- Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M. Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiol Lett* 1995;128:33-8.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986;154:1003-11.

9. Davies CR, Mazloumi Gavvani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology* 1999;119:247-57.
10. De Beer P, El Harith A, Van Grootheest M, Winkler A. Outbreak of kala-azar in the Sudan. *Lancet* 1990;335:224.
11. Bhatia S, Patel N, Gulhane S, Dongre V, Jijina FF, Pathare AV. Outbreak of kala-azar in Bombay. *J Postgrad Med* 1995;41:3-4.
12. Pianosi G, Simoni R, Annessi G, Gradoni L. Un caso di Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis nell'area del Mediterraneo. *Chron Dermatol* 1996;6(suppl):65-73.
13. Magill AJ, Grogl M, Gasser RA jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* 1993;328:1383-7.
14. Desjeux P, Meert JP, Piot B, Alvar J, Medrano FJ, Portus M, Munoz C, Laguna F, Lopez Velez R, Salas A, Sirera G, Cisterna R, Montalban C, Quero H, Gradoni L, Gramiccia M, Russo R, Dedet JP, Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Izri A, Matheron S, Farault F, Marty P, Rosenthal E, Antunes F, Abranches P, Pradinaud R. *Leishmania/HIV co-infection. South-western Europe 1990-1998*. WHO: Geneva; 2000. (WHO/LEISH/2000.42); p.1-12.
15. Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JAL, El Hassan AM, Theander TG, Kemp M. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol Lett* 1999;65:105-8.
16. Cillari E, Vitale G, Arcoleo F, D'Agostino P, Mocciano C, Gambino G, Malta R, Stassi G, Giordano C, Milano S, Mansueto S. *In vivo* and *in vitro* cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine* 1995; 7:740-5.
17. Gradoni L, Bryceson A, Desjeux P. Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bull WHO* 1995;73:191-7.
18. Gradoni L. Chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis: advances and failures. *Curr Opin Infect Dis* 1996;9:435-8.
19. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684-703.
20. Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998;56:1009-18.
21. Gradoni L. Leishmaniasis. In: Rakei RE (Ed.). *Conn's current therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 2000. p. 88-91.
22. Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:296-306.
23. Arana BA, Navin TR, Arana FE, Berman JD, Rosenkaimer F. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimoniate with or without interferon- γ in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis* 1994; 18:381-4.
24. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:651-5.
25. De Lalla F, Pelizzer G, Gradoni L, Vespignani M, Franzetti M, Stecca C. Acute pancreatitis with the administration of meglumine antimoniate for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1993;16:730-1.
26. Mishra M, Biswas UK, Jha AM, Khan AB. Amphotericin B versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. *Lancet* 1994;344:1599-600.
27. Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, Salas A, Torre-Cisneros J, Torres E, Medrano FJ, Sanz J, Pico G, Gomez-Rodrigo J, Pasquau J, Alvar J. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. *AIDS* 1999;13:1063-9.
28. Gradoni L, Davidson RN, Orsini S, Betto P, Giambenedetti M. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania infantum* and tissue distribution in mice. *J Drug Target* 1993;1:311-6.
29. Davidson RN, di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, Pempinello R, Scotti S, Raimondi F, Cascio A, Prestileo T, Caldeira L, Wilkinson RJ, Bryceson ADM. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q J Med* 1994;87:75-81.
30. Davidson RN, di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, Scotti S, Cascio A, Castagnola E, Maisto A, Gramiccia M, Di Caprio D, Wilkinson RJ, Bryceson ADM. Short course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis* 1996;22:938-43.
31. di Martino L, Raimondi F, Scotti S, Davidson RN, Gradoni L, Giacchino R. Efficacy and tolerability of liposomal amphotericin B in Italian infants with visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:477.
32. Castagnola E, Davidson RN, Fiore P, Tasso L, Rossi G, Mangraviti S, di Martino L, Scotti S, Cascio A, Pempinello R, Gradoni L, Giacchino R. Early efficacy of liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:317-8.
33. di Martino L, Davidson RN, Giacchino R, Scotti S, Raimondi F, Castagnola E, Tasso L, Cascio A, Gradoni L, Gramiccia M, Pettoello-Mantovani M, Bryceson ADM. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *J Pediatr* 1997;131:271-7.
34. Meyerhoff A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1999;28:42-8.
35. Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, Kuzoe F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull WHO* 1998;76:25-32.
36. Russo R, Nigro LC, Minniti S, Montineri A, Gradoni L, Caldeira L, Davidson RN. Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J Infect* 1996;32:133-7.
37. Dietze R, Milan EP, Berman JD, Grogl M, Falqueto A, Feitosa TF, Luz KG, Suassuna FAB, Marinho LAC, Ksionski G. Treatment of Brazilian kala-azar with a short course of Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). *Clin Infect Dis* 1993;17:981-6.
38. Dietze R, Fagundes SMS, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FAB, Fonschiffrey G, Ksionski G, Dember J. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphocil[®] (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89:309-11.

39. Gaeta GB, Maisto A, Di Caprio D, Scalone A, Pasquale G, Felaco FM, Galante D, Gradoni L. Efficacy of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent adult patients. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:675-7.
40. Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Orwith GS, Murray HW. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Ann Intern Med* 1997;127:133-7.
41. Mullen AB, Carter KC, Baillie AJ. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2089-92.
42. Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* 2000;13:243-8.
43. Neal RA, Allen S, McCoy N, Olliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:577-84.
44. Oliva G, Gradoni L, Cortese L, Orsini S, Ciamarella P, Scalone A, De Luna R, Persechino A. Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:165-71.
45. Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or in combination with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:221-5.
46. Jha TK, Olliaro P, Thakur CP, Kanyok TP, Singhania BL, Singh IJ, Singh NK, Akhoury S, Jha S. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *Br Med J* 1998; 316:1200-5.
47. Soto-Mancipe J, Groggl M, Berman JD. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Clin Infect Dis* 1993;16:417-25.
48. Sundar S, Murray HW. Effect of treatment with interferon- γ alone in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1995;172:1627-9.
49. Sundar S, Rosenkaimer F, Murray HW. Successful treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon- γ . *J Infect Dis* 1994;170:659-62.
50. Herwaldt BL. Miltefosine. The long-awaited therapy for visceral leishmaniasis? *N Engl J Med* 1999;341:1840-2.
51. Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocoline: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1630-4.
52. Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 1999;341:1795-1800.
53. Sundar S, Kumar P, Makharia M, Goyal A, Rogers M, Gibbs D, Murray H. Atovaquone alone or with fluconazole as oral therapy for Indian kala-azar. *Clin Infect Dis* 1998;27:215-6.
54. di Martino L, Pettoello Mantovani M, Gradoni L, Gramiccia M, Guandalini S. Low dosage combination of meglumine antimoniate plus allopurinol as first choice treatment of infantile visceral leishmaniasis in Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:534-5.
55. Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med* 1999;13:330-4.
56. Velez I, Agudelo S, Hendrickx E, Puerta J, Groggl M, Modabber F, Berman J. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1997;126:232-6.
57. Singh S, Singh R, Sundar S. Failure of ketoconazole treatment in cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1995;34:120-1.
58. El-On J, Livshin R, Even-Paz Z, Hamburger D, Weinrauch L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 1986;87:284-8.
59. Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A, Ftaiti A, Zaafour B, Garraoui A, Olliaro PL, Dellagi K, Ben Ismail R. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:162-6.
60. Asilian A, Jalayer T, Whitworth JAG, Ghasemi RL, Nilforooshzadeh M, Olliaro P. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:648-51.
61. Lopez-Jaramillo P, Ruano C, Rivera J, Teran E, Salazar Irigoyen R, Espglugues JV, Moncada S. Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. *Lancet* 1998;351:1176-7.
62. Davidson RN, Yardley V, Croft SL, Konecny P, Benjamin N. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:319-22.
63. Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YAW, Scalone A, Badaro R, Reed SG, Gradoni L. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 1998;177:1339-44.
64. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001;39:357-61.