

Leishmaniasis Visceral

Dra. Olga Zerpa

olzerpa@gmail.com

Dra. Marian Ulrich +

Venezuela

Instituto de Biomedicina. Ministerio de Salud. Universidad Central de Venezuela

La leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar, es una enfermedad infecciosa, parasitaria, potencialmente mortal, con amplia distribución geográfica tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. Su permanencia es asegurada por la existencia de una cadena epidemiológica constituida por fuentes de infección, agentes transmisores y hospedadores susceptibles.

Datos Históricos

La leishmaniasis visceral es conocida en la India desde el siglo XIX, pero es Leishman (1903) quien describió la *Leishmania* en muestras de bazo obtenidas de un soldado Irlandés proveniente de la India, identificándolas como formas degeneradas de *Trypanosoma*. También Donovan (1903) describe tres casos de fiebre negra o *kala-azar* provenientes de la India, donde observó flagelados que no se parecían a los tripanosomas descritos por Leishman. Ese mismo año Laveran y Mesnil (1903) estudiaron las muestras de Donovan, afirmando que este flagelado era nuevo, lo

llamaron *Piroplasma donovani* en honor a Donovan; sin embargo, más adelante Ross (1903) examina el mismo material y crea un nuevo género al que denomina *Leishmania* en honor a Leishman.

En América la LV fue descrita por primera vez por Migone (1913) en la Asunción, Paraguay en un paciente proveniente de Mato Grosso, Brasil. Cunha y Chagas (1937) proponen el nombre de *Leishmania chagasi* para el agente causal de LV en este continente.

En Venezuela, Martínez y Pons (1941) publicaron el primer caso autóctono procedente de Las Mercedes estado Guárico. Torrealba (1970) publica su tesis doctoral donde describe un total de 174 casos registrados en el país en el período de 1941-1969, distribuidos en los estados Zulia, Guárico, Cojedes, Carabobo, Aragua, Trujillo, Lara, Falcón, Portuguesa, Dto. Federal, Anzoátegui, Monagas, Bolívar, Sucre y Nueva Esparta. Posteriormente casos aislados han sido registrados en diferentes entidades Federales, definiendo el comportamiento epidemiológico de la enfermedad como una endémica rural con desplazamiento a zonas urbanas marginales (Aguilar *et al.* 1998, Zulueta *et al.* 1999, Zerpa *et al.* 2003)

Epidemiología

La leishmaniasis visceral ha sido descrita en Europa, América, Asia y África; 90% de los casos son descritos en Brasil, India, Bangladesh y Sudán (Desjeux 1996, Grimaldi *et al.* 1989). Se estima que la incidencia mundial anual es de 500.000 casos.

La prevalencia mundial de esta patología tiende a aumentar y se han registrado epidemias en países como la India donde en la provincia de Bihar se calcula que se produjeron mas de 250.000 casos durante el año 1993. En el sur de Europa se reportan anualmente un importante número de casos ligados a la infección por VIH.

El comportamiento de la LV varía de acuerdo a las regiones geográficas; así observamos que en la India y África afecta mayormente a pacientes entre la segunda y tercera década de la vida; en la primera se describe poca respuesta al tratamiento con antimoniales y un 5% de los casos presenta una forma cutánea de leishmaniasis después del tratamiento que denominada leishmaniasis dérmica post-kala azar, caracterizada por la presencia de máculas, placas y nódulos generalizadas conteniendo abundantes parásitos (Zijlstra & el Hassan 2001, 1994) Estos pacientes actúan como reservorios de parásitos, siendo capaces de mantener la transmisión de la enfermedad. Aparentemente no hay asociación con reservorios de otra especie y la enfermedad es una antroponosis; el agente causal es *Leishmania donovani* y la mortalidad frecuentemente es muy alta.

En el Mediterráneo, el comportamiento de la LV es parecido a lo observado en los últimos años en Venezuela, donde el grupo etario más afectado son los niños entre 1 y 4 años (Zerpa *et al.* 2003, Kafetzis, 2003). Es una zoonosis, donde el perro es el reservorio identificado, presenta buena respuesta terapéutica, y el agente etiológico es la *L. infantum*. (Alvar *et al.* 1997)

En Venezuela, desde 1995 hasta 2000 se registraron 242 casos en 12 entidades federales, Anzoátegui, Aragua, Bolívar, Carabobo, Cojedes, Falcón, Guárico, Lara, Nueva Esparta, Portuguesa, Sucre y Trujillo. La tasa de incidencia registrada para Venezuela fue de 0,2 casos por 100.000 habitantes. Los estados con mayor tasa de incidencia fueron Nueva Esparta, Anzoátegui, Lara, Sucre y Trujillo, con tasas variables entre 3.0 y 0.4 por 100.000 habitantes por año.

La letalidad para ese período en el país fue de 7,85%, con extremos de 17,6% en 1998 y 4,4% en 1996. En cada entidad federal la letalidad presentó grandes variaciones en los años estudiados, desde años sin letalidad, hasta valores de 50%, cambios posiblemente relacionados con el poco número de casos registrados en cada año. (Zerpa *et al.* 2003). El sexo masculino es más afectado que el femenino. Con respecto a la edad, los menores de 15 años representan el 80,6% de casos y el 67,7% están por debajo de los 4 años, lo que significa que el mayor número de pacientes con LV son niños.

La aparición de casos de LV en zonas urbanas de estos estados crea un pronóstico de importancia epidemiológica en cuanto al comportamiento de la enfermedad por la grave situación que pudiera presentarse con la urbanización de la misma, si no se toman las medidas epidemiológicas pertinentes.



Área endémica de leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita, Edo.
Nueva Esparta

Vivienda tipo del área rural en focos endémicos de leishmaniasis visceral.
Edo. Sucre.

Zerpa *et al.* (2003) publicaron los resultados de encuestas serológicas realizadas a 3025 perros de los estados Guárico, Nueva Esparta, Carabobo, Yaracuy, Falcón, Aragua, Sucre, Cojedes, Anzoátegui, Lara, Portuguesa, Trujillo y Bolívar; mostraron 13,2% de positividad con el antígeno rK39, un antígeno altamente específico derivado de *Leishmania chagasi*. El estado con mayor porcentaje de perros positivos fue el estado Nueva Esparta con 28,5% seguido por Lara con 6,8%. Se observó

ausencia de perros positivos en Carabobo, Portuguesa, Yaracuy y Bolívar, a pesar de haberse registrado casos humanos en estas entidades.

Agente causal

La enfermedad es producida por parásitos protozoarios flagelados, pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania* que son parásitos intracelulares obligados de las células del sistema fagocítico monocitario, con una forma flagelada o promastigote, que se multiplica en el tubo digestivo del insecto vector y en medios de cultivo, y una forma no flagelada o amastigote que se multiplica en los tejidos de los hospederos vertebrados. En Venezuela fue identificada la *L. chagasi* (= *L. infantum*) en muestras de pacientes y perros procedentes del estado Nueva Esparta y Trujillo (Zerpa *et al.* 2001, Moreno *et al.* 1984, respectivamente). *L. amazonensis*, *L. columbiensis* y *L. mexicana* han sido ocasionalmente reportadas como productoras de leishmaniasis visceral en América. En Europa la *L. infantum* es el agente etiológico más importante y en la India la *L. donovani* es la implicada (Alvar 1997)

Vector

Los vectores de la leishmaniasis son Dípteros de la Familia *Psychodidae*, comúnmente llamados flebótomos, cuyo nombre autóctono varía en las diferentes zonas geográficas.

Los flebótomos realizan su ciclo vital completo (huevo, cuatro estadíos larvarios, pupa y adulto) durante todo el año en áreas tropicales. Las formas inmaduras son terrestres. Sus hábitats varían desde la selva

húmeda hasta regiones muy áridas, con distribución entre el nivel del mar y los 3.200 mts. La mayor parte de las especies del Nuevo Mundo viven más en selvas que zonas arenosas. Tiene actividad crepuscular y nocturna siempre y cuando la temperatura sea mayor a los 18°C y no haya viento.

Los adultos son dípteros de pequeño tamaño, de 2-5mm, color amarillento, de alas lanceoladas, todo el cuerpo recubierto de pelos, patas y aparato bucal relativamente largos. Las alas son de color uniforme, sin manchas y las sostienen casi erectas como pequeñas mariposas. Es muy característico su vuelo corto en pequeños saltos. Las hembras son hematófagas; solo ellas son capaces de perforar la piel de los vertebrados para alimentarse de sangre. La saliva de los mosquitos posee sustancias tensoactivas y antiplaquetarias como la aspirasa y las desintegrinas que provocan la extravasación de sangre en el punto de la picadura y su fluir fácil por el canal alimenticio así como péptidos vasodilatadores, maxadilán, CGRP (calcitonin gene-related peptide) y otros componentes que inhiben la presentación de antígenos por los macrófagos, facilitando con esto el éxito de la infección del parásito en su huésped.

En America *Lutzomyia longipalpis sensu lato* y *Lu. evansi* están involucrados en la transmisión de la enfermedad, tal como ha sido demostrado en varios focos de LV en el estado Aragua (Felinciangeli *et al.* 1999), Carabobo (Aguilar *et al.* 1998) y Nueva Esparta (Felinciangeli *et al.* 1998).

Lutzomyia spp

Reservorios

Como reservorio y fuente de infección se han identificado los cánidos. En el Viejo Mundo el lobo (***Canis lupus***) y el chacal (***Canis aureus***) se encuentran parasitados, pero por su distancia de los humanos no se les considera una fuente de infección importante para los mismos (WHO 1990). En América se ha encontrado infectado el zorro cangrejero (***Cerdocyon thous***), los marsupiales didelfideos (Lainson *et al.* 2002) y el perro doméstico (***Canis familiaris***) (WHO 1990).

Leishmaniasis Visceral Humana

Se estima que un alto porcentaje de individuos infectados por *Leishmania* que habitan en áreas endémicas pueden presentar enfermedad subclínica, caracterizada por un aumento transitorio de anticuerpos anti-*Leishmania*, sin manifestaciones clínicas evidentes, o con presencia de algunos síntomas muy leves que generalmente pasan desapercibidos (Braz *et al.* 2002).

La presentación de la enfermedad depende de varios factores, que incluyen respuesta inmune del huésped, virulencia y carga parasitaria (Kafetzis, 2003); también se ha demostrado que los niños de áreas endémicas presentan mayor riesgo que los adultos de contraer la enfermedad; así mismo, la malnutrición es un factor de susceptibilidad muy importante para desarrollar leishmaniasis visceral.

Las manifestaciones clínicas clásicas en el humano incluyen fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia franca, pérdida de peso, anemia, acompañado de otros signos clínicos inespecíficos.

El período de incubación es difícil de ser determinado por la imposibilidad de determinar con exactitud la fecha de la picadura del vector. Algunos autores señalan que varía desde dos semanas a ocho meses después de la exposición, aunque se han publicado períodos de incubación de hasta 10 años (Neves 1975).

El inicio de la enfermedad puede ser repentino, como ocurre con frecuencia en los niños pequeños, o insidioso en los niños más grandes, adolescentes y adultos.

Patogenia

La leishmaniasis visceral usualmente se inicia en un hospedero susceptible con la picada de un flebótomo hembra infectado; se han reportado pocos casos transmitidos por transfusiones sanguíneas, relaciones sexuales o a través de la placenta durante el embarazo. Potentes vasodiladores como la maxidilan producidos por los flebótomos facilitan el inicio de la infección cutánea local. Hay cierta evidencia que la *L. chagasi* (= *L. infantum*) no activa los mecanismos de quimiotaxis e inflamación cutánea local significativamente. Esta observación, más otras características intrínsecas del parásito (p.ej., óptima temperatura para su replicación), conduce a patología sistémica, en contraste con las leishmanias dermatópicas.

Las formas promastigotes metacíclicas o infectantes son susceptibles a mecanismos líticos (complemento) presentes en el suero. Por lo tanto, su

sobrevivencia depende de fagocitosis por células macrofágicas. La activación de la cascada del complemento, con deposición de sus componentes en la superficie del parásito, facilita la fagocitosis mediante por receptores en la membrana de los macrófagos. Una vez fagocitado por macrófagos, los parásitos se convierten rápidamente en las formas aflageladas o amastigotes, muy resistentes a las condiciones ácidas intracelulares y se inicia la replicación intracelular del parásito por fisión binaria.

Igualmente hay fagocitosis de *Leishmania* por células dendríticas cutáneas, pero aparentemente sin multiplicación significativa de los parásitos en estas células. Las células dendríticas probablemente juegan un papel fundamental en la presentación de antígenos de *Leishmania* y el inicio de una respuesta inmunológica específica que determinará las consecuencias de la infección cutánea inicial. Si la respuesta inmunológica es de tipo Th1, los linfocitos CD4+ específicos producen mediadoras (p.ej. interferón gamma) que activan los macrófagos y otros componentes de la inmunidad mediada por células, proceso que conduce a la muerte de los parásitos y curación o limitación a un proceso subclínico que puede durar muchos años. En cambio, el desarrollo de una respuesta Th2 favorece la síntesis de anticuerpos, pero estos no destruyen los parásitos intracelulares. La interleuquina-10 producida durante una respuesta TH2 también inhibe el desarrollo de una respuesta eficaz de activación macrofágica.

Si no hay una respuesta inmunológica Th1 vigorosa que activen los macrófagos y eliminan los parásitos en la lesión cutánea inicial, los macrófagos infectadas son diseminados por todo el cuerpo; la infección se

establece en el sistema retículo-endotelial, sobre todo en el bazo, hígado (células de Kupffer), médula ósea y ganglios linfáticos, donde se encuentran condiciones óptimas para establecerse e iniciar el proceso patológico. División de las células macrofágicas *in situ*, reclutamiento de otras células, hiperplasia y multiplicación de células plasmáticas contribuyen a la formación de granulomas, con aumento del tamaño de los órganos afectados (hepato- y esplenomegalia), secuestro de glóbulos rojos en el bazo y otros trastornos de estructura y función. La hiperplasia de macrófagos en la médula ósea contribuye a la pancitopenia característica de la enfermedad. La síntesis de grandes cantidades de anticuerpos conduce a la formación de inmunocomplejos asociados con glomerulonefritis. La patología sistémica conduce a la muerte en un 90% de los pacientes no diagnosticados y tratados oportunamente.

La prueba cutánea con leishmanina mide la hipersensibilidad retardada, una de las manifestaciones de la reactividad inmunológica Th1. Esta prueba es negativa durante la LV activa, pero se hace positiva unos meses después del tratamiento y curación clínica del paciente. Esta observación demuestra que la reacción Th2 descrita arriba es transitoria y no persiste sino en la presencia de grandes números de parásitos. No se conocen con certeza los factores que favorezcan el desarrollo de una reacción Th1 o Th2 inicial, pero el estado de nutrición, la intensidad de la exposición al parásito y la presencia de otras infecciones intercurrentes han sido nombrados como factores de riesgo.

Se ha estimado que pueda haber entre 30 y 100 casos subclínicos de LV por cada caso clínico, basado fundamentalmente en la presencia de

reacciones positivas frente a la leishmanina sin manifestación clínica alguna (Desjeux, 1996). Esto sugiere la presencia de un espectro de respuestas frente a la infección, en el cual algunas personas son excepcionalmente susceptibles y desarrollan la enfermedad, otras posiblemente son totalmente resistentes, y otras demuestran cierta resistencia que permite mantener la infección subclínica durante largos períodos de tiempo. Cualquier inmunodeficiencia significativa en el último grupo, por ejemplo la infección con HIV, puede conducir a activación de la enfermedad.

Clinica

Signos y Síntomas fundamentales

- Fiebre: Es el signo más constante, aunque hay casos descritos donde las elevaciones de temperatura no fueron encontradas. La temperatura varía de 37 a 40°C (Wyller1992).
- Esplenomegalia: Es encontrado en casi la totalidad de pacientes en los que se diagnostica LV, es el hallazgo más llamativo en la exploración física, y el que induce la sospecha de esta enfermedad. La variación de series reportadas alcanza desde 95 hasta 100% (Lita *et al.* 2002, Werneck *et al.* 2003)..
- Hepatomegalia: Junto con la esplenomegalia y la fiebre, el aumento de tamaño del hígado es otro de los signos fundamentales. Aunque no esté presente en todos los enfermos, algunos series reportan desde el 66 al 93% de hepatomegalia en pacientes afectados con leishmaniasis visceral.

- Linfadenopatías: Es un signo comúnmente asociado, presente en un 36-84% de los pacientes, frecuentemente es generalizada, y los nódulos no son dolorosos a la palpación, son firmes y móviles.
- Palidez cutánea-mucosa: Es causada por la anemia severa,
- Pérdida de peso: Es de instalación lenta y progresiva hasta llegar a la caquexia si no hay intervención oportuna. La causa de la pérdida de peso es desconocida, aunque en su génesis puede influir la disminución de la ingesta de alimentos, el aumento del metabolismo (el cual está mediado por citocinas), mala absorción intestinal y la presencia de otras enfermedades intercurrentes.

Signos y síntomas Secundarios

- Respiratorios: Torrealba advierte de lo difícil de incriminar directamente a la *Leishmania* de los cuadros respiratorios encontrados en estos pacientes, ya que con mayor frecuencia son vistos en casos de evolución crónica donde el paciente presenta un estado de inmunosupresión avanzado que los hace susceptibles a infecciones respiratorias intercurrentes bacterianas y virales. Por otra parte, varios autores consideran que la neumonitis intersticial es una manifestación de leishmaniasis visceral.
- Trastornos gastrointestinales
Diarrea ha sido descrita hasta en un 45% de los enfermos. Ésta puede manifestarse como un síndrome disentérico donde se observa sangre en las heces (Wyller 1992, Cherry 1996).
- Epistaxis: El sangrado puede ser severo y comprometer la vida. En su patogénesis están involucrados diferentes factores tales como: la disminución de los elementos sanguíneos debido a la infección leishmanial de la médula ósea y/o a la presencia de leishmanias en la mucosa nasal.
- Anorexia: La pérdida del apetito ha sido reportada como frecuente en diferentes estudios como los realizados por Zijlstra *et al.* en 1991 y Hashim *et al.* en 1994.

- Debilidad y fatiga: Puede ser encontrado y se encuentra relacionado con la anemia.

Manifestaciones en la Piel:

A menudo se encuentran manifestaciones cutáneas. De manera especial en la India, la apariencia gris oscura de la piel da lugar al nombre de kala-azar (fiebre negra). Esta pigmentación es poco frecuente en los pacientes de Sudán, en quienes suele observarse hiperpigmentación del área umbilical y pliegues axilares. La patogénesis de los cambios pigmentarios es desconocida. Además en la piel de manera poco frecuente se pueden observar leishmaniomas, que son úlceras únicas o múltiples en el sitio de inoculación del parásito y que pueden preceder a la clínica de LV; aparentemente solo se han observado en Asia Central y África. La piel puede ser también afectada por las infecciones de hongos y/o virus como el Herpes.

En algunos casos tratados de LV puede presentarse un trastorno cutáneo denominado leishmaniasis dérmica post-kala-azar, cuando no se erradican todos los parásitos. En la leishmaniasis de la India, se encuentra esta complicación en un 12-17% de los casos, y con frecuencia aparece varios años después del tratamiento (Zijlstra 1994) En la enfermedad africana es menos común y ocurre a menudo durante el tratamiento en alrededor de 2-3% de los pacientes, curándose de manera espontánea en pocos meses. Se caracteriza por lesiones hipo- pigmentadas, eritematosas o nodulares

en cara, tórax, cuello y nalgas. En ocasiones las lesiones nodulares en la cara semejan a la lepra lepromatosa. Se creen que las lesiones representan una forma modificada de infección por *L. donovani* en las que los parásitos no son capaces de invadir las vísceras y se localizan en la piel. Estas alteraciones parecen estar en relación con la respuesta inmunitaria del huésped; este cambio a un tropismo cutáneo podría coincidir con la recuperación de la enfermedad visceral y desaparecer con la recaída.

Complicaciones de la LV

Las principales complicaciones que llevan a la muerte, entre ellas la hemorragia y la sobre-infección, son consecuencia de una disminución de los elementos sanguíneos debido a la infección leishmanial de la médula ósea y al hiperesplenismo. La anemia, leucopenia y la trombocitopenia son comunes. La hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia (fundamentalmente de IgG), complejos inmunes circulantes y factor reumatoide son hallazgos de laboratorio asociado. Se produce glomerulonefritis por complejos inmunes, con proteinuria y hematuria microscópica, aunque la enfermedad renal es infrecuente. La amiloidosis secundaria y la fibrosis hepática que llevan a la hipertensión portal son inusuales.

Sin tratamiento, la muerte suele acontecer como resultado de complicaciones infecciosas, entre ellas, la neumonía, tuberculosis, disentería y septicemia; o como consecuencia de anemia y hemorragias.

Diagnostico diferencial

En la etapa aguda debe diferenciarse del paludismo, tuberculosis miliar, salmonelosis, esquistosomiasis aguda, absceso hepático amibiano y tifus agudo. En las etapas crónicas puede imitar a la esquistosomiasis hepatoesplénica, brucelosis, síndrome de esplenomegalia tropical, leucemia linfocítica crónica, linfomas, histiocitosis maligna, hipertensión portal, anemia hemolítica y enfermedad de depósito de glucógeno. La leishmaniasis cutánea post-kala-azar puede ser confundida con el pán, sífilis y lepra.

Alteraciones de laboratorio

En la LV podemos encontrar pancitopenia, pero la severidad con la cual se afecta cada una de las líneas celulares es variable.

- Anemia:
- Leucopenia:
- Trombocitopenia
 - Proteínas séricas:

La albúmina en suero a menudo es menor de 3g/100ml y los valores de globulinas son mayores de 5g/100ml, de la cual la mayor parte es IgG, de la sub clase IgG1 e IgG3. La relacion albumina/globulina se encuentra invertida.

- Han sido demostrados Factor reumatoide y complejos inmunes circulantes:

- Pruebas de funcionalismo hepático:
Elevaciones de ALT y AST hasta 5 veces sus valores normales, y elevación de GGT de hasta 3 veces sus valores normales. Los niveles de bilirrubina total y directa suelen ser normales
- Orina:
Albuminuria ha sido observada entre un 40-75% de los pacientes, también ha sido demostrado proteinuria y hematuria microscópica aunque la enfermedad renal es infrecuente.



Hepato-esplenomegalia en pacientes con leishmaniasis visceral

Diagnóstico

- 1- Epidemiológico: Paciente que procedan de áreas endémicas.
- 2- Clínico: Presencia de signos y síntomas que hagan sospechar leishmaniasis visceral

Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico se basa en métodos de identificación del parásito y pruebas inmunológicas

1) Métodos de identificación del parásito:

Estos procedimientos requieren de la toma de muestras biológicas para la visualización del parásito, siendo éste el diagnóstico de certeza. El material utilizado es médula ósea obtenida por aspirado o por biopsia.

- ◆ Tinción con Giemsa donde se observan al microscopio bajo el objetivo de inmersión los amastigotes de *Leishmania*, que son las formas aflageladas del parásito vistas en el vertebrado, pueden observarse en el interior de los macrófagos o dispersos por la ruptura de estas células. Para confirmar que se trata de *Leishmania* debe identificarse la membrana celular, el núcleo y el kinetoplasto

- ◆ Cultivo: Los parásitos crecen en forma flagelar (promastigotes). Parte del material obtenido con la biopsia o el aspirado de la médula ósea se debe cultivar para aislar la cepa y para complementar la demostración del parásito. El medio de cultivo más adecuado es agar base sangre (Difco) al cual se le agrega sangre desfibrinada de conejo al 10% y antibióticos.
- ◆ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Detecta ADN del parásito infectante. Para ello se utiliza una pequeña cantidad de la muestra obtenida de médula ósea .

2. Inmunodiagnóstico

§ Serología: Inmunoensayo enzimático o ELISA. El objetivo de esta técnica es la detección de anticuerpos circulantes

contra *L. chagasi*(= *L. infantum*) en suero de pacientes. Se utilizan antígenos específicos (promastigotes de *L. donovani*, y los antígenos recombinantes rK39 y rk26, aislados de *L. chagasi* por Reed y colaboradores) (Reed 1996). Es una técnica altamente sensible y específica, mayor de 90% con el uso del antígeno rk39, según lo reportado en diferentes estudios (Maalej 2003). La reactividad cruzada con otras especies de *Leishmania* limita el uso de promastigotes enteros en pruebas de ELISA para LV.

Los niveles de anticuerpos son excepcionalmente elevados en LV, hecho que permite el uso de diversas pruebas serológicas en su diagnóstico. En el Viejo Mundo, frecuentemente se utiliza una prueba relativamente sencilla de aglutinación de parásitos muertos, el DAT (test de aglutinación directa), que demuestra una sensibilidad de \pm 90% y se adapta fácilmente a trabajos de campo. Igualmente, la inmunofluorescencia indirecta es utilizada en algunos laboratorios para el diagnóstico y la evaluación de la respuesta terapéutica.

§ Leishmanina: es negativa en los casos de LV activa esta prueba es negativa.

Tratamiento

Después de confirmarse la enfermedad parasitológicamente, o serológicamente, el paciente debe ser estabilizado clínicamente y se procederá a iniciar el tratamiento de elección que es el antimonio de meglumina, fármaco antimonial pentavalente cuyo mecanismo de acción es inhibir la fosfofructoquinasa, bloqueando la producción de ATP (Chong 1996). Estudios de microscopia electrónica de aspirados esplénicos de pacientes con LV sugieren que la droga afecta el transporte activo y/o permeabilidad de la membrana del parásito (Chulay *et al.* 1985).

El antimonio de meglumina se absorbe rápidamente después de la administración por vía intramuscular, alcanzando niveles pico de antimonio aproximadamente a las dos horas (Chulay *et al.* 1998). La concentración máxima en sangre total de antimonio es de 10 a 12 $\mu\text{g/ml}$ después de una dosis IM de 10mg/kg de antimoniales en pacientes con LV. Se acumula gradualmente en el pelo, piel y otros tejidos. Se metaboliza en hígado y el 90% se excreta en orina en 24 horas (Chulay *et al.* 1998; AMA 1991).

La dosis recomendada por la OMS (WHO/1996) es de 20mg/kg/día de antimonio pentavalente vía intramuscular

Los antimoniales están contraindicados en pacientes con hipersensibilidad a los mismos, arritmias cardíacas y enfermedad hepática o renal severa.

Efectos colaterales

-Alteraciones cardiovasculares, tales como aplanamiento de la onda T, prolongación del intervalo QT y arritmias ventriculares. La incidencia de

cambios en el ECG está relacionada con la duración de la terapia y la dosis diaria total de antimonio (Marsden 1986; AMA, 1991; Chulay *et al.* 1988). Cambios menores en el ECG son relativamente frecuentes con dosis de 20 mg/kg/día por 15 días (Marsden 1986). Bradicardia severa, hipotensión y shock han sido observadas en algunos pacientes (Anon. 1986).

-A nivel del sistema nervioso central se ha reportado: cefalea, malestar general (AMA 1991; Convit *et al.* 1989)

- Síntomas gastrointestinales descritos incluyen náuseas, vómitos, anorexia (Chulay *et al.* 1988)

- Insuficiencia renal y proteinuria has sido observados ocasionalmente. Algunos estudios reportan alteraciones en la osmolaridad urinaria por defecto en la capacidad de concentración tubular (Veiga *et al.* 1983, Marsden 1986)

Entre otras alteraciones reportadas encontramos: Elevación de las transaminasas séricas y hepatitis (Marsden 1986), rigidez articular, mialgias y artralgias (AMA 1991; Convit *et al.* 1989), rash cutáneo, edema facial, dermatitis exfoliativa (Marsden 1986; AMA 1991) y dolor en el sitio de la inyección intramuscular.

Hematología completa, pruebas de funcionalismo hepático y renal deben ser monitoreados antes de iniciar el tratamiento, a los 15 días y al finalizar el mismo

Criterios de cura

- Ausencia de la fiebre después de 2 a 3 semanas de finalizado el tratamiento, la desaparición de la misma ocurre tempranamente, alrededor del quinto día de iniciada la terapia.
- Reducción del tamaño alcanzado por el hígado y el bazo; este último ha disminuido el 50% al final del tratamiento.
- Aumento de peso
- Incremento de los valores hematológicos.
- Mejoría del estado general del paciente.

La confirmación parasitológica de curación no es necesaria y debe realizarse cuando se sospeche resistencia al tratamiento o recaída.

La leishmanina se hace positiva en el 80% de los pacientes 12 meses posterior a un tratamiento efectivo.

El seguimiento de los pacientes tratados debe ser hecho al mes de dado de alta y luego a los 3, 6 y 12 meses.

Recaídas

La OMS reporta 5% de recaídas en pacientes inmuno-competentes que hayan recibido tratamiento completo y eficaz. Son más frecuentes los tres primeros meses posteriores al tratamiento. Clínicamente se caracterizan por fiebre, esplenomegalia y pérdida de peso. Es obligatoria la confirmación parasitológica de estos casos y el descarte de la presencia de otras enfermedades infecciosas bacterianas y/o virales.

En el caso de que el paciente no haya recibido la dosis recomendada de antimonio, se debe iniciar un ciclo supervisado de 30 días a la dosis recomendada por la OMS (20 mg/kg/día de antimonio).

Si el paciente es clínicamente refractario al tratamiento supervisado con antimoniales, luego de 2 semanas de iniciada la terapia o si está parasitológicamente positivo al finalizar la misma, debe utilizarse medicamentos de segunda línea, tales como:

Anfotericina B: El mecanismo de acción es a través de enlaces con los esteroides de ergosterol presentes en la membrana plasmática de la *Leishmania*. Su uso en el tratamiento de leishmaniasis visceral es limitado por su alto poder de toxicidad. La vía de administración es endovenosa en dosis inicial de 0,5 mg/kg de peso en solución glucosada al 5% en infusión lenta de 4 a 6 horas. Al cuarto día si la dosis es tolerada se aumenta de 0,5 mg/kg hasta 1 mg/kg/día. La dosis acumulada no debe ser mayor de 2 gramos.

Los efectos colaterales de esta droga son: flebitis, cefalea, fiebre, astenia, dolores musculares y articulares, vómitos, hipotensión, disnea, hipopotasemia, alteraciones renales como disminución de la filtración glomerular

Pentamidina es una diamidina aromática, como mecanismo de acción está descrito la inhibición del ARN polimerasa, función ribosomal, síntesis de proteínas y fosfolípidos parasitarios (Goodman and Gilman 1996). La dosis recomendada es de 2 a 4 mg/kg./día IM en días alternos durante 5

semanas. Los efectos colaterales son: anorexia, astenia, náuseas, dolor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia, pancreatitis que lleva diabetes mellitus.

Paramomicina: Es un aminoglucosido anti-leishmánico que puede actuar de forma sinérgica con los antimoniales pentavalentes (WHO 1996), la dosis sugerida es 15mg/kg/día por 30 días conjuntamente con antimonio de meglumina 20mg/kg/día por el mismo periodo de tiempo. Las inyecciones de estas drogas deben ser separadamente. Los efectos colaterales de la aminosidina incluyen alteraciones renales, por lo que se recomienda realizar mediciones de urea y creatinina antes y durante el tratamiento.

Miltefosine:

Es un fosfolípido alquilado, análogo de la fosfocolina que inhibe las señales transmembranas y la síntesis de la membrana celular; originalmente se desarrolló como droga antineoplásica. Ha sido usada en la India en el tratamiento de leishmaniasis visceral, administrada vía oral a dosis de 100mg/día por 4 semanas en adultos y a dosis de 2,5 mg/kg. en niños, con tasa de curación de 95% y buena tolerancia por parte de los pacientes.(Guerin 2002)

Los efectos colaterales más frecuentemente descritos son gastrointestinales: vómitos y diarreas, elevación de la aspartato amino transferasa. Renales: aumento de la creatinina sérica. También han sido descritos efectos teratogénicos en animales y anomalías oftalmológicas

en roedores posterior al tratamiento con mitelfosine, pero en estudios multicéntricos realizados en la India por Jha *et al.* (2002) no observaron alteraciones oftalmológicas en pacientes tratados con esta droga.

Leishmaniasis visceral y SIDA

El primer caso reportado de asociación entre leishmaniasis visceral y SIDA fue hecho en España (De la Loma 1985), desde entonces esta asociación ha sido ampliamente estudiada. La superposición de estas dos entidades es altamente endémica en países como Brasil, y se ha convertido en un problema de salud pública para la OMS ya que se considera que hasta el 9% de los pacientes con SIDA en el sur de Europa desarrollan LV (Alvar 1996). Otras publicaciones señalan que se han encontrado amastigotes de *Leishmania* hasta en el 17% de pacientes infectados con HIV (Pineda, 1998)

En Venezuela, Loyo *et al.* (2002) describen 4 casos de LV en pacientes con infección por HIV, causadas por *L. braziliensis*, quienes desarrollaron lesiones cutáneas, mucosas y viscerales. *Leishmania* y HIV pueden infectar y multiplicarse en macrófagos, y ambos pueden disregular la respuesta inmune. Recientes estudios indican que la leishmaniasis puede inducir la activación de HIV latente en monocitos y células T. Así mismo, el HIV puede aumentar el crecimiento intracelular de *Leishmania* en los macrófagos (Tumbarello *et al.* 2000).

La destrucción de las células T CD4+ ayudadoras es el punto fundamental en la disminución de la función inmune que ocurre con la progresión de la infección por HIV. Esta condición inmunológica hace al huésped más

susceptible de adquirir infecciones oportunistas fatales. A la inversa, infecciones parasitarias podría influenciar la susceptibilidad para infección por HIV y la progresión de la misma. Esta acotación es sustentada por el hecho de que personas infectadas con HIV en Sub-Sahara África muestran una más rápida progresión de la infección HIV, si se compara con pacientes de otra parte del mundo.

Ambos patógenos, *Leishmania* y HIV, utilizan los mecanismos inmunoreguladores del sistema inmune del huésped, para su propia propagación. La activación inmune crónica e interacciones inmunes mediadas por citocinas inducidas por un patógeno pueden alterar la evolución de la enfermedad en personas concurrentemente infectadas con otro patógeno. Por lo tanto, la co-infección *Leishmania*-HIV puede afectar el curso de una o ambas enfermedades y contribuir con “un círculo vicioso” de multiplicación descontrolada de ambos agentes, profundizando la inmunosupresión y progresión de la enfermedad. De allí la importancia de tomar medidas que limiten la extensión de dichas infecciones (Tumbarello *et al.* 2000), como son el uso de terapia antiretroviral y terapia antileishmánica.

Dentro de las manifestaciones clínicas de la co-infección LV-HIV descritas por Alvar en 1997, encontramos fiebre en el 90% de los pacientes, esplenomegalia en el 73%, leucopenia en el 83%, trombocitopenia 76% y anemia en el 90%.

El diagnóstico de leishmaniasis visceral en pacientes con infección por HIV debe sospecharse en enfermos que habiten en áreas endémicas de

leishmaniasis y establecerse posterior a la demostración del parásito en muestras obtenidas de médula ósea, hígado o bazo, ya que los test serológicos solo son positivos en la mitad de los pacientes con co-infección (Kafetzis 2003).

La droga de primera línea en el tratamiento es el antimonio de meglumine, y solo en casos de contraindicación para su uso, mala respuesta al tratamiento, carga viral muy alta especialmente en pacientes sin terapia antiretroviral, coexistencia con otras infecciones oportunistas como micosis profundas, se debe optar por Anfotericina B a una dosis inicial de 0,5 – 0,7 mg/kg/día, llegando hasta una dosis acumulada de 1500 mg, vigilando la función renal y niveles de electrolitos séricos. Luego se mantendrá un tratamiento profiláctico con Anfotericina B (50 mg VEV semanal). Sin embargo, con respecto a esto último, estudios recientes demuestran la eficacia de altas y activas terapias antiretroviral, sugiriendo la posibilidad de suspender el tratamiento profiláctico y observar a los pacientes (WHO 1996; Tumbarello *et al.* 2000)

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Aguilar CM, Fernández R, Fernández E, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera Z, Souza WJ, Coutinho SG. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998, 93:15-16.
- 2- Alvar EJ. El Protozoo. *Las Leishmaniasis de la Biología al Control*. Junta de Castilla de León 1997:17-31.
- 3- Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Pachón I, Calbacho E, Ramírez M, Valles R, Guillen JL, Cañavate C, Amela C. AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin Dermatol* 1996, 14:541-546.
- 4- Alvar J, *Las Leishmaniasis De la Biología al Control* Laboratorios Intervet S.A Salamanca 2001
- 5- Alvar J, Molina R, Sa Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, Gonzalez F, San Andres MD, Boggio J, Rodriguez F, Sainz A and Escacenas C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 1994, 88:371-378.
- 6- AMA Department of drugs: Drug evaluations Subscription. American Medical Association, Chicago, IL, 1991.
- 7- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998, 59:53-57
- 8- *Bol Epidemiol* 2002, 23:

- 9- Abranches, P, G. Santos-Gomes G *et al.* An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991, 13: 537-550.
- 10- Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo SM. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67:344-348.
- 11- Cairó J. "Aspectos Clínicos de la Leishmaniosis Canina" *Canis et Felis Leishmaniosis*, Oct 1997, 29: 53-63.
- 12- Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, *et al.* Immunotherapy of localized intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989;160:104-115.
- 13- Cunha AM, Chagas E. Nova especie de protozoario do género *Leishmania* patogénico para o homén. *Leishmania chagasi n sp.* Nota previa. *Hospital (Río)* 1937, 43:697-701.
- 14- Chong H. Oriental Sore. A look at trends in and approaches to the treatment of leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1986; 25:615-623.
- 15- Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, 82:69-72.
- 16- Desjeux P Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996,14:417-423.
- 17- Desjeux P The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, 95:239-243.
- 18- Díaz NL, Zerpa O, Sánchez MA, Tapia FJ. Compartmented immunity in dogs infected with *Leishmania chagasi*. Worldleish II Congress, 20-24 mayo del 2001, Crete- Greece.

- 19- Donovan Ch. On the possibility of the occurrence of tripanosomiasis in India. *Br Med J* 1903, 2:79.
- 20- Evans DA, Rebélo ME. Leishmaniose viscerocutánea no cao domestico” Instituto de Proteccao da Producao Agro-Alimentar, Centro Nacional de Proteccao e Controlo Zoo-Sanitário, 1996, 1-65.
- 21- Fang FC. Perspectives series: Host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997, 99: 2818.
- 22- Feliciangeli MD, Rodríguez N, De Guglielmo Z, Rodríguez A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II Vectors and parasites. *Parasite* 1999, 6:113-120.
- 23- Feliciangeli MD, Zerpa O, Rodríguez N, Barvo A, Galindo W, Convit J. Hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Psychodidae) naturalmente infectada con promastigotes en un foco endémico de leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita, Venezuela. *Bol Dir Malariol Saneamiento Amb* 1998,38:73-75.
- 24- Fergin C. Leishmaniasis Visceral. *Tratados de Infecciones en Pediatría*, Tercera Edición Vol II, Interamericana McGraw-Hill, 1996.
- 25- Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. Pentamidina Novena edición Vol II MacGraw-Hill-Interamericana 1996,1062-1064.
- 26- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989, 41:687-725.
- 27- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, et al. Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:494-501.

- 28- Jha TK, Shyam S, Thakur CP, *et al.* Miltefosine, an oral agent, for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *New Engl J Med* 2002, 347:1739-1746.
- 29- Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgraduate Med* 2003, 43:31-38.
- 30- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheux MC, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997, 11:105-111.
- 31- Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I and Richton LA. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986, 80:138-142.
- 32- Lainson R, Ishikawa EA, Silveira FT. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, 96:630-631.
- 33- Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Brit Med. J* 1903, 1:1252-1254.
- 34- Lita G, Davachi F, Sulcebe G, Bregu H, Basha M. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania. *Int J Infect Dis* 2002, 6:66-68.
- 35- Loveran A., Mesnil F. Sur un protozoie nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. Et. Mesn.) Parasite d' une fièvre de l'Inde. *Comp Rend Hébdomadiars de Séances Acad Sci* 1903, 137:957-961.
- 36- Loyo N, Zerpa O, Oliver M, Capozzi V, Arenas A, Rodriguez N, Sarmiento V, Convit J. HIV and leishmaniasis coinfection. *Ann Dermatol Venereol* 2002; 129: 1S810.
- 37- Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C., Amri F., Dellagi K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant

- or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 68:312-320.
- 38- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986, 80:859-976.
- 39- Martínez NA, Pons AR. Primer caso de kala-azar en Venezuela. *Gaceta Med Caracas* 1941, 48:329-332
- 40- Marzal UM, Cabrera M, Díaz N, Sánchez MA, Negrón E, Zerpa O, Convit J, Tapia FJ. Concentración de nitritos derivados del óxido nítrico en perros con infección natural por *L.infantum*/*L. chagasi*.” *Acta cient Ven* 2002, 53:123.
- 41- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000, 16: 188-189.
- 42- Mazzarri MB, Feliciangeli MD, Maroli M, Hernandez A and Bravo A. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J Am Mosquito Control Assoc* 1997, 13:335-341.
- 43- Migone LE. Un caso de Kala-azar a Asunción (Paraguay) *Bull Soc Pathol Exot. Et des ces Filiales* 1913, 6:118-120.
- 44- Momen H, Grimaldi G Jr., Deane, LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987, 82:447-448.
- 45- Moreno J and Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002, 18:399-405.
- 46- Moreno J, Nieto J *et al*. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 1999, 71:81-95.

- 47- Neves J. Recentes progressos e necessidades de pesquisa na leishmaniose visceral Americana (calazar). Presentado en XI Congreso Soc Bras Med Trop, Río de Janeiro, 1975.
- 48- Noli C. Leishmaniosis Canina. *Waltham Focus* 1999, 9:16-24.
- 49- OMS. Control of the Leishmaniasis. Technical Report Series 793. Geneva (1990):25.
- 50- Pineda JA, Gallardo JA, Macías J, Delgado J, Regordan C, Morillas F, Relimpio F, Martin Santiz J, Sanchez Quijano A, Leal M, and Lissen E. Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-infected patients in southern Spain. *J Clin Microbiol* 1998, 36:2419-2422..
- 51- PiReed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996, 14:471-478.
- 52- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994, 32:2246-2252.
- 53- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J* 1903, 2:1261
- 54- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral Miltefosine for Indian visceral leishmaniasis, *N Engl J Med* 2002, 28;347:1739-1746.
- 55- Torrealba JW, Amaral ADF, Henríquez CE, Kowalenko W, Barrios PA. Observaciones iniciales sobre el perro (*Canis familiaris*) como reservorio de kala-azar en Venezuela. *Rev Ven San Asistencia Soc* 1961, 26:342-349.

- 56- Troiani M, Ludovisi A, Gramiccia M. Genetic polymorphism of *Leishmania infantum* from HIV positive patients in Italy: an update. Italian Section Society of Protozoologists 19th Annual meeting, 1998 (Resumen en *J Eukaryotic Microbiol*)
- 57- Tumbarello M, Tacconelli E, Bertagnolio S, Cauda R. Highly active antiretroviral therapy decreases the incidence of visceral leishmaniasis in HIV infected individuals. *AIDS* 2000, 14:2948-2949.
- 58- Veiga JPR, Wolff ER, Sampio RN *et al.* Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet* 1983, 2:569.
- 59- Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Pronostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection* 2003, 31:174-177.
- 60- Wyler DJ. Leishmaniasis *Nelson Tratado de Pediatría Vol I, Decimacuarta Edición, Interamericana McGraw-Hill* 1992.
- 61- Zerpa O, Pratlong F, Ulrich M, Convit J. Isolation of *Leishmania infantum*, zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, 96:901-902.
- 62- Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodriguez V, Centeno M, Negrón E, Belizario D, Convit J. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2003, 13:239-245
- 63- Zerpa O, Ulrich M, Negrón E, Rodriguez N, Centeno M, Rodriguez V, Barrios RM, Belizario D, Reed S, Convit J. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94:484-487.

- 64- Zijlstra EE, el-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, 95(Sup1):27-58.
- 65- Zijlstra EE, el-Hassan AM, Ismael A, Ghalib HW. Endemic kala-azar in Eastern Sudan: A longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 51:826-836.
- 66- Zulueta AM., Villarroel E, Rodríguez N, Feliciangeli MD, Massarri M, Reyes O, Rodríguez V, Centeno M, Barrios RM, Ulrich M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:945-950.