

Rassegna

Review

La leishmaniosi viscerale in età pediatrica

Childhood Mediterranean visceral leishmaniasis

Antonio Cascio, Claudia Colomba¹

AILMI (Associazione Italiana per la Lotta contro le Malattie Infettive)

c/o Scuola di Specializzazione in Malattie Infettive, Università di Messina;

¹Istituto di Patologia Infettiva e Virologia, Università degli Studi di Palermo

INTRODUZIONE

Le leishmaniosi sono parassitosi causate da protozoi del genere *Leishmania*, appartenente alla famiglia *Tripanosomatidae*, ospiti di diversi animali selvatici e domestici e occasionalmente trasmessi all'uomo da insetti vettori del genere *Phlebotomus*. In base alle manifestazioni cliniche della malattia nell'uomo, frutto delle complesse interazioni che si stabiliscono tra il parassita e la risposta immune dell'ospite, le infezioni da *Leishmania* si classificano in: viscerali (tra le quali si distinguono la forma mediterranea, praticamente sovrapponibile dal punto di vista clinico a quella presente in Cina e in sud-America; la forma indiana o Kala-azar e il Kala-azar africano), cutanee (bottone d'oriente urbano, bottone d'oriente rurale e leishmaniosi cutanea diffusa nel Vecchio Mondo) e muco-cutanee.

La leishmaniosi viscerale (LV) del Mediterraneo, endemica appunto nei paesi del bacino del Mediterraneo, colpisce soprattutto le zone costiere europee (Spagna, Italia, Francia, Grecia), nord-africane (Algeria, Marocco, Tunisia) e medio-orientali (Turchia, Libano, Libia); *Leishmania infantum* (zimodema MON 1) è la specie responsabile e il cane ne è il principale serbatoio. In Italia, le regioni più colpite sono la Campania, la Sicilia e il versante tirrenico della penisola.

Secondo quanto riportato dal Centro di riferimento per la sorveglianza attiva dei casi di LV, istituito nel 1987 in Sicilia presso l'Istituto di Patologia infettiva e virologia dell'Università di Palermo, a partire dal 1991 in Sicilia si è registrato un incremento del numero dei casi (nel periodo di osservazione 1987-1995 l'incidenza è stata di 6 casi per 1.000.000 abitanti). Le caratte-

ristiche epidemiologiche relative all'età dei soggetti colpiti dalla malattia sono mutate in Sicilia così come negli altri paesi europei dove negli anni, in seguito anche alla comparsa dell'infezione da HIV, si è registrato un progressivo incremento del numero dei casi nell'adulto sino al raggiungimento di un rapporto casi pediatrici/casi adulti di 1:1, rapporto che invece si mantiene ancora a favore dei primi (pari al 90% dei casi totali) nelle coste africane e a Malta [1, 2]. Nell'ambito dei casi di LV pediatrici la fascia d'età che appare più colpita è quella < 5 anni: tre recenti studi pediatrici retrospettivi condotti in Francia, Spagna e Italia indicano un'età mediana dei pazienti studiati < 3 anni [3-5].

QUADRO CLINICO DELLA LV NEL BAMBINO

La LV in età pediatrica rappresenta, ancor più che nell'età adulta per un problema di relativa e fisiologica immaturità del sistema immune cellulo-mediato, principale effettore della risposta immune all'infezione, una patologia grave che se non adeguatamente trattata porta progressivamente a morte.

Il periodo di incubazione della malattia, corrispondente alla fase di moltiplicazione del protozoo al livello cutaneo, sottocutaneo e alla successiva visceralizzazione, dura da alcune settimane a qualche mese; decorre in modo asintomatico e anche la piccola lesione cutanea corrispondente al sito di inoculo del parassita dopo puntura dell'insetto vettore passa di solito inosservata. La malattia clinicamente evidente ha inizio con l'invasione parassitemica del sistema reticolo-istiocitario.

L'esordio clinico è in genere subdolo caratterizzato da iporessia, rallentamento della crescita nei bambini più piccoli e febbre a carattere irregolare (nei primi 10-15 giorni possono registrarsi modesti rialzi termici di breve durata alternati a giorni di completa apiressia); dopo questa fase prodromica la febbre si fa più elevata (> 39 °C) e assume carattere continuo-remittente. Il pallore cutaneo è il primo segno clinico riferito dai familiari del piccolo al medico e l'epatosplenomegalia il reperto obiettivo di maggiore rilievo riscontrato all'esame obiettivo. Caratteristica è la consistenza duro-ligneo della milza che, notevolmente aumentata di vo-

lume, resta mobile, a superficie liscia e indolente. L'interessamento dei linfonodi superficiali nella LV del Mediterraneo è raro e la linfadenopatia, reperto clinico di frequente riscontro nei casi africani (Sudan 84%) [6, 7], descritta anche nelle casistiche pediatriche riportate da Spagnoli e Francesi [3, 4], non è stata riscontrata nei casi italiani [5].

Seppur raramente e solo se oculatamente ricercata all'inizio del periodo prodromico è possibile il riscontro di una piccola lesione cutanea di tipo maculo-papuloso, tipo semplice puntura d'insetto, non dolente corrispondente al sito di inoculo della leishmania che successivamente

Tabella 1 - Caratteristiche delle quattro forme di leishmaniosi viscerale osservate in tutto il mondo in pazienti immunocompetenti [5].

| Caratteristiche epidemiologiche | LV del Mediterraneo | LV Americana | Kala-azar | Kala-azar africano |
|---------------------------------|--|---|---|--|
| Distribuzione geografica | Bacino del Mediterraneo | Brasile (nord-est), America centrale | India, Pakistan, Nepal, Cina (nord e sud) | Sudan, Kenya, Corno d'Africa |
| Epidemiologia | endemica | endemica | endemica/epidemica | endemica/epidemica |
| Ciclo | Atropozoonosi | Atropozoonosi | Antroponosi | Atropozoonosi/antroponosi ? |
| Serbatoio | Cane, volpe, sciacalli | Cane, volpe, opossum | Uomo | Roditori?, Cani?, uomo? |
| <i>Leishmania</i> (specie) | <i>Leishmania donovani infantum</i> | <i>Leishmania donovani chagasi*</i> | <i>Leishmania donovani donovani</i> | <i>Leishmania donovani donovani</i> |
| Vettore e habitat naturale | <i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> Domestico | <i>Lutzomyia longipalpis</i> Rurale, peridomestico | <i>P. argentipes</i> Rurale | <i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i> Rurale |
| Rapporto maschio /femmina | 1:1 | maschi > femmine | 6:1 | ? |
| Età | <5 anni | bambini | Giovani adulti | Giovani adulti |
| <i>Manifestazioni cliniche</i> | | | | |
| Febbre | 95-100% | 95-100% | 95-100% | 95-100% |
| Splenomegalia | 95-100% | 95-100% | 95-100% | 95-100% |
| Epatomegalia | ~70% | ~70% | ~75% | ~75% |
| Iperpigmentazione cutanea | no | no | 70% | yes |
| Linfadenopatia | 0-39% | ? | 5% | 84% |
| Lesioni dermiche Post-kala-azar | no | no | 6-20% < 2 anni > 20 anni | 2-5% subito dopo il trattamento |
| Resistenza agli antimoniali | rara | rara | frequente | frequente |

**L. donovani chagasi* e *L. donovani infantum* sono identiche dal punto di vista genetico e biochimico; le uniche differenze tra la LV mediterranea e quella americana sono relative all'habitat e alle caratteristiche del vettore.

Tabella 2 - Caratteristiche cliniche ed esami di laboratorio di 111 bambini affetti da LV del Mediterraneo ricoverati presso l'Ospedale dei bambini di Palermo nel ventennio 1980-2000 [5].

| Variabili cliniche | N. casi e (%) o mediana e (range) |
|--|-----------------------------------|
| Durata mediana della malattia prima del ricovero | 15 giorni (2 giorni- 7 mesi) |
| Febbre | 111 (100%) |
| Splenomegalia | 111 (100%) |
| Epatomegalia | 91 (101%) |
| Lesioni cutanee | 2 |
| Linfoadenopatia | 0 |
| Emoglobina g/dl mediana | 7,8 (3,8-12,7) |
| Globuli bianchi x 10 ³ /μl | 4,3 (1,6-10,9) |
| Neutrofilii x 10 ³ /μl | 1 (0,2-3,7) |
| Piastrine x 10 ³ /μl | 110 (12-362) |
| Velocità di eritrosedimentazione mm/hr | 73 (9-138) |
| Proteina C reattiva mg/100ml | 2.3 (0,3-18.2) |
| Proteine totali g/dl | 7.3 (4,5-10,4) |
| Albumina g/dl | 3,3 (1,4-5,3) |
| Gammaglobuline g/dl | 2.3 (0,6-6,6) |
| Aspartato aminotransferasi IU/l | 53 (19-847) |
| Alanina aminotransferasi IU/l | 33 (8-497) |

visceralizza; tale lesione, descritta solo da altri due autori [8, 9] oltre che in due pazienti della nostra casistica [5], va distinta da quella che caratterizza la leishmaniosi cutanea (bottone d'oriente varietà secca) endemica nella nostra area geografica e causata da zimodermi dermotropi di *Leishmania infantum* [10].

È evidente che la LV del Mediterraneo nel bambino, così come nell'adulto, si differenzia dalle forme contratte in altre aree geografiche oltre che per la specie di *Leishmania* coinvolta anche per la presentazione clinica (assenza di iperpigmentazione cutanea e di lesioni dermiche post-kala-azar); il termine kala-azar, adoperato per indicare la LV indiana, non deve essere quindi confuso ed erroneamente impiegato nei casi di LV contratta nel bacino del Mediterraneo (Tabella 1). Gli esami di laboratorio non microbiologici (esame emocromo-citometrico, VES, PCR) nella LV sono di notevole ausilio e di supporto all'ipotesi diagnostica formulata sulla base dei dati clinici ed epidemiologici. L'anemia normocromica-normocitica, principalmente legata all'eritropoiesi inefficace conseguente all'infarimento midollare da parte delle leishmanie, è solo in parte dovuta al sequestro splenico da

iperplasia macrofagica e ad una lisi su base immunitaria; anche la leucopenia e la trombocitopenia hanno la suddetta genesi. Gli indici di flogosi sono sempre elevati e tipico è il tracciato elettroforetico delle proteine sieriche che mostra un incremento delle proteine totali con riduzione marcata dell'albumina e un incremento spiccato a banda larga delle gamma-globuline.

Nella tabella 2 sono indicate le caratteristiche cliniche e gli esami di laboratorio di 111 bambini con leishmaniosi viscerale ricoverati presso l'Ospedale G. Di Cristina di Palermo nel ventennio 1980-2000 [5].

■ DIAGNOSI

La diagnosi clinica di LV in età pediatrica si fonda sul riscontro della peculiare triade sintomatologica rappresentata da febbre persistente, pallore ingravescente e splenomegalia. Patologie non infettive che più spesso entrano in diagnosi differenziale con la LV nel bambino sono quelle onco-ematologiche e conferma ne è il frequente primo ricovero di questi piccoli pazienti nei reparti di ematologia.

Tabella 3 - Procedure diagnostiche effettuate su 10 bambini affetti da LV ricoverati presso l'Istituto di Patologia infettiva e virologia nel periodo novembre 1999-novembre 2000 [18].

| Paziente numero | Microscopia (midollo) | Coltura | PCR-IFI- <i>Leishmania</i> | PCR- <i>leishmania</i> (sangue periferico) | <i>leishmania</i> (midollo) | PCR-RFLP | <i>Leishmania</i> zimodema |
|-----------------|-----------------------|----------|----------------------------|--|-----------------------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | positivo | positiva | 1:320 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 2 | positivo | ND | 1:80 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | ND |
| 3 | positivo | Positiva | 1:320 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 4 | positivo | Positiva | 1:320 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 5 | positivo | Positiva | 1:160 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 6 | positivo | ND | 1:320 | positiva | ND | <i>L.infantum</i> | ND |
| 7 | positivo | Positiva | 1:160 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 8 | positivo | Positiva | 1:1280 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 9 | positivo | Positiva | 1:1280 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |
| 10 | positivo | Positiva | 1:320 | positiva | positiva | <i>L.infantum</i> | <i>L.infantum</i> (MON 1) |

La diagnosi di laboratorio della LV si avvale in primo luogo della ricerca sierologica di anticorpi anti-*Leishmania spp.* mediante diverse metodiche (test immunoenzimatici, test di agglutinazione diretta, reazioni di immunofluorescenza ecc.), quella di immunofluorescenza indiretta, impiegata routinariamente, ha elevata sensibilità e specificità (90-95%) [11]; la ricerca diretta del parassita mediante osservazione microscopica dopo colorazione panottica del tessuto midollare prelevato in genere mediante puntato sternale (nei più piccoli) o puntura della cresta iliaca (nei più grandi), consente l'identificazione dei parassiti isolati o più spesso disposti in ammassi sia extra che intracellulari. L'aspirato midollare anche se meno sensibile della puntura splenica è da preferire perché più sicuro e meno rischioso [12]. La coltura dell'aspirato midollare negli appositi terreni (terreno NNN, Tobie, EMTM, Schneider) oltre ad aumentare la sensibilità diagnostica consente anche di effettuare l'identificazione di specie mediante analisi isoenzimatica degli isolati, impiego di anticorpi monoclonali specifici e sonde di DNA.

La reazione polimerasica a catena (PCR) eseguita in laboratori specializzati su campioni di midollo osseo, sangue periferico e aspirati linfonodali è sempre più diffusamente impiegata quale metodica rapida, sensibile e specifica per la diagnosi di LV nei pazienti immunocompromessi [13-16]; il suo impiego su midollo osseo e sangue periferico di pazienti pediatrici

immunocompetenti affetti da LV è riportato in letteratura da diversi autori che hanno ottenuto risultati incoraggianti [3, 14, 17]. Da uno studio da noi condotto in collaborazione con il laboratorio dell'Istituto di Malattie infettive e tropicali dell'Ospedale L. Sacco, Università di Milano, su 10 bambini immunocompetenti ricoverati presso l'Istituto di Patologia infettiva e virologia dell'Università di Palermo per LV, è stata confermata la validità della PCR su sangue periferico quale metodica in grado di sostituire i metodi invasivi (aspirato midollare) nella diagnosi di LV e nel follow-up ai fini di una valutazione della guarigione parassitologica in età pediatrica; in tabella 3 sono riassunti i risultati delle procedure diagnostiche effettuate sui predetti bambini [18].

■ TERAPIA

Sin dal 1940 i composti di antimonio pentavalente, l'antimoniato di n-metilglucamina (Glucantim), lo stibiogluconato di sodio (Pentostam), hanno costituito le strade maestre della terapia anti-leishmania in tutto il mondo. La dose giornaliera di antimonio base (Sb) raccomandata nel 1990 dall'OMS è stata di 20 mg/Kg/die corrispondenti a 60 mg/Kg/die di antimoniato di n-metilglucamina (sino ad un massimo di 850 mg/die) per almeno 20 giorni [19]; successivamente la durata della terapia è stata protratta a 28-30 giorni e la dose massima

giornaliera abolita per evitare sottodosaggi in soggetti con peso > 42 Kg [20]. Sebbene non sia possibile confrontare i diversi regimi terapeutici per possibili bias di selezione, secondo la nostra esperienza lo schema terapeutico che prevede la somministrazione di antimonio di n-metilglucamina per 21 giorni alla dose di 560 mg/m²/die (Sb^v) (22.4-26.6 mg/Kg/die), con un incremento graduale della dose giornaliera nei primi 3-4 giorni di terapia, è efficace tanto quanto lo schema proposto dall'OMS [19].

La resistenza agli antimoniali, ampiamente documentata in India e Sudan [21], non sembra essere ad oggi un problema presente nella nostra area geografica anche se nella casistica pediatrica da noi riportata abbiamo osservato 2 ricadute dopo terapia con Glucantim [5].

La somministrazione parenterale, la lunga durata della terapia, e i possibili effetti tossici (soprattutto al livello cardiaco, renale e pancreatico) sono gli aspetti svantaggiosi della pur sempre efficace terapia con antimonio di n-metilglucamina.

L'amfotericina B liposomiale (AmBisome), rappresenta oggi una valida alternativa al Glucantim nella terapia della LV; in base ai risultati di numerosi studi può essere usato con successo nel bambino immunocompetente alla dose di 3 mg/Kg/die per 6 giorni (1 dose al giorno per i primi 5 giorni e un'ultima dose in 10° giornata) [22-24].

Grazie alla più breve durata del trattamento e alla conseguente riduzione del periodo di degenza in ospedale, questo farmaco, nonostante il suo costo elevato risulta essere più conveniente non solo in termini economici ma anche perché riduce il rischio di infezioni nosocomiali. Per questi vantaggi, secondo il nostro parere, l'AmBisome è candidato a diventare farmaco di prima scelta nella terapia della LV in età pediatrica nei Paesi industrializzati del Mediterraneo.

Key words: visceral leishmaniasis, children, *Leishmania infantum*.

RIASSUNTO

La leishmaniosi viscerale (LV), endemica nelle zone costiere dei Paesi del bacino del Mediterraneo (Spagna, Italia, Francia, Grecia, Marocco, Tunisia), è causata da *L. infantum* e trasmessa all'uomo da un dittero ematofago appartenente al genere *Phlebotomus*; il cane è il principale serbatoio dell'infezione.

La malattia, in passato più frequente in età pediatrica, ha oggi in Italia e negli altri paesi industrializzati del Mediterraneo una pressoché uguale incidenza nell'adulto e nel bambino. La malattia, in genere ad esordio subdolo, è caratterizzata dalla triade sintomatologica febbre, pallore e splenomegalia.

Gli esami ematochimici mostrano nella quasi totalità dei casi pancitopenia e la diagnosi di laboratorio si avvale di metodiche sierologiche (ricerca di anticorpi anti-leishmania mediante immunofluorescenza indiretta, test

immunoenzimatico, test di emoagglutinazione indiretta) e metodiche dirette (identificazione del parassita mediante esame microscopico, isolamento colturale e polymerase chain reaction (PCR) su midollo); la PCR eseguita su sangue periferico di bambini immunocompetenti affetti da LV si è dimostrata una tecnica altamente sensibile e per questo potenzialmente in grado di sostituire le metodiche dirette su aspirato midollare, invasive per il bambino e difficili da accettare specie nel follow-up ai fini di una valutazione della guarigione parassitologica dalla malattia. La terapia che fino ad oggi si è fondata, sull'impiego di sali di n-metilglucamina (Glucantim), in Italia e negli altri paesi industrializzati si avvale principalmente sull'utilizzo dell'amfotericina B liposomiale (AmBisome).

SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in areas bordering the Mediterranean Sea (Spain, Italy, France, Greece, Morocco, Tunisia) where it is

caused by Leishmania infantum and it is transmitted by the bite of hematophagous sandfly belonging to Phlebotomus spp.; dog constitutes the

main reservoir of the infection. In comparison with the past, when VL was typically observed more frequently in children, the current ratio of childhood to adult cases is approximately 1:1. The onset of the disease is characterized by a non-specific initial symptomatology; fever, pallor and splenomegaly are always present. Pancytopenia is present very often; the laboratory diagnosis is established by serological tests (indirect fluorescent-antibody assay, immunoassay test, indirect hemagglutination

assay) and by demonstration of *Leishmania parasites* by microscopy, culture or polymerase chain reaction (PCR) in the bone marrow aspirates. The use of PCR performed on peripheral blood has been reported to be highly sensitive for the diagnosis and the follow up of children with VL. Pentavalent antimonial drugs have been used for many decades as standard treatment for VL; in Italy liposomal amphotericin B (AmBisome) is nowadays considered the first-line treatment for VL.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Cascio A., Gradoni L., Scarlata F. et al. Epidemiologic surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 75-78, 1997.
- [2] Gradoni L., Bryceson A., Desjeux P. Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bull. World Health Organ.* 73, 191-197, 1995.
- [3] Minodier P., Piarroux R., Garnier J.M., et al. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17, 701-704, 1998.
- [4] Maltezou H.C., Sifas C., Mavrikou M., et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin. Infect. Dis.* 31, 1139-43, 2000.
- [5] Cascio A., Colomba C., Antinori S. Pediatric visceral leishmaniasis in western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 277-282, 2002.
- [6] Perea W.A., Ancelle T., Moren A., et al. Visceral leishmaniasis in southern Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 48-53, 1991.
- [7] Zijlstra E.E., Siddig Ali M., el-Hassan A.M., et al. Clinical aspects of kala-azar in children from the Sudan: a comparison with the disease in adults. *J. Trop. Pediatr.* 38, 17-21, 1992.
- [8] Schilirò G., Russo A., Musumeci S., et al. Visceral leishmaniasis following a skin lesion in a six-year-old Sicilian girl. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 656-657, 1978.
- [9] Pampiglione S. Leishmaniosi cutanea seguita da kala-azar in adulto in provincia di Teramo (Abruzzo). *Parassitologia* 13, 231-239, 1971.
- [10] Gramiccia M., Gradoni L., Angelici M.C. Epidemiology of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*: isoenzyme and kDNA analysis for the identification of parasites from man, vectors and reservoirs. In *Leishmaniasis* (Hart DT ed), 21-37, 1989.
- [11] Jamshaid I., Parsotam R.H., Saroj G., et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J. Clin. Microbiol.* 40, 475-479, 2002.
- [12] Pearson R.D., Sousa A.Q., Jeronimo M.B. Leishmania Species: visceral (kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell G.L., Bennet J.E., Dolin R., Editors. Principles and practice of infectious diseases 5th ed. Philadelphia, 2831-2845, 2000.
- [13] Piarroux R., Gambarelli F., Dumon H., et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 32, 746-749, 1994.
- [14] Lachaud L., Dereure J., Chabbert E., et al. Optimized PCR using patient blood for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 236-240, 2000.
- [15] Pizzuto M., Piazza M., Senese D., et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 39, 357-361, 2001.
- [16] Costa J.M., Durand R., Deniau M., et al. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1831-1833, 1996.
- [17] Katamura K., Kawazu SI, Naya T., et al. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2173-2177, 1998.
- [18] Cascio A., Calattini S., Colomba C., et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and program of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics*, 109, 2002.
- [19] World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Technical Report Series No.9793. Geneva: WHO, 1990.
- [20] Herwaldt B.L., Berman J.D. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 296-306, 1992.
- [21] Murray H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int. J. Infect. Dis.* 4, 158-177, 2000.
- [22] Davidson R.N., di Martino L., Gradoni L., et al. Liposomal amphotericin b (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multicentre trial. *Q. J. Med.* 87,75-81, 1994.
- [23] Davidson R.N., di Martino L., Gradoni L., et al. Short course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin-b (AmBisome). *Clin. Infect. Dis.* 22, 938-943, 1996.
- [24] di Martino L., Davidson R.N., Giacchino R., et al. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin-b. *J. Pediatr.* 131, 271-277, 1997.