

ARTÍCULO

Impacto de fenómenos naturales (deslaves y vaguadas) sobre la epidemiología de la leishmaniasis cutánea en zonas del estado Mérida, Venezuela.

Noris Rodríguez⁽¹⁾, José Carrero⁽²⁾, Héctor De Lima⁽¹⁾, Irene Sandoval⁽¹⁾, Alexis Fernández⁽¹⁾, Miguel Barrios⁽¹⁾.

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en un estudio clínico-epidemiológico, realizado en varias comunidades aledañas a la cuenca del río Mocoties del Estado Mérida, afectadas por la vaguada ocurrida en los meses de Enero y Febrero de 2005. Para ello se realizaron encuestas casa por casa para evaluar el conocimiento de la población sobre la enfermedad, así como para detectar lesiones sospechosas. Se tomaron muestras de las lesiones para diagnóstico parasitológico confirmatorio; así mismo se realizó la captura de animales silvestres a los cuales se les tomó muestras de sangre, hígado y bazo para diagnóstico. Los resultados obtenidos confirmaron 71 casos de leishmaniasis cutánea para el año 2006, número que es bajo en comparación con el 2004. Se capturaron 101 animales silvestres pertenecientes a las especies *Didelphis marsupialis*, *Rattus rattus* y *Sigmodon hispidus*, de los cuales el 19% resultaron infectados con *Leishmania* sp. Las técnicas moleculares permitieron demostrar la presencia de *Leishmania (V) braziliensis* tanto en los humanos como en los animales. La disminución en el número de casos en el 2006 podría deberse al cambio en las condiciones climáticas y ecológicas que estarían afectando la eficiencia de los transmisores de la leishmaniasis. Hasta el presente, un bajo número de *Lutzomyia* sp han sido capturadas.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea, vaguada, deslave, reservorios, epidemiología, Venezuela.

ABSTRACT

Impact of natural disasters (leaching and watercourse) on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in areas of Mérida State, Venezuela.

We present the results obtained in a clinical and epidemiological study, carried out in various communities next to the cuenca of the Mocoties river in the state of Mérida, affected by the leaching occurred in the months of January and February of 2005. For this we carried out several surveys home by home to evaluate the knowledge of the population about the disease, also to detect suspicious lesions. We took samples of the lesion for parasitological diagnosis; also we captured wild animals to take samples of blood, liver and spleen for parasite identification. The results obtained show 71 cases of leishmaniasis for the year 2006, number that is low in comparison with the year 2004. There were captured 101 wild animals belonging to the species *Didelphis marsupialis*, *Rattus rattus* and *Sigmodon hispidus*, of which 19% resulted infected with *Leishmania* sp. The molecular techniques allowed to

demonstrate the presence of *Leishmania (V) braziliensis* both in human and animals. The diminishing in the number of cases in 2006 could be due to the climatic and ecological conditions that are affecting the efficiency of the leishmaniasis transmitters. Until present, very low number of *Lutzomyia* sp have been captured.

Key words: cutaneous leishmaniasis, watercourse, leaching, reservoirs, epidemiology, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad tropical infecciosa, causada por protozoarios de la familia Trypanosomatidae del género *Leishmania* spp. Por lo menos, 20 especies son capaces de producir la enfermedad en el hombre y es transmitida por la picadura de insectos infectados por el parásito. Los insectos son mosquitos hembras del género *Phlebotomus*, clase Insecta, Orden Díptera, (en el Viejo Continente) o *Lutzomyia*, del mismo orden (en el Nuevo Continente). La leishmaniasis puede ser considerada como una antroponosis si el reservorio es humano o una zoonosis si es animal, lo cual es más frecuente. Los reservorios animales son mamíferos domésticos o silvestres, tales como perros, roedores y perezas (1, 2), aunque el perro es considerado ampliamente como el reservorio para los parásitos que ocasionan las formas viscerales de la enfermedad.

En Venezuela, la enfermedad se observa principalmente en áreas de clima tropical con temperatura media anual de 25°C ó mayor, humedad atmosférica de 75% ó más y alturas de 0 a 800 metros sobre el nivel del mar (no obstante se han registrado casos en áreas de mayor altitud). Tradicionalmente las áreas más afectadas son las rurales, boscosas, selváticas y de actividad agrícola donde se comporta como una enfermedad endémica, generalmente las epidemias se han registrado cuando los grupos de población penetran en las zonas boscosas con diferentes propósitos (3).

Según cifras del Instituto de Biomedicina, entre 1970-2006 se han presentado en el país 35.140 casos de leishmaniasis cutánea localizada (LCL), solo en el último año se produjeron 2.527 casos, de los cuales 71 se presentaron en Mérida.

En el estado Mérida, según los registros del Servicio de Dermatología Sanitaria de Tovar; los Municipios en la zona del río Mocoties son los que presentan mayor número de casos e impacto, entre ellos el Municipio Antonio Pinto Salinas (Santa Cruz de Mora) y Quebrada del Loro del Municipio Sucre, son los focos más activos. Para el 2004 Pinto Salinas presentó una tasa de incidencia de 78,55 casos/100.000 habitantes, Tovar 23,5 casos /100.000, y Sucre: 24,05 por cada 100.000 habitantes.

En el estado Mérida se han descrito varias especies de *Leishmania* como agentes causales de la LCL. Algunos autores proponen a *Leishmania garnhami* como el agente etiológico de la leishmaniasis cutánea en la cordillera de los

(1) Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, San Nicolás a Providencia, Caracas, Venezuela. (2) Ministerio del Poder Popular para la Salud y Desarrollo Social, Servicio de Dermatología Sanitaria, Municipio Tovar, Estado Mérida.

Correspondencia: Noris Rodríguez. E-mail: nmrodric@gmail.com

Financiamiento: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, Proyecto UCV-Sociedad No PSU-0900 6182-2005 y el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Andes (4); un estudio realizado utilizando PCR con oligonucleotidos especie específicos, demostraron la presencia de *L. braziliensis* y *L. mexicana* en pacientes con LCL provenientes de todos los estados del País incluyendo el estado Mérida (5). Reportes más recientes realizados con el uso de técnicas moleculares, reportaron la presencia de *Leishmania (V.) braziliensis* en 8 pacientes con LCL provenientes de caseríos ubicados en las cercanías de las cuencas de los ríos Chama-Mocoties del estado Mérida (6).

En cuanto a los reservorios de la zona, los trabajos realizados en el Municipio Tovar, donde se capturaron 215 animales silvestres pertenecientes a tres especies, permitieron comprobar la presencia de *Leishmania guyanensis* en un ejemplar de la especie *Rattus rattus* (2). Sobre los transmisores, *Lu. ovallesi* es una de las especies más abundantes y con un amplio rango de distribución en los Andes Venezolanos (7). Sin embargo, los factores ambientales afectan la distribución de animales silvestres así como de flebotomos ya que los mismos dependen de la existencia de sus fuentes de alimentación en el medio ambiente, así como de la temperatura y de la humedad relativa en el caso de los flebotomos, por lo que se espera que las alteraciones en el micro-ambiente incidan sobre la cadena epidemiológica de la leishmaniasis en las zonas afectadas por desastres naturales.

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en un estudio clínico epidemiológico realizado en el estado Mérida, principalmente en aldeas aledañas a la cuenca del río Mocoties después de la vaguada ocurrida en el año 2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de pacientes.

Toda persona con una lesión sospechosa o con síntomas clínicos de leishmaniasis cutánea o visceral, fue evaluada clínicamente y se le realizó una historia, utilizando el modelo del servicio de Dermatología Sanitaria. Para el diagnóstico parasitológico, se tomó un frotis y se aplicó leishmanina. De ser positivo el frotis o la intradermoreacción, se tomó una biopsia para el aislamiento del parásito en medios artificiales de cultivo y PCR para la identificación de la especie de parásito infectante. En los casos de pacientes con úlceras extensas e infección secundaria, se procedió inicialmente al tratamiento y asepsia de la úlcera para luego tomar la muestra para los estudios mencionados. A los pacientes con sospecha de Leishmaniasis visceral se le tomó una muestra de sangre para el estudio parasitológico por PCR.

Estudio de posibles reservorios.

Simultáneamente con el estudio de la enfermedad en el humano, se realizaron evaluaciones en las mismas áreas endémicas para determinar los posibles reservorios de la enfermedad. Se efectuaron capturas mensuales durante un período de 10 días cada mes, para lo cual se dispusieron un total de 30 trampas por área, las cuales se colocaran en el peridomicilio, en las zonas de cultivo y en las zonas boscosas cercanas al domicilio. Las trampas se revisaron diariamente por personas de las comunidades debidamente entrenadas. Los animales capturados se mantuvieron en jaulas, en un lugar acondicionado en las zonas de estudio hasta el momento de su procesamiento. En primer lugar, se realizó la identificación taxonómica de los animales capturados y examen físico para buscar lesiones sospechosas, luego se procedió a la toma de sangre por punción cardíaca para realizar un examen en fresco, un extendido para teñir con Giemsa y cultivo. Cuando alguno de los tres exámenes resultó positivo, el animal fue

sacrificado en atmósfera de éter y se tomaron muestras de hígado, bazo y ganglio para PCR y cultivo.

Diagnóstico parasitológico por PCR.

Las biopsias tomadas de humanos con lesiones sospechosas de leishmaniasis y de animales silvestres, se colocaron en un tubo de 1,5 ml conteniendo 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA, pH 8) + 5 µg/ml de proteinasa K, posteriormente las muestras fueron incubadas a 56° C durante 1 hora y una vez lisadas se procedió a la extracción del ADN utilizando el método de extracción con fenol/cloroformo (8, 9). El ADN se precipitó de la fase acuosa con 2,5 volúmenes de etanol a -20° C durante 2 horas y luego fue recolectado mediante centrifugación y finalmente se resuspendió en buffer TE. 100ng de ADN fueron utilizados en la reacción de PCR, en una mezcla que contiene: 2,5mM deoxinucleotidos (dNTPs), 5 Unidades de Taq Polimerasa, 10 µl de agua estéril y 200 ng de cada primer (B1= 5'-GGGGTTGGTGAATATAGTGG-3'; B2= 5'-CTAATTGTGCACGGGGAG-3'). La mezcla fue protegida con 20 µl de aceite mineral y colocada en un termociclador (PT 100, MJ Research) para su amplificación, utilizando el siguiente programa: 5 min a 95° C para denaturar el ADN y luego 35 ciclos que constan de 1 min a 94° C, 1 min a 60° C, 1 min a 72° C. El producto final obtenido, fué visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml).

Preparación de ácidos nucleicos y análisis de restricción.

Los aislados fueron cultivados masivamente en medio SDM-79 +5% de suero fetal bovino para aislamiento de ácidos nucleicos. Los parásitos fueron recolectados en fase exponencial, por centrifugación a 7.000 RPM y lavados tres veces con PBS a la misma velocidad; finalmente se resuspendieron en 1 ml del mismo buffer y se contaron en cámara de Newauer. La concentración de parásitos se ajustó en 1x10⁹/ml, luego se lisaron en buffer (Tris-EDTA pH 8, SDS 10%). Para la extracción de ADN de kinetoplasto o ADN total se siguieron los procedimientos previamente descritos (8, 9) según sea el caso. Posteriormente 10µg de ADN total o de ADN de kinetoplasto fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción, una vez digeridos, los patrones generados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 o al 1% respectivamente. Los productos de la digestión se visualizaron mediante luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio.

Hibridación de ADN en dot blot.

10 µl del producto amplificado por PCR fue aplicado directamente sobre papel de nitrocelulosa, después de secar al aire, el ADN fue desnaturalizado sobre el papel con 10 µl de NaOH 1 N, inmediatamente se realizó la neutralización con 10 µl de acetato de amonio 2N. La nitrocelulosa se secó en horno de vacío durante una hora a 80° C; luego se procedió a la pre-hibridación durante toda la noche en buffer que contiene (5XSSC, 1% SDS, 5X Denhardt, 50µg/ml de esperma de salmón y 50% formamida). La hibridación se realizó durante 12 horas utilizando el mismo buffer en presencia de la sonda marcada con digoxigenina (Boehringer-Manhein), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

RESULTADOS

Diagnóstico parasitológico de los pacientes.

Entre Enero y Diciembre de 2006 se registraron 71 casos de LCL en el estado Mérida de los cuales solo 15 fueron atendidos en el Servicio de Dermatología Sanitaria de Tovar, provenientes de las zonas cercanas a este municipio. La Fig.1

representa el número de pacientes por comunidades, comparado con el número de pacientes que fueron atendidos en 2004, donde se presentaron 299 casos de LCL en el estado, siendo atendidos 86 pacientes en el Servicio; esto demuestra una disminución en 75% del número de casos registrados en la zona con respecto al 2004.

Captura e identificación de animales silvestres.

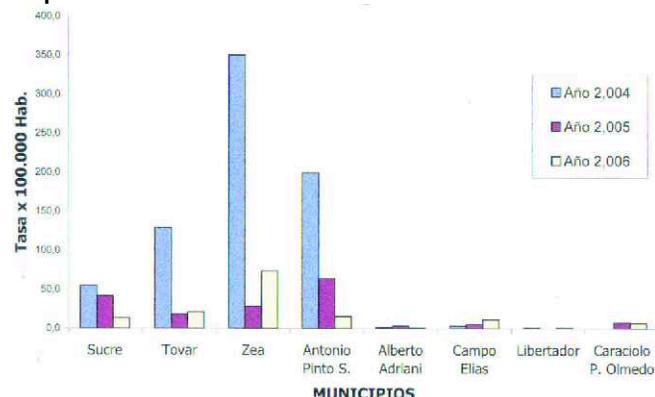


Figura 1. Representa la incidencia de casos de leishmaniasis (número de casos /100.000 habitantes) en las comunidades aledañas a la cuenca del río Mocotíes. Se compara la incidencia en el año 2004 (antes de la vaguada), 2005 (año de la vaguada) y 2006 (posterior a la vaguada).

La Tabla 1 muestra el número y la especie de animales silvestres capturados en el período comprendido entre Marzo 2006 y Abril 2007. En este período se capturaron 101 animales pertenecientes a tres especies siendo la más abundante *Rattus rattus* (86), seguida por *Didelphis marsupialis* (11) y *Sigmodon hispidus* (4), encontrándose un total de 19 animales con PCR positivo para *L.(V.) braziliensis*. Adicionalmente se lograron aislar 8 cultivos de los cuales 7 fueron provenientes de *Rattus rattus* y 1 cultivo de *Didelphis marsupialis*. Los cultivos fueron utilizados para la caracterización molecular de los aislados.

Caracterización molecular de aislados de *Leishmania* sp.

Tabla 1. Especies y N° de animales silvestres capturados.

Especie	Nº de Animales	Cultivo +	PCR +
<i>Rattus rattus</i>	86	7	14
<i>Didelphis</i>	11	1	4
<i>Sigmodon hispidus</i>	4	0	1

La Fig. 2 A es una muestra de los resultados obtenidos al realizar la PCR con los oligos específicos para *Leishmania braziliensis*. La banda diagnóstica de 780 pares de bases esta presente en todas las muestras de animales (líneas 1-5) y en las muestras de pacientes (6,7,8), la misma banda esta presente en los aislados de referencia internacional correspondiente a *Leishmania braziliensis* (M2903, línea 9); *Leishmania guyanensis* (M4147, línea 10) y *Leishmania panamensis* (LS96, línea 11).

La Fig. 2 B corresponde al patrón de restricción generado después de la digestión del producto de PCR con la enzima RsaI, observándose que el patrón de los aislados se corresponde con el patrón generado por *L. braziliensis*

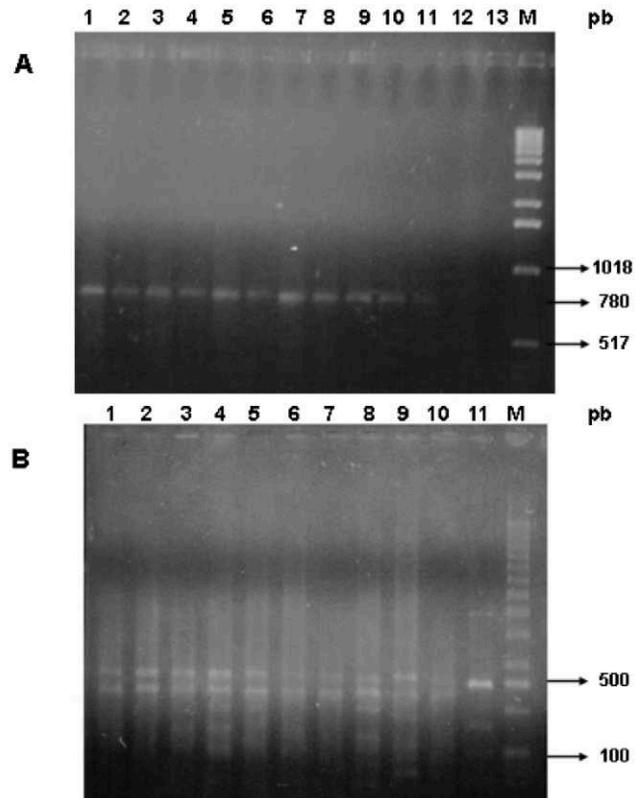


Figura 2 A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR realizada con los oligonucleotidos B1 y B2. La corrida se realizo a 80 Voltios y posteriormente los gels fueron fotografiados con película Polaroid 665. Líneas 1-5.- Muestras de animales silvestres; líneas 6-8.- Muestras de pacientes con LCL; línea 9.- *L.(V.) braziliensis* (M2903); línea 10.- *L.(V.) guyanensis* (M4147); línea 11.- *L.(V.) panamensis* (LS94); línea 12.- *L.(L.) mexicana* (PH8); 13.- Control negativo; M.- Marcadores de peso Molecular (1Kb Plus DNA, Gibco-BRL).

Figura 2 B. Electroforesis de los productos de PCR digeridos con la enzima RsaI. Líneas 1-5.- Muestras de animales; líneas 6-8.- Muestras de pacientes; línea 9.- *L.(V.) braziliensis* (M2903); línea 10.- *L.(V.) guyanensis* (M4147); línea 11.- *L.(V.) panamensis* (LS94); M.- Marcadores de peso molecular.

corresponde con el patrón generado por *L. braziliensis* observándose bandas entre 500 y 100 pares de bases, producto de la digestión.

La hibridación en dot blot (Fig. 3) utilizando una sonda especie específica LbJ38 (9) para *L. braziliensis*, marcada con digoxigenina, revelaron la alta homología entre los aislados de animales silvestres (Muestras 1, 2, 3, 4 y 5) así como de pacientes (muestras 6, 7 y 8) con la sonda específica, dicha hibridación es comparable con la obtenida para la cepa de referencia internacional *L.(V.) braziliensis* (M2903) correspondiente a la muestra 10.

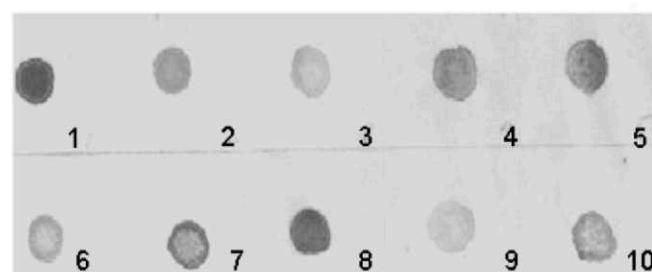


Figura 3. Hibridación en dot blot del ADN de kinetoplasto de los distintos aislados con la sonda LbJ38, marcada con digoxigenina. Muestras 1-5 corresponden a muestras de animales; muestras 6-8 corresponden a pacientes de LCL; muestra 9.- *L.(V.) guyanensis* (M4147); muestra 10.- *L.(V.) braziliensis* (M2903).

DISCUSIÓN

La leishmaniasis cutánea, se describe como una zoonosis selvática, en la cual el hombre se infecta en la medida que habita o trabaja en el ambiente natural de los vectores y reservorios (10, 11). La dinámica ecológica de las regiones selváticas, hacen posible la persistencia de la cadena epidemiológica de la leishmaniasis, la cual involucra vectores y reservorios que a su vez dependen de condiciones climáticas y topográficas adecuadas para su mantenimiento y reproducción.

Diversos estudios llevados a cabo en diferentes partes del mundo han mostrado la estrecha relación entre el clima y los patrones de distribución espacial y temporal de plagas y enfermedades, tal como ocurre con los fenómenos conocidos como el Niño y la Niña (12). Se ha demostrado que el fenómeno del Niño ha tenido influencia sobre la incidencia de paludismo y dengue en Colombia (13, 14). En relación con la leishmaniasis, se ha demostrado (15), que la incidencia de leishmaniasis visceral en Brasil se incrementaba en más de un tercio respecto al año previo cuando ocurría el fenómeno El Niño. Más recientemente en Colombia (16) y en el noroeste de Venezuela (17) han demostrado que la variabilidad climática esta influyendo en la enfermedad.

Los resultados preliminares obtenidos en el presente trabajo sugieren que el cambio en las condiciones ecológicas y climáticas debida a la vaguada y consecuente deslave ocurrida en las zonas adyacentes a la cuenca del río Mocoties, en el estado Mérida, puede haber afectado la ocurrencia de casos de leishmaniasis, pasando de 299 casos en 2004 a 137 en 2005 y 71 en 2006, ésta disminución probablemente se debe a la falta de vectores eficientes para transmitir el parásito, ya que se ha observado baja densidad de las especies transmisoras. Contrariamente, el porcentaje de animales silvestres infectados se incrementó considerablemente; en este estudio se reporta un porcentaje de infección por *Leishmania* del 19% en comparación con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado entre 1999 y 2000, en la misma zona, donde se capturaron 215 animales y solo un ejemplar (0,45%) de la especie *Rattus rattus*, resultó positivo para *Leishmania guyanensis* (2).

En este trabajo, se confirma el papel de esa especie como reservorio de *Leishmania*, sin embargo lo encontramos infectado con *Leishmania braziliensis*, verificandose también *Didelphis marsupialis* infectado con esta misma especie de *Leishmania*, tal como ya ha sido reportado en Brasil donde éste marsupial ha sido considerado como reservorio potencial para *L. braziliensis* y *L. donovani* (18).

Los estudios moleculares confirman la presencia de *Leishmania braziliensis* tanto en las especies de animales mencionadas así como en las muestras de pacientes analizadas, lo cual confirma los hallazgos previos (5,19) donde se reporta a *L. braziliensis* como el agente más importante desde el punto de vista epidemiológico responsable de la leishmaniasis cutánea en Venezuela.

A pesar de que el número de reservorios silvestres infectados es alto, se observa una disminución en el número de casos humanos, lo cual podría explicarse por la disminución en el número de transmisores ya que las condiciones ecológicas y climáticas, indispensables para su desarrollo se encuentran alteradas, tal como ocurre después del fenómeno de La Niña, donde se ha observado una disminución de enfermedades

transmitidas por vectores (20); sin embargo, debe llamarse la atención a las autoridades de salud así como a la población que habita en las áreas endémicas, para estar atentos y tomar las previsiones necesarias para minimizar el contacto con los transmisores que activarían su multiplicación cuando se restablezcan las condiciones climáticas y ecológicas necesarias para su reproducción.

AGRADECIMIENTOS

A Jesús Ignacio Contreras y José Gregorio Contreras Molina por el apoyo para la captura y cuidado de los animales y a los concejos comunales de los Municipios Tovar y Zea por su apoyo y participación en las visitas casa por casa.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Lima H; De Guglielmo Z; Rodriguez A; Convit J; Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and Black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara State, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97 (2): 169-174.
2. De Lima H; Carrero J; Rodriguez A; De Guglielmo Z; Rodriguez N. Trypanosomatidae de importancia en salud publica en animales silvestres y sinantrópicos en un área rural del Municipio Tovar del Estado Mérida, Venezuela. Biomédica. 2006; 26: 42-50.
3. D'Suze C; García C. Epidemiología de la Leishmaniasis. Dermatol. Venez. 1993; 31(2): 4 – 11.
4. Scorza JV; Valera M; De Scorza C; Carnevali M; Moreno E y Lugo A. A New species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg. 1979; 73:293-298.
5. Rodriguez N; Cardona M; Zerpa O; Barrios M; Sosa A; Fernández A. Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp en áreas endémicas de Venezuela. Bol. Malariol. San. Amb. 2001; 41(2): 21-26.
6. Lugo-Yarbu A; Valera M; Alarcón M; Moreno E; Premoli-Percoco G; Colasante C. Detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en el endotelio vascular de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada. Investigación Clínica. 2003; 44 (1): 61-76. ISSN 0535-5133.
7. Nieves E; Dávila D; Palacios-Pru E. Daño ultra estructural del intestino medio abdominal de *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae) ocasionado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Parasitol Latinoam. 2004; 59:115-122.
8. Rodriguez N; Guzmán B; Rodas A; Takiff H; Bloom B; Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasite by PCR and hybridization. J. of clinic. Microbiol. 1994; 9: 2246-2252.
9. Rodriguez N; De Lima H; Rodriguez A; Brewster S; Barrer D.C. Identification of a repetitive DNA sequence from *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Venezuelan strain. Parasitol, 1994; 115: 349-358.
10. Agudelo LA; Uribe J; Sierra D; Ruiz F; Vélez ID. Presence of American Cutaneous leishmaniasis vectors surrounding the city of Medellín, Colombia. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(5): 641-42.

11. Palma G; Gutierrez Y. Laboratory diagnosis of Leishmania. Clin Lab Med. 2002; 11(4): 909-22.
12. Kovats RS; Bouman MJ; Hajat S; Worrall E; Haines A. El Niño and Health. Lancet. 2003; 362: 1481-1489.
13. Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector borne diseases. Clin. Microb. Rev. 2004; 17: 136-173.
14. Poveda G; Rojas W; Quiñones ML; Vélez ID; Mantilla RI; Ruiz D. Coupling between annual and ENSO timescales in the malaria association in Colombia. Environ Health Perspec. 2001; 5: 489-93.
15. Franke C; Ziller M; Staubach Ch. Impact of El Niño/Southern oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 914-917.
16. Cardenas R; Sandoval CM; Rodriguez-Morales AJ; Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in Northeastern Colombia. Am. J. Trop. Med and Hyg. 2006; 75(2): 273-7.
17. Gabaniel G; Rada L; Blanco JJ; Rodriguez- Morales AJ; Escalera JP. Impacto de los eventos del Niño Southern Oscillation (ENSO) sobre la leishmaniasis cutánea en Sucre, Venezuela, a través del uso de información satelital, 1994-2003. Rev. Peru. Med Exp. Salud Publica. 2005; 22(1): 32-38.
18. Schallig H.D; Da Silva E.S; Van der Meide W.F; Schoone G.J; Montijo C.M. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2007; 7(3): 387-93.
19. Rodriguez N; De Lima H; Aguilar C.M; Rodriguez A; Barker D.C; Convit J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; Supl 1: 105-109.
20. Pabón JD; Nicholls RS. El cambio climático y la salud humana. Biomédica. 2005; 25 (1): 1-4.