

**LITERATURE REVIEW**

## **Visceral Leishmaniasis in Latin America and therapy perspectives**

### **Leishmaniasis visceral en América Latina y perspectivas terapéuticas**

Catalina Tovar A<sup>1\*</sup> M.Sc, María Yasnot A<sup>2</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad del Sinú, Facultad de Ciencias de la Salud. Grupo de Resistencia Bacteriana y Enfermedades Tropicales. Carrera 1w No. 38-153, Barrio Juan XXIII. Montería, Colombia. <sup>2</sup>Universidad de Córdoba. Facultad Ciencias de la Salud. Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, Carrera 6 No. 76-103 Montería, Colombia. Correspondence: [catalina@unisinu.edu.co](mailto:catalina@unisinu.edu.co).

Received: August 2015; Accepted: January 2016.

#### **ABSTRACT**

In Latin America, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum*. In this geographical area, main vectors associated with transmission are *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia evansi*, with dogs being incriminated as the main reservoir involved in transmission of the disease. This pathology primarily affects children between 0 - 5 years, a highly susceptible population where socio-economic, environmental and nutritional factors affects the pathological outcome and increase the likelihood of vector-human contact. According to the World Health Organization (WHO) recommended treatment for Visceral Leishmaniasis is liposomal amphotericin B, a drug with a limited and variable availability between countries depending on market prices, which leaves pentavalent antimonial as the most widely used treatment despite the associated toxic effects. In the Americas, evidence on the efficacy of single-dose (monotherapy) and combination therapies as options for treating these parasites is required.

**Keywords:** Disease, drug therapy, *Leishmania infantum*, *Lutzomyia*, vector (Source: MeSH).

#### **RESUMEN**

La Leishmaniasis visceral es una enfermedad causada en América Latina por *Leishmania infantum*, en esta área geográfica los principales vectores asociados a la transmisión son *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, siendo el perro uno de los principales reservorios incriminados en su transmisión. Es una patología que afecta principalmente a la población infantil entre los 0 a 5 años, donde los factores socioeconómicos, ambientales y nutricionales son determinantes en el contacto con el insecto vector y el desenlace patológico. Según la Organización Mundial de la Salud el tratamiento recomendando para esta patología es la Anfotericina B liposomal, sin embargo, la disponibilidad del medicamento por el costo varía entre los diferentes países, dejando antimoniales pentavalentes como opción más utilizada, pese a los efectos tóxicos asociados. En el continente americano se requiere evidencia de la eficacia de monoterapias de una solo dosis y terapias combinadas, como opciones para el tratamiento de estas parasitosis.

**Palabras clave:** Enfermedad, *Leishmania infantum*, *Lutzomyia*, tratamiento, vector (Fuente:MeSH).

## INTRODUCTION

Visceral Leishmaniasis (VL) is a parasitosis caused by a flagellate protozoan of the *Leishmania* genus. In Latin America, the species responsible for this clinical form is *Leishmania infantum*; its transmission cycle involves a vector insect of the *Lutzomyia* genus, and reservoir animals such as dogs, which stand out for their role in domestic transmission (1).

The infectious process begins when a hematophagous female of the *Lutzomyia* feeds on the blood of the host releasing metacyclic promastigotes from its salivary glands, which are engulfed mainly by local macrophages, and once inside turn into amastigotes that reproduce inside the cell. After the rupture of the macrophage, the amastigotes are released and are able to infect new cells; then they migrate to the liver, bone marrow, and spleen (2) altering the spleen architecture producing self-limiting granulomatous reactions in the liver (3). Disease progress is favored by malnutrition and/or immunosuppression of the host. The disease is characterized mainly by fever, splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathy, progressive cachexia, and hematological complications such as anemia, leukopenia, thrombocytopenia or pancytopenia, probably along with hypergammaglobulinemia and hypoalbuminemia, which gives rise to the need of a differential diagnosis with pathologies such as malaria, leukemia, lymphoma, and brucellosis, among others (4).

This disease has a high mortality rate in cases that do not receive treatment in a timely manner. The World Health Organization (WHO) estimates that each year, between 200,000 and 400,000 new cases of visceral leishmaniasis appear, and over 90% of them in countries such as Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, Sudan, and South Sudan (5). Initially, VL appeared in rural contexts, but factors such as vector domiciliation, the presence of intra and peridomestic reservoirs, in addition to physical, climate, and other factors derived from human activity, have given rise to urban transmission cycles (6).

This article provides a review of this subject in the general context of the disease, emphasizing on the information found in Latin America and especially in Colombia, describes the therapeutic schemes currently approved and the perspectives in this field.

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis visceral (LV) es una parasitosis causada por un protozoo flagelado del género *Leishmania*, en América Latina la especie responsable de esta forma clínica es *Leishmania infantum*, su ciclo de transmisión involucra un insecto vector perteneciente al género *Lutzomyia*, y animales reservorios, como el perro que se destaca por su papel en el ciclo de transmisión doméstica (1).

El proceso infeccioso inicia cuando una hembra hematófaga del género *Lutzomyia* se alimenta de sangre del hospedador liberando de sus glándulas salivares promastigotes metacíclicos, los cuales son fagocitados principalmente por macrófagos locales, al interior se transforman en amastigotes que se reproducen intracelularmente. Tras la ruptura del macrófago los amastigotes son liberados con la capacidad de infectar nuevas células, posteriormente migran al hígado, médula ósea y bazo (2) alterando la arquitectura esplénica y produciendo reacciones granulomatosas autolimitadas a nivel hepático (3). El progreso de la enfermedad se ve favorecido por la desnutrición y/o inmunosupresión del hospedero. La enfermedad se caracteriza principalmente por la aparición de fiebre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, caquexia progresiva y complicaciones hematológicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia o pancitopenia, puede acompañarse de hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, lo que hace necesario realizar un diagnóstico diferencial principalmente con patologías como malaria, leucemia, linfoma y brucelosis entre otras (4).

Es una enfermedad con una elevada mortalidad en los casos donde no se recibe tratamiento de manera oportuna. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se producen en el mundo entre 200.000 y 400.000 nuevos casos de Leishmaniasis visceral, más del 90% de ellos en países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur (5). Inicialmente, la LV se presentaba en contextos rurales, sin embargo, factores como la domiciliación del vector, presencia de reservorios en el intra y peridomicilio, sumado a factores físicos, climáticos y otros derivados de la actividad humana han permitido ciclos de transmisión a nivel urbano (6).

En este artículo se hace una revisión del tema desde el contexto general de la enfermedad con énfasis en la información encontrada para América Latina y en particular para Colombia, asimismo se describen los esquemas terapéuticos avalados en la actualidad y las perspectivas en este campo.

### **Epidemiology of *Leishmaniasis* in Latin America**

Visceral Leishmaniasis is autochthonous in 12 American countries: the five countries with the highest number of cases in 2012 were Brazil, Paraguay, Colombia, Argentina, and Mexico, with an incidence rate of 4.8 cases per 10,000 population, and a mortality rate of 6.6% (213 deaths), showing a 1.8% reduction when compared to the previous year (7). Between 2001 and 2013, 45,490 cases were recorded, with a yearly average of 3,499 cases. The incidence of visceral leishmaniasis in the Americas for 2013 was 2.59 cases per 100,000 population, only considering the population of the area of transmission. Brazil and Paraguay were the countries with highest rates, 4.35 and 3.85 cases per 10,000 population, respectively. The death rate for that year was 6.7% (229 deaths), with reduction about one point versus the previous year (8).

With the development of the HIV-AIDS pandemic, several co-infections with other microorganisms have been observed, including *Leishmania infantum*. Brazil is the Latin American country with the highest co-infection rates for these two pathologies (9).

Both clinical entities potentiate each other, boosting symptom development and their complications; the most frequently observed clinical manifestations are fever and splenomegaly (10), although there have been seldom reports of atypical cutaneous lesions caused by *L. infantum* (*L. chagasi*) (11). Brazil reported 209 cases of Leishmania/HIV coinfection in 2013, accounting for 6.4% of the total cases of visceral leishmaniasis (8). Serological tests are used in the field for screening essays; however, there have been serologically negative coinfection patients, because of the immunosuppression that leads to a low production of antibodies for the parasite (12). Some authors propose the use of molecular techniques due to their high sensitivity and specificity of diagnosis of VL in this population from bone marrow aspirate or blood (13). On average, 60% of the people with VL are initially diagnosed with AIDS, in advanced immunosuppression stages, with a mean CD4+ lymphocyte count below 200/ $\mu$ l, which is seen in 62%-100% of the cases (14).

### **Epidemiología de *Leishmaniasis* in Colombia**

According to the information of the National Health Institute (15), visceral leishmaniasis is

### **Epidemiología de la *Leishmaniasis* en América Latina**

La Leishmaniasis visceral es autóctona en 12 países de las Américas; los cinco países con mayor número de casos en el 2012 fueron Brasil, Paraguay, Colombia, Argentina y México con una tasa de incidencia de 4.8 casos por 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad del 6.6 % (213 muertes), presentando una disminución del 1.8% con respecto al año anterior (7). Entre el 2001 y el 2013 se registraron 45.490 casos con una media anual de 3.499 casos. La incidencia de la Leishmaniasis visceral en la Región de las Américas para el 2013 fue de 2.59 casos por 100.000 habitantes, considerando solamente la población del área de transmisión. Brasil y Paraguay fueron los países que presentaron las mayores tasas con 4.35 y 3.85 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. La tasa de letalidad para ese año fue de 6.7% (229 muertes), presentando una disminución alrededor de un punto con respecto al año anterior (8).

Con el desarrollo de la pandemia de VIH-SIDA se han observado variadas coinfecciones con diferentes microorganismos, entre ellos *Leishmania infantum*. Brasil es el país con las mayores tasas de coinfección para estas dos patologías en América Latina (9).

Las dos entidades clínicas se potencian entre si favoreciendo el desarrollo de la sintomatología y sus complicaciones; las manifestaciones que se observan en mayor frecuencia son fiebre y esplenomegalia (10), aunque inusualmente se ha reportado el padecimiento de lesiones cutáneas atípicas causadas por *L. infantum* (*L. chagasi*) (11) Brasil en el 2013 reportó 209 casos de coinfección Leishmania/VIH, representando 6.4% del total de casos de Leishmaniasis visceral (8). Pruebas serológicas son utilizadas en campo para ensayos de tamizaje, sin embargo se han encontrado pacientes con coinfección serológicamente negativos, consecuencia de la inmunosupresión que conlleva a una baja producción de anticuerpos frente al parásito (12). Algunos autores proponen el uso de técnicas moleculares por su alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de LV en esta población a partir de muestras de aspirados de médula ósea o sangre (13). En promedio el 60% de las personas con LV son diagnosticados inicialmente con SIDA, en estados de inmunosupresión avanzados, con recuento medio de linfocitos CD4+ inferior a 200/ $\mu$ l lo que se observa en el 62%-100% de los casos (14).

### **Epidemiología de la *Leishmaniasis* en Colombia**

En Colombia de acuerdo a la información del Instituto Nacional de Salud (15) la Leishmaniasis visceral es endémica principalmente en el Valle

endemic in the Valley of the Magdalena River and its affluents; some foci match vector distribution in the departments of Tolima, Huila, Cundinamarca, Bolívar, Córdoba, Sucre, Santander, and Norte de Santander. In 2015, 7,900 cases of leishmaniasis were reported, out of which 7.777 (98.4%) were cutaneous leishmaniasis, 108 cases (1.4%) were mucous leishmaniasis, and 15 cases (0.2%) were visceral leishmaniasis. When compared to 2014, there was a reduction of 3.777 cases, i.e. 32.3% variation on the epidemiologic data (16).

According to the information reported by the National System for Public Health Vigilance (SIVIGILA, for its acronym in Spanish), between 2006 and 2015, 293 cases of visceral leishmaniasis have been reported in Colombia, with an average of 29.3 cases per year. The departments involved are Bolívar, Córdoba, Huila, Risaralda, Sucre, Boyacá, Cundinamarca and Tolima, and the municipality of El Carmen de Bolívar is the one with the most cases reported (Table 1). During the 20<sup>th</sup> epidemiologic week of 2016, there have been 19 reported cases, 63% of them in the department of Bolívar.

The Colombian municipality with the largest amount of registered cases is El Carmen de Bolívar, which has contributed with 67 cases to SIVIGILA during the last 10 years, thus being the main focus of the disease, nationwide. During the last years, evidence of circulation of insects in the area has been collected, as well as vigilance on canine population (17). Recently, due to the case of a minor with symptoms compatible with VL, a focus of transmission was identified in the city of Cartagena, finding *Lu. Evansi* and opossums infected with *L. infantum* (18).

In 2012, in the municipality of Neiva, an outbreak of leishmaniasis in an urban area was reported, with a positive diagnosis for 7 minors; the reservoir study established a seropositivity of 6.1% of the analyzed canines, and complementary entomological studies confirmed the presence of *Lu. Longipalpis* in the peridomicile (19).

Another VL focus is located in the northern part of the department of Córdoba, in the municipalities of San Andrés de Sotavento and Tuchín, where the population is comprised of 90% indigenous persons. Children under 2 are the most affected, where malnutrition is the most significant characteristic. The only study in humans reported in this area dates back

del Río Magdalena y sus afluentes, existen focos que coinciden con la distribución del vector en Tolima, Huila, Cundinamarca, Bolívar, Córdoba, Sucre, Santander y Norte de Santander. Para el 2015 se presentaron 7.900 casos de Leishmaniasis de los cuales 7.777 casos (98.4%) fueron de Leishmaniasis cutánea, 108 casos (1.4%) de Leishmaniasis mucosa y 15 casos (0.2%) de Leishmaniasis visceral. Respecto al 2014, se presentó una reducción de 3.777 casos, es decir 32.3 % de variación en el dato epidemiológico (16).

De acuerdo con la información que reporta el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) en Colombia entre el año 2006 – 2015 se han notificado 293 casos de Leishmaniasis visceral, con un promedio anual de 29.3 casos. Los departamentos implicados son Bolívar, Córdoba, Huila, Risaralda, Sucre, Boyacá, Cundinamarca y Tolima, siendo el municipio de El Carmen de Bolívar el que más casos ha notificado (Tabla 1). En la semana epidemiológica 20 de 2016 se han reportado 19 casos, donde el departamento de Bolívar aportó el 63% de los casos.

En municipio de Colombia con mayores registros es El Carmen de Bolívar que en los últimos 10 años ha aportado un total de 67 casos de al SIVIGILA, constituyendo el principal foco de esta enfermedad a nivel nacional. En los últimos años se han recopilado evidencias de la circulación de los insectos vectores en la zona, así como vigilancia la población canina (17). Recientemente a través del caso de una menor de edad con sintomatología compatible con LV, se identificó un foco de transmisión en la ciudad de Cartagena, encontrándose *Lu. evansi* y zarigüeyas infectas con *L. infantum* (18).

En el año 2012 en el municipio de Neiva se reportó un brote de Leishmaniasis visceral en zona urbana, donde se realizó diagnóstico positivo a 7 menores de edad, el estudio de reservorios estableció la seropositividad del 6.1% de los caninos analizados y estudios entomológicos complementarios permitieron confirmar la presencia de *Lu. Longipalpis* en el peridomicilio (19).

Otro de los focos de LV se ubica al norte del departamento de Córdoba en los municipio de San Andrés de Sotavento y Tuchín, la población esta constituida por un 90% de indígenas, los principales afectados son menores de 2 años, donde la desnutrición es la característica más importante. El único estudio en humanos reportado para esta área data de 1995, donde se obtuvo una seropositividad con prueba de intradermorreacción de Montenegro en población infantil del 40% (20).

**Table 1.** Notification of VL cases in Colombia 2006 – 2015

DEPARTMENT	MUNICIPALITY	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
BOLIVAR	SAN PABLO										1	1
	EL CARMEN DE BOLIVAR		20		8	2	4		3	9	21	67
	SAN JUAN NEPOMUCENO										1	1
	Unknown municipality			19								19
	CARTAGENA						1					1
BOYACA	Unknown municipality	14										14
CESAR	LA GLORIA										1	1
CORDOBA	SAN ANDRES SOTAVENTO		7		4	2	1		1	5	2	22
	TUCHIN				1	5	1		3	5	4	19
	MOÑITOS											0
	LORICA					1						1
	MOMIL				1							1
	MOÑITOS				3	1					1	5
	SAN PELAYO				1							1
	Unknown municipality	11	9	1								
CUNDINAMARCA	Unknown municipality			3								3
	VILLETA		1									1
	GIRARDOT				1							1
HUILA	NEIVA				3			7		1		11
	RIVERA		1									1
	PALERMO						1					1
	Unknown municipality	2			1							3
NORTE SANTANDER TOLIMA	Unknown municipality									1		1
	GUAMO		2						1			3
	COYAIMA					1		1				2
	ORTEGA					1						1
	ESPINAL				1							1
	FLANDES				1							1
	Unknown municipality	7		3								10
SUCRE	SAMPUES		2		1	1				1	2	7
	OVEJAS		5		5	5	3	1	3	1	1	24
	SAN ONOFRE										1	1
	LOS PALMITOS					2			1			3
	SINCELEJO				2	1			1	4		8
	COROZAL					1				1		2
	PALMITO					1				1	1	3
	CHALAN				2	2						4
	SAN PEDRO			2								2
	MORROA			1								1
	COLOSO (RICAURTE)			2								2
	Unknown municipality	10		7						1	1	19
Unknown origin							2			1		3
TOTAL		44	52	33	35	26	13	9	13	31	37	293

to 1995, which obtained a 40% seropositivity with Montenegro's intradermal reaction test in children (20).

### Vectors

There are about 500 known species of phlebotomines in America (21). *Lu. longipalpis* the main vector of visceral leishmaniasis in Latin America, mainly located in dry tropical forests, arid and semi-arid areas, but also there are reports in very humid and forest areas (22).

In Colombia, about 164 species of Lutzomyias, 13 of them pointed out as vectors of leishmaniasis (21). Among them, *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia evansi* are the most abundant and geographically spread species. *Lu. longiplapis* is found in the Valley of the Magdalena River, in rural areas with tropical dry forests from the departments of Córdoba, Sucre and Bolívar, and even in suburban and urban areas predominantly in the intradomicile (23). On the other hand, *Lu. evansi* has been historically distributed towards the Caribbean (24). It is the main species with anthropophilic behavior in regions such as Montes de María (Sucre – Bolívar), and its adapting power has allowed it to become an urban vector for leishmaniasis (25,26). In Riohacha, department of Guajira, its circulation has been reported (27). The department of Córdoba shows evidence of transmission zones with VL cases, such as San Andrés de Sotavento (20).

However, as a result of the influence of climate change, the geographic distribution of insects may change, and the establishment of new insect niches in zones previously devoid of them this can be predicted based on environmental patterns (28). In 2013, the presence of *Lu. longipalpis* was reported in the department of Caldas, with an unusual altitude distribution between 392 and 1387 meters above sea level, which is evidence of the adaptation of this species due to the new climate context (29).

In the Colombian Caribbean region, there have been reports of species such as *Lu. panamensis*, *Lu. micropyga*, *Lu. Shannoni* and *Lu. Atroclavata*, with anthropophilic behavior and identification of the human food source, direct incrimination as vectors of this parasitosis requires further analysis but gives rise to the possibility of more vector species of VL involved in Colombia (25).

### Reservoirs

Historically, dogs are the main reservoir of *L. infantum*, playing a key role in the domestic

### Vectores

En el continente Americano se conocen alrededor de 500 especies de flebótomos (21) *Lu. longipalpis* es el principal vector de Leishmaniasis visceral en América Latina, se ubica especialmente en áreas de bosque seco tropical, regiones áridas y semiáridas; pero también, existen reportes en zonas muy húmedas y boscosas (22).

En Colombia se han reportado alrededor de 164 especies de Lutzomyias, 13 han sido incriminadas como vectores de Leishmaniasis (21) entre ellas *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, son las especies de mayor abundancia y distribución geográfica. *Lu. longiplapis* se encuentra en el Valle del Río Magdalena en áreas rurales con bosque seco tropical en los departamentos de Santander, Cundinamarca, Tolima y Huila y también en la Costa Caribe en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar, incluso presente en áreas suburbanas y urbanas con predominio en el intradomicilio (23). Por otro lado, *Lu. evansi* tiene distribución hacia el caribe históricamente (24), es la principal especie con comportamiento antropofílico en regiones como los Montes de María (Sucre – Bolívar), su poder de adaptación le ha permitido convertirse en un vector urbano para la Leishmaniasis (25,26). En Riohacha en la Guajira existen reportes de su circulación (27). En el departamento de Córdoba se evidencia en zonas de transmisión con casos de LV como San Andrés de Sotavento (20).

Sin embargo, producto de la influencia del fenómeno del cambio climático la distribución geográfica de los insectos en general puede variar, incluso puede predecirse con base a patrones ambientales el establecimiento de nuevos nichos para estos insectos, en zonas no antes habitadas por estos (28). En el 2013 se reportó la presencia de *Lu. longipalpis* departamento de Caldas con una distribución altitudinal no habitual alrededor entre los 392 a 1387 m.s.n.m, lo que evidencia la adaptación de esta especie dado los nuevos contextos climáticos (29).

En la región Caribe Colombia han sido reportadas especies como *Lu. panamensis*, *Lu. micropyga*, *Lu. Shannoni* y *Lu. Atroclavata*, con comportamientos antropofílicos, e identificación de fuente de alimentación humana, la incriminación directa como vectores de esta parasitosis necesita ensayos adicionales, pero abre la posibilidad de más especies vectoras para LV involucradas en Colombia (25).

### Reservorios

Históricamente el perro es el principal reservorio de *L. infantum*, con un papel fundamental en el ciclo de transmisión doméstico y en la

transmission and visceral form of the disease. Canines become reservoirs after a vector insect bearing the parasite bites them; some develop clinical manifestations, mainly onychogryphosis, cachexia, alopecia, and to a lesser extent, lymphadenitis, skin ulcers, and digestive disorders, while others may remain asymptomatic (30).

Within the framework of the study of disease foci, seroprevalence data has been collected in the canine population. A study in the Department of Tolima, an endemic area for this parasitosis, did not find a total correspondence between the symptoms of the dogs and the serologic studies. This could be interpreted as a limited diagnostic test for visceral leishmaniasis, and of course, the national guidelines for managing seropositive animals (30). Another interesting option for serologic tests such as screening tests, is the molecular identification of the parasite; studies in the department of Sucre report a 33.6% prevalence of *Leishmania spp* in canine population (31).

On the other hand, possums (*Didelphis marsupialis*) have been found infected with four species of *Leishmania* (*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* and *L. forattinii*), and are considered as a potential reservoir due to its broad distribution throughout Latin America, in both rural and urban areas (32–34).

Evidence provided during the last years suggest cats as an important reservoir for leishmaniasis. In Iran, a 10% infection rate with *L. infantum* was informed from liver and spleen samples (35); in Brazil, the natural infection with *Lu. longipalpis* was determined based on a cat infected with *L. infantum* (36). Studies in feline population must be enhanced and their role in the transmission chain of the disease must be assessed, since they are domestic animals with high presence in homes (37,38).

Pigs are another group of animals that may prove important in the anthroponotic or domestic transmission cycle of VL due to their role in the economy of rural populations; evidence of parasite specific antibodies leads to the thought that these mammals may play a role in the domestic transmission of this parasitosis. Likewise, studies conducted in endemic areas of the disease in Bangladesh report the presence of *L. infantum* antibodies with a 9.4% positivity in bovine cattle (37). The role of these animals as reservoirs is debated, and further structured studies are necessary in order to truly determine their role in the transmission (37).

forma visceral de la enfermedad. Los caninos se convierten en reservorios tras la picadura del insecto vector infectado con el parásito, algunos desarrollan manifestaciones clínicas principalmente onicogriphosis, caquexia, alopecia, y en menor proporción puede observarse linfadenitis, úlceras cutáneas y trastornos digestivos, mientras que otros pueden permanecer asintomáticos (30).

En el marco de los estudios de foco de la enfermedad se han recopilado datos de seroprevalencia frente al parásito en la población canina, un estudio realizado en Departamento del Tolima, zona endémica para esta parasitosis, no se encontró una total correspondencia entre la sintomatología de los perros versus los estudios serológicos, esto podría interpretarse como una prueba limitada para el diagnóstico de la Leishmaniasis visceral canina y por supuesto las directrices nacionales frente al manejo de animales seropositivos (30). Otra interesante opción frente a las pruebas serológicas como tamizaje, es la identificación molecular del parásito, estudios en el departamento de Sucre reportan una prevalencia del 33.6% de *Leishmania spp* en la población canina (31).

Por otra parte, las zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) se ha encontrado infectada con cuatro especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. forattinii*), es considerada un potencial reservorio por su amplia distribución en América Latina, en áreas rurales y urbanas (32–34).

Evidencias aportadas en los últimos años sugieren a los gatos como un importante reservorio de la Leishmaniasis, en Irán se reportó una tasa de infección 10% de *L. infantum* a partir de muestras de hígado y bazo (35), en Brasil de determino la infección natural de *Lu. longipalpis* a partir de un gato infectado con *L. infantum* (36), los estudios en población felina deben ser ampliadas y evaluar su papel en la cadena de transmisión de la enfermedad, considerando que es un animal doméstico con una alta presencia en los hogares (37,38).

Otros animales que podrían tener una connotación importante en el ciclo de transmisión antroponótica o doméstica de la LV, por su rol en la economía de las poblaciones rurales es el cerdo, la evidencia de anticuerpos específicos contra el parásito hace pensar que este mamífero pudiera tener un papel en la transmisión doméstica de esta parasitosis. De igual estudios realizados en Bangladesh en zonas endémicas de la enfermedad reportan la presencia de anticuerpos contra *L. infantum* con una positividad del 9.4% en ganado vacuno (37). El papel de estos animales como reservorios es cuestionado y deben realizarse estudios

### Medicines used for treating V.L.

In a working paper published in 2013, the Panamerican Health Organization recommended the use of liposomal amphotericin B, pentavalent antimonials, and amphotericin b deoxycholate, indication periodic patient monitoring checking for warning signs of adverse effects of the medicine, as well as verifying adherence to the treatment in order to prevent resistance from appearing (39).

Currently available treatments have adverse effects that may compromise kidney, liver, and heart functions, cause hypersensitivity, and they are contraindicated under certain parameters for children under 1, people above 50, pregnancy, and immunosuppressed patients. Anti leishmanicidal therapy has an extended treatment scheme (20-30 days), and its usually intravenous route of administration leads to lack of adherence due to patient discomfort.

The currently indicated treatment in Colombia is systemic. The use of therapeutic alternatives is subject to medical criteria and specific conditions. The recommended medicines are meglumine antimoniate, miltefosine, pentamidine, and amphotericin B (Table 2). After parasitological confirmation, all patients must undergo a clinical assessment of their heart, kidney, and liver functions, and weekly follow-ups during the whole treatment (15).

Despite this situation, initiatives have been gradually promoted during the last 10 years leading to the search for new therapeutic options, some in the hands of the Drugs for Neglected Diseases initiative. This initiative involves the participation of bodies such as the Malaysian Ministry of Health; the Institute for Medical Research of Kenya; the Indian Council for Medical Research; the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) of Brazil; and the Pasteur Institut of France; Doctors without

estructurados que puedan establecer con veracidad su papel en el ciclo de transmisión (37).

### Farmacos usados en el tratamiento de la L.V.

La Organización Panamericana de la Salud en un documento de trabajo publicado en el 2013 recomendo el uso de Anfotericina B liposomal, antimoniales pentavalentes y anfotericina B desoxicolato, indicando un monitorio periódico al paciente vigilando signos de alerta frente a afectos adversos que pueden presentarse por el medicamento, así como el seguimiento a la adherencia al tratamiento con el fin de evitar la aparición de resistencia frente a los fármacos (39).

Los tratamientos disponibles actualmente tienen efectos adversos que pueden comprometer la función renal, hepática, cardíaca, generar hipersensibilidad, y bajos ciertos parámetros están contraindicados en menores de un año, mayores de 50 años, embarazadas y pacientes inmunosuprimidos. La terapia antileishmanicida tiene un esquema de tratamiento prolongado (20 – 30 días) y su forma de administración, regularmente vía intravenosa, induce a la falta de adherencia, por las molestias que genera en el paciente.

En Colombia en la actualidad el tratamiento indicado es sistémico, el uso de alternativas terapéuticas está condicionado a criterio médico y a condiciones específicas. Los medicamentos recomendados son antimonio de meglumina, miltefosina, pentamidina y anfotericina B (Tabla 2). Posterior a la confirmación parasitológica a todo paciente debe realizarse una evaluación clínica de la función cardíaca, renal y hepática, y un seguimiento semanal durante todo el tratamiento (15).

Pese a este panorama en los últimos 10 años de manera paulatina se han ido promoviendo iniciativas que han llevado a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, algunas en manos de la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi, por sus siglas en inglés de Drugs for Neglected Diseases initiative), en esa

**Table 2.** Medication indicated for VL treatment in Colombia.

Medication	Meglumine antimoniate (First choice)	Miltefosin	Pentamidine	Amphotericin B
Commercial name	Glucantime®	Impávido®	Pentacarinat®	Fungizone®
Presentation	Amp 1.5 g / 5 mL	Cáps 50 mg	Powder 300 mg P.R	Vial 50 mg
Dosage	20 mgs/kg / d for 20-28 days (IM, IV)	2.5 mg/kg/d x 28-40 days	3 mg/kg / d x 4 – 7 doses (IM) applied every other day	1 mg/kg / up to 1.5 grs
Contraindications	Liver, kidney, heart failure Severe malnutrition Pneumonia, TBC Hyperthyroidism Pregnancy Children under 18 months	Pregnancy Radiotherapy	Known hypersensitivity Kidney failure Pregnancy	Liver, kidney, heart failure Severe malnutrition Pneumonia, TBC Hyperthyroidism Pregnancy Children under 6 years

Borders; and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) of UNICEF/UNDP/World Bank, and WHO as permanent observers, and the promotion of the articulation with other public and private research entities in various countries (40).

### **Aiming for a combined therapy**

As a result of the emerging resistance to anti-leishmanicidal components, studies have been carried out in order to assess the effectiveness and cost-benefit of combined therapy. In East Africa, the effectiveness of a combined therapy of miltefosine 100 mg/day and paromomycin plus 15mg/kg/day for 10 days was assessed, achieving a >95% effectiveness; the combination of paromomycin with sodium stibogluconate for 17 days showed a 90% effectiveness (41). Cost-effectiveness analysis indicates that the miltefosine + paromomycin combination is the best cost-effective strategy when compared to other combinations including amphotericin B (42). Likewise, there are some Stage II studies to assess the safety of three therapeutic options: liposomal amphotericin B plus sodium stibogluconate, liposomal amphotericin B plus miltefosine, and only miltefosine in Ethiopia (43).

The Indian National Roadmap for Kala-Azar Elimination document published in November 2014 indicates liposomal amphotericin B in a 10 mg/kg as the first option for treating visceral leishmaniasis in that country. A second option is a combination of paromomycin miltefosine for 10 days; other options include a 28-day treatment with miltefosine or amphotericin B in multiple doses. These recommendations were approved by the WHO due to the results of a stage III study carried out between 2008 and 2010 in said country, which assessed the effectiveness of a combined therapy of liposomal amphotericin B, miltefosine, and paromomycin, and the evidence of the study achieving positive results when using a single intravenous dose of liposomal amphotericin B (40,44). The DNDi started a pharmacovigilance study in South Asia between 2012 and 2015, to assess the safety of three medicine combinations: liposomal amphotericin B + miltefosine, liposomal amphotericin B + paromomycin, and miltefosine + paromomycin. AmBisome (liposomal amphotericin B), paromomycin, and miltefosine (40); study results are not yet available, but as we mentioned above, similar studies in India and Bangladesh have yielded positive results favoring the use of these combinations.

actividad participan entidades como: el Ministerio de Salud de Malasia, el Instituto de Investigaciones Médicas de Kenia, el Consejo para la Investigación Médica de la India, la Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Brasil y el Institut Pasteur de Francia; Medicos Sin Fronteras; y el Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de UNICEF/PNUD/Banco Mundial y OMS, como observador permanente, también se promueve la articulación con otras entidades de investigación de carácter público y privado de diferentes países(40).

### **Apuntado a una terapia combinada**

En consecuencia frente a la emergencia de la resistencia a los compuestos antileishmanicidas, se han realizado estudios para evaluar la efectividad y el costo beneficio de la terapia combinada. En el Este de Africa fue evaluada la efectividad de una terapia combinada miltefosina 100 mg/día más paramomicina plus 15mg/kg/día durante 10 días obteniendo una efectividad mayor al 95%; la combinación paramomicina con estibogluconato de sodio durante 17 días mostró una efectividad del 90% (41). Los análisis de costo efectividad refieren que la combinación miltefosine + paramomicina como la estrategia más costo efectiva frente a otras combinaciones que incluyan anfotericina B (42). Así mismo se adelantan estudios en fase II para evaluar la seguridad de tres opciones terapéuticas: anfotericina B liposomal más estibogluconato de sodio, anfotericina B liposomal más miltefosine y miltefosine solo en Etiopia (43).

En el documento Hoja de Ruta para la Eliminación de Kala-azar de la India (en inglés: Indian National Roadmap for Kala-Azar Elimination) publicado en noviembre de 2014, indican como primera opción terapéutica la Anfotericina B liposomal en una dosis de 10 mg/kg para el tratamiento de Leishmaniasis visceral en este país. Como segunda opción se encuentra la combinación de paramomicina miltefosine en un esquema de 10 días, otras opciones incluyen un tratamiento de 28 días con miltefosine o anfotericina B en multiples dosis. Estas recomendaciones fueron aprobadas por la OMS en consecuencia a los resultados un estudio fase III que se desarrolló entre 2008 – 2010 en ese país donde se evaluó la efectividad de la terapia combinada con anfotericina B liposomal, miltefosine y paramomicina y las evidencias del estudio donde obtienen resultados favorables con la aplicación de anfotericina B liposomal en una sola dosis por vía intravenosa (40,44). El DNDi inicio un estudio de farmacovigilancia en el Sur de Asia entre 2012 – 2015 que evalúa la seguridad de tres combinaciones de medicamentos; anfotericina B liposomal + miltefosine, anfotericina B liposomal + paramomicina y miltefosine + paromomycin. AmBisome (Anfotericina B liposomal), Paramomicina

### **New molecule study**

Some efforts have been placed in redirecting medicines and in assessing combined therapies. Generating drugs against new therapeutic targets is a slow process that requires pre-existing as well as deeper studies of parasite cell biology, although they are always the desired objective. Ideal Target Product Profiles constitute the ideal specifications that a drug must meet considering patient needs and the main characteristics of the healthcare system involved. For the case of visceral leishmaniasis, this work route emphasizes on ideal characteristics such as the absence of adverse effects, a preference for oral administration, with a 10-day therapeutic scheme, and drug stability in tropical climates (45).

Studies developed in the last years have had the purpose of studying pharmaceutical targets such as the dihydrofolate reductase enzyme of the parasite (DHFR), cyclin-dependent kinase, ergosterol biosynthesis pathway, topoisomerase and metacaspase inhibition, and different metabolic pathways (45,46).

During the last years, the High Throughput Screening analysis technique has become more popular. This technique allows assessing large molecule collections to identify their biological activity, and a large-scale initial selection of pharmacological candidates. This methodology facilitates quantification of the ion channel activity, membrane proteins involved in several pathologies, and even promotes the development of complex clinical trials such as metabolic pathway control, monitoring intracellular events, and gene expression profiles, among others. The chemical compounds usually subject to analysis have a known pharmaceutical action. Although expensive due to the required infrastructure and equipment, these methodologies are one of the greatest perspectives in the development of new drugs (47). In the case of leishmaniasis, molecular tests have been carried out to assess their action against promastigotes in vitro, and intracellular amastigotes, generating expectations in regards to the development of metabolites with anti-kinetoplast action (48).

In Africa, sitamaquine, an 8- aminoquinoline was evaluated for treatment of the visceral form, orally administered, with promising results in stage II. However, adverse kidney effects must be assessed, as well as the development of clinical pictures such as methemoglobinemia (49).

y Miltefosine (40), los resultados del estudio aún no se encuentran disponibles, pero como anteriormente se mencionó estudios similares desarrollados en la India y Bangladesh han arrojado resultados positivos favoreciendo el uso de estas combinaciones.

### **Estudio de nuevas moléculas**

Algunos esfuerzos se han direccionado al reposicionamiento de medicamentos y la evaluación de terapias combinadas. La generación de drogas contra nuevos blancos terapéuticos es un proceso lento, que necesitan de estudios preexistentes y más profundos del conocimiento de la biología celular del parásito, pero siendo de cualquier manera el objetivo deseado. Los perfiles ideales de producto objetivo (TPP, por sus siglas en inglés de Target Product Profile) constituyen las especificaciones ideales que debe cumplir un medicamento considerando las necesidades de los pacientes y las características principales del sistema de salud relacionado. En el caso de Leishmaniasis visceral existe esta ruta de trabajo que destacan las características ideales como no presentar efectos adversos, vía de administración preferiblemente oral, con un esquema terapéutico de 10 días y estabilidad del fármaco en climas tropicales (45).

Estudios desarrollados en los últimos años han tenido como objetivo es estudios de blancos farmacéuticos como enzima dihidrofolato reductasa del parásito (DHFR), kinasas dependientes de ciclina, vía de biosíntesis del ergosterol, inhibición de topoisomerasas y metacaspasas, y diferentes vías metabólicas (45,46)

En los últimos años ha tomado fuerza la técnica de Análisis farmacológico de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés de High-throughput screening). La técnica permite la evaluación de grandes colecciones de moléculas para la identificación de su actividad biológica y la selección inicial candidatos farmacológicos a gran escala. Esta metodología permite la cuantificación de la actividad de canales iónicos, proteínas de membrana, implicadas en diversas patologías, incluso favorece el desarrollo de ensayos complejos como: control de rutas metabólicas, monitorización de eventos intracelulares, perfiles de expresión génica, entre otros. Los compuestos químicos sometidos al análisis generalmente se conocen su acción farmacológica. Aunque son metodologías costosas por la infraestructura y equipamiento requerido, son una de las grandes perspectivas para el desarrollo de nuevos medicamentos (47). En el caso de Leishmaniasis se han realizado ensayos moléculas evaluando su acción contra promastigotes in vitro y amastigotes intracelulares, generando expectativas frente al desarrollo de metabolitos con acción anti-kinetoplasto (48).

Compounds such as chalcone, flavonoids, saponins, alkaloids, terpenoids, artemisinin, oxylipin, and guaianolides, among others, derived from plants, are included as leishmanicidal activity; some have *in vitro* essays and high safety indexes to develop stage I clinical trials, or to be proposed for the HTS technique. However, understanding the chemical and molecular characteristics of this type of compounds requires a large amount of time and financial investment (50).

### Conclusions

Visceral leishmaniasis is a disease that mainly affects children under 7 and immunosuppressed patients; since they are vulnerable populations, Latin American government entities must seek the development of new drugs with more tolerable doses and administration routes, and less broad and severe adverse effects. Even though the path for generating new drugs demands a high investment of time and money, our continent must weigh the possibility of implementing single-dose combination therapeutic schemes that will reduce treatment duration, as has already been implemented in Asian countries after gathering the clinical evidence required for such purpose. On the other hand, deforestation, rural settlements and changes in climate parameters have favored vector insect domiciliation and its adaptation to urban environments, which would in turn allow for vector dissemination and the appearance of new disease foci; therefore, entomological vigilance is a good tool for indirect disease tracking, generating information that can predict new foci appearance.

En África se evaluó la sitamaquina un 8-aminoquinolona para el tratamiento de la forma visceral con administración por vía oral, con resultados prometedores en la fase II. Sin embargo, debe evaluarse con detenimiento los efectos adversos a nivel renal y el desarrollo de cuadros como la metahemoglobinemia (49).

Compuestos como Chalcona, flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenoides, artemisina, Oxylipina, guaianolide entre otros, derivados de plantas, figuran como opciones anti-Leishmaniasidas; algunos cuentan con ensayos *in vitro* e índices de seguridad altos para desarrollar ensayos clínicos fase I o perfilarse para ser evaluados por la técnica de HTS. Sin embargo, entender las características químicas y moleculares de este tipo de compuestos requiere una gran cantidad de tiempo e inversión económica (50).

### Conclusiones

La Leishmaniasis visceral es una enfermedad que afecta principalmente a niños menores de 7 años y a pacientes inmunosuprimidos, como poblaciones vulnerables entidades gubernamentales en América Latina deben propender por el desarrollo de nuevos medicamentos con dosis y vías de administración más tolerables y efectos adversos en menor proporción y gravedad. Si bien el camino para la generación de nuevos medicamentos requiere un gran inversión en tiempo y dinero, en nuestro continente se deben evaluar la posibilidad de implementar esquemas terapéuticos con combinaciones y en una sola dosis, los cuales disminuyen los días de tratamiento, como se ha venido implementado en países asiáticos luego de reunir las evidencias clínicas necesarias para esta directriz. Por otro lado, la deforestación, asentamientos rurales y cambio en los parámetros climáticos han permitido la domiciliación del insecto vector y su adaptación en ambientes urbanos, lo que podría permitir la diseminación del vector y favorecer de nuevos focos de la enfermedad, por lo cual la vigilancia entomológica es una buena herramienta en el seguimiento indirecto de la enfermedad, generando información que puede predecir la aparición de nuevos focos.

## REFERENCES

1. Fernández MJ, Charry CT, Bello GF, Escovar J, Lozano C, Ayala S M, et al. Prevalence of canine visceral leishmaniasis in municipalities of Huila, Colombia. *Rev Salud Pública* 2016; 4(3):278–85.
2. Ready P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014; 6:147.
3. Cruz-Hernández V, León-Tapia S, Cruz-Reyes MÁ, Sosa-López R, Arango-Díaz Á, González-Sánchez E. Leishmaniasis visceral, reporte de cuatro casos y revisión de la bibliografía. *Med Interna México* 2013; 29(2):204–9.
4. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354(9185):1191–9.

5. OMS | Leishmaniasis [Internet]. Nota descriptiva No. 375 Febrero de 2015. World Health Organization; 2015 [cited 2016 May 11]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
6. Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* 2015; 148:128–36.
7. Pan American Health Organization. LEISHMANIASIS Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis Nº 2 - June, 2014 [Internet]. 2014. Available from: <http://new.paho.org/leishmaniasis>
8. Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas [Internet]. 2015 [cited 2016 May 13]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=es)
9. Albuquerque LCP de, Mendonça IR, Cardoso PN, Baldaçara LR, Borges MRMM, Borges J da C, et al. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of visceral leishmaniasis in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 47(1):38–46.
10. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(9):e3136.
11. Roselino AM, Chociay MF, Costa RS, Machado AA, Figueiredo JF de C. L. (L.) chagasi in AIDS and visceral leishmaniasis (kala-azar) co-infection. *Rev do Inst Med Trop São Paulo* 2008; 50(4):251–4.
12. Jarvis JN, Lockwood DN. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2013; 26(1):1–9.
13. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(5):e1665.
14. Pintado V, López-Vélez R. Leishmaniasis visceral asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19(7):353–7. A
15. Ministerio de la protección Social; Instituto Nacional de Salud; Organización Panamericana de la Salud. Guía para la Atención Clínica Integral del paciente con Leishmaniasis [Internet]. Bogotá; 2010 [cited 2016 May 13]. Available from: [http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/leishmaniasis\\_viceral/02 clinica leishmaniasis.pdf](http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/leishmaniasis_viceral/02 clinica leishmaniasis.pdf)
16. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico No. 52 de 2015 [Internet]. Bogotá; 2015 [cited 2016 May 13]. Available from: [http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn\\_Epidemiologico/2015 Boletin epidemiologico Semana 52.pdf](http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn_Epidemiologico/2015 Boletin epidemiologico Semana 52.pdf)
17. Cantillo-Barraza O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo AM, Calle J, Triana O. Distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en la Isla Margarita del departamento de Bolívar, Colombia. *Biomédica*. 2010; 30(3):382–9.
18. Hernández CPZ, Sotelo MSA, Oviedo OPF, Barraza OC, Toro GR. Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia [Internet]. *CIENCIA EN DESARROLLO*. 2016; 7(1):83–91. Available from: [http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia\\_en\\_desarrollo/article/view/4234](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/view/4234)
19. Zambrano Hernandez C del P, Ayala Sotelo MS, Fuya Oviedo OP, Montenegro Puentes CA, Aya Vanegas NM, Rodriguez Toro JG, et al. Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva (Huila), 2012. *Rev Salud Pública* 2015; 17(4):514–27.
20. Vélez ID, Travi BL, Gallego J, Palma GI, Agudelo S del P, Montoya J, et al. Evaluación ecoepidemiológica de la leishmaniasis visceral en la comunidad indígena Zenú de San Andrés de Sotavento, Córdoba: primer paso para su control. *Rev Colomb Entomol*. 1995;21(3):111–22.
21. Vivero RJ, Torres-Gutierrez C, Bejarano EE, Peña HC, Estrada LG, Florez F, et al. Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of Leishmania transmission in Colombia. *Parasit Vectors* 2015; 8(1):116.

22. Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(3):e638.
23. Vivero RJ, Bejarano EE, Pérez-Doria A, Flórez F, Estrada LG, Torres C, et al. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), en los alrededores de la Ciudad de Sincelajo, Colombia. *Biota Neotrop*, 2009; 9(4):277–80.
24. Cortés Alemán L, Pérez-Doria A, Bejarano Martínez EE. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) antropofílicos de importancia en salud pública en Los Montes de María, Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 2009; 61(3):220–5.
25. Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, et al. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Trop* 2016; 153:86–92.
26. M. JIG, Vélez ID. Presencia en Isla Fuerte, Bolívar de *Lutzomyia evansi* vector de leishmaniosis visceral. *Iatreia*. 1994; 7(1):33–5.
27. Barreto M, Burbano ME, Barreto P. Registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. *Colombia Médica*. 2006; 37(1):39–45.
28. González C, Paz A, Ferro C. Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species under climate change scenarios in Colombia. *Acta Trop* 2014; 129:83–90.
29. Acosta LA, Mondragón-Shem K, Vergara D, Vélez-Mira A, Cadena H, Carrillo-Bonilla L. [Expansion of the distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) in the department of Caldas: Increased risk of visceral leishmaniasis]. *Biomédica* 2013; 33(2):319–25.
30. Romero M, López M, Echeverry M, Rivas F. Canine Visceral Leishmaniasis: Diagnostic tests do not detect real state of the infection. *Rev Salud Pública* 2008; 10(2):290–8.
31. Paternina-Gómez M, Díaz-Olmos Y, Paternina LE, Bejarano EE. Alta prevalencia de infección por *Leishmania* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) en caninos del norte de Colombia. *Biomédica* 2013; 33(3):375–82.
32. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014; 3(3):251–62.
33. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(5):557–65.
34. Travi B. Leishmaniasis visceral canina. *Rev MVZ CORDOBA*. 2000; 5(1):29–32.
35. Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM, et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10(3):313–6.
36. da Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo N de F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 174(1–2):150–4.
37. Alam MS, Ghosh D, Khan MGM, Islam MF, Mondal D, Itoh M, et al. Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Vet Res* 2011; 7(1):27.
38. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2009; 136(14):1915–34.
39. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis visceral en las Américas Recomendaciones para el Tratamiento [Internet]. Washington, DC; 2013. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22226&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid)
40. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). New VL treatments – Asia – DNDi [Internet]. 2015 [cited 2016 May 19]. Available from: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/new-vl-treatments-asia/>

41. Olliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23(6):595–602.
42. Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Rijal S, Faiz MA, et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(9):e818
43. Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EAG, Younis BM, Abuzaid AA, et al. Safety and efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2011; 12:166
44. Directorate of National Vector Borne Disease Control, Programme (NVBDCP), Directorate General of Health Services Minister of Health & Family Welfare 22 Sham Nath Marg D-54. National Roadmap for Kala-Azar Elimination Agosto 2014 [Internet]. Delhi; 2014. Available from: [http://nvbdcp.gov.in/Doc/Road-map-KA\\_2014.pdf](http://nvbdcp.gov.in/Doc/Road-map-KA_2014.pdf)
45. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs drug Resist* 2012; 2:11–9.
46. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(6):485–97.
47. Don R, Ioset J-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 2014; 141(1):140–6.
48. Siqueira-Neto JL, Song O-R, Oh H, Sohn J-H, Yang G, Nam J, et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(5):e675.
49. Loiseau PM, Cojean S, Schrével J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite* 2011; 18(2):115–9.
50. Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* 2011; 18(12):1056–69.