



Leishmania en piel de *Rattus rattus* de zona urbana de la Ciudad de Corrientes, Argentina

Gabriela Verónica Ramírez^{1*} ; Raquel Mónica Ruiz¹ ; Elsa Agustina Alegre¹ .

¹Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra Salud Pública. Corrientes (Capital). Argentina.
*Correspondencia: aguara1978@gmail.com

Recibido: Noviembre 2021; Aceptado: Mayo 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. detectar *Leishmania sp.* en piel de cola de *Rattus rattus* a través de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. **Material y método.** Se analizaron 45 muestras de piel de *Rattus rattus* del área urbana de la ciudad de Corrientes, Argentina. La detección de *Leishmania sp* se realizó mediante técnicas de PCR anidada. **Resultados.** En la primera ronda de amplificación se detectó ADN de *Leishmania* en 22 muestras de 45 procesadas (49%) y en 14 muestras en la segunda ronda (31%). **Conclusiones.** Estos resultados contribuyen a aumentar la información existente en nuestra región sobre la posible relación entre *Leishmania* y *Rattus rattus*, teniendo en cuenta la alta prevalencia encontrada en piel sumado a la total ausencia de lesiones. Otros aspectos deberán seguir estudiándose para establecer el rol de estos animales en la cadena epidemiológica de la enfermedad en una zona urbana endémica a leishmaniasis en otras especies animales.

Palabras clave: ADN de *Leishmania*; Cadena epidemiológica; leishmaniasis; prevalencia; rata negra; reacción en cadena de la polimerasa (*Fuentes: MeSH, CAB*).

ABSTRACT

Objective. the objective of the present work was the detection of *Leishmania sp.* in *Rattus rattus* tail base skin through polymerase chain reaction (PCR) techniques. **Material and method.** We analyzed 45 *Rattus rattus* skin samples from the urban area of the city of Corrientes in Argentina. The *Leishmania spp* detection was performed by nested PCR technique. **Results.** *Leishmania* DNA was detected in 22 samples out of 45 processed (49%) in the first round of amplification, and in 14 samples (31%) in the second round (31%). **Conclusions.** These results contribute to increase the existing information in our region on the possible relationship between *Leishmania* and *Rattus rattus*, considering the high prevalence found in skin added to the total absence of lesions. Other aspects should be further studied to establish the role of these animals in the epidemiological chain of the disease in an urban area endemic to leishmaniasis in other animal species.

Keywords: *Leishmania* DNA; epidemiological chain; leishmaniasis; prevalence; black rat; polymerase chain reaction (*Sources: MeSH, CAB thesaurus*).

Como citar (Vancouver).

Ramírez GV, Ruiz RM, Alegre EA. *Leishmania* en piel de *Rattus rattus* de zona urbana de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2546. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2546>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

INTRODUCCIÓN

En las Américas, la situación epidemiológica de las leishmaniasis es compleja, debido a la gran variedad de vectores flebotomínicos y a las más de 40 especies de mamíferos que son capaces de albergar al parásito en los diferentes ciclos de transmisión. En Argentina, la leishmaniasis cutánea se considera endémica en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, noroeste de Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Misiones y noreste de Corrientes. Con respecto a la leishmaniasis visceral, se han informado casos humanos y caninos en las provincias de Misiones y Corrientes, en Santiago del Estero casos humanos y en Formosa únicamente casos caninos (1).

Estudios en mamíferos han demostrado que varias especies se comportan como huéspedes del parásito y algunas juegan un papel importante como reservorios, tanto domésticos, sinantrópicos o silvestres, debido a que *Leishmania* puede tener un gran número de reservorios diferentes, lo que contribuye al mantenimiento del ciclo de la enfermedad en diferentes ambientes, desde silvestres hasta peridomiciliarios (2).

La importancia de la relación entre roedores sinantrópicos y leishmaniasis en Latinoamérica se evidenció a través de varios trabajos, demostrando que dichos roedores, al comportarse como reservorio de varias especies de *Leishmania* y presentar una amplia distribución y abundancia en áreas urbanas y periurbanas, presentan un riesgo para el ser humano, al tener una mayor probabilidad de contacto con el mismo y, por lo tanto, de transmisión del parásito (3).

En relación al papel de los roedores sinantrópicos, se planteó la hipótesis de que los cambios ambientales y la pérdida de biodiversidad, llevan a una selección de animales sinantrópicos, quienes aumentan su distribución y abundancia, aumentando en consecuencia la exposición del ser humano a los patógenos, como sucede por ejemplo en la región de Australasia, donde los animales silvestres sinantrópicos tienen 15 veces más probabilidades de ser una fuente de enfermedades infecciosas zoonóticas emergentes y reemergentes, que los animales silvestres, independientemente de la especie (4). Sumado a esta teoría, se plantea que la antropización y modificación de hábitats naturales provoca una disminución en la diversidad de hospedadores y puede conducir a la selección de especies más

generalistas, que se convertirían en reservorios competentes para algunos patógenos, proceso denominado "selección de reservorios" (5).

Por otra parte, resultan importantes las técnicas diagnósticas que se utilizan para la detección del parásito *Leishmania* y en este aspecto, las técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten detectar ADN de *Leishmania* sin la necesidad de realizar previamente el aislamiento del parásito o la observación microscópica y son de importancia sobre todo cuando se trata de roedores silvestres o sinantrópicos, en donde los parásitos rara vez causan lesiones cutáneas, son muy leves o, incluso puede detectarse en roedores sin ningún tipo de lesión aparente (6).

En Argentina, si bien existen varios trabajos sobre la distribución de las diferentes especies de *Leishmania* y sus correspondientes vectores, son escasos los estudios relacionados directamente a la detección del parásito en roedores silvestres y sinantrópicos. Se conoce la importante prevalencia de la infección en bazos de roedores de la especie *Rattus rattus* que habitan la ciudad de Corrientes (6) y la detección *L. braziliensis* en ejemplares de *Akodon sp.* y *Euryoryzomys russatus* en Puerto Iguazú, provincia de Misiones (7). Sin embargo, hay otros datos importantes que se desconocen o están poco estudiados, como las especies de roedores y la relación que existiría entre los mismos y el parásito *Leishmania*, en la ciudad de Corrientes, la importancia que podría tener el roedor en mantener la enfermedad en nuestra región geográfica, en especial si pudieran comportarse como huéspedes naturales, reservorios o de mantenimiento.

Se ha encontrado que la piel de la oreja y cola (8) de los roedores es un buen lugar para la infección con *Leishmania*, debido a que en esos lugares el grosor de la piel es menor y con menor densidad de pelo, lo cual facilita la alimentación de los vectores por su probóscide corta, por lo tanto, ambas localizaciones son lugares de asentamiento y proliferación del parásito, sin embargo, no existen estudios que evidencien si en nuestra región sucede lo mismo y tampoco se conocen las especies de parásitos que podrían localizarse en esos lugares.

Por los datos ya expuestos, se deduce la importancia de conocer esa información faltante, la cual sería fundamental para comprender la eco-epidemiología de la enfermedad en

nuestra región. Teniendo en cuenta los estudios realizados en piel, donde la base de cola es uno de los principales lugares donde el parásito *Leishmania* puede encontrarse y replicarse en roedores, y teniendo en cuenta la abundancia de la población de roedores sinantrópicos en la ciudad de Corrientes, el objetivo del presente trabajo fue la detección de *Leishmania sp.* en piel de base de cola de *Rattus rattus* a través de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. El estudio fue observacional, transversal y descriptivo.

Sitio de estudio. El estudio se realizó en el área urbana y suburbana de la ciudad de Corrientes, provincia de Corrientes, Argentina (27° 28' S y 58° 50' O).

Condiciones geoclimáticas. El clima es subtropical, con temperaturas cálidas en verano y presentando heladas en invierno. La temperatura media anual fluctúa entre 19.5°C y 22°C. En cuanto a las precipitaciones, la media anual de precipitaciones se desplaza entre 1200 y 1400 mm.

Periodo de estudio: El trabajo se llevó a cabo entre marzo del 2011 y junio del 2012.

Captura de roedores: se realizó mediante la utilización de trampas tipo Sherman, empleando como cebo semillas de zapallo y/ grasa bovina. Las trampas fueron entregadas a distintos barrios de la ciudad, en número de 2 a 3 jaulas por manzana por día. Para la ubicación de las jaulas se tuvo en cuenta la identificación de rastros de roedores e información de los mismos habitantes, datos que se tomaron previamente a la entrega de las trampas. Las mismas fueron controladas diariamente por las personas que habitaban la vivienda, las cuales fueron notificando la presencia o no de roedores atrapados. Los ejemplares capturados fueron trasladados al laboratorio de la cátedra Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCV/UNNE), donde fueron identificados siguiendo la clave de Osgood (1943) registrándose datos de edad y sexo. Además, se efectuó una inspección clínica externa, evaluándose la presencia de zonas alopecias, escamosas o lesiones en punta de las orejas, hocico, cola, base de cola y pulpejos de los miembros.

Muestras de estudio. Se trabajó con 45 muestras de piel de base de la cola de *Rattus rattus*, de tamaño de 1 cm de largo por 0.2 cm de ancho; las cuales fueron obtenidas anteriormente, identificadas en tubos eppendorf, almacenadas y conservadas en freezer a -20°C.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio del Servicio Veterinario de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCV/UNNE).

Extracción de ADN mediante técnica de digestión con CTAB. En primer lugar, la extracción de ADN se realizó mediante la técnica de digestión con CTAB. Para ello, las muestras de piel se acondicionaron empleando una técnica estandarizada por nuestro equipo de trabajo, consistente en la reducción del tejido por medio de pequeños cortes, con tijera fina estéril de cirugía, para la obtención de diminutos fragmentos.

Estos fragmentos fueron luego colocados en tubo Eppendorf libre de ADN y suspendidos en 500 µl de solución fisiológica, agitadas en vórtex y centrifugadas a 12.000 rpm por 4 minutos con posterior eliminación del sobrenadante. La obtención del material genético de las muestras se realizó siguiendo técnicas descritas por Alegre et al (9).

PCR control de material genético de ratas. A los efectos de corroborar la presencia de material genético se realizó una PCR Simple control de especie, siguiendo recomendaciones descriptas (6), empleando como control positivo ADN de rata y control negativo agua destilada estéril.

Para la separación de los productos de PCR se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para la visualización se utilizó transiluminación UV empleando como marcador de peso molecular Ladder 100 (CienMarker).

Detección de *Leishmania sp.* por Nested PCR o PCR anidada. Esta técnica se lleva a cabo mediante dos rondas de amplificación, utilizándose los primers S4 y S12 para la primera ronda, los cuales amplifican bandas de 520pb. Para la segunda ronda se utilizaron los primers S17 y S18 que amplifican bandas de 490 pb siguiendo las recomendaciones descriptas por Ruiz et al (6).

Se utilizó ADN de *Leishmania sp.* provisto por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben" (Argentina), y como control negativo se utilizó agua destilada.

Para la separación de los productos de PCR se utilizó electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en TBE (Tris- Ácido bórico-EDTA) 1X, que fueron teñidos con bromuro de etidio, posteriormente la visualización se realizó por transiluminación UV. Para realizar la comparación de tamaño de los fragmentos que fueron amplificados se utilizó un marcador de peso molecular (Ladder 100).

Aspectos éticos. Para la realización del presente trabajo se tuvieron en cuenta los criterios de bienestar animal. Las presentes actividades descriptas se desprenden de un proyecto mayor, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, bajo el Expediente N°: 14-2019-02029, protocolo N° 0084.

RESULTADOS

De los 45 ejemplares capturados, un 40% (18) fueron machos y un 60% (27) hembras. En cuanto a edad, el mayor número de roedores correspondió al rango de edad de 6 a 8 meses, con un 35.5% (16), seguidos por ejemplares de 12 a 14 meses de edad con un 17.77% (8). Ninguno de los ejemplares mostró clínicamente síntomas compatibles con leishmaniasis, tampoco se observó ningún tipo de lesión.

Se realizó la extracción del material genético de las 45 muestras de piel de base de la cola de *Rattus rattus*. En cuanto a las PCR control, se logró una correcta obtención de material genético en todas las muestras procesadas, observándose bandas de amplificación de un fragmento de 118pb, evidenciando presencia e integridad del ADN de la especie estudiada, así como también ausencia de inhibidores de la reacción.

A cada muestra, se aplicó la técnica de PCR anidada. En la primera ronda de amplificación se observaron bandas específicas de ADN de *Leishmania sp.* en 22 muestras de las 45 muestras procesadas (49%) (Figura 1). En la segunda ronda de PCR el número disminuyó, detectándose amplificación específica en 14 muestras (31%) (Figura 2). No se observó amplificación en controles negativos en ninguna de las reacciones moleculares.

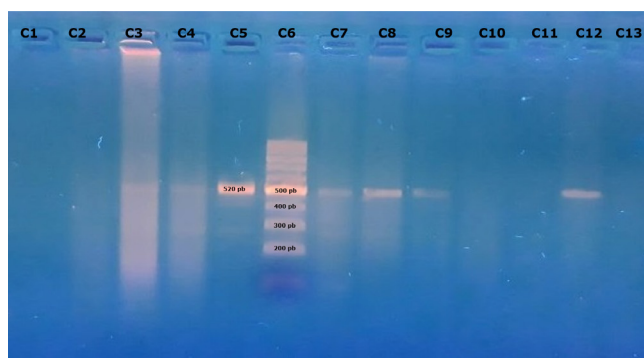


Figura 1. PCR anidada: Primera ronda de amplificación. C1-4, C10 y C11: muestras de piel de base de cola negativas a *Leishmania sp.*; C7-9, C12; muestras positivas. C6: marcador de peso molecular (Ladder 100). C5: control positivo y C13 control negativo. Amplicon: 520 pb.

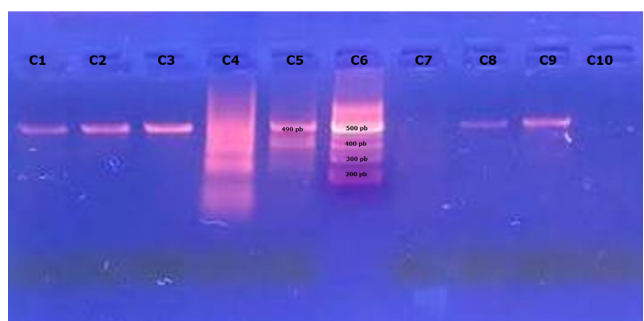


Figura 2. PCR Anidada. segunda ronda de amplificación. muestras positivas con bandas de amplificación de 490 pb (C1 - C3 y C8). C5: marcador de peso molecular (ladder 100). C5: control positivo y C10: control negativo.

DISCUSIÓN

Son varias las razones que dificultan la comprensión de la epidemiología de las leishmaniasis, siendo una de las principales la identificación de sus múltiples reservorios naturales. Los reservorios naturales son ampliamente desconocidos debido a las dificultades en la captura de números suficientes de animales silvestres, las técnicas utilizadas en el aislamiento e identificación de los parásitos (2). Además, es muy importante tener en cuenta que los reservorios naturales varían según el tipo de parásito, del vector y del área geográfica.

En el presente trabajo ninguno de los roedores evidenciaba lesiones o sintomatología compatible con la presencia del parásito, sin embargo, se obtuvo una alta tasa de animales positivos, esto nos demuestra la importancia de aplicar herramientas de alta sensibilidad y especificidad

como es la técnica de PCR anidada, sobre todo en estudios epidemiológicos.

Se interpreta que el resultado obtenido de una frecuencia de 31% (14 muestras de un total de 45) es alta, en comparación a otros estudios realizados en piel de roedores sinantrópicos. En Brasil (10) obtuvieron una frecuencia del 10% (8 muestras de un total de 80) de detección de *Leishmania sp* en muestras de piel de *Rattus norvergicus* utilizando PCR anidada. También en *R. norvergicus*, en muestras de piel de oreja (11), obtuvieron un 31% (18 muestras de un total de 57). También en Brasil, Castro Ferreira y colaboradores (12) obtuvieron un 64.9% de prevalencia en muestras de piel y Quaresma y colaboradores un 25% en piel de oreja (13).

Sumado a la prevalencia de 31% obtenida en este trabajo, puede observarse que *Rattus rattus* es el roedor sinantrópico en donde se ha detectado *Leishmania* en mayor frecuencia, en comparación con otras especies como *Mus musculus* o *Rattus norvergicus* (14). Esto podría deberse a que *Rattus rattus* es el roedor sinantrópico que suele encontrarse con mayor abundancia en zonas endémicas de Leishmaniasis, especialmente en zonas urbanas (15,16), como también pudo observarse en nuestro trabajo, donde la totalidad de las capturas fueron hechas en la zona urbana de la ciudad de Corrientes y correspondió a un 100% a *Rattus rattus*; resultados similares fueron obtenidos por Ruiz y colaboradores donde, de 63 roedores capturados en la zona urbana de la ciudad de Corrientes, 62 ejemplares correspondieron a *Rattus rattus* y solo 1 ejemplar a *Mus musculus* (6).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es la ausencia de lesiones en los roedores

que fueron analizados en nuestro trabajo, hecho que coincide con otras investigaciones (4,6,15,16,17). Esto podría deberse a una adaptación de *Leishmania* a su huésped, logrando un estado de equilibrio resultante de una antigua relación huésped-parásito (18).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuye a incrementar la información existente en la ciudad de Corrientes (Argentina) sobre la posible relación que podría existir entre *Leishmania* y un roedor sinantrópico como *Rattus rattus*, teniendo en cuenta la importancia de la elevada prevalencia encontrada en piel, con la probabilidad de transmisibilidad por vectores que esto implica, sumado a la total ausencia de lesiones en dichos ejemplares, aspectos que son esenciales para determinar el rol de reservorio en una especie.

De todas maneras, otros aspectos deberán continuar estudiándose debido que aún quedan muchas dudas por resolver, sobre todo teniendo en cuenta la alta prevalencia encontrada en piel de la base de cola. Resta investigar si esa prevalencia se correspondería a otros lugares, como piel de oreja u otros tejidos como bazo y médula, estudios que se realizarán en otras etapas de trabajo. Y si esa prevalencia podría tener relevancia en otorgar a *Rattus rattus* un rol importante en la cadena epidemiológica de la enfermedad en nuestra región, como ser la de actuar como reservorio.

Conflicto de intereses.

Los autores de este estudio declaran que no existe conflicto de intereses con la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Germano M, Salomón M, Neira G, Lozano E, Mackern Oberti J, Cargnelutti D. Leishmaniasis in the Argentine Republic: Temporal and geographical distribution from 2013 to 2017. *Asian Pac J Trop Med.* 2019; 12(7):300-305. <http://dx.doi.org/10.4103/1995-7645.262073>
2. Roque A, Jansen A. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014; 3(3):251-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
3. Caldart E, Freire R, Ferreira F, Ruffolo B, Sbeghen M, Mareze M, et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2017; 26(1):17-27. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017001>
4. McFarlane R, Sleight A, McMichael T. Synanthropy of wild mammals as a determinant of emerging infectious diseases in the Asian–Australasian region. *EcoHealth.* 2012; 9:24-35. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0763-9>

5. Faust C, Dobson A, Gottdenker N, Bloomfield L, McCallum H, Gillespie T, et al. Null expectations for disease dynamics in shrinking habitat: dilution or amplification? *Phil Trans R Soc B*. 2017; 372(1722):20160173. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0173>
6. Ruiz R, Bastiani C, De Biasio M, Alegre E, Ramírez N. Detección de *Leishmania sp.* en *Rattus rattus* de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Arch Med Vet*. 2015; 47(3):401-407. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000300020>
7. Fernández M, Fraschina J, Acardi S, Liotta D, Lestani E, Giuliani M, et al. Assessment of the role of small mammals in the transmission cycle of tegumentary leishmaniasis and first report of natural infection with *Leishmania braziliensis* in two sigmodontines in northeastern Argentina. *Parasitology Research*. 2018; 117(2):405-412. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5714-5>
8. Corps B. The effect of graft thickness, donor site and graft-bed on graft shrinkage in the hooded rat. *Br J Plast Surg*. 1969; 22:125-133. [https://doi.org/10.1016/S0007-1226\(69\)80053-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1226(69)80053-6)
9. Alegre E, De Biasio M, Ramirez N, Ruiz R, Bastiani C. Detección y diferenciación molecular de *Leptospiras sp.* utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN. *Rev Vet*. 2013; 24(1):53-55. <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2411151>
10. Marcelino A, Ferreira E, Avendanha J, Costa C, Chiarelli D, Almeida G, et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2011; 183(1-2):54-58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.019>
11. Akhavan A, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian M, Rassi Y, Bates P, et al. *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol*. 2010; 126:552-556. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.003>
12. de Castro Ferreira E, Cruz I, Cañavate C, de Melo L, Pereira A, Madeira F, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Vet Res*. 2015; 11(1): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y>
13. Quaresma P, Rêgo F, Botelho H, Silva S, Moura A Jr, Teixeira R. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105(10):579-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.005>
14. Parhizkari M, Motazedian M, Asgari Q, Mehrabani D. The PCR-based detection of *Leishmania major* in *Mus musculus* and other rodents caught in Southern Iran: A guide to sample selection. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105:319-323. <https://doi.org/10.1179/136485911X12987676649827>
15. Pereira A, Ferreira E, Lima A, Tonelli G, Rêgo F, Paglia A, et al. Detection of *Leishmania spp* in silvatic mammals and isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS One*. 2017; 12(11):e0187704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187704>
16. Lima B, Dantas-Torres F, Carvalho M, Marinho-Junior J, Almeida E, Brito M. Small mammals as hosts of *Leishmania spp.* in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013; 107(9):592-597. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt062>
17. de Oliveira Lara-Silva F, Andrade Barata R, Monteiro Michalsky E, de Castro Ferreira E, Garcia Lopes M, da Costa Pinheiro A, et al. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/592986>
18. Andrade M, Courtenay O, Brito M, Carvalho F, Carvalho A, Soares F, et al. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015. 9(10):e0004137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004137>