

COMUNICACIÓN BREVE

## Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela

Dalila Hernández <sup>1</sup>, Elina Rojas <sup>1</sup>, José Vicente Scorza <sup>1</sup>, Alicia Jorquera <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela.

**Introducción.** En Trujillo, Venezuela, la prevalencia de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es de 38 por 100.000 habitantes.

**Objetivo.** En una localidad periurbana, rural, de la ciudad capital, estudiamos a los perros caseros (*Canis familiaris*) para investigar mediante la técnica de xenodiagnóstico la eventual capacidad para infectar a *Lutzomyia youngi*, especie flebotomina con actividad vectorial intradomiciliaria comprobada y abundante en el área de estudio.

**Materiales y métodos.** Los perros con lesiones sugestivas de LTA, parasitológicamente diagnosticados, fueron seleccionados para el xenodiagnóstico permitiendo a flebótomos silvestres de una zona libre de LTA alimentarse *ad libitum* sobre toda la superficie corporal de cada animal, y evidenciar, en disecciones efectuadas a los 5 días post-ingesta, la posible presencia de flagelados en sus tractos digestivos, en cuyo caso, fueron evaluados por la técnica PCR-Multiplex para determinar la identidad del parásito.

**Resultados.** Un total de 455 flebótomos se ingurgitaron sobre dos perros en tres evaluaciones distintas; en una única ocasión, se observaron promastigotes en 4 (0,88%) insectos, cuya identificación molecular reveló pertenecían al subgénero *Viannia*.

**Conclusión.** El perro casero constituye un potencial factor de riesgo intradomiciliario en el ciclo de la LTA.

**Palabras claves:** leishmaniasis, perros, xenodiagnóstico, PCR, factores de riesgo.

### **Dog (*Canis familiaris*) infectivity to *Lutzomyia youngi* in Trujillo, Venezuela**

**Introduction.** In Trujillo, Venezuela the prevalence for American tegumentary leishmaniasis (ATL) is 38 per 100.000 inhabitants.

**Objective.** In a periurban, rural settlement of the capital city Trujillo, we studied the potential capability of the domestic dog (*Canis familiaris*) as a source of infection for *Lutzomyia youngi*, a phlebotomine sand fly species abundant in the study area and whose domestic vectorial activity has been proven.

**Materials and methods.** Dogs with dermal lesions suggestive of ATL and parasitological confirmation of infection, were selected for xenodiagnosis by allowing sylvatic phlebotomines from a ATL free area, to feed *ad libitum* over each animal's entire body surface. The insects' intestinal tracts were dissected 5 days after the blood meal in order to look for flagellate forms. When these were found, parasitological identification was performed by the multiplex-PCR technique.

**Results.** Four hundred and fifty five sand flies engorged over two dogs in three different assays; promastigotes were found in 4 (0.88%) of the specimens on only one occasion. PCR identified DNA of the *Leishmania Viannia* subgenus.

**Conclusion.** The household dog has the potential of being a domestic risk factor in the ATL transmission cycle.

**Key words:** leishmaniasis, dogs, xenodiagnosis, PCR, risk factors.

En Venezuela, la leishmaniasis tegumentaria americana es un importante problema de salud pública que ocurre en casi todo el territorio, especialmente en la región de los Andes, donde el estado Trujillo reporta oficialmente una prevalencia de 38 en 100.000 habitantes (1), aunque se reconoce un notable subregistro de casos (2).

En la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria americana, se han descrito modificaciones asociadas con la evolución de la relación parásito-hopedor; la inicial concepción enzoótica de la infección (3) ha adoptado un carácter zoonótico definido por el desarrollo y progreso de actividades humanas que han acompañado un incremento de la incidencia de la enfermedad y enmarcado un ciclo urbano y suburbano de transmisión (4,5), caracterizado en la región andina venezolana por el reemplazo de la vegetación primaria por plantaciones de café, medio importante de subsistencia en comunidades periurbanas y un paisaje ideal para la procreación de vectores de leishmaniasis tegumentaria americana (6).

En el ambiente doméstico, diversos estudios han reportado la coincidencia de personas y perros (*Canis familiaris*) con leishmaniasis tegumentaria americana conviviendo en las mismas casas (7-11), hecho que ha contribuido a la suposición de que el perro doméstico podría tener algún papel como reservorio de leishmaniasis dermatópicas, similarmente a como está establecido en la epidemiología de la leishmaniasis visceral (12). Para ello, se han empleado diversas técnicas diagnósticas en el estudio de la prevalencia de leishmaniasis tegumentaria americana canina (13-18); no obstante, son escasas las investigaciones sobre la capacidad del perro para infectar a potenciales vectores de *Leishmania* causantes de leishmaniasis tegumentaria americana.

Correspondencia:

Dalila Hernández, Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela; Avenida Medina Angarita, sector Los Ilustres; apartado postal N° 100, Trujillo 3102-A, Venezuela.

Telefax: (0058) (272) 236 3503  
dalilahr@latinmail.com

Recibido: 20/05/05; aceptado: 13/12/05

La técnica de xenodiagnóstico con *Lutzomyia* sp. fue introducida por Christensen y Hearer (19). Para la leishmaniasis tegumentaria americana, los reportes disponibles sobre el xenodiagnóstico en perros refieren animales con lesiones; Vexenat *et al.* (20), al alimentar *Lutzomyia whitmani* sobre lesiones de leishmaniasis en tres perros, obtuvo un índice de infección de 2,68% (5/186). En otra investigación en la que se utilizó *Lutzomyia migonei*, Bezerra *et al.* planteaban que la capacidad infectiva del perro dependía de la evolución de sus lesiones, y disminuían de acuerdo con su antigüedad (21).

Entre tanto, *Lutzomyia youngi* ha sido señalada como la especie más común del grupo *verrucarum* en la región de los Andes venezolanos (22), con una abundancia de población de 80% en el estado Trujillo, Venezuela, donde se le ha hallado naturalmente infectada en 1,8% (4/221) en una localidad periurbana de la ciudad capital del estado (23,24), y ha sido empleada en la técnica del xenodiagnóstico en casos humanos (25).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad infecciosa de perros con lesiones de leishmaniasis, presumiblemente, causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Por ser el perro de asentamientos rurales un animal doméstico estrechamente en contacto con el ambiente selvático, consideramos probable que en condiciones naturales fuera activamente picado por *L. youngi*, especie de flebótomo de comprobada actividad picadora intradomiciliaria y abundante en el área de estudio (26,27).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

La localidad del estudio fue Loma de Piedras Negras, una comunidad periurbana, rural, de tradición agrícola cafetalera, ubicada a 15 km en dirección noroeste de la capital del estado, Trujillo, (9°18'40" LN, y 70°27'28" LO), considerada como un área de riesgo epidemiológico alto para leishmaniasis tegumentaria americana (26-28), y donde se ha descrito por métodos moleculares que la especie de parásito circulante causante de leishmaniasis cutánea en la población humana y en la población canina pertenece a la especie *L. (V.) braziliensis* (11,29).

### **Animales del estudio**

Mediante una encuesta domiciliaria se hizo un censo de todos los perros caseros de la localidad. En una posterior visita, previo consentimiento de los dueños de los animales, se examinaron los perros incluidos en el estudio mediante una evaluación clínica general, inspeccionando rigurosamente la integridad de su pelaje y de su piel. Se consideraron alteraciones dérmicas sospechosas de leishmaniasis tegumentaria americana, las úlceras, los nódulos, las excoriaciones, las cicatrices y las despigmentaciones.

### **Examen parasitológico**

De los animales con lesiones sugestivas de leishmaniasis tegumentaria americana se hicieron dos improntas *in situ* y dos frotis de biopsias del borde de la lesión sobre láminas portaobjetos. Luego de fijadas y coloreadas con Giemsa, se evaluaron microscópicamente con el objetivo de inmersión en busca de formas amastigotas de *Leishmania* sp., considerando la relación parásitos visualizados por cada 100 células blancas contadas por impronta.

En los animales que resultaron positivos a la evaluación parasitológica directa, se intentó el aislamiento *in vitro* e *in vivo* de los parásitos mediante la siembra e inoculación de triturados de tejido del borde de sus lesiones en tubos de ensayo con medio agar sangre y en los metatarsos de un par de hámsteres (*Mesocricetus auratus*) machos de 3 meses de edad.

Para el xenodiagnóstico se seleccionaron los perros con lesiones cuyo diagnóstico clínico se confirmó mediante el examen parasitológico.

### **Flebótomos**

Los flebótomos utilizados para el xenodiagnóstico se capturaron directamente en su hábitat silvestre. El procedimiento fue el siguiente: a 12 km de la ciudad capital, en la localidad de Las Calderas, donde la fauna de flebótomos está compuesta predominantemente por *L. youngi* y cuya temperatura media es un factor limitante para el desarrollo de *Leishmania* sp. (30,31), se expuso, en tres distintas ocasiones, cada perro en una jaula de 1,0 x 0,5 m colocada dentro de una trampa

de Shannon confeccionada para tal fin, con un peso en el borde inferior de la tela, de modo que reposó directa y uniformemente sobre el suelo para evitar el escape de los flebótomos.

Los insectos se recolectaron de forma manual mediante un aspirador de boca (tubo de Castro), seleccionando las hembras que se posaron sobre la trampa iluminada que, en grupos de cinco, fueron liberadas hasta introducir unas 200 ejemplares en el interior de la trampa donde reposaba el perro dentro de la jaula, tras lo cual, se desconectó la lámpara para que se alimentaran *ad libitum* sobre cualquier parte anatómica del animal evaluado. Transcurrida media hora, se recapturaron los insectos en reposo dentro de la trampa y se confinaron en grupos de 10 hembras ingurgitadas, en envases cilíndricos de vidrio de 5 cm de diámetro por 6 cm de alto, revestidos internamente con una lámina delgada de corcho y sellados con tela de organdí en la boca del frasco.

### **Estudio parasitológico directo de los flebótomos**

Aplicando técnicas previamente probadas (25,30,32), se mantuvieron los flebótomos en un insectario acondicionado con una temperatura de 24°C y humedad relativa de 70%, constantes hasta el momento de su disección, a las 120 horas después de la ingestión de sangre. Se revisaron diariamente para determinar la mortalidad, a la vez que se mantuvieron hidratados con solución saturada de sacarosa.

Las disecciones se hicieron bajo microscopio estereoscópico siguiendo el protocolo siguiente: previa exposición de los insectos a vapores de éter, se les hicieron lavados y enjuagues sucesivos en solución jabonosa con un detergente no iónico NP40 y solución salina simple, con el objetivo de retirar residuos y remover los pelos corporales de los insectos. Luego, se colocaron en láminas portaobjetos y, con agujas entomológicas, se seccionaron sus alas y extremidades para facilitar el desprendimiento de la cabeza que, al ser delicadamente halada, extraía el tubo digestivo del cuerpo. Una vez separado, se cubrió con una lámina cubreobjetos de 25x20 mm para ser estudiado con objetivo de 40X, a la vez

que se emplearon los criterios taxonómicos de Young y Duncan (33) para verificar que fuera *L. youngi* la especie de flebótomo empleada en el estudio.

### **Estudio molecular de los flebótomos parasitológicamente positivos**

Para la identificación molecular de la especie de parásito presente en los flebótomos positivos, se preparó un extracto crudo de ADN a partir de cada hembra positiva; para ello, se colocaron separadamente los tractos digestivos de cada una de éstas en tubos Eppendorf que contenían 100 ml de una solución Chelex-100 al 5%. Allí se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento siguiendo el protocolo de Harris *et al.* (34), cuyo ensayo consiste en un paso único PCR-multiplex para la detección simultánea de genomas de parásitos de los subgéneros *Leishmania* (*L.*) y *Viannia* (*V.*) del Nuevo Mundo utilizando secuencias que empalman en el gen ARN (miniexón) según el tamaño del gen y la secuencia del espacio intergénico.

Los iniciadores están contruidos de la siguiente manera: LU-5A, 5'-TTTATTGGTATGCGAA ACT TC-3' que corresponde a una secuencia altamente conservada y repetitiva en todas las especies de *Leishmania*, y LM-3A, 5'-GCACCGCACCGG(A/G)CCAC-3'; LB-3C, 5'-CGT(C/G)CCGAACCCCG TGTC-3'; y LC-3L, GCCCGCG(C)GTCACCACCAT -3', los cuales generan productos de 218-240 pb para *L. (Leishmania)*; 146-149 pb para *L. (Viannia)* y 351-397 pb para *L. chagasi*. Los controles positivo y negativo incluidos fueron ejemplares de colonia de las especies *Lutzomyia longipalpis* y *L. youngi* y hembras experimentalmente infectadas con *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8) (35).

### **Resultados**

La localidad estudiada está compuesta por 46 viviendas; se censaron 58 perros caseros, de los cuales, 17, pertenecientes a 10 viviendas distintas, presentaron lesiones sugestivas de leishmaniasis tegumentaria americana. La confirmación de la infección, mediante el examen

parasitológico, se logró en dos ejemplares al observar cada lámina fijada y coloreada durante unos 30 minutos, registrándose 1 parásito por cada 100 células blancas.

Clínicamente, un ejemplar (Nº1) presentó tres lesiones dérmicas (oreja, prepucio y escroto), mientras que el otro (Nº2), presentó una única lesión en el hocico.

Se tuvo éxito en el aislamiento de parásitos mediante el cultivo *in vivo* en el perro Nº2, de cuyos hámsteres inoculados se observó la formación de discretos granulomas a los tres y medio meses, de los que se espera la identificación molecular. Las siembras procuradas en medio agar-sangre resultaron negativas al ser revisadas periódicamente hasta las tres semanas después de la inoculación.

En el xenodiagnóstico, el total de flebótomos ingurgitados fue de 455. La mortalidad fue total en las dos primeras evaluaciones y alcanzó para la tercera y última, 49% entre ambos grupos. A pesar de los infructuosos resultados de los dos primeros ensayos, en la tercera ocasión se registró una tasa de infección de 6,45% (4/62) para el perro Nº1; para el perro Nº2 la mortalidad fue muy alta, y se lograron disecar sólo 13 flebótomos, de los cuales, todos fueron negativos. Considerando ambos grupos de insectos como un total general, se registró 5,33% (4/75) de positividad para este último ensayo en el que, además, se confirmó, preliminarmente mediante la técnica PCR-multiplex, la identidad de los parásitos observados como pertenecientes al subgénero *Leishmania* (*Viannia*), quedando por determinarse la secuencia del producto obtenido.

### **Discusión**

Como han reportado Mengistu *et al.* y Padilla *et al.* (10,36), el aislamiento de *Leishmania* sp. mediante cultivo *in vitro* resultó poco sensible, aspecto que podría estar relacionado con la evolución de la enfermedad (37), ya que en estos animales sus dueños refirieron no recordar el momento de aparición de las lesiones dérmicas ni la posible causa de su origen.

Mayor sensibilidad mostró el cultivo en el animal experimental, en los que el crecimiento lento y

discreto de los histiocitomas concordó con características macroscópicas del desarrollo de *Leishmania* dermatóparas (7).

El método empleado para xenodiagnóstico fue un ensayo en el que se procuró reproducir lo más cercanamente posible el contacto de los insectos con el mamífero en condiciones naturales. En tres intentos anteriores, haciendo uso de la metodología empleada por Rojas y Scorza (25), los flebótomos capturados se confinaron y, luego, expusieron sobre las lesiones y otras partes anatómicas de los perros evaluados, con un éxito de alimentación muy bajo (menor al 10%), sumado a una alta mortalidad (observaciones sin publicar).

Nuestros hallazgos de infección en los flebótomos disecados confirman que *L. youngi*, especie abundante en la localidad estudiada, es susceptible a infectarse con *Leishmania* del subgénero *Viannia* al alimentarse sobre el perro casero. En investigaciones previas se logró con esta técnica la infección experimental de esta especie de flebótomo en 5,56% (4/72) al ser alimentados sobre *Didelphis marsupialis* inoculados con *L. braziliensis* (32) y, en otro ensayo, al ser alimentados sobre lesiones de 8 personas, se obtuvieron tasas de infección entre 4 y 20% (25).

En los perros de nuestro estudio, los flebótomos tuvieron oportunidad de picar sobre las lesiones u otra parte anatómica del animal; aun teniendo en cuenta que el perro sobre el cual se infectaron los flebótomos presentaba lesiones múltiples, inferimos que muchas hembras se alimentaron sobre piel intacta, pues en ensayos previos practicados sobre este mismo animal, aplicando una metodología distinta para el xenodiagnóstico (25), en la que se controló la cantidad de insectos expuestos sobre distintas áreas corporales, observamos un mayor porcentaje de ejemplares ingurgitados sobre piel intacta.

Este hecho sugiere la posibilidad de que los perros infectados, aparentemente sanos, pudieran ser fuente de infección para flebótomos vectores, como se ha demostrado para la leishmaniasis visceral (38), en la que el perro es el reservorio de la enfermedad y se ha estudiado la asociación entre su signología clínica y su capacidad

infecciosa, determinándose que el estado clínico del perro no tiene influencia sobre su estado infeccioso (39).

Se ha demostrado mediante modelos estadísticos la asociación entre las prevalencias de la enfermedad en la población humana y de la infección en caninos de áreas endémicas (18,40). Sin embargo, queda por investigar la influencia que tiene la presencia de lesiones dérmicas en caninos como factor de riesgo para la presencia de la enfermedad en humanos.

La PCR para detectar ADN parasitario en el vector ha demostrado una alta sensibilidad en ensayos de capturas de insectos silvestres (35), lo cual sugiere que su uso podría aumentar significativamente la sensibilidad del xenodiagnóstico.

Los hallazgos de este trabajo reafirman la capacidad de *L. youngi* para infectarse con *L. (V.) braziliensis* e incentivan el uso de la técnica de xenodiagnóstico en perros. Por ser los perros una población susceptible de contraer y actuar como reservorios de leishmaniasis tegumentaria americana, la búsqueda activa y el examen de animales con lesiones dérmicas podría ser una medida adicional útil en la vigilancia epidemiológica.

#### **Conflicto de intereses**

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" en el Laboratorio de Control de Enfermedades Metaxénicas y Transmisibles con supervisión y aprobación del Comité de Bioética.

El procesamiento molecular se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela.

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses que puedan afectar los resultados de esta investigación.

#### **Financiación**

Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes: NURR-C-335-03EM; NURR-H-226-03-09B y ADG-CVI-NURR-03-95.

## Referencias

1. **Bonfante-Garrido R, Barroeta S.** Leishmanias y leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Primera edición. Barquisimeto: Dirección de Imprenta y Reproducción UCLA; 2002. p.220.
2. **Rodríguez N, De Lima H, Aguila CM, Rodríguez A, Barker DC, Convit J.** Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(Suppl.1):S105-9.
3. **Pifano F.** Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis tegumentaria en la región neotropical, con especial referencia a Venezuela. *Arch Ven Med Trop Parasit Med* 1960;3:31-61.
4. **Wijeyaratne PM, Arsenault LK, Murphy CJ.** Endemic disease and development: the leishmaniasis. *Acta Trop* 1994;56:349-64.
5. **Desjeux P.** Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly Epidemiol Rec* 2002;77:365-70.
6. **Scorza J, Rojas E.** Caficultura y leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. *Bol Dir Malaria Sanam Ambient* 1988;28:114-27.
7. **Bonfante-Garrido R, Morillo N, Torres R.** Leishmaniasis cutánea canina en Venezuela. *Bol Of Sanit Panam* 1981;91:160-5.
8. **Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Jesús AC et al.** Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81:155-63.
9. **Aguilar CM, Rangel EF, García L, Fernández E, Momen H, Grimaldi Filho G et al.** Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989;84:19-28.
10. **Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM et al.** Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol* 2002;110:1-10.
11. **Hernández D.** Estudio epidemiológico de la leishmaniasis cutánea en perros de una comunidad cafetalera del estado Trujillo (tesis). Trujillo: Universidad de los Andes; 2004.
12. **Tesh RB.** Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:287-92.
13. **Falqueto A, Sessa PA, Varejao JB, Barros GC, Momen H, Grimaldi Junior G.** Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86:499-500.
14. **Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MC, Tramontano N.** A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985;80:17-22.
15. **Passos VM, Andrade AC, Silva ES, Figueiredo EM, Falcao AL.** Inquérito canino sorológico canino em foco recente de leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:323-9.
16. **Santos EG, Marzochi MC, Conceição NF, Brito CM, Pacheco RS.** Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998;40:41-7.
17. **Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M et al.** The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:158-64.
18. **Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR.** Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 2003;41:1486-93.
19. **Christensen HA, Herrer A.** Detection of *Leishmania braziliensis* by xenodiagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972;66:798-9.
20. **Vexenat JA, Barretto AC, Rosa AC.** Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81:125-6.
21. **Reithinger R, Canales Espinoza J, Llanos-Cuentas A, Davies CR.** Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (Vianna)* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:141-5.
22. **Agudelo LA, Uribe J, Sierra D, Ruiz F, Vélez ID.** Presence of American cutaneous leishmaniasis vector surrounding the city of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:641-2.
23. **Mogollón J, Manzanilla P, Scorza JV.** Distribución altitudinal de nueve especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el estado Trujillo, Venezuela. *Bol Dir Malaria San Amb* 1977;7:206-23.
24. **Scorza JV, Márquez M, Márquez JC.** Hallazgo de *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) naturalmente infectada con *Leishmania braziliensis*, en el área suburbana de Trujillo, Venezuela. *Bol Dir Malaria San Amb* 1984;24:21-8.
25. **Rojas E, Scorza JV.** Xenodiagnosis with *Lutzomyia youngi* in Venezuelan cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989;84:29-34.

26. **Rojas E, Scorza JV.** Actividad intradomiciliaria de *Lutzomyia youngi* (Diptera, Psychodidae) en Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb 1989;29:66-70.
27. **Rojas E, Scorza JV, Morales C, Barazarte R, Torres A.** Diversity and species composition of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Venezuelan urban focus of cutaneous leishmaniasis. J Am Mosq Control Assoc 2004;20:189-94.
28. **Morales C.** Leishmaniasis cutánea en la ciudad de Trujillo, Venezuela: condicionantes urbanos (tesis). Trujillo: Universidad de los Andes; 2000.
29. **Guevara P, Rojas E, González N, Scorza JV, Añez N, Valera M et al.** Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. Clin Diag Lab Inmunol 1994;1:385-9.
30. **Scorza JV, Márquez JC, Márquez M.** La isoterma de 19°C como factor limitante de la endemidad de la leishmaniasis cutánea en Los Andes de Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb 1986;25:42-9.
31. **Rojas E, Scorza T, Álvarez L, Scorza JV.** Changes in sandfly populations following anthropic action in an Andean Venezuelan coffee plantation. Entomología y Vectores 2004;11:495-503.
32. **Scorza JV, Rezzano S, Márquez JC.** *Didelphis marsupialis*, reservorio primario de *Leishmania* spp. en la ciudad de Trujillo, Venezuela. Bol Malariol San Amb 1986;26:1-5.
33. **Young DG, Duncan MA.** Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* and sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Entomol Inst 1994;54:1-881.
34. **Harris E, Kropp G, Belli A, Rodríguez B, Agabian N.** Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol 1998;36:1989-95.
35. **Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M.** Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100:43-8.
36. **Mengistu G, Akuffo H, Fehniger TE, Negese Y, Nilsen R.** Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:154-7.
37. **Romera GA, Sampaio RN, Macedo V, Marsden PD.** Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:505-8.
38. **Vexenat JA, de Castro JA, Cavalcante R, Tavares JP, da Silva MR, Batista WH et al.** Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994;89:131-5.
39. **Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA et al.** Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994;88:491-3.
40. **Reithinger R, Espinoza JC, Davies CR.** The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Perú. Am J Trop Med Hyg 2003;69:473-80.