

POKROK V LÉČBĚ VISCERÁLNÍ LEISHMANIÓZY

Vladimír Mihál¹, Dagmar Pospíšilová¹, Martina Suková², Jan Starý²

¹Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc

²Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Leishmanióza, parazitární onemocnění přenášené sáním krve některých druhů hmyzu rodu *Phlebotomus*, postihuje různé věkové skupiny v závislosti na druhu *Leishmania spp.*, geografické lokalitě, rezervoáru nemoci a imunokompetenci hostitele. Viscerální leishmanióza je nejtěžší forma nemoci, která, není-li léčena, ohrožuje život. Rozsah a projev onemocnění závisí na několika faktorech, mezi které zahrnujeme protilátkovou a na buňky vázanou imunitní odpověď hostitele, virulenci infikujících druhů a velikost parazitární nálože. Intermitentní horečka, splenomegalie, hepatomegalie, zvětšení lymfatických uzlin, trombocytopenie, rychlý úbytek tělesné hmotnosti, anémie, leukopenie a hypergamaglobulinemie jsou nejčastější příznaky viscerální leishmaniózy. Autoři popisují dvě děti s viscerální leishmaniózou diagnostikovanou v České republice. Obě děti byly infikovány v oblasti Středoziemního moře několik měsíců před prvními klinickými projevy onemocnění.

Klíčová slova: viscerální leishmanióza, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, oblast Středoziemního moře, horečka neznámého původu, splenomegalie, lipozomální amfotericin B.

VISCERAL LEISHMANIASIS TREATMENT PROGRESS

Leishmaniasis, a parasitic disease transmitted by the suction of blood of some species of sandflies, affects various age groups depending on the infecting *Leishmania* species, geographic location, disease reservoir, and host immunocompetence. Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease which, if left untreated, could have a life-threatening course. The extent and presentation of the disease depend on several factors, including the humoral and cell-mediated immune response of the host, the virulence of the infecting species, and the parasite burden. Intermittent fever, splenomegaly, hepatomegaly, lymph node enlargement, thrombocytopaenia, rapid weight loss, anaemia, leukopaenia and hypergamaglobulinaemia are the most common findings of visceral leishmaniasis. The authors describe two cases of paediatric visceral leishmaniasis diagnosed in the Czech Republic. Both children were infected in Mediterranean countries several months before clinical presentation.

Key words: visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, Mediterranean area, fever of unknown origin, splenomegaly, liposomal amphotericin B.

Historie

Zobrazení kožních vředů a deformit tváře, které bylo objeveno na keramických výrobkách z období před Inků v Peru a Ekvádoru, se datuje do prvního století před Kristem. Je evidentní, že některé formy leishmaniózy existovaly již v této době. Písemnosti z období Inků z 15. a 16. století, ale i z doby španělské kolonizace, se zmiňují o riziku sezónních zemědělců, vracejících se z And s kožními vředy. Onemocnění bylo označováno jako „nemoc údolí“ nebo „Andská nemoc“. Později zohyždění nosu a úst, nápadně podobné lézím zapříčiněným leprou mělo vliv na nové označení choroby „bílá lepra“. Starověký indický lékař použil pro nemoc sanskrtský název kala-azar (černá horečka), který byl později nazván viscerální leishmanióza (VL). V roce 1901 Leishman identifikoval určité organizmy v nátěrech ze sleziny pacientů, kteří zemřeli na horečku „dum-dum“. V té době Dum-dum, město nedaleko Kalkaty, bylo považováno za obzvlášť nebezpečné. Onemocnění bylo charakterizováno celkovou vyčerpaností, nepravidelnými a opakujícími se záchvaty horečky, těžkou anémií, atrofií svalstva a nadměrným zvětšením sleziny. Původně byly tyto organizmy považovány

za trypanozomy, ale v roce 1903 je kapitán Donovan definoval jako nové organizmy. Spojitost mezi novými organizmy a kala azar byla nakonec popsána majorem Rossem, který nový organizmus pojmenoval jako **Leishmania donovani**.

I když i kožní forma leishmaniózy mohla být objevena před spoustou let, jeden z prvních klinických popisů podal v roce 1756 Alexander Russell po provedení vyšetření tureckého pacienta. Nemoc, která byla tehdy známá pod pojmem „Aleppo boil“, byla popsána velmi přesně: „Po ní dochází ke zjizvení, zanechává ošklivé jizvy, které zůstávají po celý život a mnoho měsíců mají lividní zbarvení. Když nejsou podrážděné, zřídka způsobují bolest.“

Leishmaniózy postihují nejchudší země světa, kde se předpokládá, že až 80% lidí vydělává dva dolary denně. Onemocnění se vyskytuje v tropickém, subtropickém a částečně i mírném pásmu, s výjimkou Austrálie a Oceánie. Ročně je zaznamenáno 1,5–2 miliony případů (oficiálně je deklarováno pouze 600 000) v 88 zemích světa pěti kontinentů (72 z nich můžeme zařadit mezi rozvíjející se krajiny), kde má nemoc endemický charakter (obrázek 2). Na celém světě je celkem ohroženo

350 milionů lidí. Smrtelné epidemie leishmaniózy propukají periodicky. Například v roce 1990 protřpěl Súdán kritickou situací s nadměrnou mortalitou (100 000 úmrtí z 300 000 ohrožených lidí). Epidemie se objevily i v jiných endemických oblastech (východoindický stát Bihar, Afghánistán). 90% viscerálních forem je pozorováno v Bangladéši, Brazílii, Indii a v Súdánu. 90% mukokutánních leishmanióz je diagnostikováno v Bolívii, Brazílii a Peru a 90% kožních forem onemocnění v Afghánistánu, Brazílii, Íránu, Peru, Saudské Arábii a Sýrii. V posledních deseti letech je v endemických oblastech pozorován výrazný nárůst prevalence. Leishmanióza se šíří v mnoha oblastech světa, kde se počty viscerální formy onemocnění překrývají s onemocněním AIDS. Až v 33 zemích světa byla leishmanióza zaznamenána u pacientů s AIDS jako oportunní infekce. Koincidence infekce HIV a VL jako oportunní nákazy je často popisována z endemických oblastí jižní Evropy, kde je 25–70% dospělých pacientů s VL infikovaných HIV. Odhaduje se, že až u 1,5–9% pacientů s HIV se vyvine leishmanióza. WHO byla nucena v této oblasti zavést zvýšený dohled. Přibližně polovina pacientů s VL jsou děti.

Protozoonóza, kterou způsobuje rod *Leishmania* se přenáší při sání krve drobným (2–3 mm) dvoukřídlým hmyzem *Phlebotomus* species (Asie, Afrika, Evropa) a *Lutzomyia longipalpis* (Mexiko, Stř. a Již. Amerika). K nákaze dochází jak při sání krve, tak ještě před ním při tzv. probingu, kdy během snahy o nalezení krevní kapiláry vypouští hmyz do kůže spolu s malým množstvím slin i infekční stadia leishmanií. Celkem bylo popsáno kolem 500 známých druhů flebotomů, ale pouze 30 z nich bylo pozitivně identifikováno jako možný vektor onemocnění. Rezervoárem nákazy jsou psovité šelmy a hlodavci. Leishmanie-ničivka (existuje 20 patogenních druhů a řada poddruhů) způsobuje systémové tzv. viscerální formy (VL), kožní a mukokutánní formy. Extrémně vzácný, ale možný, je kongenitální přenos (40). Převážně v endemických oblastech zapříčiňuje onemocnění ročně invaliditu až u 2,4 milionů lidí a až u 59 tisíc lidí je příčinou smrti.

Viscerální leishmanióza

Klinicky se VL může prezentovat jako infekce (symptomatická forma), onemocnění s několika příznaky (oligosymptomatická nebo subklinická forma) nebo onemocnění s bujnou (plně rozvinutou) manifestací (klasická nebo akutní forma). Po inokulaci promastigotních forem hmyzem-vektorem do kůže dochází ke komplexní interakci mezi parazitem a imunitním systémem hostitele, která se výrazně podílí

na klinické prezentaci VL (obrázek 1). Faktory, které se v tomto procesu uplatňují nejsou dnes ještě dostatečně rozpoznány, je však známo, že leishmaniová-specifická buněčná odpověď se významně podílí na výsledku probíhající infekce. Dnes víme, že *Leishmania* spp. je obligátně intracelulární parazit makrofágů a že specifická imunita u VL je řízená CD4+ T pomocnými (Th) buňkami a že zvýšená vnímavost k nemoci je spojená s neschopností produkovat profil cytokinů stimulujících makrofágy (Th1 profil), do kterého zahrnujeme interferon gama (IFN- γ), IL-2 a IL-12. Na druhé straně, v průběhu leishmaniózy pozorujeme zvýšenou produkci imunosupresivních cytokinů IL-4 a IL-10 (Th2 profil) a zvýšenou hladinu TNF α . Carvalho a spol. (21) popsali u oligosymptomatických forem VL, které se hojily spontánně, vysoké hladiny IFN- γ , což podpořilo názor, že rezistence k infekci je v přímém vztahu k účinné Th1 odpovědi. Na základě imunologických studií lze konstatovat, že rezistentní formu VL (symptomatickou) výrazně ovlivňuje Th1 cytokinový profil a že zvýšenou vnímavost k leishmaniím naopak determinuje Th2 profil. IL-4 hraje velmi významnou roli při progresi infekce do nemoci, ale uplatňuje se i při snížení regulace IFN- γ (25).

Většina VL je **asymptomatická** nebo se projevuje mírnými a často přechodnými příznaky, jakými jsou průjem, suchý kašel, adynamie, zvýšená teplota remitentního i intermitentního

typu, pocení a diskrétní hepatosplenomegalie. Tato mírná nebo přechodná forma onemocnění se ale může vyvinout do klasického obrazu VL.

Začátek **klasické formy VL** bývá většinou záluďný, rafinovaný a zejména v oblastech, kde se infekce běžně nevyskytuje, může být tato možnost horečky neznámého původu při diferenční diagnostice opomenuta. V klinickém obraze klasické formy VL dominuje bifazický charakter horečky (synonymum onemocnění), progredující splenomegalie (další synonymum onemocnění), hepatomegalie, generalizovaná lymfadenopatie, bolest a distenze břicha, průjem, rychlý pokles tělesné hmotnosti. Převládající hematologické znaky VL jsou mírná trombocytopenie, leukopenie s neutropenií, eosinofilie, lymfocytóza a monocytóza. Byl popsán i ojedinělý případ imunitní hemolytické anémie u batolete s VL (38). U neléčených případů dochází ke krvácivým projevům, pancytopenii, hypergamaglobulinémii, poklesu albuminů, někdy ke žloutence a přes nadměrnou chuť k jídlu i ke kachexii. Protože asi 10% pacientů má snížené koagulační poměry a často i trombocytopenii, je punkce sleziny mnohými autory považována za kontraindikovanou (byly popsány fatální iatrogenní ruptury sleziny). V poslední fázi neléčené choroby se vyvíjejí generalizované edémy a ascites. Neléčená VL končí většinou do dvou let úmrtím.

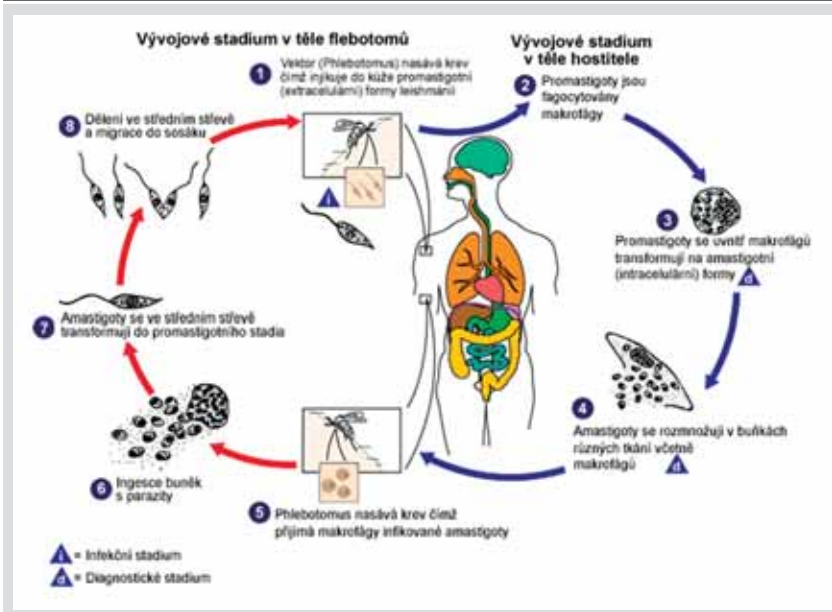
V oblastech se zvířecím rezervoárem (psovití šelmy), jakou je oblast Středozemního moře, postihuje VL zejména děti v batolecím věku a je zapříčiněná převážně druhem *Leishmania infantum*. Africký typ VL rovněž zapříčiňuje *Leishmania infantum*, ale postihuje starší děti a mladé dospělé. Hlavním rezervoárem zde jsou hlodavci.

Některé druhy leishmanií postihující vnitřní orgány, mohou vyvolat kožní leishmaniózu (např. *L. infantum*) a naopak původci kožní leishmaniózy mohou visceralizovat. *L. tropica*, což je častý původce kožní leishmaniózy na Blízkém východě, způsoboval u amerických vojáků, kteří se účastnili válečné operace Pouštní bouře, horečnaté onemocnění s hepatosplenomegalií, které bylo diagnostikováno jako VL (44).

Diagnóza leishmaniózy

Zlatým standardem pro diagnostiku leishmaniózy je mikroskopický nebo kulturační nález parazita v biotickém materiálu z tkáně pacienta (26). Senzitivnější je aspirát ze sleziny, než z kostní dřeně, jater nebo lymfatických uzlin (pozitivitu vykazuje až 98% aspirátů ze sleziny, 85% aspirátů z kostní dřeně a 60% z jater). Výhodou mikroskopického vyšetření je jeho rychlost. Nevýhodou je skutečnost, že mikroskopický průkaz vyžaduje značnou

Obrázek 1. Životní vývojový cyklus leishmanií (upraveno podle www.dpd.cdc.gov/dpdx). Leishmanióza je přenášena na člověka krevsajícími samičkami drobného dvoukřídlého hmyzu rodu *Phlebotomus*. Flebotomus injikuje infekční promastigoty v průběhu nasávání krve z kůže (1). Promastigoty, které jsou v raně po propíchnutí, jsou pohlceny makrofágy (2) a transformují se do amastigotní vývojové formy (3). Amastigoty se množí v infikovaných buňkách a zachvacují různé tkáně, v závislosti na druhu leishmanie (4). Objevují se klinické příznaky leishmaniózy. Flebotomy se stávají nakažlivými, když při nasávání krve z infikovaného hostitele přijímají makrofágy infikované amastigoty (5, 6). Ve středním střevě flebotomů se amastigoty transformují na promastigoty (7). Zde se dělí a migrují do sásáku vektora (8).



pozornost a především zkušenost, kdy je lze při nízkém počtu parazitů snadno přehlédnout. Možný je i kultivační záchyt leishmanií na specifické půdě, nebo intraperitoneální inokulací do zvířete, což vyžaduje čerstvý materiál a výsledek je k dispozici až za několik dnů. Vzhledem k obtížnému získávání tkáňových punktátů se dnes v diagnostice onemocnění uplatňují více sérologické metody. Přímý aglutinační test, při kterém jsou obarvené parazity aglutinované protilátkami ze séra pacienta, je velmi oblíbený v Iránu a Africe, ale vysoká cena komerčně dostupného antigenu je často limitujícím faktorem pro širší použití. V Indii a částečně i v Evropě a v Africe se používá rychlý „strip test“ pro průkaz sérových protilátek vůči rekombinantnímu antigenu rK39 (uchovaný antigen z *Leishmania infantum*), jímž je papírek impregnován. Gen kódující kinesinu podobný protein objevený u *Leishmania chagasi* obsahuje opakující se 117-bp sekvence kódující 39 aminokyselinových zbytků (K39), které jsou přítomny u všech druhů leishmanií, které zapříčiňují viscerální formu. Senzitivita (67–100%) i specifita (93–100%) testu je velmi vysoká. Podstatným omezením testů je slabá odpověď u některých pacientů, ale i přítomnost protilátek u některých zdravých jedinců. Detekce leishmaniového antigenu v moči pomocí latex aglutinačního testu (Katex) se jeví velmi nadějně pro diagnózu i pro určení prognózy. Techniky založené na polymerázové řetězové reakci vykazují vysokou senzitivitu i specifitu, ale jejich dostupnost je limitována jejich cenou. Zavedení Western blottingových metod do diagnostiky VL má velkou perspektivu. Tato metoda využívá 65-kDa antigenní komponentu, přítomnou ve 100% vzorků sér od pacientů s klinicky a parazitologicky potvrzenou VL. Nikdy nebyla identifikována v testovaných kontrolních sérech (100% specifita). Test bývá pozitivní i u pacientů bez splenomegalie. Western blotting má i značný prognostický význam: vymizení nebo znovuobjevení se specifického pruhu, předpovídá uzdravení nebo relaps onemocnění (6). U pacientů současně nemocných VL a AIDS je diagnóza založena na krevním nátěru a kultivaci.

Patogeneze

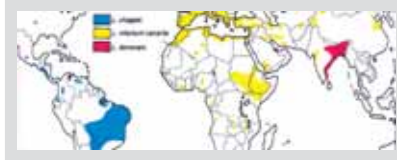
Leishmanie žijí jako extracelulární bičíkaté promastigoty v zaživacím ústrojí samičích flebotomů a u zvířecích a lidských hostitelů se postupně proměňují na amastigotní (bezbičíkaté) formy. V této formě jsou leishmanie rezistentní na fagolysozomální enzymy a mohou se množit i uvnitř makrofágů. To jim dovoluje šířit se prostřednictvím retikuloendoteliálního systému hostitele a přežít v přítomnosti intracelulárních lysozomálních organel makrofágů. Poslední dobou bylo zjištěno, že některé

složky flebotomů mají schopnost zvýšit průnik promastigotů do makrofágů a zvýšit jejich virulenci. Bylo potvrzeno, že patogenese je závislá na T-buněčné cytotoxicitě a kontrola VL závisí na zdatnosti pomocných Th1 lymfocytů a včasné multicytokinové odpovědi v průběhu infekce. Svou nezastupitelnou roli zde hrají i NK buňky, které jsou prvními hodinami infekce hlavním zdrojem cytokinů včetně IFN- γ (30). V průběhu progresu leishmaniózy u myši se zvyšuje počet Th2 CD4+ T-buněk a sekrece interleukinu-4, což vede k polyklonální aktivaci B-buněk. VL je spojena s buněčnou anergií (negativní kožní test s leishmaniovým antigenem), která se zvrátí na pozitivní až po několika měsíční úspěšné léčbě. Nepatříčná prezentace antigenu a komunikace mezi buňkou prezentující antigen a T-buňkou, ale i indukce IL-10 a IL-4, může vysvětlit tuto anergii. IL-10 a IL-4 potlačují a IL-12 stimuluje aktivitu interferonu- γ . Fakt, že IL-12 a IFN- γ hrají velmi důležitou roli v obraně proti infekci způsobené leishmanií, je s úspěchem využíván při konstrukci vakcín nebo v terapeutických režimech (adjuvantní efekt). Infekce se může zhojit spontánně, nebo může přejít do chronické formy, často ale v důsledku sekundární infekce končí letálně. Faktory, které ovlivňují to, zda infekce zůstane asymptomatická nebo progreduje do obrazu VL, nejsou dnes kompletně objasněny. Epidemiologické studie identifikovaly některé faktory životního prostředí, jež mohou ovlivnit zvýšenou náchylnost k leishmaniím.

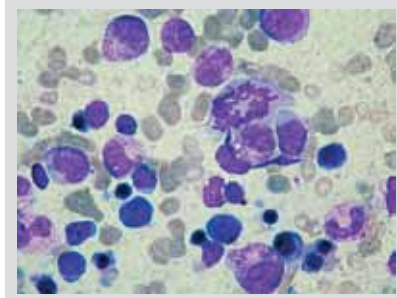
Genetika leishmanióz byla studována na myších modelech, u kterých byly objeveny mutace v genech *Nramp1* a *H-2* lokus (22, 23, 24). Pokusy k identifikaci lidských genů zodpovědných za zvýšenou vnímavost k leishmaniím byly orientovány do oblasti HLA alel a polymorfismu genu *TNF*. Bucheton a spol. recentně popsali u lidí, kteří byli infikováni komplexem *L. donovani*, *L. infantum* a *L. archibaldi* signifikantní vazbu VL k oblasti chromozomu 22q12 a chromozomu 2q23-24 (10). Gen IL-2 receptor- β řetězec (*IL2RB*), který je lokalizovaný v oblasti chromozomu 22q12, je dobrým kandidátem pro kontrolu VL. Kritickou roli IL-2 pro proliferaci T-buněk a diferenciaci T-buněčné odpovědi lze demonstrovat u pacientů s VL, u kterých je T-buňková proliferace i odpověď výrazně potlačena. V průběhu akutní fáze onemocnění byly u pacientů pozorovány vysoké hladiny solubilního cirkulujícího IL-2 receptoru.

V případech spontánní úpravy lze u pacientů pozorovat nárůst buněčné imunity s rozvojem pozdního typu přecitlivosti, která připomíná tuberkulinovou přecitlivost po BCG vakcinaci. S úspěchem se dnes využívá jako leishmaniový kožní test Montenegro, který má pouze epidemiologický význam. Pokud jedi-

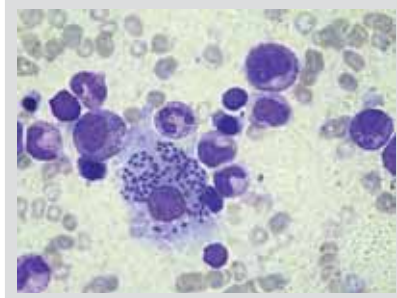
Obrázek 2. Oblasti výskytu *Leishmania* sp.



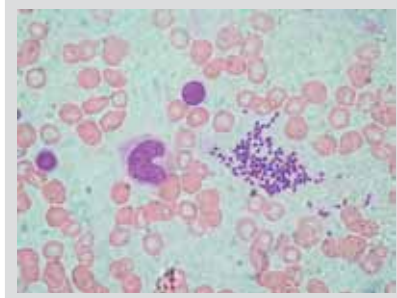
Obrázek 3. Obraz reaktivních změn kostní dřeně, bez přítomnosti blastických elementů, centrálně mitóza myeloidní řady (barvení podle Pappenheima, x1000)



Obrázek 4. Amastigoty *Leishmania* spp. ležící uvnitř makrofágu kostní dřeně (barvení podle Pappenheima, x1000)



Obrázek 5. Skupina mimobuněčných amastigotů *Leishmania* spp. (barvení podle Pappenheima, x1000)



Obrázek 6. Znáznornění velikosti sleziny (11 cm pod oblouk) u dítěte s VL před zahájením léčby Abelcetem



nec není schopen adekvátně reagovat, parazit má obvykle lepší podmínky na to, aby se v těle rozšířil prostřednictvím makrofágo-monocytárního systému.

Léčba

Parazitární nemoci představovaly pro lidstvo vždy velkou překážku. Vývoji nových anti-parazitárních látek se věnovala vždy náležitá pozornost. V pětadvacetiletém období, mezi lety 1975–1999, bylo testováno celkem 1393 nových molekul, z kterých pouze v sedmi případech byly prokázány antiprotozoální vlastnosti. I když je dnes známo asi 25 látek s antileishmaniálním účinkem, jen málo z nich se používá v humánní medicíně, většina se aplikuje parenterální cestou (19, 20). Nejstarší z nich byla ureastibamine (**pětímocný antimon**), vyvinutá v Indii v roce 1922. Originální látka měla vážné toxické účinky. **Sloučeniny pětímocného antimonu** se pak staly jedinou léčebnou modalitou po mnohá desetiletí a velkou měrou se podílely na záchraně milionů životů. Tyto látky se staly základním kamenem léčby leishmaniózy před déle než 60 lety. Dvě hlavní sloučeniny pětímocného antimonu se stále používají zejména v endemických oblastech: stiboglukonát sodný (Pentostam®) a meglumine antimonát (Glucantime®). Pentostam obsahuje antimon v dávce 100 mg/ml a používá se převážně v anglicky mluvících zemích a Glucantime obsahuje antimon v dávce 85 mg/ml a především se používá ve francouzsky mluvících oblastech. Lék se podává intravenózně nebo intramuskulárně a má srovnatelný účinek, když se podává ve stejné dávce. Doporučený léčebný režim spočívá v jednotlivé denní i. v. dávce léku (20 mg/kg) po dobu 30 dnů. Systémová toxicita závisí na celkové dávce podaného antimonu. Nevýhodou je potřeba intramuskulární aplikace, délka hospitalizace a nezanedbatelné (ale přechodné) vedlejší účinky. Vedlejší nežádoucí efekt (nevolnost, bolest, EKG abnormality, zvýšení aminotransferáz, chemická pankreatitida) jsou časté, ale obvykle reverzibilní (16). Závažné nežádoucí účinky jsou méně časté, ale zejména arytmie u pacientů s vysokými dávkami antimonu a pankreatitida u HIV nemocných mohou být příčinou smrtelné komplikace. V roce 1970 se začaly v některých oblastech Indie objevovat zprávy o necitlivosti sloučenin pětímocného antimonu až u čtvrtiny případů s VL. Znepokojivý nástup rezistence na sloučeniny pětímocného antimonu urychlil úspěšný klinický vývoj **diamidinu** (pentamidin isothionát) a **amfotericinu B** (12, 14). Pentamidin (Pentacarinat®) se podával v dávce 4 mg/kg, třikrát týdně po dobu šesti týdnů u pacientů rezistentních na sloučeniny antimonu. Nežádoucí účinky (myalgie, nauzea, bolest hlavy a hypoglyké-

mie) byly při této doporučené dávce poměrně časté. Výjimečně byl pozorován rozvoj nezvratné cukrovky. Když se pentamidin podával jako lék druhé linie (u rezistence na antimon) jeho účinnost byla pouze 75%, což vedlo k jeho omezenému podávání. Amfotericin B byl dlouho uznáván za velmi účinný leishmanicidní lék. Pravděpodobně působí tak, že interkaluje s parazitárním episterolem, předchůdcem ergosterolu. Nejpoužívanějším tradičním preparátem je amfotericin B desoxycholát (Fungizone®). Vedlejší účinky jsou časté, souvisejí s infuzí (horečka, nachlazení, bolest kostí) a celkovou dávkou (nefrotoxicita). Renální toxicita je i dnes velkým problémem (7). Poté, co i u antifugálních látek byla prokázána vysoká nefrotoxicita, byly do klinického použití úspěšně zavedeny **koloidní a tukové formulace amfotericinu B**. Jsou srovnatelně účinné, ale širšímu použití stále brání jejich extrémně vysoká cena. Jejich vysoká účinnost se vysvětluje i cíleným efektem na tkáňové makrofágy, do kterých se dostávají procesem fagocytózy. Pro léčbu jsou dostupné tři preparáty: AmBisome®, což je formulace používající sférické jednolamelové lipozomy menší než 100 nm (27); Amphocil®, disperze s cholesterol-sulfátem v poměru 1:1; Abelcet®, obsahující formulaci s fosfolipidovým základem. Poslední dobou se u pacientů s VL porovnávala účinnost jednotlivé infuze (single dose) lipozomálního amfotericinu B (5–15 mg/kg) versus podání infuze jednou denně v dávce 1 mg/kg po dobu 5 dnů. Léčebné výsledky v obou skupinách byly srovnatelné (91% versus 93%). Dalším používaným lékem proti leishmanióze je **paromomycin** (aminosidin), aminoglykosidové antibiotikum, které se podává jednou denně, obvykle intramuskulárně cestou. Když se podává v kombinaci se sloučeninami pětímocného antimonu, zkracuje se doba podávání a zvyšuje se konečný efekt. Je ototoxický a nefrotoxický. **Alopurinol** vstoupil do léčby leishmaniózy v osmdesátých letech. Nerandomizované studie prokázaly, že kombinace alopurinolu (15 mg/den) a antimonu byla v léčbě VL velmi účinná. V poslední době, v randomizovaných studiích, u pacientů s VL rezistentních na antimon, byla kombinovaná terapie alopurinolu s pentamidinem úspěšnější než monoterapie pentamidinem (16). V pokusech na myších bylo prokázáno, že interferon gama je velmi potentní makrofágový aktivátor se synergickým účinkem na sloučeniny pětímocného antimonu. Denní aplikace rekombinantního IFN-γ v kombinaci s pětímocným antimonem vedla ke zlepšeným léčebným výsledkům asi u 2/3 lidských pacientů s rezistencí na sloučeniny antimonu. Randomizované studie s identickou kombinací léků, které byly podávány po dobu 28 dnů, tuto posilující vlastnost

interferonu ale nepotvrdily (31). Podávání samotného IFN-γ mělo na lidskou VL pouze omezenou účinnost. V posledních letech bylo značné úsilí nasměrováno k nalezení účinného orálního léku, s cílem minimalizovat komplikace spojené s injekční aplikací léků. Mnohé z nich, včetně azolových antimykotik (ketokonazolu, itraconazolu, flukonazolu), ale i metronidazolu (1) byly úspěšně vyzkoušeny. Největší naděje se vkládá do původně protinádorového léku **miltefosinu**, který patří do skupiny alkylfosfocholinů, cytotoxických derivátů odvozených od membránových eterlysofosfolipidů. Původně byl vyvíjen jako perorální protinádorový lék, ale vývoj byl během klinických studií vzhledem k nežádoucí gastrointestinální toxicitě zastaven a dnes se v onkologii používá jako lék účinný při léčbě kožních metastáz karcinomu prsu (11). Účinek proti *Leishmania* spp. byl objeven v *in vitro* pokusech náhodně a zařadil se mezi léky, které jsou označovány jako dar štěstí, který přichází nečekaně (35). Miltefosin je cytotoxický alkylfosfolipidový analog, jehož účinek proti leishmaniím a *Trypanosoma cruzi* pravděpodobně souvisí s přímým působením na metabolismus membránových lipidů v buňkách parazitů (13, 14). Ovlivňuje permeabilitu a fluiditu membrány a šíření signální transdukce. Je účinný na všechna vývojová stadia parazita. Molekulární mechanismus, který má podíl na antileishmaniálním účinku hexadecylfosfocholinu (HePC) nebyl doposud objasněn. Paris a spol. (3) ve studii na promastigotních formách *Leishmania donovani* prokázali, že HePC je schopný indukovat proces buněčné smrti s četnými charakteristickými znaky apoptózy mnohobuněčných organismů (změny cytoplazmy, jádra a membrány). V současnosti je miltefosin považován za velmi perspektivní přípravek pro perorální léčbu VL, včetně případů rezistentních na léčbu deriváty pětímocného antimonu (2, 3, 4, 5, 8). Miltefosin podaný perorálně má velmi dlouhý biologický poločas (150–200 hodin). Léčba orálními preparáty miltefosinu v dávce 100–150 mg/den po dobu 3–4 týdnů vyléčí téměř všechny pacienty s VL, včetně antimon-rezistentních (16). Dávka 100 mg (2,5 mg/kg/den) po dobu 21–28 dnů byla účinná na neléčenou, ale i na rezistentní formu VL. Nejčastějšími vedlejšími účinky jsou zvracení a průjem, ale jejich trvání je krátké. U některých pacientů byl patrný přechodný vzestup transamináz. Ve srovnání s amfotericinem B je výrazně méně nefrotoxický a nevyvolává horečku. Určité problémy činí jeho cena (celková léčebná dávka pro 30kilového pacienta byla vykalkulována na 150 amerických dolarů) a teratogenní účinek (prokázán na experimentálních zvířatech), pro který není doporučován během těhotenství (17). Vzhledem k jeho dlouhému biologickému poločasu je

v průběhu léčby a nejméně 8 týdnů po jejím ukončení doporučována antikoncepční prevence (9). Rezistence na miltefosine byla v experimentu studována na *Leishmania tropica*. Bylo zjištěno, že se na ní nejvíce podílí zvýšená exprese membránového proteinu, P-glykoproteinu, který je kontrolován genem *mdr1* (18).

U pacientů s VL je třeba také rychle diagnostikovat a léčit doprovodné bakteriální infekce a dbát na zajištění dostatečné výživy. Ve zcela ojedinělých případech je indikována splenektomie, a to při perzistujícím hypersplenizmu po klinicky úspěšné chemoterapii. Po léčbě VL může dojít k relapsu onemocnění, k čemuž dochází nejčastěji v následujících 6 měsících po ukončení léčby. Bylo totiž prokázáno, že životaschopné, amastigotní formy leishmanií mohou i po úspěšné chemoterapii perzistovat v organizmu. Relapsy VL jsou mnohem častější u pacientů s HIV infekcí, než u imunokompetentních osob a setkáváme se s nimi jak po léčbě antimonovými preparáty, tak liposomálním amfotericinem B. Pro tyto HIV pozitivní pacienty by proto byla velmi vhodná chronická supresivní terapie, ale zatím nebyl určen ani optimální lék, ani dávkovací režim (43). Po ukončení léčby VL je doporučována nejméně dvouletá dispenzarizace rekonvalescenta (41).

Proti leishmanióze je dnes testováno mnoho vakcín, avšak žádná z nich není zatím rutinně podávána v klinické praxi. Vakcíny používají usmrcené nebo živé oslabené (atenované) parazity, nebo rekombinované komponenty (antigeny, peptidy) odvozené od DNA, které byly testovány se střídavým úspěchem. Posledním krokem byl vývoj vakcíny, která využívá proteiny slinných žláz dvoukřídlého vektora, který je schopen v kůži navodit silnou ochranu proti leishmaniové infekci. Dosavadní výsledky testů na myších modelech jsou velmi nadějné (32). Za velmi perspektivní se považuje konstrukce vakcíny s inkorporací proteinů ze slin flebotoma společně s antigeny parazita (33). V poslední době byl zahájen vývoj nové generace vakcín, které využívají klíčovou roli dendritických buněk v procesu zpracování antigenu a při určení jeho polarizace (34).

Leishmaniózy spadají do spektra protozoálních onemocnění, které se dnes vyskytují endemicky v 88 krajínách Asie, Afriky, Ameriky a jižní Evropy. Geografická distribuce leishmanióz se rozšiřuje a dnes je nemoc popisována i v oblastech, kde se vyskytovala v minulosti neendemicky. Ve střední Evropě je toto parazitární onemocnění popisováno převážně u lidí, kteří pobývali v endemických oblastech (Středozemní moře, Itálie, Španělsko aj.). V Německu provedli v roce 2000 epidemiologickou studii na průkaz importovaných leishmanióz. Za dvouleté období celkem analyzo-

vali 23 pacientů s VL (18 z nich byli němečtí turisté; 3 imigranti z Angoly, Iránu a Toga; a 2 návštěvníci z Itálie a Portugalska). Poměr mužů k ženám byl 6,7:1. Medián mezi prvními projevy onemocnění a správnou diagnózou byl 4 měsíce (rozpětí 1–16 měsíců). Všichni pacienti měli horečku, 17 (74%) mělo splenomegalii, 11 (48%) hepatomegalii, 20 (87%) anémii, 17 (74%) leukopenii a 8 (35%) trombocytopenii. Šest případů VL bylo zaznamenáno v tomto období u dětí ve věku 2 měsíců až 11 let. 78% pacientů s VL se nakazilo v oblasti Středozemního moře a v Portugalsku a většina infekcí byla zapříčiněna druhy z komplexu *Leishmania donovani*. *Leishmania infantum* byl nejčastějším druhem. Chalupa a spol. upozornili na problematiku importované VL u 8 případů českých občanů, kteří se nakazili v endemické oblasti středomoří a východní Afriky (41). Osm případů VL bylo diagnostikováno v České republice od 50. let do konce roku 2000. Poslední případy (včetně dětských pacientů) byly importovány z Chorvatska, jehož pobřeží je dnes turisticky atraktivní a kde v posledních několika letech výskyt této nákazy stoupá (42). Očekává se, že vzhledem ke globálnímu oteplování by se oblast vhodná pro přežití flebotomů mohla přesunout více na sever, k našim hranicím. Pacienti, u kterých se projeví leishmanióza a kteří endemickou oblast nenavštívili, se mohou nakazit od psů (rezervoár), kteří společně s chovateli pobývají v endemických oblastech. Nedávno byl popsán případ dítěte a koně nakaženého leishmaniózou, kteří nikdy neopustili Německo. Spekulovalo se o autoch-

tonním původu infekce (36). Před nedávnem byl v jižním Německu dokonce detekován druh *Phlebotomus mascitti* Grassi, i když zatím nebylo prokázáno, že by mohl plnit funkci plnohodnotného vektora (37). V Německu ani v České republice nepodléhá leishmanióza povinnému hlášení. Systematické zpravodajství týkající se frekvence, typu nebo původu leishmaniové infekce zatím v zemích střední Evropy chybí. Jsou popisovány pouze jednotlivé případy. V České republice byly publikovány pouze dva případy viscerální leishmaniózy u dětí (28, 29). Obě děti byly infikovány v oblasti Středozemního moře několik měsíců před prezentací prvních klinických příznaků onemocnění. Začátek onemocnění byl u obou dětí velmi závažný až rafinovaný. Prvními klinickými příznaky byly horečka, progredující splenomegalie, hepatomegalie, anémie, leukopenie a trombocytopenie (tabulka 1). K vyložení hemoblastózy nebo myeloproliferace bylo u obou dětí provedeno vyšetření kostní dřeně s nálezem reaktivních změn (aktivovaná dřeň), bez infiltrace blastickými elementy (obrázek 3). Diagnóza VL byla stanovena až na základě opakovaného vyšetření kostní dřeně s hojnou přítomností amastigotních forem *Leishmania* spp. (obrázek 4, 5). Sérologická diagnostika byla provedena nepřímým hemaglutinačním testem Celognost® s antigenem komplexu *Leishmania donovani* (Dr. E. Nohýnková, III. interní klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK Praha).

Pacient č. 1: před přijetím na Dětskou kliniku LF UP Olomouc byla pacientka dva

Tabulka 1. Laboratorní a klinické nálezy u dvou dětí s viscerální leishmaniózou při přijetí a po ukončení léčby liposomálním amfotericinem B (Abelcetem®)

	PACIENT č. 1		PACIENT č. 2	
věk (roky)	3,5		7,0	
pohlaví	ženské		mužské	
maximální teplota (°C)	40,0		41,0	
příznaky do diagnózy (měsíce)	3,5		3,0	
endemická oblast	Chorvatsko (3,5 měsíce před příznaky onemocnění)		Itálie (Sicílie) (3 měsíce před příznaky onemocnění)	
léčba	antibiotika, kortikoidy		antibiotika, virostatika, antitumorková, kortikoidy	
kostní dřeň	reaktivní dřeň, bez blast. elementů		aktivovaná dřeň, bez blast. elementů	
	PŘIJETÍ	UKONČENÍ LÉČBY	PŘIJETÍ	UKONČENÍ LÉČBY
CRP (mg/l)	55,0	1,0	-	-
FW (mm)	40/85	21/54	-	-
hemoglobin (g/l)	74	103	87	110
erytrocyty (x10 ¹² /l)	3,25	3,72	-	-
leukocyty (x10 ⁹ /l)	3,1	6,1	3,1	5,4
trombocyty (x10 ⁹ /l)	154	226	85	295
slezina pod oblouk (cm)	5	0	6	0
játra pod oblouk (cm)	2	0	4	0
IHA (nepřímá hemaglutinace)	1:32	negativní	1:256	negativní
ABELCET®-kumulativní dávka (mg/kg)	63,0		40,0	

měsíce pro nespecifické příznaky (slabost, nechutenství, bledost a horečka) v péči dětského lékaře. Při přijetí k nám dominovala splenomegalie a intermitentní horečky s výstupy do 40 °C. Při laboratorním vyšetření byla zjištěna mírná pancytopenie s narůstajícími znaky zářetou (sedimentace, proteiny akutní fáze). Dívka byla léčena kombinací širokospektrých antibiotik. Vzhledem k dlouhotrvajícím septickým teplotám a progresi splenomegalie zvažujeme možnost systémového poškození pojiva a z diagnostických rozpaků podáváme pulzy metylprednisolonu a intravenózních imunoglobulinů, po kterých pozorujeme jen přechodné celkové zlepšení s poklesem teplot. Protože pozorujeme další progresi splenomegalie až 11 cm pod žební oblouk (obrázek 6), opakujeme vyšetření kostní dřeně, kde byly nalezeny amastigotní formy *Leishmania* spp. (obrázky 4, 5). Zahájená léčba liposomálním Amfotericinem B (Abelcet) v dávce 3 mg/kg s celkovou kumulativní dávkou 63 mg/kg (21 dnů léčby) vedla k vyléčení, úplné eradikaci parazita a sérologické negativitě (28).

Pacient č. 2: před přijetím na II. dětskou kliniku 2. LF UK byl chlapec 5 týdnů v péči spádového dětského oddělení pro trvající febrilní stav, hepatosplenomegalii a pancytopenii. Kostní dřeň byla v tomto období vyšetřena opakovaně bez diagnostického závěru. Bylo uvažováno o hemoblastóze, systémové formě juvenilní idiopatické artritidy, sepsi s hemofagocytujícím syndromem. Chlapec byl léčen kombinací širokospektrých antibiotik, virostatik a antimykotik. V diagnostických rozpácích byl podán bolus metylprednisolonu a intravenózních imunoglobulinů, což vedlo ke krátkodobému poklesu teplot a zlepšení krevního obrazu. Po doplňujícím laboratorním vyšetření byla stanovena diagnóza hemofagocytující lymfocytózy (HLH): pancytopenie, koagulopatie s nízkým fibrinogenem, hyperlipidemie, vysoká hodnota LDH a feritinu, aktivace T-lymfocytů s průkazem hemofagocytujících makrofágů. Byla zahájena léčba protokolem HLH-94, po kterém došlo k přechodnému zlepšení krevního obrazu, trvala však organomegalie. Čtyři týdny od začátku léčby se objevil relaps teplot i pancytopenie, později se stav komplikoval hypertrofickou kardiomyopatií se závažnou komorovou tachykardií. Vzhledem k rezistenci na specifickou léčbu HLH byla zahájená terapie antilymfocytárním globulinem. V té době bylo v kostní dřeni nalezeno velké množství amastigotních forem *Leishmania* spp. Nepřímou hemaglutinací byla v séru prokázána přítomnost specifických anti-leishmaniových protilátek. Byla přerušena imunosupresivní léčba a zahájena léčba Abelcetem® podle schémy US Foods and Drug Administration v celkové kumulativní dávce 40 mg/kg. Do tří týdnů ustoupila splenomegalie a upravili se parametry

krevního obrazu. Tři měsíce po zahájení cílené léčby nebyly leishmanie nalezeny ani v aspirátu kostní dřeně (29).

Závěr

Začátek klasické formy VL bývá většinou zálný a rafinovaný a zejména v oblastech, kde se infekce běžně nevyskytuje, může být tato možnost horečky neznámého původu při diferenční diagnostice opomenuta. Nákaza může dlouho probíhat inaparentně. Pamatovat je třeba na poměrně dlouhou inkubační dobu, od několika týdnů po několik měsíců, ojediněle i několik let. Pro správné stanovení diagnózy je důležitá cestovní anamnéza. Ve středoevropské oblasti byly případy VL u dětí diagnostikovány pouze ojediněle a některé z nich ani nenavštívili endemickou oblast (39). Uvažuje se o možnosti „transportu“ vektora z endemické oblasti nebo

se zvažuje autochtonní původ infekce (36, 37). Pacienti, u kterých se projeví leishmanioza a kteří endemickou oblast nenavštívili, se mohou nakazit i od psích rezervoárů, kteří společně se svými chovateli pobývají v endemických oblastech. Vzhledem k postupnému globálnímu oteplování by se oblast vhodná pro přežití flebotomů mohla přesunout více na sever, až k našim hranicím. Protože v klinickém obrazu klasické formy VL dominuje splenomegalie s pancytopenií, jsou děti obvykle konziliárně vyšetřeny dětskými hematology, kteří z diferenční diagnostického hlediska musí vždy vyloučit akutní hemoblastózu, myeloproliferaci, hemogaocytující lymfocytózu nebo hemolytickou anémii. Aspirace kostní dřeně s vysokou senzitivitou až 85% patří kromě imunologických a molekulárně biologických technik mezi základní diagnostické metody.

Literatura

- Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004; 10: 307–315.
- Sundar S, Sindermann H, Klaus J, et al. Oral miltefosine treatment in children with mild to moderate Indian visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 434–438.
- Paris C, Loiseau PM, Borjes C, et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 852–859.
- Sindermann H, Croft SL, Engel KR, et al. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004; 193: 173–180.
- More B, Bhatt H, Kukreja V, Ainaure SS. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; 49: 101–103.
- Kumar P, Pai K, Tripathi K, et al. Immunoblot analysis of the immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in case of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. *Clin Diagn Immunol* 2002; 9: 1119–1123.
- Agudo JM, Lumberras C, González-Vidal D, et al. Assessment of nephrotoxicity in patients receiving amphotericin B lipid complex: a pharmacovigilance study in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 785–790.
- Prasad R, Kumar R, Jaiswal BP, Singh UK. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J Pediatr* 2004; 71: 143–144.
- Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 217–221.
- Bucheton B, Abel L, El-Safi S, et al. A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of Kala-Azar. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1052–1060.
- Lobovská A, Nohýnková E. New drugs for treatment of parasitic infections. *Cas Lek Cesk* 2003; 142: 177–181.
- Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 397–401.
- Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3010–3015.
- Dupuy-Camet J. New drugs for the treatment of human parasitic protozoa. *Parasitologia* 2004; 46: 81–84.
- Murray HW. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 279–292.
- Rosenthal E, Marty P. Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; 49: 61–68.
- Croft SL, Seifert K, Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126: 165–172.
- Harms G, Schönian G, Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 872–875.
- Seifert K, Matu S, Peréz-Victoria JP, et al. Characterization of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 380–387.
- Davies CR, Kaye P, Drift SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003; 326: 377–382.
- Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 787–794.
- Cavalho L, Bacellar O, Brownell C, et al. Restoration of INF- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1994; 152: 5949–5956.
- Bradley DJ, Taylor BA, Blackwell J, et al. Regulation of leishmania populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin Exp Immunol* 1979; 37: 7–14.
- Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Mmp1* gene. *J Exp Med* 1995; 182: 655–666.
- Blackwell J, Freeman J, Bradley D. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature* 1980; 283: 72–74.
- Gama MEA, Costa JML, Pereira JCR, et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Brazil J Med Biol Res* 2004; 37: 129–136.
- Poljak V, Krč I, Ehrmann J. In: Manuál infekčních nemocí. Solen, 2000: 204–206.
- Smith O, Hann I, Cox C, et al. Visceral leishmaniasis: rapid response to Ambisone treatment. *Arch Dis Child* 1995; 73: 157–159.
- Mihál V, Gregůrková J, Michálková K, et al. Neobvyklá příčina horečky, splenomegalie a leukopenie. *Pediatr pro Praxi* 2001; 2: 83–84.
- Suková M, Starý J, Housková J, et al. Hemofagocytující lymfocytóza jako manifestace viscerální leishmaniozy. *Čas Lék Čes* 2002; 141: 581–584.
- Korbel DS, Finney C, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasit* 2004; 34: 1517–1528.
- Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2185–2197.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 2001; 194: 331–342.
- Reed SG. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. *J Exp Med* 2001; 194: F7–9.
- Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M. Dendritic cells in leishmania infection. *Microbes Infect* 2004; 6: 1402–1409.
- Kuhlenord A, Maniera T, Eibl H, et al. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1630–1634.
- Bogdan C, Schönian G, Banuls AL, et al. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 302–306.
- Naucke TJ, Pesson B. Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitti* Grassi, 1908, (Diptera: Phlebotomidae) in Germany. *Parasitol Res* 2000; 86: 335–336.
- Ditis J, Ritsas I, Tsantali C, et al. Immune haemolytic anaemia due to visceral leishmaniasis in a young child. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 49–50.
- Kollarich H, Emminger W, Zaunschirm A, et al. Suspected autochthonous Kala-Azar in Austria. *Lancet* 1989; i: 901–902.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, et al. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (kala-azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 1999; 104: E65.
- Chalupa P, Vaníšta J, Burget I, et al. Přehled importovaných viscerálních leishmanióz v České republice. *Bratisl Lek Listy* 2001; 102: 84–91.
- Punda-Polic V, Sardelic S, Bradaric N. Visceral leishmaniasis in southern Croatia. *Lancet* 1998; 351: 188.
- MANDLELL, DOUGLAS and BENNETT'S Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone 2000, 3263 pp.
- Herwaldt B. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191–1199.