



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

“LEISHMANIASIS EN MÉXICO; UN ANÁLISIS ECO-
EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO DE FOCOS
CON ALTA INCIDENCIA DE TRANSMISIÓN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CAMILA GONZALEZ ROSAS

TUTOR PRINCIPAL

DR VICTOR SANCHEZ-CORDERO DÁVILA

COMITÉ TUTOR

DRA INGBORG BECKER FAUSER

DR ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER

MÉXICO, D.F.

Marzo de 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la UNAM por su enorme generosidad al haberme dado la oportunidad de pertenecer a ella y por los múltiples reconocimientos que me otorgó como estudiante. Estoy orgullosa de pertenecer a esta Universidad y la honraré siempre.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas por permitirme llevar a cabo mis estudios de Doctorado dentro de un plan de estudios de excelencia con los beneficios que esto tuvo en mi formación.

A mi tutor, Dr Víctor Sánchez-Cordero, por haber sido un gran consejero para la vida y por permitirme compartir con él las múltiples inquietudes sobre los estudios de ecología de enfermedades que hicieron posible llevar a cabo este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ingeborg Becker Fauser y Dr. Enrique Martínez Meyer, por acompañarme en el proceso de formación durante los años que estuve en el posgrado y por estar siempre dispuestos a ayudarme académica y personalmente.

A los miembros del jurado: Dra Celia Alpuche, Dra Patricia Tato, Dr. Julio Campo, Dr. Eduardo Rebollar y Dr. Enrique Martínez Meyer por sus comentarios sobre el manuscrito.

Al Dr. Eduardo Rebollar Téllez por involucrarse con gran interés en los proyectos que hicieron parte de mis estudios de posgrado en México y por heredarme de una forma muy generosa sus conocimientos sobre leishmaniasis, haciendo posible la obtención de resultados de gran calidad en los diversos proyectos en los que colaboramos.

Al Dr. Christopher Stephens por su constante apoyo en mi proceso de formación académica, por permitirme hacer parte de su equipo de investigación en el Centro de Ciencias de la Complejidad y por esperar siempre más de mi.

A los integrantes de los laboratorios de Sistemas de Información Geográfica, Análisis Espaciales y a la UNIBIO del Instituto de Biología, así como a los de Inmunoparasitología y Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la UNAM, en donde se realizó parte fundamental de este proyecto.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por darme el apoyo financiero para llevar a cabo mi Doctorado.

Por último, pero no menos importante, a todos los amigos que hice en este país y que hicieron de mi vida en México una experiencia inolvidable.

A mi amigo Carlos Ibarra por ayudarme a caminar este largo trayecto con todos los matices que tuvo, haciéndome saber que siempre podía contar con él. A Joaquín Giménez por abrirme las puertas de una gran amistad, por escucharme, por la buena compañía y por Camilo. A mi equipo colombiano, que me hizo sentir el calor de hogar: Rolando, Tatiana, Carolina, Margarita, María Clara, Paula y Felipe. A la serbia mas colombiana, Mirjana por tener siempre las palabras indicadas. A Lupita y Ernesto por todo el afecto y el apoyo que nos dieron en estos años.

**A la memoria de mi abuelo, el Dr Fernando Rosas,
quien me heredó la pasión por la ciencia y me inspiró a seguir su camino**

A Daniel, mi vida entera, mi felicidad y mi mayor reto

A mis hermanos, mis papás y mi abuela Helena,
quienes siempre han creído en mi y me han llenado de amor por la vida

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
INDICE	4
RESUMEN	5
CAPITULO 1 Current knowledge on <i>Leishmania</i> vectors and reservoirs in México: how species' geographic distributions relate to transmission areas.....	8
CAPÍTULO 2 Incriminación de reservorios de <i>Leishmania</i> en México: revisión de técnicas de muestreo y detección de <i>Leishmania mexicana</i> (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en mamíferos silvestres.....	29
CAPÍTULO 3 Caracterización ecológica y búsqueda de reservorios potenciales de leishmaniasis en la región sureste de México.....	48
CAPÍTULO 4 Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species.....	74

RESUMEN

El estudio de las enfermedades zoonóticas desde una perspectiva ecológica, ha tomado una gran importancia en los estudios epidemiológicos, debido a la ventaja que implica conocer las variables involucradas en los ciclos de transmisión y la dinámica de las poblaciones involucradas, para poder optimizar el diseño, implementación y monitoreo de intervenciones de prevención y control.

Desde esta perspectiva, este proyecto de tesis tiene como finalidad hacer una valoración de la situación de la transmisión de leishmaniasis en México, por medio de la utilización de métodos de análisis que van desde predicciones de distribución e interacción de especies, hasta pruebas moleculares de detección del parásito en tejidos de mamíferos silvestres.

En un primer capítulo, se reunió la información conocida sobre las especies de vectores y reservorios que han sido implicados en la transmisión de leishmaniasis en el país y se superpusieron sus distribuciones a las áreas de transmisión, con el fin de generar hipótesis sobre las especies que pueden estar sosteniendo los ciclos de transmisión en las diferentes áreas en las que se sabe que hay casos en humanos. La información sobre la distribución de vectores y reservorios confirmados no es suficiente por si sola para poder explicar las dinámicas de transmisión y generar estrategias de control de la enfermedad. Sin embargo, la asociación de ciertas especies de vectores con las áreas de transmisión permite suponer que hay variaciones en la eficiencia de ciertas especies y que esto se podría ver reflejado en el número de casos.

Con base en esta información, el segundo capítulo consistió en hacer una búsqueda de los métodos de muestreo y detección de mamíferos silvestres con el fin de establecer una metodología sólida con la que fuera posible obtener la información sobre mamíferos

infectados en las áreas de transmisión. En esta revisión, fue evidente no solo que no existe un consenso sobre los métodos de muestreo y detección de *Leishmania* en mamíferos silvestres, sino que las publicaciones sobre el tema en ocasiones tienen la información incompleta o se contradicen. Adicionalmente, las pruebas preliminares de detección de parásitos en mamíferos llevadas a cabo en el laboratorio, demostraron que existía una homología entre los oligonucleótidos que estaban siendo utilizados y el ADN de ratón sano, lo que nos estaba llevando a la obtención de falsos positivos. A partir de estas conclusiones, surgió la necesidad de estandarizar una técnica de detección que pudo finalmente ser aplicada en las muestras obtenidas en campo.

El tercer y cuarto capítulo, se enfocaron en hacer valoraciones sobre dos focos conocidos de transmisión de leishmaniasis. Por una parte, en el tercer capítulo hizo una valoración de la variación ecológica entre las áreas de transmisión del sureste con especial énfasis en el estado de Tabasco que, a pesar de tener la mayor incidencia de casos históricos, tiene la menor cantidad de información sobre las especies de vectores y reservorios involucrados. Pudo constatar que existe una variación importante en el estado de Tabasco en el clima y la composición de especies. Adicionalmente, se encontró que mamíferos como los murciélagos, cuyo papel como reservorios es incierto, pueden estar involucrados en la transmisión del parásito, modificando las premisas sobre las dinámicas de transmisión y abriendo nuevas posibilidades en los procesos de domiciliación de la enfermedad.

Por último, el cuarto capítulo se enfocó en hacer una valoración de la información conocida sobre el foco del norte de México que, aunque no presenta un número de casos alarmante desde la perspectiva epidemiológica, tiene características ecológicas que permiten suponer que la transmisión en esta área es muy particular y podría incluso estar involucrando

especies (o cepas) de parásitos distintas a las del resto del país. Este capítulo involucró un análisis de la posibilidad de dispersión de la enfermedad en Norte América bajo escenarios de cambio climático, debido a que existen evidencias de que, aunque los primeros casos parecen provenir de México, notificaciones recientes demuestran que la ocurrencia de infección se está desplazando hacia el norte, involucrando nuevas especies de mamíferos que antes no habían sido registradas como reservorios.

Con este panorama general de la leishmaniasis en México, basado en análisis eco-epidemiológicos, se abre un nuevo campo de investigación que posiciona al país entre los pioneros de los estudios de este tipo, involucrando una gran variedad de disciplinas y profesionales con el objetivo final de brindar las herramientas necesarias para enfrentar situaciones de gran importancia en salud pública como lo son las enfermedades emergentes y en particular aquellas transmitidas por vectores.

Current knowledge on *Leishmania* vectors and reservoirs in México: how species' geographic distributions relate to transmission areas

INTRODUCTION

Understanding transmission cycles of vector-borne diseases is rather complex as frequently many actors are involved, including the parasites, their hosts and vectors. In this way, detecting the ecological and geographic patterns of vector-borne diseases occurrence become relevant for understanding modes of parasite transmission.¹ Recent research in ecological niche modeling, integrating point occurrence data with digital environmental maps, provides a useful and powerful framework for understanding the eco-epidemiological geography of zoonotic diseases, as their transmission cycles involve different sylvatic (enzootic) and domestic reservoir and vector species, each susceptible to environmental variations.^{2,3,4,5,6} The ecological niche is defined as the set of environmental conditions in which species can maintain populations without immigrational subsidy, and provides an ecological framework for testing hypotheses regarding roles of environmental variables in shaping distributional patterns of species, and also to evaluate how different species' ecological niches relate to one other.^{3,7}

An interesting and complex disease system from the point of view of the variety of species involved in the transmission cycle and public health relevance are the leishmaniases, a group of diseases with different clinical manifestations caused by parasites that are in turn transmitted by sand fly vectors (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), maintained in the wild by transmission among mammal reservoir hosts. Both vectors and reservoir hosts may differ depending on the geographic regions where they occur.^{8,9,10,11}

In the New World, insect vectors known to be responsible for *Leishmania* transmission

to humans belong to the genus *Lutzomyia*. Although the taxonomy of sand flies has seen major changes in nomenclature, following Galati's (1995) proposal, however, throughout this paper we use the name *Lutzomyia* (*sensu* Lewis et al. 1977) in a more conservative sense.^{12,13} Most sand fly species are only classified as suspected leishmaniasis vectors, since ultimate proof of involvement is rather difficult to achieve.^{9,14,15}

In Mexico, at least for the cutaneous form of the disease (CL), one subspecies, *Lutzomyia olmeca olmeca* (Vargas & Díaz-Nájera, 1959) has been incriminated, but several others are suspected.¹⁶ Previous studies in the state of Campeche documented *L. olmeca olmeca* infected with *Leishmania* parasites, *Lutzomyia cruciata* (Coquillett, 1907) was also found infected with similar parasites, although the particular *Leishmania* species could not be identified.¹⁷ *Lutzomyia cruciata* is also a suspected leishmaniasis vector in Nicaragua and Belize, and its abundance at some collecting sites in the Yucatan Peninsula exceed those of the known vector species.^{18,19,20,21,22} Other species that feed on humans and that have been found infected with *Leishmania* parasites in the wild in Central America include *L. panamensis* (Shannon, 1926), *L. shannoni* (Dyar, 1929) and *L. ylephiletor* (Fairchild & Hertig, 1952).^{10,23} Finally, *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931), has been found infected with *L. panamensis* in Panama.^{24,25} In northern Mexico and the southern United States, sand fly species suspected of being involved in parasite transmission to humans are *Lutzomyia diabolica* (Hall, 1936) and *L. anthophora* (Addis, 1945).^{26,27} The former species is suspected as a vector of *L. mexicana*, and has been infected experimentally with *L. infantum*. The latter was able to transmit *L. mexicana* parasites experimentally to mice.^{28,29,30}

The visceral form of the disease (VL), is caused by *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) and it is transmitted in the New World to humans by *Lutzomyia longipalpis* and *L. evansi*. The former species is considered the main vector of *L. infantum*, and is known to comprise a species complex distributed in the Neotropics from Mexico to Argentina.^{31,32,33,34} Whereas, *L.*

evansi is considered a secondary vector, given its lower transmission potential; it has been found from Mexico south to Colombia and Venezuela.^{32,35,36,25,37}

In Mexico, the first clinically-documented records of cutaneous leishmaniasis (CL), were from forested parts of the Yucatan Peninsula.^{38,39,49} Currently, although cases are not reported by public health authorities, they are nonetheless a significant public health problem. VL cases have been reported in several foci in the Mexican state of Chiapas and the Balsas River Basin, where tropical dry forests occur (Becker I Laboratorio de Inmunoparasitología, UNAM and Ramsey J Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), unpublished data). Hence, in Mexico, knowing the ecology and geography of vector species involved in *Leishmania* transmission is of great relevance to public health. Since entomological surveillance is one of the most important intervention strategies and is a part of the Norma Oficial Mexicana sobre la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector (PROY-NOM 032-SSA2-2000) of vector borne diseases, the official policy of the Mexican government's public health agency.

The aim of this study was to estimate the likely distributions of all sand fly species with potential medical importance for leishmaniasis transmission in Mexico, and to relate these distributions to known transmission areas. By this means, we identify vector and reservoir species likely to be involved in *Leishmania* transmission cycles. Since Mexican leishmaniasis cases have not been followed up with research on local transmission, information regarding leishmaniasis etiology in the country is very scarce. Distributional maps on a national scale will facilitate the understanding of the relative roles of different sand fly vectors and reservoir host species; the ultimate aim is to help with the identification of high-risk areas and in the design of control and prevention strategies.

METHODS

Eleven sandfly species (*Lutzomyia*) of, at least, potential medical importance occur in Mexico – these species were identified based primarily on their vector status and public health relevance in nearby countries, and also by the findings obtained by different authors in recent years in Mexico. For CL, we included nine species: the proven vector *L. olmeca olmeca* and eight suspected vectors: *L. cruciata*, *L. shannoni*, *L. ylephiletor*, *L. gomezi*, *L. diabolica*, *L. ovallesi*, *L. panamensis*, and *L. anthophora*.^{16,19,21,41,10,23,42,43,25,27,44,45,46,29} For the visceral form, we included the two known vectors, *L. longipalpis* and *L. evansi*.^{31,36}

A database summarizing known occurrences for these species in Mexico was assembled from a variety of sources, such as scientific publications, records of the entomological collections of the Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) and the Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), and personal communications with Dr. Oscar Velasco-Castrejón (Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM). Geographic coordinates were added to each record based on the Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2000 locality database (INEGI; www.inegi.gob.mx), Biogeomancer (www.biogeomancer.org), and Falling Rain Genomics, Inc. (www.fallingrain.com/world/).⁴⁷

Ecological niche modeling. We modeled ecological niches and estimated potential geographic distributions for each species using the computer algorithms Genetic Algorithm for Rule-set Prediction (GARP) and Maxent.^{48,49} We used both algorithms because using different methodological approaches reduce the bias introduced by individual method's idiosyncrasy.^{50,51,52} We integrated the two model results by identifying areas predicted by both methods as fitting the predicted geographic distribution of the species.

To include information on reservoir host distributions, we used ecological niche models for rodent species so far found infected with *Leishmania mexicana* in North America: *Neotoma micropus*, *N. albigula*, *Peromyscus yucatanicus*, *Otodylomys phyllotis*, and

Sigmodon hispidus.^{53,54,55,56,57} Models were provided by the Laboratorio de Análisis Espaciales at UNAM and were built based on researchers' collection data.

Ecological niche models were developed for each sand fly species for which at least 10 records were available; the remaining species were not modeled, since only 1-3 records were obtained. GARP models were built based on 75% of records in these vectors and 50% in reservoirs, reserving the remainder for model refinement and evaluation. For each species, we developed 100 replicate models, and chose a "best subset" of these models based on optimal error distributions for individual replicate models, according to published recommendations⁵⁸; a threshold of omission error was set to 5%, above which models were discarded; from the remaining models, median area predicted across all replicate models was calculated, and the 10 models with predicted areas closest to the median were selected. Models generated using Maxent were run choosing 500 maximum iterations and a 25% random test percentage in vectors and 50% in reservoirs.

For all model outputs, we then calculated a cumulative binomial probability based on a threshold for presence that was set such that 90% of the occurrences on which the model was based were included in the predicted area (i.e., $e = 10\%$ in the terminology of Peterson et al 2008), and remaining areas were classed as absent.

Areas were calculated by counting numbers of pixels (each pixel in Mexico is approximately 1.0991 km²).⁶

Worldclim climatic coverages used for modeling were chosen to minimize inter-variable correlations measured based on 5000 random points in Mexico. We generated a correlation matrix in JMP 6.0 among all variables in the WorldClim dataset version 1.4 (1 km resolution; www.worldclim.org), and retained only those variables that were relatively uncorrelated ($r > 0.75$). We also included slope, aspect and topographic index from the Hydro-1K dataset.^{59, 60}

Areas of public health importance. To define important areas for leishmaniasis transmission in Mexico, we used the states historically known to report cases of leishmaniasis clipped with the Mexican ecoregions to set geographical limits with ecological meaning.⁶¹ Two transmission levels were set such that states with recurrent transmission had annual records for at least 15 consecutive years and states with occasional transmission had sporadic records (Fig 3). Further, predicted distributions for each vector species was overlapped with the map produced depicting the areas of transmission, to estimate the percentage of the distribution of each vector to recurrent and occasional transmission areas (Table 1). Reported cases were obtained from the Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.

RESULTS

Presence records for *Leishmania* vector species in Mexico were assembled (Fig 1). Not surprisingly, we found that sampling of phlebotomines was focused in the southeastern parts of the country. Among states, phlebotomine sampling was most intense in Campeche (n = 86), Oaxaca (n = 47), and Quintana Roo (n = 40). In contrast, only single phlebotomine sampling localities were available for the states of Coahuila, Chihuahua and Tamaulipas. The species most commonly collected were *Lutzomyia cruciata* (n = 102) and *L. shannoni* (n = 61), while only very few satially unique records exist for *L. anthophora* (n = 2), *L. ylephiletor* (n = 3), *L. gomezi* (n = 3), and *L. evansi* (n = 1). *L. olmeca olmeca*, the only demonstrated CL vector in Mexico, has been collected in 29 localities, all in the southern part of the country (Fig 1). Overall, patterns of sand fly species richness of potential vectors reflect a clear tendency of high species density in southeast Mexico, including the States of Veracruz, Tabasco, Campeche, and Quintana Roo (Figs. 1 and 2).

Ecological Niche Modeling. The 12 climatic variables chosen to build the models were: mean diurnal range, isothermality, maximum temperature of warmest month, temperature annual range, mean temperature of wettest quarter, mean temperature of driest quarter, precipitation seasonality, precipitation of warmest quarter, and precipitation of coldest quarter, all from Worldclim.

Five out of the seven species modeled had larger predicted areas by GARP than those predicted by Maxent. However, this tendency was not absolute, as *L. ovallesi* and *L. diabolica* showed larger prediction areas in the Maxent models (Fig. 2).

The potential distribution of *L. olmeca olmeca* was restricted to Campeche, Quintana Roo, Tabasco, and southern Veracruz, as well as some areas in Chiapas and Yucatán. *Lutzomyia cruciata* was the species with the largest predicted area of potential distribution, ranging across the Yucatan Peninsula and the states of Chiapas, Oaxaca and, Veracruz, and along the Pacific Coast north to Nayarit. Surprisingly, *L. shannoni* showed smaller area of potential distribution, even though the two have broadly overlapping distributions. The potential distribution of *L. panamensis* was restricted to the Yucatan Peninsula, southern Veracruz, and the Chontalpa region of Tabasco. *L. ovallesi* had a small predicted potential distribution restricted to Campeche and Quintana Roo (Fig. 2). In northern Mexico, the most broadly distributed species was *L. diabolica*. Its potential distribution reached the southern part of the United States, supporting the idea of its potential importance as a vector in Texas (Fig. 2).

The predicted distribution for *S. hispidus* (1.14×10^6 km²) coincided in high proportion with potential distributions of all vector species occupying: 99.7% of *L. panamensis*, 98.9% of *L. olmeca olmeca*, 95% of *L. ovallesi*, 84% of *L. cruciata*, 77.7% of *L. shannoni*, 77% of *L. longipalpis*, and 56.7% of *L. diabolica*. The rodent *P. yucatanicus* was predicted to occur only in the Yucatan Peninsula (110,569 km²), but its distribution coincided in good measure with all

of the vectors except for *L. diabolica*, varying from 84.5% with *L. panamensis* to 31.6% with *L. shannoni*. *O. phyllotis* was also restricted to the Yucatan Peninsula and adjacent portions of Tabasco and Chiapas (145,533 km²), and overlapped with vector species from 88% with *L. panamensis* to 41% with *L. shannoni*. *N. albigula* was distributed in the northwestern part of the country and occupied a broad predicted area (366,265 km²), where it coincides only to some degree with the predicted distribution of *L. diabolica* (4.7%). *N. micropus* occupied the northeastern corner of Mexico (257,477 km²) and displayed low levels of coincidence with three vector species, the highest being with *L. diabolica* (12.7%; *L. cruciata* 1.6% and *L. shannoni* 0.5%).

Areas of public health importance. The Yucatan Peninsula holds areas of recurrent leishmaniasis transmission (Fig. 3). In those areas, *P. yucatanicus* and *O. phyllotis* had almost 70% of their distributional area and the sandflies *L. olmeca olmeca*, *L. panamensis*, and *L. ovallesi* almost 80% of theirs (Table 1). Widely-distributed vector species such as *L. shannoni* and *L. cruciata* were present in all transmission areas, and were dominant in the Southeast and Veracruz regions with recurrent transmission rates. In general, all vector species were distributed in areas with recurrent transmission, except for *L. diabolica* which appeared related only to areas of occasional transmission (Table 1).

Cases in the north related to the presence of *L. diabolica* and *N. micropus*. All of the predicted distribution of *N. micropus* was in occasional transmission areas; in contrast, no transmission has been recorded in *N. albigula* dominated areas.

Interestingly, areas of recurrent transmission were focused in the moist forest ecoregions, while occasional transmission areas were mainly distributed in the tropical dry forests and tamaulipan mezquital ecoregions (Fig. 4).

DISCUSSION

Studies of geographic and ecological distributions of hosts, vectors and cases of diseases offer powerful tools for identifying risk zones and exploring potential interactions between hosts and parasites.^{2,3} Our results provide a baseline against which to improve research on *Leishmania* parasites and their vectors and reservoirs in Mexico. Since one of the criteria set by the World Health Organization for linking species to disease transmission is that vector and reservoir geographic distributions must coincide with human case distributions, our comparisons of modeled potential distributions allowed us to assess disease transmission in places where entomological surveillance and reservoir searches have scarcely been conducted.⁴

The distribution of the only proven CL vector in Mexico, *L. olmeca olmeca*, does not overlap all of the known CL case occurrences in the country, suggesting that other sand fly species must be involved as primary vectors in those areas. Based on numbers of records and broad geographic distributions, we suggest that *L. cruciata* and *L. shannoni* would be the most suitable candidates: both broadly range in the southeast and in the coastal lowlands. Note that *L. shannoni* occurs north well into the United States, so incorporation of occurrences in the United States into next-generation models would be wise.⁶²

Leishmaniasis transmission in the states of Campeche and Quintana Roo is related to areas of moist forest, suggesting that infection is occurring by human proximity to areas with original vegetation coverages.^{63,10} A curious variation occurs in the state of Yucatán, where case incidence is very low compared to the rest of the Peninsula, even though the known reservoirs are present. In addition, the proven vector *L. olmeca olmeca* has been reported in this state, although, the population abundance of this species is very low compared with other sandflies in the area (e.g. *L. cruciata*); it may be possible that the number of human cases arising from infectious bites of *L. olmeca olmeca* are minimum.⁶⁴

In Tabasco, most of the original vegetation coverage has been replaced, especially with cacao crops. There, *L. olmeca olmeca* has been identified as the primary vector, and clinical cases with a high prevalence of diffuse cutaneous leishmaniasis have been recorded.⁶⁵ In this area, no reservoir studies have been conducted previously, and known reservoirs are not present, suggesting that other reservoir species could be involved in this area. Areas with homogenous coverages such as crops, offer less complex habitat where only disturbance-tolerant species can survive. Vector species with medical importance have shown to have the ability to recolonize perturbed areas after human interventions and rodent species, not only can be found in crops but also can become pests increasing their relative abundances.³⁶ In the modified environments, where cases are known to occur, landscape analysis should be conducted to establish population dynamics of vectors and reservoirs and their impact in parasite incidence and persistence.

In Nayarit, cases have been related to coffee plantations. In that region, as occurs in Tabasco, no reservoir sampling has ever been conducted, and then other reservoir species not identified yet must exist. From our predictions, *S. hispidus* can be present in that region. Given their geographic distribution, vector species responsible for transmission in this state could be limited to *L. shannoni*, *L. diabolica* and *L. cruciata*.

In the northern part of the country, where few cases are known to occur, only the reservoir *Neotoma micropus* seems to play an important role in the transmission since its predicted distribution coincides with the presence of cases. In spite of its vast distribution, *N. albigula* does not seem to be related in zoonotic cycles in Mexico, since its distribution does not coincide with case occurrence. The suspected vector related to this species in Arizona is *L. anthophora*; however, this species has been collected only in northeastern Mexico, in the states of Nuevo León and Tamaulipas. Given the low number of records for *L. anthophora* in Mexico, ecological niche models could not be developed. However, models based on

collection points in the USA, predict potential distributional areas for this vector in the Mexican states of Sinaloa, Sonora, and Baja California Sur.⁶⁶ *Lutzomyia anthophora* is a non-anthropophilic feeder, so although no human cases have been recorded in these states, sylvatic transmission may be occurring.⁵⁴ The absence of an anthropophilic vector species provides a barrier for parasite transmission to humans. However, cases occurring in the Mexico-US border must be monitored carefully as other vector species can be incriminated in the parasite transmission to humans. For example, the spread of *L. diabolica* from the east can favor the appearance of zoonotic transmission foci in the western states. Clearly, intensive monitoring of sand fly species along the US-Mexican is crucial to identify potential risk areas of infection in the region.

For VL very little is known. The recognized vector *L. longipalpis* is distributed in dry forests corresponding to areas of VL transmission. No parasite isolations from either vectors or reservoirs have been achieved and no surveillance has been undertaken by governmental health authorities. We consider initiation of research on visceral leishmaniasis in Mexico to be of paramount importance.

Although leishmaniasis distribution and incidence in Mexico is likely underestimated, the general picture is one of focal regions with recurrent transmission. In Quintana Roo and Tabasco, where most cases have historically been reported, cases are usually related to areas with changing land use, suggesting the possibility of a domiciliation process. It is critical to evaluate the course of disease transmission under dynamic scenarios related to land use or climatic change⁶⁶ More generally, for leishmaniasis ecological complexity, the presence of specific transmission areas occurring in the northern foci, the Balsas river basin, the southeastern region and Nayarit, where particular species interactions seem to be occurring, we believe that different *Leishmania* strains are involved in varying foci.

Figure 1. Data collection points of *Lutzomyia* species with medical importance in Mexico.

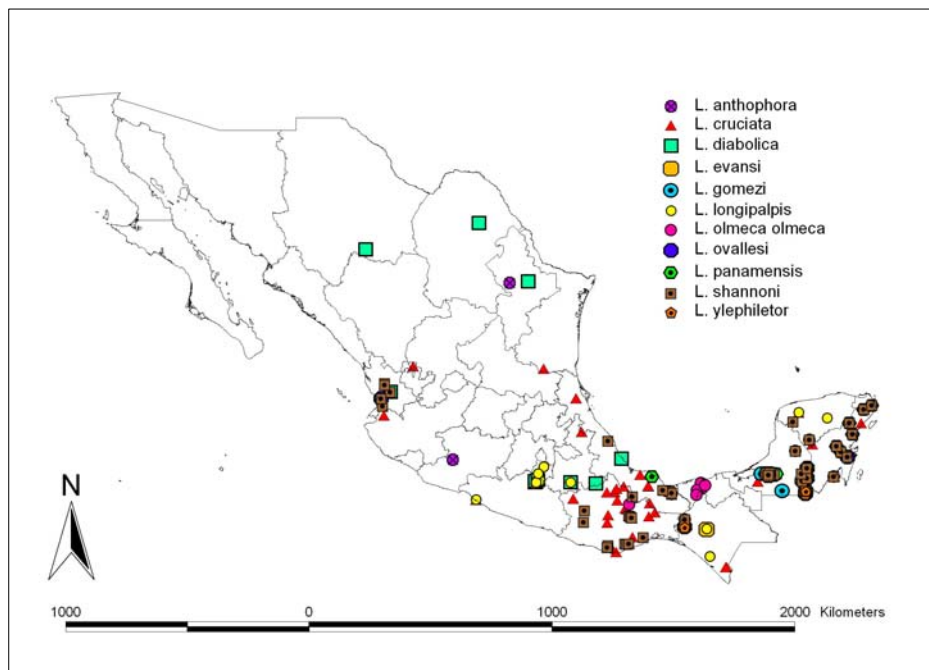


Figure 2. Ecological niche modeling of the species of *Lutzomyia* with medical importance. Grey areas show the coincidence between the predicted distributions generated by GARP and Maxent models where 90% of the collection data occur.

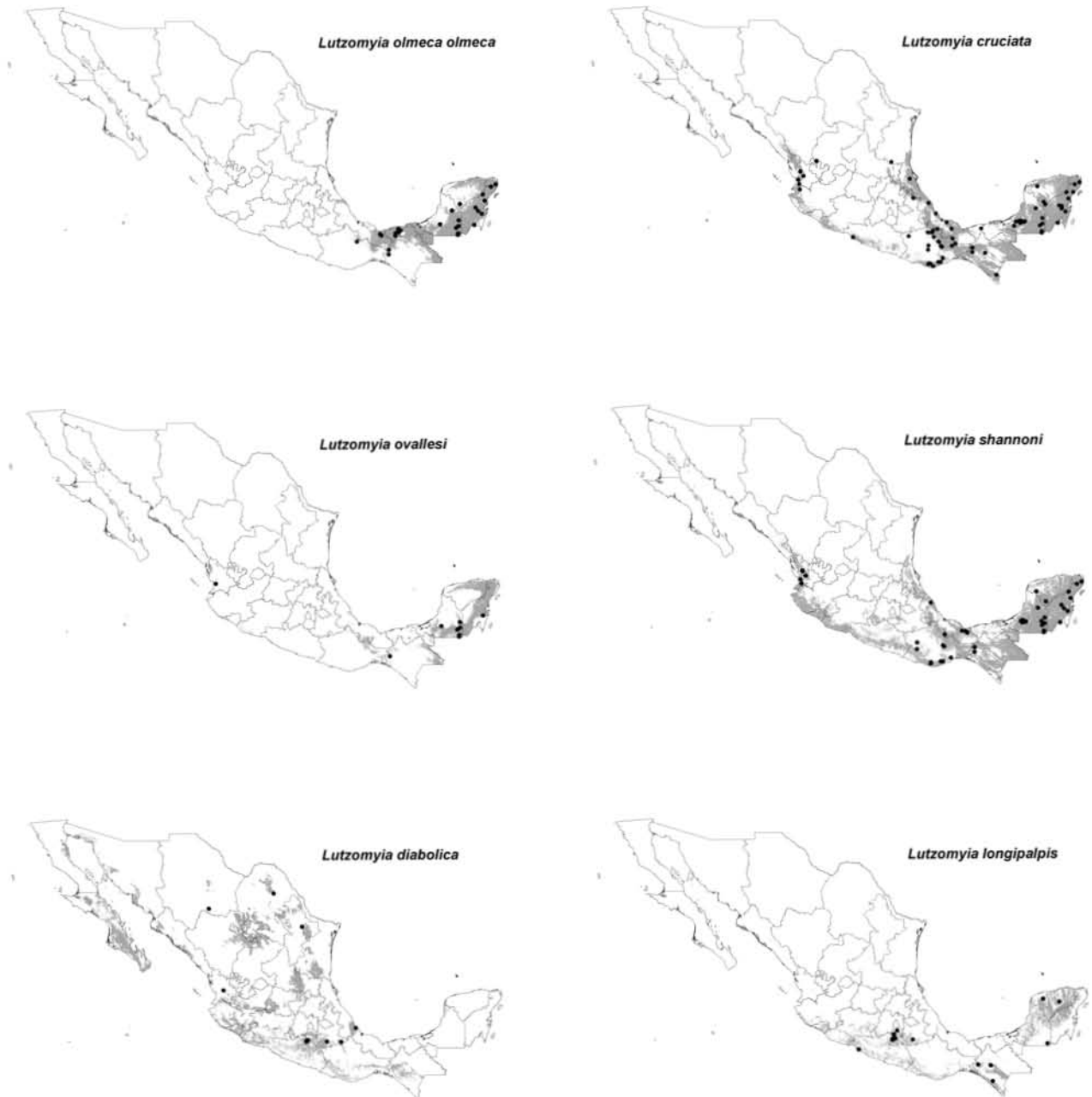


Figure 3. Leishmaniasis transmission areas. In black areas of recurrent transmission, in gray areas of occasional transmission.

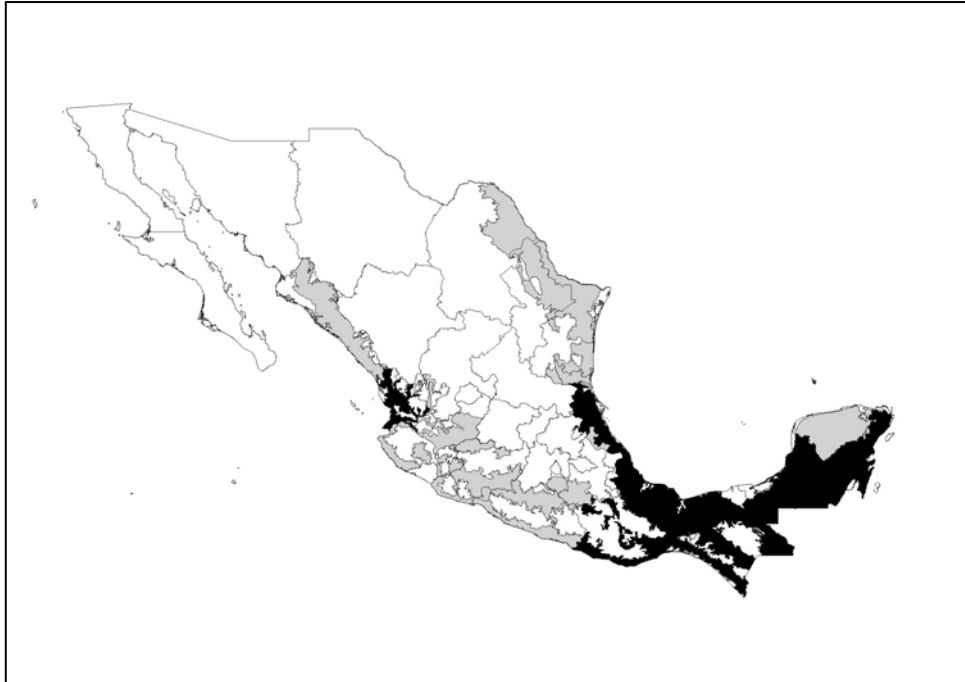


Figure 4. Ecoregions where leishmaniasis transmission is known to occur.

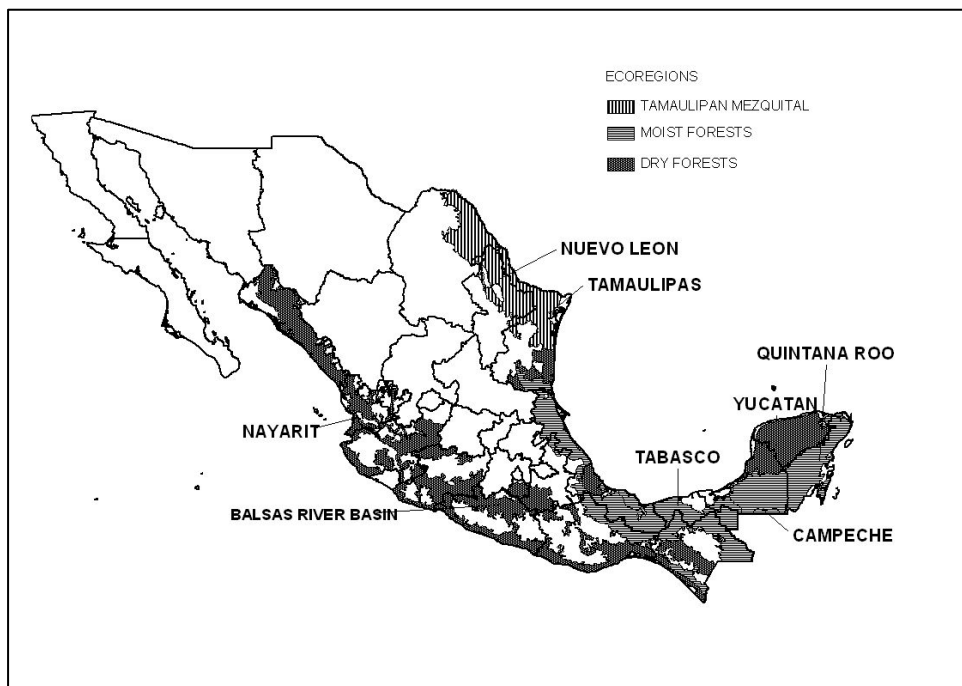


Table 1. Percent of the predicted area of distribution for each species by transmission levels.

Species	Recurrent%	Occasional%
<i>O. phyllotis</i>	69.1	22.4
<i>P. yucatanicus</i>	68.5	28.4
<i>S. hispidus</i>	23.5	25.7
<i>N. micropus</i>	0.4	40.1
<i>N. albigula</i>	0	0.9
<i>L. olmeca</i>	81.8	9.2
<i>L. ovallesi</i>	79.3	16.9
<i>L. panamensis</i>	76.5	21.3
<i>L. cruciata</i>	67.3	14.4
<i>L. shannoni</i>	60.5	17.9
<i>L. longipalpis</i>	43	44.5
<i>L. diabolica</i>	8.1	25.7

Acknowledgments

We thank the Entomology laboratory at the Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), H Huerta, O Velasco and S Ibáñez for providing sandfly collection data. The GIS Unit at Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), especially A Jarvis and S Castaño for providing support in the geographic analysis. C González was the recipient of the Dirección General de Estudios de Posgrado fellowship for the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. This project was partially supported by the Macroproyecto Tecnologías para la Universidad de la Información y de la Computación at UNAM, and by the Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT project IN225408).

REFERENCES

1. Mullner RM, Chung K, Croke KG, Mensah EK, 2004. Geographic Information Systems in public health and medicine. *J Med Syst* 28: 215-221.
2. Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Beard CB, Ramsey JM, 2002. Ecologic Niche Modeling and Potential Reservoirs for Chagas Disease, México. *Emerg Infect Diseases* 8: 662-667.
3. Peterson AT, Shaw J, 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol* 33: 919-931.
4. Peterson AT, Scachetti R, Fonseca de Camargo V, 2004. Using epidemiological survey data to infer geographic distributions of leishmaniasis vector species. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 10-14.
5. Peterson AT, Martínez-Campos C, Nakazawa Y, Martínez-Meyer E, 2005. Time-specific ecological niche modeling predicts spatial dynamics of vector insects and human dengue cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 647-655.
6. Peterson, A. T. 2008. Biogeography of diseases: A framework for analysis. *Naturwissenschaften* 95: 483 – 491.
7. Grinnell J, 1917. Field tests of theories concerning distribution control. *Am Nat* 51: 115–128.
8. Velasco-Castrejon O, 1987. Leishmaniasis in Mexico. *Rev Latinoam Microbiol* 29: 119-126
9. Travi B, Montoya J, 1994. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM. Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina. Cali, Colombia 280 p.
10. Rebollar-Téllez E, Reyes-Villanueva F, Fernández-Salas I, Andrade-Narváez FJ, 1996. Population dynamics and biting rhythm of the anthropophilic sandfly *Lutzomyia cruciata* in southeast México. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38: 29-33.
11. Monroy-Ostria A, Hernandez--Montes O, Barker DC, 2000. Aetiology of visceral leishmaniasis in Mexico. *Acta Trop* 75: 155-161.
12. Galati BEA, 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol San Amb* 35: 133-142.

13. Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM, 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol* 2: 319-332.
14. Killick-Kendrick R, 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4:1-24.
15. Killick-Kendrick R, 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289.
16. Biagi FF, De Biagi AM, Beltrán F, 1965. Phlebotomus flaviscutellatus, transmisor natural de Leishmania mexicana. *Pren Méd Méx* 30: 276-272.
17. Rebollar-Téllez E, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narvaez FJ, 1996. A two years study on vectors of cutaneous leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission in the state of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 91: 555-560.
18. Disney RHL, 1968. Observations on a zoonosis: leishmaniasis in British Honduras. *J Appl Ecol* 5: 1-59.
19. Williams P, 1966. The biting rhythms of some anthropophilic phlebotomine sandflies in British Honduras. *Ann Trop Med Parasitol* 60: 357-364.
20. Williams P, 1970. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64: 317-364.
21. Rebollar-Téllez E, Reyes-Villanueva F, Fernández-Salas I, Andrade-Narvaez FJ, 1996. Abundance and parity rate of *Lutzomyia cruciata* in an endemic focus of localized cutaneous leishmaniasis in Southern Mexico. *J Med Entomol* 33: 683-685.
22. Rebollar-Téllez E, Manrique-Saide P, 2001. New distributional record of *Lutzomyia cruciata* in the state of Yucatán, Mexico. *Entomol News* 112: 337-339.
23. Porter CH, Steurer FJ, Kreutzer RD, 1987. Isolation of *Leishmania mexicana mexicana* from *Lutzomyia ylephiletor* in Guatemala. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 929-930.
24. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaría G, Mendoza Y, Calzada JE, 2009. Molecular Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 81: 565-571.
25. Young DG, Duncan MA, 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the*

- Entomological Institute, No.54, Gainesville, Associated Publishers, 881pp.
26. McHugh CP, Grogl M, Kreutzer RD, 1993. Isolation of *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae) collected in Texas. *J Med Entomol* 30: 631-633.
 27. McHugh CP, Melby PC, LaFon S, 1996. Leishmaniasis in Texas: epidemiological and clinical aspects of human cases. *Am J Trop Med Hyg* 55: 547-555.
 28. Lawyer PG, Young DG, Butler JF, Akin DE, 1987. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 24: 347-355.
 29. Endris RG, Young DG, Perkins PV, 1987. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* by a North American sand fly, *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 24: 243-247.
 30. Young DG, Perkins PV, 1984. Phlebotomine sand flies of north America (Diptera: Psychodidae). *Mosqu News* 44: 263-304.
 31. Lainson R, Ward RD, Shaw JJ, 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 266: 628-630.
 32. Young DG, 1979. A Review of the Bloodsucking Psychodid Flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). *Inst Food Agric Sci Tech*. Bull 806, University of Florida, Gainesville, 266 pp.
 33. Montoya-Lerma J, Ferro C, 1999. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Amat-G G, Andrade-C G, Fernández F, eds. Insectos de Colombia. Vol II. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Alvarez Lleras No 13. Editora Guadalupe. Santa Fe de Bogotá, 210-245.
 34. Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA. Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA, 2007. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends Parasitol* 24: 12-17.
 35. Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP, 2003. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 85: 19-29.
 36. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J, 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*

- 84: 676-677.
37. Ibáñez-Bernal S, Rodríguez-Domínguez G, Gómez-Dantes CH, Ricardez-Esquinca JR, 2004. First record of *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar 1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 127-129.
 38. Seidelin H, 1912. Leishmaniasis and Babesiasis in Yucatán. *Ann Trop Med Parasitol* 6: 295-299.
 39. Beltrán E, Bustamante ME, 1942. Datos epidemiológicos acerca de la úlcera de los chicleros (Leishmaniasis americana) en México. *Rev Inst Salubr Enferm Trop* 3: 1-28.
 40. Beltrán E, 1944. Cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Sci Mon* 59: 108-119
 41. Rebollar-Téllez EA, Tun-Ku E, Manrique-Saide PC, Andrade-Narvaez FJ, 2005. Relative abundances of sandfly species (Diptera: Phlebotominae) in two villages in the same area of Campeche, in southern Mexico. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 193-201.
 42. Rowton E, de Mata M, Rizzo N, Navin T, Porter C, 1991. Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parassitologia* 33: 501-504.
 43. Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Med Vet Entomol* (accepted).
 44. Feliciangeli MD, Reyes RM, Limongi JE, 1988. Natural infection of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 393-394.
 45. Bonfante-Garrido R, Spinetti H, Cupillo E, Momen H, Grimaldi G, 1991. *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a vector of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Parassitologia* 33: 99-104.
 46. Christensen HA, Fairchil GB, Herrer A, Johnson CM, Young DG, de Vázquez AM, 1983. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 20: 463-484
 47. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (2004). "Cabeceras Municipales, 2000". Extraído de Principales Resultados por Localidad. XII Censo de Población y Vivienda 2000 del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). México.

48. Stockwell DRB, Peters D, 1999. The GARP Modeling System: problems and solutions to automated spatial prediction. *Int J Geogr Inf Sci* 13: 143-158.
49. Phillips SJ, 2006. Maxent software for species habitat modeling, version 2.2.0, <http://www.cs.princeton.edu/schapiere/maxent>.
50. Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudik M, Ferrier S, Guisan A, Hijmans RJ, Huettman, Leathwick JR, Lehmann A, Li J, Lohmann LG, Loiselle BA, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, Overton JM, Peterson AT, Phillips SJ, Richardson K, Scachetti-Pereira R, Schapire RE, Soberón J, Williams SE, Wisz MS, Zimmermann NE, 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.
51. Peterson AT, Pape M, Eaton M, 2007. Transferability and model evaluation in ecological niche modeling: A comparison of GARP and Maxent. *Ecography* 30: 550-560.
52. Graham CH, Elith J, Hijmans R, Guisan A, Peterson AT, Loiselle BA, NCEAS Species Distribution Modeling Group, 2007. The influence of spatial errors in species occurrence data used in distribution models. *J Appl Ecol* 45: 239-247.
53. McHugh CP, Grogl M, Kerr SF, 1990. Isolation of *Leishmania mexicana* from *Neotoma micropus* collected in Texas. *J Parasitol* 76: 741-742.
54. Kerr SF, McHugh CP, Merkelz R, 1999. Short report: A focus of *Leishmania mexicana* near Tucson, Arizona. *Am J Trop Med Hyg* 61: 378-379.
55. Chablé-Santos JB, Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Andrade-Narvaez FJ, 1995. Isolation of *Leishmania (L.) mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 53: 141-145.
56. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG, Itzá-Ortiz MF, Andrade-Narvaez FJ, 2000. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in Naturally Infected Rodents from the State of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 595-600.
57. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narvaez FJ, 2009. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 87-94.
58. Anderson RP, Lew D, Peterson AT, 2003. Evaluating predictive models of

- species' distributions: Criteria for selecting optimal models. *Ecol Modell* 162: 211-232.
59. Hijmans RJ, Cameron S, Parra J, 2005. WorldClim, Versión 1.3. <http://biogeو.berkeley.edu/worldclim/worldclim.htm>.
60. USGS, 2001. HYDRO 1k Elevation Derivative Database, <http://edcdaac.usgs.gov/gtopo30/hydro/>. U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
61. Olson DM, Dinerstein E, Wikramanayake ED, Burgess ND, Powell GVN, Underwood EC, D'amico JA, Itoua I, Strand HE, Morrison JC, Loucks CJ, Allnutt TF, Ricketts TH, Kura Y, Lamoreux JF, Wettengel WW, Hedao P, Kassem KR, 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *Bioscience* 51: 933-938.
62. Minter L, Kovacic B, Claborn DM, Lawyer P, Florin D, Brown GC, 2009. New state records for *Lutzomyia shannoni* and *Lutzomyia vexator*. *J Med Entomol* 46: 965-968.
63. Sánchez-Tejeda G, Rodríguez N, Parra CI, Hernández-Montes O, Barker DC, Monroy-Ostria A, 2001. Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, State of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 15-19.
64. Rebollar-Téllez EA, Orilla-Moguel H, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, Manrique-Saide P, Zapata-Peniche A, 2006. An update on the phlebotomid sandfly fauna from Yucatan, Mexico. *Entomol News* 117: 21-24.
65. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Zuloaga Romero S, Pérez-Becker R, Saavedra-Lira E, Pérez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejón O, Becker I, 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: Genetic heterogeneity of Mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Exp Parasitol* 95: 277-284.
66. González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, et al. (2010) Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1): e585. doi:10.1371/journal.pntd.0000585

Incrimination de reservorios de *Leishmania* en México: revisión de técnicas de muestreo y detección de *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en mamíferos silvestres

INTRODUCCIÓN

Dentro del ciclo de transmisión de los parásitos del género *Leishmania*, los mamíferos reservorios juegan un papel fundamental, debido a que sus características biológicas y ecológicas pueden estar directamente relacionadas con el curso de la infección. Disney (1968) definió a un reservorio como aquel que no solo adquiere la infección, sino que, además, es fuente de infección para los insectos vectores, mientras que un hospedero accidental solamente adquiere la infección. En otra definición, un reservorio primario es un mamífero responsable de mantener la infección en un foco enzoótico mientras que, un reservorio secundario, es un animal que, a pesar de infectarse, no puede sostener el ciclo enzoótico (Saliba et al. 1999, Shaw 1988). Los humanos y los animales domésticos, como caballos, cerdos y gatos son, en principio, hospederos accidentales (Silva et al. 2005), aunque se ha debatido que dentro del proceso de domiciliación de la enfermedad, los animales domésticos pueden estar actuando como reservorios únicos como ocurre con la leishmaniasis visceral, en donde el perro parece estar en capacidad de mantener por sí mismo el ciclo de transmisión. Ashford (1996) así mismo, considera una categoría llamada hospederos de enlace (*liaison hosts*), los cuales servirían como puente en la infección entre un ciclo netamente enzoótico y uno antropozoonótico rural.

En el caso de leishmaniasis cutánea, Reithinger y Davies (1999)

revisaron de manera minuciosa la literatura concerniente al papel como reservorios desempeñado por los perros domésticos y se concluyó que, al menos en esa fecha, no había los suficientes elementos para considerar a los cánidos domésticos como hospederos reservorios y que más bien corresponderían a hospederos accidentales.

Existen cinco criterios delineados originalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para incriminar a una especie de mamífero como reservorio de *Leishmania spp.*: a) debe existir una coincidencia en el área de distribución geográfica de la enfermedad y la especie de mamífero, b) el parásito aislado del mamífero debe ser el mismo aislado de casos en humanos, c) el mamífero debe tener una alta parasitemia para poder infectar a los vectores, d) la especie del mamífero debe tener una prevalencia de infección de al menos 20%, y e) la especie de mamífero debe sobrevivir lo suficiente para mantener el ciclo el ciclo de transmisión.

Biológicamente, un buen reservorio debe tener un contacto frecuente con los insectos vectores (*i.e* ser capaz de transmitir el parásito a los insectos y, por lo tanto, ser su fuente alimenticia), mantener el curso de la infección durante largo tiempo sin enfermarse drásticamente y albergar los mismos parásitos que infectan al humano (Chaves et al. 2007, Rotureau 2006, Saliba 1999). Las especies que actúan como reservorios deberían ser abundantes, ocupando un alto porcentaje de la biomasa de mamíferos, ser gregarios y tener una longevidad suficiente para pasar el parásito de una estación de transmisión a la siguiente (Ashford 1996).

Desde este punto de vista, las especies de roedores y murciélagos revisten una particular importancia, ya que reúnen características ecológicas de

importancia como reservorios. Con respecto a los murciélagos, su papel como reservorios de la leishmaniasis no está claro, aunque esto podría reflejar que existen muy pocos estudios al respecto. Por una parte, la abundancia y distribución de los murciélagos los coloca en un lugar importante dentro de la comunidad de mamíferos y existe evidencia en laboratorio, de que *Lutzomyia longipalpis* puede alimentarse de la sangre de ellos (Lampo et al. 2000). Rotureau (2006b) reportó la ausencia de infección en 216 especímenes analizados pertenecientes a cuatro familias; mientras que, recientemente, se reportó en Venezuela infección en un murciélago *Carollia perspicillata*, con *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) de once ejemplares analizados pertenecientes a tres géneros: *Carollia* (8), *Phylloderma* (2) y *Rhynophylla* (1) (De Lima et al. 2008).

En América, numerosas especies de mamíferos tanto silvestres como domésticos, pertenecientes a diversos grupos taxonómicos (roedores, marsupiales, primates, cánidos, murciélagos, lagomorfos y edentados) han sido encontradas infectadas con diferentes especies de *Leishmania* (Ashford, 1996). Sin embargo, estas especies pueden ser tanto reservorios como hospederos accidentales y su confirmación requiere de un proceso complejo y difícil de llevar a cabo bajo condiciones controladas (Rotureau 2006, Travi et al. 2002).

Las asociaciones entre un parásito y una especie de mamífero no son exclusivas, por lo tanto, puede encontrarse una especie de reservorio albergando distintas especies de parásitos (Saliba et al. 1999), como ocurre con *Choloepus didactylus* en Brasil, que se ha encontrado con infecciones concurrentes de *Leishmania braziliensis* (Calvopina et al. 2004), *L. shawi* (Gramiccia y Gradoni 2005) y *L. guyanensis* (Rotureau 2006).

A una escala geográfica mayor, un mamífero de distribución amplia puede albergar diferentes especies de parásitos en distintas regiones geográficas, como es el caso de *Didelphis marsupialis* que ha sido encontrado infectado en Brasil con *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (Rotureau 2006, Lainson et al. 1981), en Colombia con *L. chagasi* (Travi et al. 1994, Davies et al. 2000, Travi et al. 2002), en Guyana con *L. guyanensis* (Rotureau 2006) y en Venezuela con *L. garnhami* (Davies et al. 2000). Por otra parte, una misma especie de parásito puede encontrarse en diferentes especies de mamíferos de distintos grupos taxonómicos como ocurre con *Leishmania braziliensis* que infecta animales silvestres (Zeledón et al. 1977, Telleria et al. 1999, Davies et al. 2000) y domésticos, principalmente al perro (*Canis familiaris*) (Davies et al. 2000, De Lima et al. 2002).

En México, el parásito causante de la mayoría de los casos en pacientes, es *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Biagi, 1953). Esta especie tiene una amplia distribución que va desde el sur de los Estados Unidos de América (EUA), en donde ha sido aislada tanto de pacientes como de los roedores *Neotoma albigula*, *Neotoma floridiana* y *Neotoma micropus* (McHugh et al. 2003), hasta la parte norte de América del sur (Sierra et al. 2006). En Centroamérica, *L. mexicana* ha sido aislada de reservorios silvestres en Belice (*Heteromys desmarestianus*, *Sigmodon hispidus*, *Heterogeomys hispidus* (actualmente *Orthogeomys hispidus*), *Oryzomys couesi* y *Nyctomis sumichrasti*) (Disney 1968, Williams 1970) y Costa Rica (*H. dermarestianus*) (Zeledón et al. 1977). Adicionalmente, está reportada en Honduras, Nicaragua, Panamá y República Dominicana (Young y Duncan 1994). Es importante mencionar que en México se ha detectado la presencia de perros domésticos infectados con

Leishmania mexicana en los estados de Oaxaca, Tabasco y Quintana Roo (Velasco et al. 2009). Al igual que en otros estudios, el aislamiento del parásito se llevó a cabo por medio de improntas y de aspirado de las lesiones y la detección a nivel de especie se llevó a cabo por medio de anticuerpos monoclonales (Solano-Gallego et al. 2001, Velasco et al. 2009).

La información existente sobre las especies y órdenes de mamíferos infectados con parásitos de *Leishmania* no permite definir la existencia de patrones comunes dentro de los ciclos de transmisión ya que por ejemplo, en ocasiones los reservorios son especies endémicas y en otras especies de distribución amplia. En cada región geográfica existen especies particulares que pueden estar actuando como reservorios y su papel dentro de la transmisión debe ser valorado en cada foco, ya que la dinámica de la transmisión es compleja y está sujeta a las variaciones poblacionales de los mamíferos presentes en la zona y de los insectos vectores transmisores del parásito.

Técnicas de muestreo

En el área de distribución de *Leishmania mexicana*, los trabajos sobre la ecología de transmisión de la leishmaniasis son escasos y, por lo tanto, pocos estudios han estado orientados hacia la búsqueda de los reservorios de este parásito en los diferentes focos de infección (Van Wynsberghe et al. 2009, Raymond et al. 2003, Van Wynsberghe et al. 2000, Canto-Lara et al. 1999, Chable-Santos et al. 1995, Kerr et al. 1995, McHugh et al. 1990).

En EUA, los trabajos con reservorios se orientaron a la búsqueda de roedores en Arizona, en donde se detectó transmisión enzoótica y en el estado

de Texas se han reportado casos en humanos (McHugh et al. 1996). Los muestreos se llevaron a cabo cerca de las madrigueras de los roedores o en los corredores utilizados para desplazamiento, con el fin de lograr un mayor éxito de captura. Kerr y colaboradores (1995) indican que, gracias a su estructura, los nidos de *Neotoma micropus* pueden albergar al vector *Lutzomyia anthophora*, que se encontró infectado con *Leishmania mexicana* (McHugh et al. 1993). Por este motivo, la estrategia de enfocarse en los nidos y madrigueras puede ser de gran utilidad en los estudios de búsqueda de reservorios y vectores.

Los muestreos se llevaron a cabo principalmente con trampas Sherman (12,5 x 38 cm) cebadas con frutas y avena, y los animales capturados fueron pesados y sexados, para ser posteriormente liberados en el sitio de la captura. De cada uno de los ejemplares capturados, se obtuvo una biopsia de cada oreja con un sacabocado de 2 mm para ser procesada por cultivo y PCR.

En Arizona, Kerr y colaboradores (1999) llevaron a cabo un muestreo para buscar roedores infectados con *L. mexicana* entre septiembre y octubre de 1998. Se utilizaron trampas Sherman, colocadas cerca de madrigueras y huecos de árbol en donde pudieran encontrarse los roedores, no se especificó cual fue el cebo utilizado. En Texas, se ha establecido que la época de transmisión es en otoño, particularmente en octubre, y la presencia del parásito es focal (cuatro de 16 localidades muestreadas) (Kerr et al. 1995). En un estudio llevado a cabo entre agosto de 1998 y febrero de 2000, Raymond y colaboradores (2003) hicieron un muestreo de roedores, poniendo dos trampas Sherman cerca de cada nido. Se realizó un máximo de tres intentos por nido en cada estación, tomando una biopsia de cada oreja con un sacabocado de 2

mm de diámetro.

En México, existen pocos trabajos en los que se ha llevado a cabo la detección de parásitos en mamíferos silvestres y se ha identificado hasta ahora *Leishmania mexicana* aislada de roedores silvestres por medio de cultivo de los parásitos presentes en las lesiones (Van Wynsberghe et al. 2000) o detectada por medio de anticuerpos monoclonales (Canto-Lara et al. 1999). En 2009, Van Wynsberghe y colaboradores, publicaron un estudio con datos desde 1994 hasta 2004, en donde se incluyeron datos de colectas intermitentes de roedores en cuatro localidades de Campeche y se buscó la presencia de *Leishmania*, inicialmente por aspirado y cultivo, y a partir de las muestras de 2001 por medio de la técnica de PCR. En total, siete roedores fueron encontrados positivos para *Leishmania* a lo largo del estudio: *H. gaumeri*, *H. desmarestianus*, *O. phyllotis*, *O. melanotis*, *P. yucatanicus*, *S. hispidus*. *R. gracilis* y un marsupial: *Marmosa mexicana*.

En Belice, en estudios llevados a cabo desde la década de los años 1960, se hicieron numerosos esfuerzos por identificar los actores involucrados en la transmisión de la leishmaniasis encontrándose infectados en campo *Ototylomys phyllotis*, *Heteromys desmarestianus*, *Nyctomys sumichrasti* y *Sigmodon hispidus* (Strangways-Dixon y Lainson 1962, Lainson y Strangways-Dixon 1964, Disney 1968). En el trabajo de Disney (1968) se hizo una comparación de los métodos de muestreo de mamíferos y evaluó la atracción de los insectos hacia ciertas especies de mamíferos silvestres. También comparó el número de capturas con trampas ubicadas en el piso y en los árboles notando una diferencia importante en el número de ejemplares de algunas especies capturadas en cada uno de los sitios. Por ejemplo, *O.*

phyllostis fue capturado en su mayoría en las trampas de los árboles (96/118) mientras que *H. desmarestianus* fue capturado exclusivamente en el suelo.

En otros países de Centroamérica (El Salvador, Honduras, Nicaragua) si bien el parásito ha sido aislado de pacientes, no se han llevado a cabo estudios sobre los reservorios involucrados en la transmisión.

En Colombia, *L. mexicana* sólo ha sido aislada de pacientes (Corredor 1990, Montoya-Lerma 1999) y con respecto a los reservorios, aunque se han llevado a cabo estudios sobre ellos tanto en zonas de cultivo como en áreas silvestres, nunca se ha reportado *Leishmania mexicana* en mamíferos (Alexander et al. 1998). El bajo número de estudios sobre roedores, hace inminente la necesidad de identificar los mamíferos involucrados en los ciclos de transmisión de *L. mexicana* con el fin de generar las hipótesis sobre la distribución de este parásito en el país y el resto de Suramérica.

Métodos de detección

El desarrollo de métodos de detección de *Leishmania* ha estado orientado principalmente a proporcionar técnicas para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes. Sin embargo, estas técnicas no siempre resultan directamente aplicables a la detección del parásito en mamíferos silvestres, debido a la baja tasa de infección en reservorios y la marcada estacionalidad en la prevalencia de infección. Además, la parasitemia no se mantiene constante en la población de mamíferos y su estacionalidad está determinada por la abundancia relativa de individuos susceptibles en la población. Por lo tanto, sólo los individuos recientemente infectados podrían actuar como reservorios (Travi et al. 2002).

La correcta asignación de una especie como reservorio es un proceso complejo y en muchas ocasiones puede darse la situación de que los mamíferos infectados sean sintomáticos o asintomáticos y con ello, que se reporten falsos negativos (Rotureau 2006, Van Wynsberghe et al. 2000). También es usual encontrar bajas tasas de infección en condiciones naturales, lo que hace difícil el proceso de detección (De Lima et al. 2002).

En general, la detección de *Leishmania* en los ejemplares capturados en el campo se hace a partir de biopsias de diferentes órganos o de tejidos de lesiones que sugieran la presencia del parásito (Raymond et al. 2003, McHugh et al. 2003). La presencia de lesiones en los animales silvestres resulta interesante ya que pocos individuos las presentan. En el estudio llevado a cabo por Chablé-Santos y colaboradores (1995) en el estado de Campeche, se describen las características de las lesiones siendo en general puntos rojos o blancos de 3 a 5 mm de diámetro en la piel en áreas en las que se ha perdido el pelo, principalmente en la base de la cola.

En un ejemplar de *S. hispidus* capturado en Campeche, se documentó que las lesiones curaron espontáneamente después de un mes (Chablé-Santos et al. 1995). Sin embargo, en casos en los que se ha registrado diseminación de la enfermedad, los animales no se han recuperado de la infección (McHugh et al. 2003). Un estudio detallado sobre el curso de la infección en los mamíferos silvestres podría proporcionar valiosas pistas a nivel de respuesta inmune entre las diferentes especies y de los factores inmunológicos del hospedero que pueden ser determinantes sobre la evolución de la infección (Rotureau et al. 2006).

Las principales herramientas en el diagnóstico de la leishmaniasis son la observación al microscopio de muestras de tejido de la lesión o cultivos en los que se observan los promastigotes. Sin embargo, a pesar de que estas técnicas son relativamente rápidas y de bajo costo, resultan poco sensibles (Bensoussan et al. 2006). Los cultivos, aunque son más sensibles, son susceptibles a la contaminación (Belli et al. 1998).

En los trabajos de detección de *L. mexicana*, las técnicas más utilizadas son el diagnóstico por PCR acompañado de cultivo de los parásitos.

La técnica de cultivo utilizada en los trabajos de EUA utiliza diferentes medios: Schneider para *Drosophila* con 20% (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 500 unidades/ml de penicilina, 500 g/ml de estreptomina y 500 g/ml de 5-fluorocitosina (Kerr et al. 1995, Merkelz y Kerr 2002) o medio M199 (Kerr et al. 1999). Los aislados de *Leishmania* obtenidos en estos trabajos fueron identificados por medio de análisis de isoenzimas en la Walter Reed Army Institute of Research en Washington, DC.

PCR en la detección de *Leishmania* en mamíferos silvestres

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica molecular de gran sensibilidad que permite hacer simultáneamente la detección y caracterización de *Leishmania* (Belli et al. 1998). Resulta de gran utilidad en la detección de parásitos en reservorios ya que ha probado ser más sensible que las otras técnicas utilizadas, elevando considerablemente el porcentaje de muestras positivas obtenidas.

Existen diferentes oligonucleótidos para la detección, tanto de género como de especie, que utilizan blancos diferentes. Cada grupo de investigación

ha adaptado la técnica de acuerdo al tipo de muestras que se quieran procesar, de los mamíferos muestreados y del parásito que quiera detectarse (Bensoussan et al. 2006, Vergel et al. 2005). Sin embargo, aunque en la literatura se han reportado varios oligonucleótidos para la identificación de *Leishmania* en distintos reservorios, hay controversia sobre la especificidad y la sensibilidad en pruebas diagnósticas. Con el fin de unificar criterios y protocolos, faltaría realizar un estudio en laboratorio para comparar directamente los diferentes oligonucleótidos disponibles sobre las mismas cepas de parásito y evaluar atributos como la especificidad y sensibilidad.

En México y los EUA, los oligonucleótidos que han sido utilizados más comúnmente para detectar parásitos del género *Leishmania* en mamíferos silvestres, son los 13A (GTGGGGGAGGGGCGTTCT) y 13B (ATTTTACACCAACCCCAAGTT), diseñados por Rodgers (1990) para muestras de humanos y que identifican una región del cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* y amplifican 120 pares de bases. Con éstos se ha detectado *Leishmania* a partir de biopsias de oreja de *Neotoma micropus*, *Neotoma albigula* y *Neotoma floridiana* en los focos de transmisión de Texas y Arizona, EUA (Raymond et al. 2003, McHugh et al. 2003, Kerr et al. 1999).

En un ensayo en el que se comparó la sensibilidad y la especificidad de oligonucleótidos que anillan en diferentes regiones (kDNA, SLME e ITS1), se confirmó que los iniciadores 13A y 13B resultaron ser los más sensibles (98.7%), pero a su vez los menos específicos con seis falsos positivos (Bensoussan et al. 2006). Es importante señalar que los oligonucleótidos iniciadores publicados en el trabajo de Bensoussan y colaboradores (2006) están invertidos con respecto a nombre y secuencia y el iniciador 13B que

correspondería al 13A tiene dos bases cambiadas. Bajo estas discrepancias, no puede establecerse si en realidad se utilizaron secuencias diferentes o si hubo errores tipográficos en la publicación. Si bien los autores consideran que los falsos positivos podrían ser positivos verdaderos debido a que la técnica es demasiado sensible, es probable que esto se deba a la homología que presentan con monocitos de humano, como lo reportan Vergel y colaboradores (2005). Estos resultados deben considerarse con particular atención ya que en el caso de búsqueda del parásito en mamíferos podría estar ocurriendo lo mismo sin que sean detectados los falsos positivos porque no utilizan otras técnicas que sirvan como control o porque no usan un verdadero control negativo con ADN de ratón sano. Los trabajos de Kerr et al. (1999), McHugh et al. (2003), Raymond et al. (2003) y Van Wynsberghe et al. (2009), no presentan imágenes de los geles obtenidos y no utilizaron como un control negativo una muestra de ADN de ratón sano. Dada la alta homología, es necesario incluir controles de ratón sano con el fin de confirmar que los resultados positivos se deben estrictamente a la presencia de ADN del parásito y no de ratón.

Otros iniciadores que están siendo utilizados recientemente para detección por PCR en muestras de mamíferos, son LMC1S (5'-CTRGGGGTTGGTGAAAATAG-3') y LMC1R (5'-TWTGAACGGGRTTTCTG-3'), diseñados a partir del cinetoplasto de *Leishmania*. Estos tienen una alta sensibilidad (0.1 – 1 parásitos) y amplifican una región de 700 pb (Kato et al 2005).

CONCLUSIONES

Debido a que la transmisión de la leishmaniasis es un proceso focal e involucra un gran número de variables bióticas y abióticas, la detección del parásito en los mamíferos silvestres debería ser optimizada mediante los siguientes criterios: 1) identificar las áreas de muestreo basadas en evidencia de presencia del parásito por reportes previos de casos en humanos, 2) conocer la estacionalidad de la transmisión, es decir, en qué épocas del año ocurren los picos de infección; y 3) caracterizar la fauna existente en el lugar de muestreo con el fin de establecer el tipo de mamíferos que van a capturarse. Por lo general, en los trabajos en los que se ha detectado *L. mexicana*, el muestreo está dirigido a pequeños mamíferos (*i.e* menores de 500 g), siendo los más abundantes y los más fáciles de capturar. Adicionalmente, sería adecuado considerar estimaciones estadísticas que permitan conocer atributos poblacionales de las especies (*e.g* número de especies, sus abundancias relativas y estructura de edades), calcular un tamaño de muestra representativo por cada especie de interés, además de llevar a cabo muestreos verticales distribuyendo trampas a diferentes alturas con el fin de ampliar el rango de especies analizadas y poder detectar ciclos de transmisión diferentes.

Dadas las controversias sobre la especificidad y sensibilidad de los distintos oligonucleótidos (iniciadores) reportados en la literatura, es prioritario generar un consenso y optimizar métodos que permitan el diagnóstico molecular de *Leishmania* en reservorios silvestres. Por medio de pruebas en laboratorio, podrían realizarse comparaciones de sensibilidad y especificidad sobre tejidos de roedores infectados con diferentes concentraciones de

parásitos de *L. mexicana* y con otros trypanosomatidos.

Finalmente, es importante remarcar que la detección del parásito en los mamíferos no es evidencia suficiente de su papel como reservorios y que el término reservorio debería solo utilizarse cuando exista evidencia ecológica de su papel y otros criterios de incriminación hayan sido validados (Disney 1968). La incriminación de un mamífero como reservorio hace parte de un proceso dinámico, susceptible a cambios en el espacio y el tiempo, por lo tanto, de acuerdo con Chaves et al. (2007) es necesario desarrollar criterios de incriminación que permitan demostrar que existe una dinámica de transmisión en la que un hospedero vertebrado puede transmitir a otro el parásito por medio de un insecto vector.

Si bien las aproximaciones ecológicas a los estudios de transmisión de enfermedades son un campo relativamente nuevo, análisis multidisciplinarios en los que se haga una valoración de los focos de transmisión involucrando la mayor cantidad de variables posibles y en los que se tengan en cuenta las dinámicas poblacionales de las especies involucradas, van a permitir tener mayor claridad sobre las condiciones eco-epidemiológicas de los focos de transmisión, optimizando la implementación de estrategias de control y prevención.

REFERENCIAS

Disney RHL. 1968. Observations on a zoonosis: leishmaniasis in British Honduras. *Journal of applied ecology* 5:1-59.

Saliba EK. 1999. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 17(3):275-277.

Shaw JJ. 1988. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83(Suppl1):486-490.

Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. 2005. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitology* 21(12):550-551.

Ashford RW. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14(5):523-32.

Reithinger R, Davies CR. 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61(4):530-41

Chaves LF, Hernández MJ, Dobson AP, Pascual M. 2007. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 23 (7):311-316.

Rotureau B. 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(1):81-96.

Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(6):718-9

[Rotureau B](#), [Catzefflis F](#), [Carme B](#). 2006b. Absence of *Leishmania* in Guianan bats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(2):318-21.

De Lima H, Rodríguez N, Barrios MA, Avila A, Cañizales I, Gutiérrez S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103(4):412-4.

Travi BL, Arteaga LT, León AP, Adler GH. 2002. Susceptibility of Spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(6):887-892.

Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y. 2004. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(7):663-72.

Gramiccia M, Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology* 35(11-12):1169-80.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. 1981. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75(4):530-6.

Travi B, Montoya J. 1994. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM. Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina. Cali, Colombia 280 pp.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saude Publica* 16(4):925-50.

Zeledón R, McPherson B, Ponce C. 1977. Isolation of *Leishmania braziliensis* from a Wild Rodent in Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26(5):1044-1045.

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. 1999. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(1):5-6.

De Lima H, De Guglielmo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodriguez N. 2002. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(2):169-74.

McHugh CP, Thies ML, Melby PC, Yantis LD, Raymond RW, Villegas MD, Kerr SF. 2003. Short report: A disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern wood rat, *Neotoma floridiana* collected in Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (5):470-472.

[Sierra D](#), [Ochoa M](#), [Calle JI](#), [García G](#), [Colorado D](#), [Vélez ID](#). 2006. *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the village of San Matias, municipality of Gomez Plata, North West of Antioquia, Colombia. *Biomédica* 26(Supl1):232-5.

Williams P 1970. Phlebotomine sand flies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine*

and Hygiene 64: 317-364.

Young, D.G. y M.A. Duncan. 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the Entomological Institute 1994, No.54, Gainesville, Associated Publishers, 881 pp.

Velasco O, Rivas B, Munguía A, Hobart O. 2009. Leishmaniasis cutánea de perros en México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 29(3):135-140.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. Journal of Clinical Microbiology 39(2):560-563.

Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narváez FJ. 2009. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, México. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 51(2):87-94.

Raymond RW, McHugh CP, Witt LR, Kerr SF. 2003. Temporal and spatial distribution of *Leishmania mexicana* in a population of *Neotoma micropus*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 98(2) 171-180.

Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG, Itzá-Ortiz MF, Andrade-Narváez FJ. 2000. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in Naturally Infected Rodents from the State of Campeche, Mexico. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 95(5): 595-600

Canto-Lara SB, Van Wynsberghe NR, Vargas-Gonzalez A, Ojeda-Farfan FF, Andrade-Narvaez FJ. 1999. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania spp.* isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94(3):305-9.

Chablé-Santos JB, Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Andrade-Narvaez FJ, 1995. Isolation of *Leishmania (L.) mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. Am J Trop Med Hyg 53: 141-145.

Kerr SF, McHugh CP, Dronen NO Jr. 1995 Leishmaniasis in Texas: prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *Neotoma micropus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53(1):73-7.
McHugh CP, Grogl M, Kerr SF, 1990. Isolation of *Leishmania mexicana* from *Neotoma micropus* collected in Texas. J Parasitol 76: 741-742.

McHugh CP, Melby PC, LaFon SG. 1996. Leishmaniasis in Texas: epidemiology and clinical aspects of human cases. American Journal of

Tropical Medicine and Hygiene 55(5):547-55.

McHugh CP, Grogl M, Kreutzer RD. 1993. Isolation of *Leishmania Mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae) collected in Texas. Journal of Medical Entomology 30(3):631-633.

Kerr SF, McHugh CP, Merkelz R. 1999. Short report: A focus of *Leishmania mexicana* near Tucson, Arizona. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 61(3):378-379.

Strangwys-Dixon y Lainson. 1962. Dermal leishmaniasis in British Honduras: some host-reservoirs of *L. brasiliensis mexicana*. British Medical Journal 1(5292):1596-8.

Lainson R y Strangways-Dixon J. (1964) The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras Part II. Reservoir-hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 58:136-153.

Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Duque S, Pelaez D, Rodriguez G, Nichols S, Hernandez CA, Morales A, Young DG, Ferro de Carrasquilla C. 1990. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42:206-214.

Montoya-Lerma J, Cadena H, Segura I, Travi BL. 1999. Association of *Lutzomyia columbiana* (Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia due to species of the *Leishmania mexicana* complex. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94(3):277-83.

Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann, Adler GH. 1998. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Tropica 69:41-50.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology. 44(4):1435-1439.

Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of new World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58(1):102-109.

Merkelz RM y Kerr SF. 2002. Demographics, den use, movements, and absence of *Leishmania mexicana* in southern plains woodrats (*Neotoma micropus*). Southwestern Naturalist 47:70-77

Vergel C, Walker J, Saravia N. 2005. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. American Journal

of Tropical Medicine and Hygiene 72(4):423-9.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*. 71:267-275.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(1):87-93.

Caracterización ecológica y búsqueda de reservorios potenciales de leishmaniasis en la región sureste de México

INTRODUCCIÓN

El ciclo de transmisión de la leishmaniasis es un proceso de interacciones complejas, debido a que el parásito, un tripanosomátido del género *Leishmania*, requiere dos hospederos silvestres -un mamífero reservorio y un insecto vector- para llevar a cabo su ciclo de vida. En el vector, el ciclo se conoce como ciclo propagativo, debido a que el parásito se multiplica y cambia su forma de amastigote a promastigote procíclico primero y después alcanza la forma infectiva o promastigote metacíclico; en el reservorio sólo se encuentra en su forma de amastigote, inmóvil e intracelular (Sánchez-Saldaña et al. 2004). Si bien hay evidencias de que podría existir un proceso de transmisión de humano a humano por medio de un vector, en especial en el intra-domicilio (Vergel et al. 2005), y que se ha comprobado que los mamíferos domésticos pueden actuar como reservorios de la enfermedad (Ryan et al. 2003, Solano-Gallego et al. 2001), los mamíferos silvestres constituyen los reservorios naturales del parásito en un ciclo totalmente enzoótico y, por lo tanto, son los que revisten la mayor importancia desde el punto de vista de la ecología de transmisión de la enfermedad (Ashford 1996, De Almeida et al. 2006).

Los primeros registros de leishmaniasis cutánea en México se remontan al año 1912 (Seidelin, 1912) y se ubicaron en las zonas boscosas de la península de Yucatán (Beltrán y Bustamante 1942, Beltrán 1944). Actualmente, esta enfermedad se considera como un problema de salud

pública ya que se encuentra en 22 estados, siendo Tabasco, Quintana-Roo, Campeche, Chiapas, Oaxaca y Nayarit aquellos con mayor número de casos conocidos (SSA, 2006). En algunos estados, como es el caso de Tabasco, se ha registrado además de la forma de leishmaniasis cutánea localizada (LCL), que es la más común, leishmaniasis cutánea difusa (LCD), en la que los pacientes presentan una sintomatología severa y progresiva a pesar de que aparentemente son infectados con la misma especie de parásito (*Leishmania mexicana*) (Berzunza-Cruz et al. 2000, 2002). Por una parte, se cree que esta manifestación está relacionada con la respuesta inmunológica por parte de los pacientes (Velasco et al. 1989, Berzunza-Cruz et al. 2000) y también se ha propuesto que el entorno de transmisión de la enfermedad, en función de los vectores y reservorios involucrados, pueden jugar un papel importante en la variación de la manifestación clínica (Rotureau 2006a).

En México, el parásito *Leishmania mexicana* (Biagi, 1953), causante de los casos en pacientes, ha sido también aislado de roedores silvestres (*Sigmodon hispidus*, *Oryzomys melanotis*, *Otodylomys phyllotis*, *Peromyscus yucatanicus*, *Heteromys gaumeri*, *Heteromys desmarestianus*, *Reithrodontomys gracilis*) y del marsupial *Marmosa mexicana* en el estado de Campeche (Cantolara et al. 1999, Van Wynsberghe et al. 2000, 2009). Adicionalmente, en Belice se ha reportado infección en los mamíferos *H. desmarestianus*, *S. hispidus*, *Heterogeomys hispidus*, *Oryzomys couesi* y *Nyctomys sumichrasti* (Disney et al. 1968).

Con respecto a los insectos vectores responsables de la transmisión en esta zona, *Lutzomyia olmeca olmeca* (Vargas & Díaz-Nájera 1959) es el único que ha sido incriminado (Biagi et al. 1965). Hace algunos años, en el estado de

Campeche, se realizaron disecciones de especímenes colectados en campo, encontrando flagelados en *L. olmeca olmeca* y *L. cruciata*, aunque la técnica de disección no permitió realizar una identificación específica (Rebollar et al. 1996). En la actualidad, se ha encontrado evidencia de que otras especies de flebotomíneos tienen importancia médica, como es el caso de *L. shannoni*, *L. panamensis* y *L. ylephiletor* (Pech et al. 2010, Sánchez-García et al. 2010). En cuanto a *L. ovallesi*, su papel como vector en México aún es muy incierto, pero en algunas publicaciones se ha reportado que ha sido encontrada en el campo infectada con parásitos presuntamente de *Leishmania braziliensis* en Centroamérica (Porter et al. 1987) y en Venezuela (Bonfante-Garrido et al. 1991). En el sureste de México se ha demostrado la infección en humanos con *L. braziliensis* (Velasco-Castrejón et al. 1989, Pérez-Mutul et al. 1994; Canto-Lara et al. 1999), pero se desconoce qué especies de flebotomíneos podrían ser los vectores y hasta ahora solo se puede inferir que *L. ovallesi* es la especie que más probablemente actúa como vector.

Actualmente no existe información detallada sobre los ciclos de transmisión de la leishmaniasis en la región sureste de México, debido a que no se ha llevado a cabo una detección rigurosa y simultánea de los vectores, reservorios y parásitos presentes en los diferentes focos. Tabasco es el estado con mayor número de casos históricos en el país (6216 casos entre 1988 y 2006 de acuerdo con los Servicios de Salud del estado) y allí se encuentra la mayor diversidad de cuadros clínicos de leishmaniasis asociados a pacientes que habitan en zonas de cultivo (cacaotales principalmente). No obstante la magnitud del problema de salud, hasta ahora se desconoce las especies que actúan como vectores y reservorios en esta región, de hecho no existen

publicaciones científicas al respecto y es de destacar lo prioritario y urgente que resulta valorar estos componentes. En el estado de Campeche, las autoridades de salud han reportado el aumento de pacientes con formas clínicas resistentes al tratamiento, lo cual sugiere la posible introducción de nuevas especies de *Leishmania* provenientes de Centro y Sudamérica. Por el contrario, el estado de Yucatán no reporta con frecuencia casos de leishmaniasis a pesar de limitar con los estados de Campeche y Quintana Roo; además no existen ríos o montañas que pudieran servir como barreras entre Yucatán y los estados vecinos los cuales presentan consistentemente un mayor número de casos anuales. Estas diferencias en la incidencia y la prevalencia de la enfermedad entre Yucatán y los estados vecinos, sugiere que puede haber otras variaciones como las ecológicas causantes de la diferencia en el número de casos, independiente de la notificación de casos.

Estudios previos sobre la distribución y la ecología de los vectores no han revelado una variación que pueda ser asociada a las diferentes manifestaciones clínicas. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es explorar si existe una variación geográfica y ecológica en función de las especies de mamíferos, considerando su asociación con los insectos vectores.

MÉTODOS

Con el fin de reunir la información disponible sobre los mamíferos presentes en la Península de Yucatán y Tabasco, se construyó una base de datos geográfica, incluyendo todas las especies de mamíferos depositados en colecciones biológicas disponibles en línea (GBIF; www.gbif.org) y complementada con datos de los investigadores Ella Vázquez del Instituto de Ecología de la UNAM y Mircea Hidalgo de la Universidad Juárez Autónoma de

Tabasco (UJAT). La información sobre la distribución de las 11 especies de *Lutzomyia* de importancia médica presentes en México había sido previamente reunida en una base de datos geográfica (González 2007) y fue complementada con puntos de colecta no publicados en Tabasco del maestro Raúl Zapata Mata de la UJAT.

Con el fin de conocer la distribución de las especies de mamíferos en el ambiente ecológico y evaluar si existen diferencias significativas entre las áreas de transmisión, se realizó una prueba de componentes principales por medio del programa JMP 6.0. Para todas las especies de mamíferos, se asignaron a cada punto de colecta variables climáticas y topográficas. Las coberturas climáticas utilizadas fueron elaboradas por el Dr. Oswaldo Téllez con el método Bioclim (Nix 1986, Busby 1991) e incluyen 19 variables climáticas (estacionalidad de la temperatura, precipitación del cuarto más seco, temperatura mínima promedio del mes más frío, isothermalidad, rango anual de temperatura, temperatura promedio del cuarto más seco, precipitación del mes más seco, temperatura promedio del cuarto más lluvioso, temperatura promedio del cuarto más frío, precipitación del cuarto más frío, estacionalidad de la precipitación, rango diurno de temperatura, precipitación del cuarto más lluvioso, temperatura máxima promedio del mes más cálido, temperatura promedio anual, temperatura promedio del cuarto más cálido, precipitación del mes más lluvioso, precipitación del cuarto más cálido, precipitación anual). La información topográfica fue obtenida a partir de las coberturas de aspecto, pendiente, índice topográfico y elevación del conjunto de datos de Hydro-1K (USGS 2001). Todas las coberturas fueron utilizadas a una resolución de 30 segundos de arco (aproximadamente 1km) para los análisis.

A partir de los registros de co-ocurrencia de mamíferos y vectores, se llevaron a cabo pruebas de interacción de especies, utilizando la fórmula epsilon (ϵ):

$$\epsilon(B_i|B_j) = \frac{N_{B_j}(P(B_i|B_j) - P(B_i))}{(N_{B_j}P(B_i)(1 - P(B_i)))^{1/2}}$$

cuya hipótesis nula es que los elementos de las clases B_i se distribuyen al azar en el espacio geográfico.

Esta fórmula permite calcular una probabilidad de interacción entre especies de mamíferos e insectos vectores (Stephens et al. 2009). Este método permite valorar, desde una perspectiva geográfica, cuales especies coinciden en el espacio geográfico con mayor frecuencia, como un indicador de su posible interacción. En el caso de los vectores, debido a su condición de ser hematófagos, su interacción con los mamíferos podría ser como fuente de alimento, implicando su participación como reservorios dentro del ciclo de transmisión de *Leishmania* entre mamíferos silvestres y al humano.

Para este análisis, se utilizó una gradilla de 10 km y se asignó a los puntos de colecta de cada especie el valor de la celda en la que se ubicó. Los valores del número de celdas del vector, número de celdas del reservorio, número de celdas coincidentes y número de celdas totales fueron asignadas a la fórmula con el fin de obtener la probabilidad de interacción. De esta forma, se obtuvo un listado de los mamíferos que potencialmente podrían estar asociados a los vectores de leishmaniasis en los cuatro estados analizados, considerando sospechosos todos los mamíferos con valores de interacción ϵ mayores a dos, que es el valor considerado significativo. Para los vectores no se discriminó por especie, sino que se consideró el género *Lutzomyia*, suponiendo que cualquiera de las especies de importancia médica puede infectarse de cualquier reservorio.

Muestreo

Con el fin de validar las predicciones, se seleccionaron dos áreas de muestreo con diferentes incidencias de transmisión. Una corresponde a una zona en la que existe transmisión recurrente, en el límite entre los estados de Tabasco y Chiapas (Beltrán 1944) y la otra en donde el número de casos conocidos es muy bajo, en el estado de Yucatán.

La validación de las predicciones se hizo en campo entre los meses de febrero y mayo de 2009 con el fin de confirmar la presencia de mamíferos y vectores y corroborar la infección de los ejemplares capturados. En el área de transmisión de Tabasco y Chiapas, se muestrearon cuatro localidades por estado y otras cuatro localidades en el estado de Yucatán. Se llevó a cabo un muestreo por localidad, teniendo en cuenta que, aunque la ausencia de infección no puede considerarse como un negativo verdadero para la localidad, los positivos sí pueden ser considerados como evidencia de infección en la localidad (Fig. 1).

Los muestreos de mamíferos se llevaron a cabo generando un cuadrante de 100 trampas Shermann (HB Shermann Traps Inc., Tallahassee, FL) cebadas con una mezcla de avena con vainilla, distribuidas de acuerdo al terreno y separadas entre sí cada 10 metros. Dentro del cuadrante se colocaron cinco trampas Tomahawk (Tomahawk Live Trap Co., WI), cebadas con chorizo para captura de mamíferos medianos. Las trampas fueron montadas antes de anochecer y permanecieron activas durante la noche. Además, en cada localidad se pusieron tres redes para la captura de murciélagos montadas al anochecer y revisadas cada quince minutos durante cuatro horas. Los mamíferos capturados fueron medidos, pesados y sexados,

se anotó su edad y estado reproductivo. La identificación se llevó a cabo siguiendo la nomenclatura de Ramírez-Pulido *et al.* (2005).

Algunas muestras adicionales de localidades dentro del estado de Tabasco fueron obtenidas por medio de un convenio de colaboración con el grupo de Ecología de la UJAT.

Análisis moleculares para detección de *Leishmania*

Con el fin de detectar la presencia de *Leishmania* en mamíferos silvestres, se obtuvieron muestras de los ejemplares colectados en campo y se procesaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De los roedores y marsupiales, se tomaron muestras de piel (oreja y cola), hígado y corazón y para los murciélagos de piel (oreja y ala), hígado y corazón.

Los tejidos obtenidos fueron procesados con el kit de extracción de Qiagen (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA, USA) para obtener el DNA de las muestras y el PCR fue llevado a cabo utilizando los iniciadores LMC1S (5'-CTRGGGGTTGGTGTAATAAG-3') y LMC1R (5'-TWTGAACGGGRTTTCTG-3') diseñados por Kato (2005). Estos iniciadores amplifican una región del cinetoplasto de *Leishmania* de 700 pb.

La mezcla de reacción se preparó a partir de 25 µl de master mix, 2 µl de ADN, 1 µl de cada uno de los iniciadores y agua para completar un volumen total de 50 µl. Los ciclos de la PCR fueron: 5 minutos a 94°C de desnaturalización, seguidos de 30 ciclos de anillado a 94°C por un minuto, 55°C un minuto y 72°C un minuto, finalizando con 10 minutos a 72° C de extensión. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en

geles de agarosa utilizando como control del corrido de peso molecular ADN marcador IX (0.072-1.35kbp). Los productos fueron visualizados en un transluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

La base de datos de mamíferos incluyó 802 registros para el estado de Yucatán, 698 para Campeche, 425 para Quintana Roo y 481 para Tabasco; mientras que para la de vectores se obtuvieron 9 para Yucatán, 87 para Campeche, 40 en Quintana Roo y 12 en Tabasco.

El análisis de componentes principales, incluyendo todas las especies de mamíferos presentes en el área de estudio, refleja una variación geográfica y ecológica. Se obtuvieron dos grupos de especies bien diferenciados: el primero, que se distribuye a lo largo del eje Y con el componente principal CP1, relacionado a variaciones en la temperatura, agrupa los registros de mamíferos en los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán y, el segundo, relacionado a variaciones en precipitación (explicar cuales) agrupa mamíferos que ocurren principalmente en el estado de Tabasco (Fig 2).

Con respecto al análisis de interacción entre reservorios potenciales y vectores, el estado con mayor cantidad de especies de mamíferos con interacciones significativas es Quintana Roo, con 39 especies, pertenecientes a seis órdenes, seguido de Yucatán con 33 especies en cinco órdenes, Campeche con 16 especies en cuatro órdenes y, Tabasco con 12 especies en cuatro órdenes. En todos los estados, el mayor número de especies pertenece al orden Chiroptera; sin embargo, la composición de especies varía entre los estados.

En Tabasco, el 75% de las especies sospechosas ($n = 9$) pertenecen al

orden Chiroptera, mientras que sólo una especie está en cada uno de los órdenes Carnivora (*Lontra longicaudis*), Pilosa (*Tamandua mexicana*) y Rodentia (*Orthogeomys hispidus*). En Campeche, 37,5% están en el orden Chiroptera (n = 6), 25% en Rodentia (n = 4), 25% en Carnivora (n = 4) y 12,5% en Didelphimorphia (n = 2). En Yucatán, el orden Chiroptera tiene 60,6% (n = 20) de las especies, Rodentia tiene el 30,3% (n = 10) y, cada uno de los ordenes Didelphimorphia (*Tlacuatzin canescens*), Lagomorpha (*Sylvilagus floridanus*) y Cingulata (*Dasypus novemcinctus*) tienen una especie. En Quintana Roo, 41% de las especies están en el orden Chiroptera (n = 16), 33% en Rodentia (n = 13), 15% en Carnivora (n = 6), 4.1% en Primates con dos especies (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*) y una especie para los ordenes Perissodactyla (*Tapirus bairdii*) y Didelphimorphia (*Didelphis virginiana*) (Tabla 1).

Muestreo

A partir de los muestreos realizados en las 12 localidades seleccionadas, se capturaron 98 mamíferos: 26 roedores, 2 marsupiales y 70 murciélagos. En Tabasco se capturaron 14 murciélagos, 2 marsupiales y 6 roedores y en Chiapas 56 murciélagos y 5 roedores. En el estado de Yucatán se capturaron exclusivamente roedores, 9 en Chichimilá, 5 en Cuncunul y uno en Xul; ningún mamífero fue capturado en Yaxcuná.

Chiapas fue el estado con mayor número de capturas (n = 61), seguido de Tabasco (n = 22) y Yucatán (n = 15). La localidad con mayor número de ejemplares capturados fue Emiliano Zapata, Chiapas, con 27 mamíferos (Tabla 2). Los mamíferos colectados pertenecieron a 25 especies diferentes, de las cuales 11 fueron murciélagos. Adicionalmente, cuatro ejemplares fueron

identificados a nivel de género. El grupo de mastozoología de la UJAT proporcionó muestras de cuatro ardillas *Sciurus aureogaster* de la localidad de Paraíso en Tabasco, y un murciélago *Artibeus lituratus* de Comalcalco, Tabasco, que presentaba lesiones sugestivas de presencia de *Leishmania*.

Análisis moleculares de detección de *Leishmania*

Se procesaron por PCR tres muestras de cada uno de los 98 ejemplares de mamíferos colectados en campo y de los cinco ejemplares entregados por el grupo de mastozoología de la UJAT.

En total se obtuvieron 13 mamíferos positivos para el género *Leishmania*, de los cuales 9 fueron murciélagos (*Artibeus lituratus* (n = 1), *Artibeus jamaicensis* (n = 2), *Glossophaga soricina* (n = 2), *Sturnira lilium* (n = 2), *Desmodus rotundus* (n = 1), *Carollia sowelli* (n = 1)), dos roedores (*Sciurus aureogaster* y *Ototyllumys phyllotis*) y un marsupial (*Philander oposum*). Las muestras infectadas fueron predominantemente de piel seguidas de hígado y corazón.

Los murciélagos infectados provenían de tres localidades de los estados de Tabasco (Comalcalco y Yumká) y Chiapas (Emiliano Zapata), mientras que el único roedor infectado fue colectado en Yucatán (Chichimilá). De los ejemplares entregados por la UJAT, un murciélago (*Artibeus lituratus*) y dos ardillas (*Sciurus aureogaster*) provenientes de Comalcalco y Paraíso respectivamente, resultaron infectadas. Es relevante mencionar que el murciélago *Artibeus lituratus* presentó una gran variedad de lesiones en las alas sugestivas de infección con *Leishmania* sp. y al ser procesado resultó positivo para infección en todas las muestras (Tabla 3).

DISCUSIÓN

A partir de los análisis realizados, fue posible comprobar que en la región sureste de México existe una variación importante entre los componentes involucrados en la ecología de la transmisión, tanto a nivel de las variables bióticas como abióticas. En Tabasco y el norte de Chiapas existe un ciclo de transmisión mantenido por mamíferos diferentes a los que han sido confirmados como reservorios en la península de Yucatán (Van Wynsberghe et al. 2000, 2009, Canto-Lara et al. 1999) y esta variación en la composición de especies parece estar relacionada con variaciones ambientales, ya que Tabasco está sujeto a regímenes de humedad y temperatura diferentes a los de la Península (Fig. 2).

Los mamíferos sospechosos de ser reservorios en Tabasco son predominantemente arborícolas o de talla grande como el oso hormiguero (*Tamandua mexicana*) y, aparentemente, los ratones no están cumpliendo un papel protagónico en los focos de transmisión de este estado debido a que sus valores de interacción con los insectos vectores no resultó significativa. El oso hormiguero *Tamandua tetradactyla* ha sido encontrado infectado en Brasil y Ecuador (Calvopina et al. 2004, Davies et al. 2000, Telleria et al. 1999). Confirmando las predicciones arrojadas por las redes de interacción de especies, los mamíferos encontrados con *Leishmania* en esta región fueron murciélagos o mamíferos arborícolas, como ardillas (*Sciurus aureogaster*) y marsupiales (*Philander opossum*), que son reservorios confirmados en otros países (Rotureau 2006a, Davies et al. 2000).

En el estado de Quintana Roo, las redes mostraron una gran diversidad de mamíferos sospechosos como grandes carnívoros y primates, que no han

sido probados como reservorios en México. Sin embargo, algunas especies de primates han sido reportadas como reservorios en Brasil (Gramiccia et al. 2005) y resulta interesante la presencia de la zorra *Urocyon cinereoargenteus*, ya que el zorro sudamericano, *Cerdocyon thous*, ha sido reportado infectado con *Leishmania* en Brasil y Venezuela (Rotureau 2006a, Curi et al. 2006, Davies et al. 2000).

Los resultados obtenidos para Yucatán con la presencia de un roedor infectado, sugieren que en el estado pueden estar ocurriendo ciclos enzoóticos de transmisión de la enfermedad. La variación en la tasa de infección entre los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche, puede deberse, entre otros factores, a que en Yucatán hay pocos remanentes de bosque conservado y las actividades económicas del estado ya no están relacionadas con la explotación del chicle (*Manilkara zapota*), por lo tanto hay menos población expuesta a la picadura de los insectos vectores. Es importante llevar a cabo una exploración de los ciclos enzoóticos que ocurren en el estado.

Con respecto a los murciélagos, los resultados de infección obtenidos en este trabajo con seis especies infectadas, abren la posibilidad de que estén cumpliendo un papel relevante como reservorios de la enfermedad. Su abundancia y distribución los posiciona en un lugar importante dentro de la comunidad de mamíferos y existen evidencias en laboratorio de que los insectos vectores pueden alimentarse de ellos (Lampo et al. 2000). Estudios previos sobre detección de *Leishmania* en murciélagos no arrojan información contundente, ya que Rotureau et al. (2006b) reportaron ausencia de infección en 216 especímenes de cuatro familias analizadas. Sin embargo, recientemente se reportó en Venezuela infección de murciélagos de la especie

Carollia perspicillata con parásitos de *Leishmania chagasi* (De Lima et al. 2008). Queda por confirmar en nuestro estudio la especie del parásito encontrado en las muestras positivas con el fin de saber a qué ciclo de transmisión podrían vincularse estos reservorios sospechosos. Adicionalmente, el hecho de haber encontrado un murciélago con lesiones y una grave infección representada por la presencia del parásito en todos los órganos analizados, pone en evidencia que es necesario llevar a cabo una valoración amplia del rol de los murciélagos como reservorios, ya que uno de los criterios principales para su incriminación indica que no deben padecer la enfermedad y resulta interesante la grave afección del ejemplar capturado (Ashford 1996).

Desde el punto de vista de la ecología de la transmisión, variaciones en la composición de especies de mamíferos son de gran importancia, ya que pueden sugerir que existen variaciones también en los insectos que están actuando como vectores y en los parásitos circulantes. Rotureau et al. (2006c) en las Guayanas, descubrieron que en una misma localidad, había variaciones en los ciclos de transmisión existiendo uno a nivel de sotobosque y uno en un estrato más alto del bosque con diferentes especies de vectores, reservorios y parásitos soportando cada uno.

En los estudios llevados a cabo por Disney (1968) en Belice, se evidenció una gran variación en la incidencia de la enfermedad entre focos muy cercanos a través del tiempo (Van Wynsberghe et al. 2009). En nuestro estudio, la distribución de las localidades con mamíferos infectados sugiere que existen diferentes focos de transmisión ya que las localidades positivas son distantes unas de otras. Dentro de una región con tasas aparentemente bajas de transmisión, pueden existir focos con altas incidencias, lo que demuestra la

heterogeneidad geográfica de la leishmaniasis (Bern et al. 2008). La distribución focal de la infección puede estar determinada por un recambio en la proporción de reservorios susceptibles en una población y, por la variación espacial y estacional de los vectores: por lo tanto, es crítico detectar los momentos del año en que esta situación ocurre en cada foco de transmisión (Brandão-Filho y Shaw 2006).

Es necesaria una valoración al nivel de foco en donde puedan analizarse las variables micro-ambientales involucradas en la transmisión con el fin de tener información confiable sobre la que se puedan diseñar las estrategias de control y prevención. Adicionalmente, es necesario llevar a cabo ajustes periódicos para poder adaptar estas estrategias a ambientes cambiantes y en proceso de urbanización (Desjeux 2001).

La variación entre los focos de Tabasco y la Península no resulta ser exclusivamente climática sino que, además, ha habido una transformación importante en el uso del suelo en el estado de Tabasco (Márquez et al. 2005), causando que algunos de los casos en este estado estén relacionados a la presencia de cultivos de cacao. Las áreas de cultivo resultan escenarios importantes desde el punto de vista de la composición de especies ya que al constituir una oferta continua e ilimitada de alimento, favorecen el establecimiento de especies de roedores y marsupiales que pueden incluso convertirse en plagas (Rotureau 2006a). En Veracruz, el aumento en el número de casos está relacionado a la época de corte de café lo que implica un mayor número de humanos susceptibles en contacto con los vectores que habitan estas zonas de cultivo (Pérez-Sánchez et al. 2007). Desde el punto de vista de los vectores, los cultivos sombreados y con alta humedad relativa son de gran

importancia ya que proveen hábitat estables, con variaciones relativamente escasas en sus condiciones de humedad y temperatura, ya que generalmente están sometidos a sistemas de riego y cuentan con árboles de sombra. De forma semejante, los cultivos ofrecen un refugio idóneo para ciertas especies de mamíferos que tienen la plasticidad de establecerse en estas zonas y aumentar sus abundancias relativas como es el caso de roedores que son plagas de cultivos. Escenarios óptimos para el establecimiento de reservorios y vectores de enfermedades resultan ser zonas de riesgo inminente para los humanos que habitan o desarrollan sus actividades diarias allí. Es necesario, por lo tanto, poner particular atención a las áreas de transmisión en cultivos ya que pueden estar representando sistemas de transmisión con características muy particulares y que debido a su cercanía con las viviendas podrían resultar críticas en la transmisión de la enfermedad al humano y los procesos de domiciliación de la enfermedad.

Las posibilidades de los análisis predictivos de interacción de especies utilizados para generar las listas de mamíferos sospechosos son de gran importancia, ya que permiten hacer una valoración preliminar de las áreas de mayor relevancia eco-epidemiológica. A partir de las listas de sospechosos es posible optimizar el trabajo de campo con el fin de muestrear las especies de importancia en las zonas de interés favoreciendo una mejor distribución de recursos en especial en regiones con posibilidades limitadas.

Figura 1. Localidades muestreadas en cada uno de los estados. Los círculos rojos indican las localidades positivas para *Leishmania* mientras que los círculos verdes indican ausencia del parásito en las muestras de los animales capturados. Los números indican cada una de las localidades por estado: 1. Poblado C16, 2. Las Piedras 3 Sección 3. Grutas de Cocona, 4. Yumká, 5. Xul, 6. Yaxcuná, 7. Cuncunul, 8. Chichimilá, 9. Maya Bell, 10. Los Alushes, 11. Emiliano Zapata, 12. Ixtapangajoya.

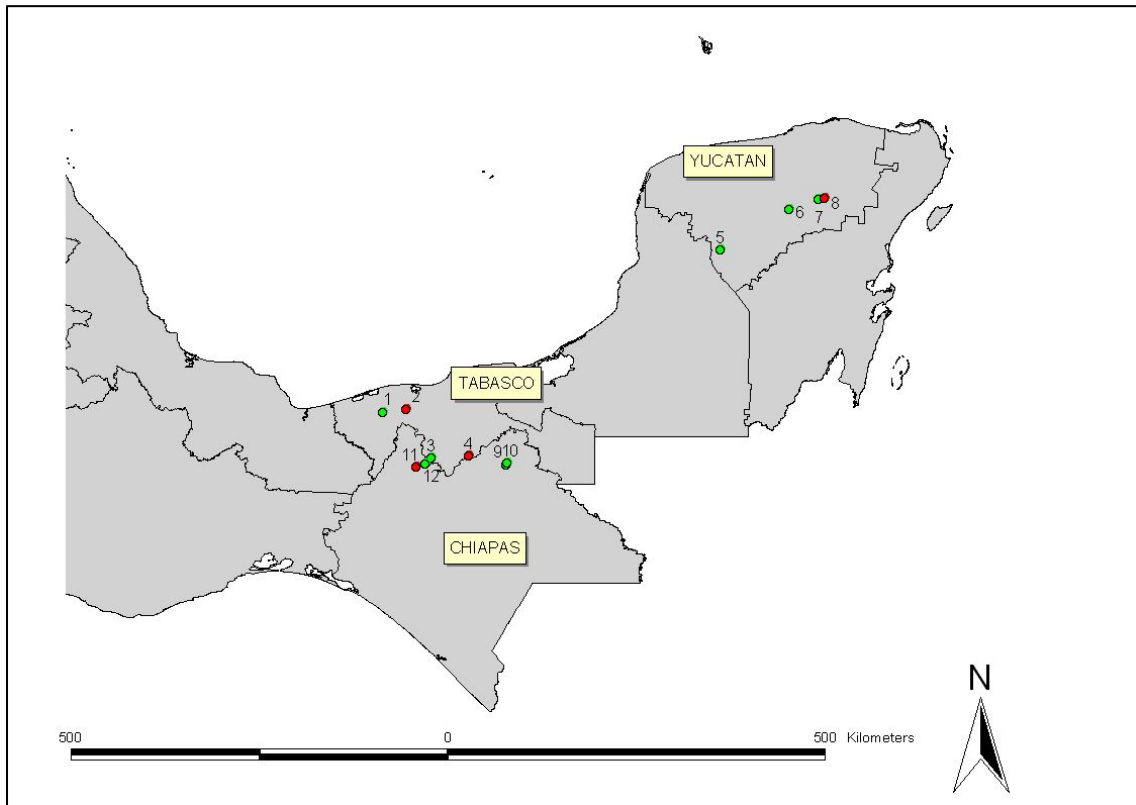


Figura 2. Análisis de componentes principales para los mamíferos colectados en el área de estudio en función de las variables ambientales. Los rombos son los datos que pertenecen al estado de Tabasco, los triángulos al estado de Campeche, los círculos a Quintana Roo y los cuadrados a Yucatán. El componente principal CP1 explica el 49.47% de la variación de los datos y está relacionado a las variables que tienen que ver con precipitación, el componente principal CP2 explica el 25% de la variación y está relacionado con las variables de temperatura. El CP3, que no se grafica, explica el 17% de la variación y está relacionado a las variables de estacionalidad, temperaturas máximas y rango anual de temperatura. En conjunto los tres componentes explican el 91.5% de la variación de los datos.

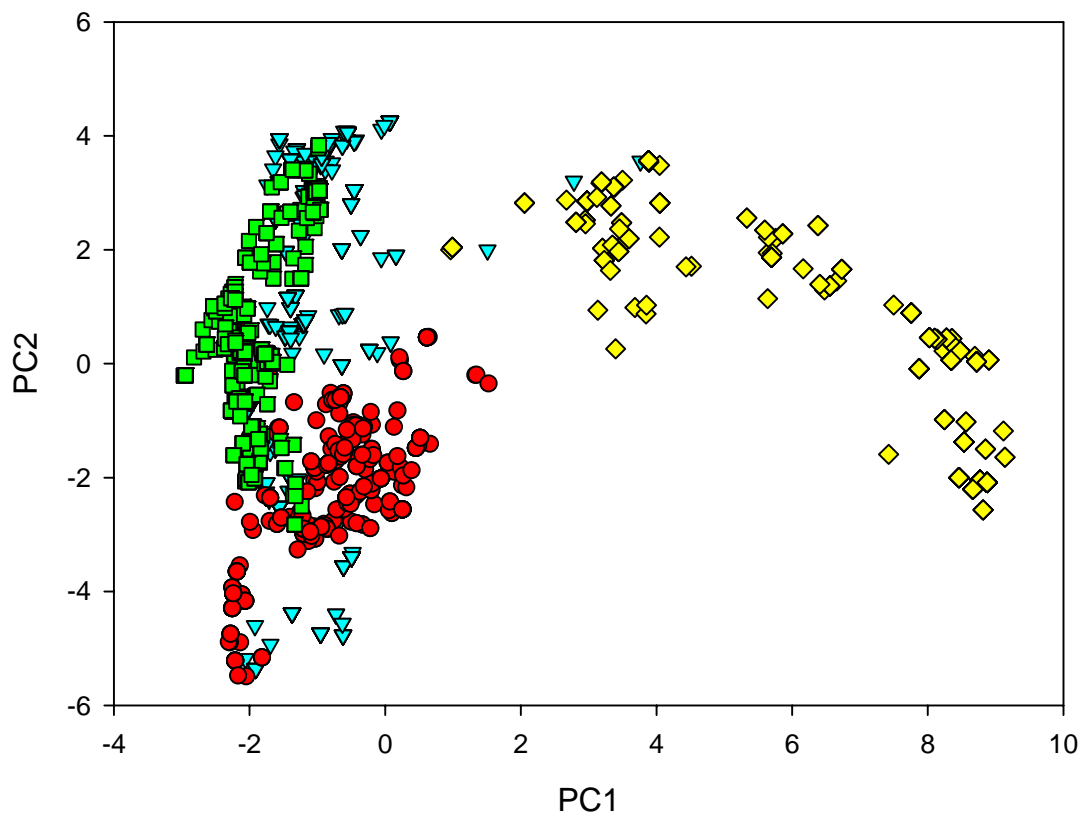


Tabla 1. Listado de especies de mamíferos sospechosos de ser reservorios de *Leishmania* de acuerdo a su valor de interacción (Epsilon) con insectos del género *Lutzomyia* en cada uno de los estados analizados.

CAMPECHE			QUINTANA ROO		
Posición	Especie	Epsilon	Posición	Especie	Epsilon
1	<i>Reithrodontomys gracilis</i>	10.16232	1	<i>Eira barbara</i>	4.83166061
2	<i>Molossus sinaloae</i>	7.185845	2	<i>Cuniculus paca</i>	4.338638695
3	<i>Myotis keaysi</i>	7.185845	3	<i>Carollia sowelli</i>	3.950099296
4	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	7.185845	4	<i>Philander opossum</i>	3.950099296
5	<i>Peromyscus leucopus</i>	7.185845	5	<i>Conepatus semistriatus</i>	3.882154877
6	<i>Ototylomys phyllotis</i>	5.134952	6	<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	3.882154877
7	<i>Carollia sowelli</i>	4.982757	7	<i>Potos flavus</i>	3.632587778
8	<i>Coendou mexicanus</i>	4.982757	8	<i>Rhogeessa aeneus</i>	3.632587778
9	<i>Eptesicus furinalis</i>	4.982757	9	<i>Mormoops megalophylla</i>	3.366013072
10	<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	4.982757	10	<i>Myotis elegans</i>	3.067880842
11	<i>Leopardus pardalis</i>	4.982757	11	<i>Dermanura phaeotis</i>	2.909562717
12	<i>Peropteryx macrotis</i>	4.982757	12	<i>Desmodus rotundus</i>	2.762224817
13	<i>Rhynchonycteris naso</i>	4.982757	13	<i>Chiroderma villosum</i>	2.568627451
14	<i>Tapirus bairdii</i>	4.982757	14	<i>Reithrodontomys gracilis</i>	2.462995759
15	<i>Desmodus rotundus</i>	4.465851	15	<i>Dasyprocta punctata</i>	2.218530189
16	<i>Artibeus intermedius</i>	4.192671	16	<i>Mimon cozumelae</i>	2.218530189
17	<i>Oryzomys couesi</i>	4.192671	17	<i>Diphylla ecaudata</i>	1.953187899
18	<i>Sigmodon hispidus</i>	4.192671	18	<i>Nasua narica</i>	1.953187899
19	<i>Didelphis virginiana</i>	3.988058	19	<i>Otonyctomys hatti</i>	1.953187899
20	<i>Diphylla ecaudata</i>	3.988058	20	<i>Saccopteryx bilineata</i>	1.741601003
21	<i>Heteromys desmarestianus</i>	3.988058	21	<i>Artibeus jamaicensis</i>	1.74146434
22	<i>Lontra longicaudis</i>	3.988058	22	<i>Artibeus intermedius</i>	1.663801669
23	<i>Sciurus deppei</i>	3.988058	23	<i>Leopardus pardalis</i>	1.418300654
24	<i>Sturnira lilium</i>	3.600064	24	<i>Ateles geoffroyi</i>	1.289713242
25	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	3.384179	25	<i>Didelphis virginiana</i>	1.289713242
26	<i>Heteromys gaumeri</i>	3.243643	26	<i>Peromyscus leucopus</i>	1.289713242
27	<i>Peromyscus yucatanicus</i>	3.105854	27	<i>Centurio senex</i>	1.176485443
28	<i>Lonchorhina aurita</i>	2.964666	28	<i>Didelphis marsupialis</i>	1.176485443
29	<i>Orthogeomys hispidus</i>	2.964666	29	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	1.176485443
30	<i>Rhogeessa aeneus</i>	2.964666	30	<i>Sciurus deppei</i>	1.176485443
31	<i>Chiroderma villosum</i>	2.649545	31	<i>Ototylomys phyllotis</i>	1.116370211
32	<i>Eira barbara</i>	2.649545	32	<i>Carollia perspicillata</i>	1.075456384
33	<i>Sciurus yucatanensis</i>	2.559173	33	<i>Oryzomys couesi</i>	1.075456384
34	<i>Alouatta pigra</i>	2.400403	34	<i>Heteromys gaumeri</i>	1.067592591
35	<i>Cuniculus paca</i>	2.400403	35	<i>Orthogeomys hispidus</i>	0.984320936
36	<i>Glossophaga soricina</i>	2.400403	36	<i>Sturnira lilium</i>	0.517364748
37	<i>Nasua narica</i>	2.400403	37	<i>Sigmodon hispidus</i>	0.372055131
38	<i>Ateles geoffroyi</i>	2.19617	38	<i>Peromyscus yucatanicus</i>	0.100236808
39	<i>Carollia perspicillata</i>	2.024182			
40	<i>Dasyprocta punctata</i>	1.632474			
41	<i>Artibeus jamaicensis</i>	1.529834			
42	<i>Dermanura phaeotis</i>	1.529834			

YUCATAN			TABASCO		
Posición	Especie	Epsilon	Posición	Especie	Epsilon
1	<i>Oryzomys melanotis</i>	9.08845	1	<i>Chiroderma villosum</i>	6.02771377
2	<i>Rhogeessa parvula</i>	9.08845	2	<i>Molossus rufus</i>	4.144928
3	<i>Micronycteris microtis</i>	8.97842	3	<i>Pteronotus davyi</i>	4.144928
4	<i>Artibeus intermedius</i>	7.98134	4	<i>Tamandua mexicana</i>	3.63137496
5	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	7.24101	5	<i>Dermanura phaeotis</i>	3.18466055
6	<i>Otonyctomys hatti</i>	7.24101	6	<i>Centurio senex</i>	3.28853691
7	<i>Artibeus lituratus</i>	6.3487	7	<i>Glossophaga leachii</i>	3.28853691
8	<i>Molossus rufus</i>	6.1931	8	<i>Noctilio leporinus</i>	3.28853691
9	<i>Pteronotus davyi</i>	6.1931	9	<i>Orthogeomys hispidus</i>	3.28853691
10	<i>Pteronotus parnellii</i>	6.1931	10	<i>Rhynchonycteris naso</i>	3.28853691
11	<i>Carollia perspicillata</i>	5.12017	11	<i>Carollia subrufa</i>	2.76500632
12	<i>Oryzomys couesi</i>	4.92959	12	<i>Lontra longicaudis</i>	2.76500632
13	<i>Mormoops megalophylla</i>	4.70568	13	<i>Carollia perspicillata</i>	1.90203496
14	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	4.37918	14	<i>Artibeus intermedius</i>	1.56683691
15	<i>Artibeus jamaicensis</i>	4.25581	15	<i>Cyclopes didactylus</i>	1.56683691
16	<i>Reithrodontomys gracilis</i>	4.00826	16	<i>Sturnira lilium</i>	1.4339697
17	<i>Tlacuatzin canescens</i>	3.86765			
18	<i>Mimon cozumelae</i>	3.51033			
19	<i>Lasiurus ega</i>	3.48575			
20	<i>Glossophaga soricina</i>	3.40616			
21	<i>Peromyscus leucopus</i>	3.30835			
22	<i>Eptesicus furinalis</i>	3.18559			
23	<i>Lasiurus intermedius</i>	3.18559			
24	<i>Rhogeessa aeneus</i>	3.18559			
25	<i>Ototylomys phyllotis</i>	3.12925			
26	<i>Sigmodon hispidus</i>	3.12925			
27	<i>Natalus stramineus</i>	2.94094			
28	<i>Peromyscus yucatanicus</i>	2.89448			
29	<i>Peropteryx macrotis</i>	2.73607			
30	<i>Sturnira lilium</i>	2.56087			
31	<i>Sylvilagus floridanus</i>	2.40852			
32	<i>Orthogeomys hispidus</i>	2.27422			
33	<i>Dasypus novemcinctus</i>	2.15448			
34	<i>Desmodus rotundus</i>	1.50305			
35	<i>Heteromys gaumeri</i>	1.07675			

Tabla 2. Listado de especies de mamíferos capturadas en las localidades muestreadas.

Estado	Chiapas				Tabasco				Yucatán				
	Emiliano Zapata	Ixtapangajoya	Los Alushes	MayaBell	Las piedras	Grutas de Cocona	Emiliano Zapata	Yumka	Chichimila	Culcunul	Yaxcuná	Xul	
Especie	Total												
<i>Artibeus ituratus</i>	9	2	1	3				3					
<i>Artibeus jamaicensis</i>	9	7						2					
<i>Carollia sowelli</i>	19	3		5	8			3					
<i>Dermanura phaeotis</i>	5			2	2			1					
<i>Dermanura sp</i>	1	1											
<i>Dermanura watsoni</i>	2				2								
<i>Desmodus rotundus</i>	2	2											
<i>Didelphis marsupialis</i>	1						1						
<i>Eptesicus sp.</i>	1				1								
<i>Glossophaga soricina</i>	3	2			1								
<i>Heteromys gaumeri</i>	5								1	4			
<i>Heteromys sp</i>	2	2											
<i>Molossus rufus</i>	1					1							
<i>Mus musculus</i>	1						1						
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	0												
<i>Ototyllumys phyllotis</i>	7								7				
<i>Peromyscus yucatanicus</i>	1								1				
<i>Peromyscus leucopus</i>	1		1										
<i>Peromyscus levipes</i>	1							1					
<i>Peromyscus mexicanus</i>	4	1	1				2						
<i>Peromyscus yucatanicus</i>	2									1		1	
<i>Peromyscus zarhynchus</i>	1						1						
<i>Philander oposum</i>	1					1							
<i>Pteronotus parnelli</i>	1	1											
<i>Reitrodontomys sp.</i>	1					1							
<i>Sciurus aureogaster</i>	0												
<i>Sturnira lilium</i>	14	6			4			4					
<i>Sturnira ludovici</i>	1				1								
<i>Uroderma bilobatum</i>	2			1	1								
Total	98	27	3	11	20	3	4	1	14	9	5	0	1

Tabla 3. Listado de especies encontradas infectadas con *Leishmania*, distribuidas por localidad.

Estado		Chiapas	Tabasco				Yucatán
Localidad		Emiliano Zapata	Comalcalco	Cunduacán	Paraíso	Yumká	Chichimilá
Especie	Total	Infect/ Tot	Infect/Tot	Infect/Tot	Infect/Tot	Infect/Tot	Infect/Tot
<i>Artibeus lituratus</i>	1		1/1				
<i>Artibeus jamaicensis</i>	2	2 / 7					
<i>Carollia sowelli</i>	1					1/ 3	
<i>Desmodus rotundus</i>	1	1/ 2					
<i>Glossophaga soricina</i>	2	2 / 2					
<i>Ototyllum phyllotis</i>	1						1 / 7
<i>Philander opossum</i>	1			1 / 1			
<i>Sciurus aureogaster</i>	2				2 / 4		
<i>Sturnira lilium</i>	2	1 / 6				1 / 4	
Total	13	6	1	1	2	2	1

REFERENCIAS

Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. 2004. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana* 14(2):82-98.

Vergel C, Walker J, Saravia N. 2005. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(4):423-9.

Ryan PR, Arana BA, Ryan JR, Wirtz RA, Wortmann GW, Rizzo NR. 2003. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Veterinary Parasitology* 115:1-7.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39:560-563.

Ashford RW. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology* 14(5):523-32.

De Almeida Curi NH, Miranda I, Talamoni SA. 2006. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around Brazilian National Park. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(1):99-101.

Seidelin H. 1912. Leishmaniasis and babesiasis in Yucatan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 6:295-299.

Beltrán F, Bustamante ME 1942. Datos epidemiológicos acerca de la "úlceras de los chicleros" (leishmaniasis americana) en México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* 3:1-28.

Beltrán E, 1944. Cutaneous leishmaniasis in Mexico. *The Scientific Monthly* 59(2):108-119.

Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Romero SZ, Pérez-Becker R, Saavedra-Lira E, Pérez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejón O, Becker I. 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology* 95(4):277-84.

Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez Montfort R, Becker I. 2002. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research* 88(10):918-25.

Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in México. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41(3):280-288.

Rotureau B. 2006a. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 74(1):81-96.

Canto-Lara SB, Van Wynsberghe NR, Vargas-Gonzalez A, Ojeda-Farfan FF, Andrade-Narvaez FJ. 1999. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94(3):305-9.

Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG, Itzá-Ortiz MF, Andrade-Narvaez FJ. 2000. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in Naturally Infected Rodents from the State of Campeche, Mexico. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 95(5): 595-600.

Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narvaez FJ. 2009. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 51(2):87-94.

Disney RHL. 1968. Observations on a zoonosis: leishmaniasis in British Honduras. Journal of applied ecology 5:1-59.

Biagi F, de Biagi AM, Beltrán F. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. La Prensa Médica Mexicana 30(9-12):267-272.

Rebollar-Téllez E, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narvaez FJ. 1996. A two years study on vectors of cutaneous leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission in the state of Campeche, Mexico. Memorias Instituto Oswaldo Cruz 91(5):555-560.

Pech-May A, Escobedo-Ortegón J, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA. 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognised as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. Medical and Veterinary Entomology (En prensa).

Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fauser I, Rebollar-Téllez EA. 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania mexicana* in the periurban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (In Press)

Porter CH, Steurer FJ, Kreutzer RD. 1987. Isolation of *Leishmania mexicana mexicana* from *Lutzomyia ylephiletor* in Guatemala. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81:929-930.

Bonfante-Garrido R, Spinetti H, Cupillo E, Momen H, Grimaldi G. 1991. *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a vector of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Parassitologia 33:99-104.

Pérez-Mutul J, Balám-Tzek L, Canto-Lara S. 1994. Identificación de protozoarios del género *Leishmania* con sondas biotinadas de kDNA en la Península de Yucatán, México. *Revista Biomédica* 5: 60-69

González C. 2007. Vectores de leishmaniasis en México y Colombia, modelado de nicho ecológico y predicciones de distribución geográfica. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Instituto de Biología. UNAM.

Nix HA. (1986). A biogeographic analysis of Australian Elapid snakes, in Longmore, R. (ed.) *Atlas of Australian Elapid Snakes*. Australian Flora and Fauna Series 8: 4-15.

Busby JR. (1991) BIOCLIM - A Bioclimatic Analysis and Prediction System. In: Margules, C.R. & M.P. Austin (eds.) *Nature Conservation: Cost Effective Biological Surveys and Data Analysis*. pp. 64-68. Canberra: CSIRO.

USGS 2001. Hydro 1K. Elevation Derivative Database, <http://edcdaac.usgs.gov/gtopo30/hydro/> U.S. Geological Survey, Washington DC.

Stephens CR, Heau JG, González C, Ibarra-Cerdeña CN, Sánchez-Cordero V, González-Salazar C. 2009. Using biotic interaction networks for prediction in biodiversity and emerging diseases. *PLoS One* 28:4(5):e5725.

Ramírez-Pulido J, Arroyo-Cabrales J, Castro-Campillo A. 2005. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zoológica Mexicana* 21(1):21-82.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopina M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(1):87-93.

Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y. 2004. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(7):663-72.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saúde Publica* 16(4):925-50

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. 1999. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(1):5-6.

Gramiccia M, Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35(11-12):1169-80.

Curi NH, Miranda I, Talamoni SA. 2006. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(1):99-101

Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(6):718-9

Rotureau B, Catzefflis F, Carme B. 2006b. Absence of *Leishmania* in Guianan bats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(2):318-21.

De Lima H, Rodríguez N, Barrios MA, Avila A, Cañizales I, Gutiérrez S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103(4):412-4.

Rotureau B, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Fouque F, Carme B. 2006c. Diversity and ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coastal French Guiana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75(1):62-9.

Bern C, Maguire JH, Alvar J (2008) Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(10): e313. doi:10.1371/journal.pntd.0000313

Brandão-Filho SP, Shaw JJ. 2006. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends in Parasitology* 22(11):500-501.

Desjeux P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis Worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (3):239-243.

Isaac-Márquez R, De Jong B, Ochoa-Gaona S, Hernández S, Kantún M D. 2005. Estrategias productivas campesinas: un análisis de los factores condicionantes del uso del suelo en el oriente de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 21, 56-72.

Pérez-Sánchez E, Hidalgo L, Gómez-Pérez G, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C. 2007. Nuevo foco de leishmaniasis cutánea localizada en Veracruz. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* 24(6):1-4.

Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species

Camila González¹, Ophelia Wang², Stavana E. Strutz³, Constantino González-Salazar⁴, Víctor Sánchez-Cordero¹, Sahotra Sarkar^{3*}

1 Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, **2** Department of Geography and the Environment, University of Texas at Austin, Austin, Texas, United States of America, **3** Biodiversity and Biocultural Conservation Laboratory, Section of Integrative Biology, University of Texas at Austin, Austin, Texas, United States of America, **4** Laboratorio de Análisis Especiales, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México

Abstract

Background: Climate change is increasingly being implicated in species' range shifts throughout the world, including those of important vector and reservoir species for infectious diseases. In North America (México, United States, and Canada), leishmaniasis is a vector-borne disease that is autochthonous in México and Texas and has begun to expand its range northward. Further expansion to the north may be facilitated by climate change as more habitat becomes suitable for vector and reservoir species for leishmaniasis.

Methods and Findings: The analysis began with the construction of ecological niche models using a maximum entropy algorithm for the distribution of two sand fly vector species (*Lutzomyia anthophora* and *L. diabolica*), three confirmed rodent reservoir species (*Neotoma albigula*, *N. floridana*, and *N. micropus*), and one potential rodent reservoir species (*N. mexicana*) for leishmaniasis in northern México and the United States. As input, these models used species' occurrence records with topographic and climatic parameters as explanatory variables. Models were tested for their ability to predict correctly both a specified fraction of occurrence points set aside for this purpose and occurrence points from an independently derived data set. These models were refined to obtain predicted species' geographical distributions under increasingly strict assumptions about the ability of a species to disperse to suitable habitat and to persist in it, as modulated by its ecological suitability. Models successful at predictions were fitted to the extreme A2 and relatively conservative B2 projected climate scenarios for 2020, 2050, and 2080 using publicly available interpolated climate data from the Third Intergovernmental Panel on Climate Change Assessment Report. Further analyses included estimation of the projected human population that could potentially be exposed to leishmaniasis in 2020, 2050, and 2080 under the A2 and B2 scenarios. All confirmed vector and reservoir species will see an expansion of their potential range towards the north. Thus, leishmaniasis has the potential to expand northwards from México and the southern United States. In the eastern United States its spread is predicted to be limited by the range of *L. diabolica*; further west, *L. anthophora* may play the same role. In the east it may even reach the southern boundary of Canada. The risk of spread is greater for the A2 scenario than for the B2 scenario. Even in the latter case, with restrictive (contiguous) models for dispersal of vector and reservoir species, and limiting vector and reservoir species occupancy to only the top 10% of their potential suitable habitat, the expected number of human individuals exposed to leishmaniasis by 2080 will at least double its present value.

Conclusions: These models predict that climate change will exacerbate the ecological risk of human exposure to leishmaniasis in areas outside its present range in the United States and, possibly, in parts of southern Canada. This prediction suggests the adoption of measures such as surveillance for leishmaniasis north of Texas as disease cases spread northwards. Potential vector and reservoir control strategies—besides direct intervention in disease cases—should also be further investigated.

Citation: González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, et al. (2010) Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1): e585. doi:10.1371/journal.pntd.0000585

Editor: Alison P. Galvani, Yale University, United States of America

Received: April 13, 2009; **Accepted:** December 2, 2009; **Published:** January 19, 2010

Copyright: © 2010 González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partially supported by the Universidad Nacional Autonoma de Mexico (Project PAPIIT IN 225408). CG was a recipient of the Dirección General de Estudios de Posgrado fellowship for the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sarkar@mail.utexas.edu

Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne parasitic disease endemic in most tropical regions of the world with approximately two million

new human cases reported each year [1,2]. In the Americas, parasite species belonging to the genus *Leishmania* are responsible for different clinical pathologies, including the deadly visceral form caused by *Leishmania chagasi*, as well as the mucocutaneous (MCL),

Author Summary

We explored the consequences of climate change for the spread of leishmaniasis in North America. We modeled the distribution of two sand fly vector and four rodent reservoir species found in northern México and the southern United States. Models were based on occurrence data and environmental and topographic layers. Successful models were projected to 2020, 2050, and 2080 using an extreme (A2) and a conservative (B2) future climate scenario. We predicted potential range shifts of vector and reservoir species varying assumptions about dispersal ability and capacity to persist in habitats with different degrees of ecological suitability. Even with the most conservative assumptions the distributions of both vector and reservoir species expand northwards, potentially reaching as far as southern Canada in the east. Assuming that at least one vector and one reservoir species must be present for a parasite cycle, the extent of this shift is predicted to be controlled by the availability of suitable habitat for sand fly vector species. Finally, we computed the human population potentially exposed to leishmaniasis because of these range shifts. Even in the most optimistic scenario we found that twice as many individuals could be exposed to leishmaniasis in North America in 2080 compared to today.

localized cutaneous (LCL), pseudo-diffuse (PDCL), and diffuse (DCL) disfiguring forms of the disease caused by at least fourteen *Leishmania* species from the subgenera *Leishmania* and *Viannia* [3–6]. Mucocutaneous leishmaniasis is caused by *L. brasiliensis*, *L. panamensis* and *L. guyanensis* [7,8], while diffuse forms have been related to *L. m. mexicana*, *L. amazonensis* [8], *L. pífanói*, *L. guyanensis* [6,9,10], and *L. panamensis* [7,11]. Which clinical form is manifested depends on both host immune capacity and the parasite species or strain responsible for the infection even though the genetic determinants of the variation between them remain unknown [6,12].

In North America (México, United States, and Canada), the transmission of the disease depends on female blood-feeding sand fly vectors from species belonging to the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotomidae) with several mammal reservoir species serving as parasite hosts; humans only act as incidental hosts (not necessarily maintaining parasite circulation in a population) [13,14]. To be considered as an effective reservoir a mammal species must (i) have a high degree of exposure to sand fly vectors (as a primary blood-feeding source), (ii) be able to host the parasite for long periods without developing the disease, and (iii) be known to have been infected with parasite strains implicated in human cases [15–17].

In tropical America, transmission of leishmaniasis is believed to have traditionally been restricted to humid sylvatic habitats in which humans were exposed to the parasite during forest-related activities [14,18,19]. However, human-induced habitat transformation has facilitated rapid invasion of some vector and mammal species into non-sylvatic habitats thereby increasing both human exposure and risk of infection [8]. The dynamics of the disease are correlated with population fluctuations in reservoirs and vectors [20,21], and strongly correlated with environmental changes [18] and climatic factors [14,22]. Because climatic factors can lead to species' range shifts, analyses of vector and reservoir species' distributional responses to climate change scenarios provide insight into how the spatial epidemiology of leishmaniasis may be affected by climate change [23]. In particular, estimating the

potential future distributions of vector and reservoir species can help identify potential risk areas for human infection.

Ecological niche models (ENMs) based on point occurrence data, digitized environmental layers, and machine learning algorithms, typically all overlaid on a Geographic Information System (GIS) platform, provide a useful framework for understanding the geography of vector-borne diseases [19,24–26]. Ecological niche modeling is based on attempting to predict the fundamental niche of a species which is defined as the set of biotic and abiotic environmental conditions in which it can maintain populations without immigrational subsidy [27]. When projected to geographical space, the fundamental niche gives the potential distribution of a species. Constraints on dispersal due to geography, as well as negative ecological interactions (such as competition), may prevent a species from occupying the entirety of its fundamental niche [28–30]. Taking such factors into account generates the actual geographical distribution of a species. In practice, ENMs incorporate both the ecological requirements and spatial locations of species and predict species occurrences in an area between the potential and actual distributions. These distributions then have to be modified using the constraining factors mentioned above to obtain the actual distributions. ENMs are thus useful for providing a framework to test hypotheses regarding the role of different environmental variables in determining species' distributional patterns [25,31–33].

For leishmaniasis in North America, *L. m. mexicana* is responsible for most human cutaneous cases of leishmaniasis and has been isolated from diverse mammal reservoir and sand fly vector species in México [34–36] and the United States [37–40]. Along the México–United States border, the cutaneous form of the disease occurs in semi-arid scrubland habitats of the Sonoran and Tamaulipan biotic provinces [37,38], in which the sand fly species, *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia anthophora*, are the presumed vectors [39]. In this region, the parasite has been isolated from the white-throated and southern plains woodrats, *Neotoma albigula* and *Neotoma micropus*; to the east it is also found in the eastern woodrat, *Neotoma floridana* [21,37,38]. Transmission has been observed to be restricted to localized areas, with highest prevalence in autumn [21,37,38,41]. We also included the Mexican woodrat, *Neotoma mexicana*, in this study as a potential reservoir because it shows wide geographic overlap with *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia anthophora* and has been incriminated as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* [42]. It is thus likely to be a competent reservoir for *L. m. mexicana* because *Trypanosoma* and *Lutzomyia* are both kinetoplastid protozoa and are thus likely to share some of the same reservoirs.

In north México, disease cases were reported in the north, between 1986 and 1999, in the states of Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, and Chihuahua [43]. In the United States, *Leishmania* parasites have been isolated in Texas, Arizona, Oklahoma, and Ohio from humans, dogs, rodents, and insects [21,37,38,41]. The (human) disease is autochthonous in Texas; mucocutaneous, localized cutaneous, and diffuse leishmaniasis have been reported [44–47]. By late 2009, 40 cases of leishmaniasis had been reported in Texas [46] [Chad McHugh, personal communication], and two cases had been reported in Oklahoma [Kristy Bradley, personal communication].

It is likely that the occurrence of human cases is strongly correlated with the presence of competent vector and reservoir species in sufficiently high densities [20,21]. In this study, we begin by constructing ENMs for these species to predict their potential geographical distributions. We then project models showing sufficient predictive power to future climate scenarios for 2020, 2050, and 2080. We use the A2 and B2 scenarios for which

interpolated climate layers based on the 2003 Third Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Assessment Report [48] are publicly available. Except for the A1FI scenario, which is unlikely because it assumes no carbon emissions reduction, the A2 scenario is the most extreme of the six canonical IPCC emissions scenarios [49]; the B1 scenario is the most conservative but, since interpolated climate layers were not available for it, we used the related B2 scenario which is also conservative. We assumed that results invariant under both scenarios are likely to be robust.

A variety of methods have been proposed for the assessment of disease risk though a standard framework is yet to emerge [50–53]. Here, disease risk was assessed using only two risk components. The first was simply the potential for the presence of both vector and reservoir species based on (i) the quality of available habitat as predicted by the ENMs and (ii) dispersal ability, that is, patterns of dispersal from their ranges at the previous time that was modeled. The second was the projected “cost” measured by the number of people potentially exposed to the disease. Different projected future population estimates were used for the A2 and B2 scenarios. These are not the only components of disease risk. For the spread of leishmaniasis, three categories of risk have traditionally been distinguished [8], those due to: (i) anthropogenic transformations and other environmental changes; (ii) immunological profiles of human populations; and (iii) treatment failure and drug resistance. Leishmaniasis has also been associated with poverty in one recent analysis [54] which would affect factors in all three categories; it is known to be less prevalent in urban settings than rural contexts [53]. This analysis is restricted to only one element of risk from environmental changes: that due to climate change, which will interact with other risk factors in complex ways which are beyond the scope of this study. However, this element of risk, the “ecological risk,” provides an epidemiological baseline for consideration of other aspects of risk. If the ecological risk is low, then other risk factors will typically not matter very much: if disease vectors and reservoirs cannot survive in an area because of ecological reasons, then there is little likelihood that the diseases can become autochthonous in that region. If the ecological risk is high, the other factors will be critical to the control of the disease. In what follows, for expository brevity, we will use “risk” to refer only to this ecological risk of leishmaniasis spread.

Methods

Study area

The study area for model construction consisted of all the terrestrial regions of Canada, the United States, and México delimited by the 14.13° N line of latitude to the south at the México—Guatemala border. It was divided into 41 680 234 cells (average area: 0.50 sq km [SD = 0.33]) at a resolution of 30 arc-seconds (0.00833°) of latitude and longitude. All of continental Canada and the United States were included in order to identify all areas in which potential distributional shifts of vector and reservoir species would place them at risk for leishmaniasis through a northward range expansion of the disease.

Vector and reservoir species records

The two known *Lutzomyia* vector species found in this region and known to have epidemiological relevance, *Lutzomyia anthophora* and *Lutzomyia diabolica*, were included. For reservoirs, we included all *Neotoma* species widely distributed in northern México or the southern United States. *Neotoma albigula*, *Neotoma micropus*, and *Neotoma floridana* are known reservoirs; *Neotoma mexicana* is believed to be a reservoir [26].

For ENM construction, species point occurrences were obtained from the Disease Vectors Database (www.diseasevectors.org; last accessed 24-February-2009) which provides free publicly-accessible data on both vector and reservoir occurrence records [55]. Reservoir point locality records were obtained from museum mammal collections (all of which are listed in the Acknowledgments). Vector point locality records were obtained from published literature [40,56,57], and personal communications (Chad McHugh, 2007), all included in the Disease Vectors Database [55]. Figure 1 shows the reservoir and vector species occurrence points used for ENM construction. Because of the fine resolution of the study, and in order to ensure concordance between species' records and the environmental layers used, only post-1990 occurrence points were used in model construction. Seventeen occurrence points were available for *Lutzomyia anthophora*, 31 for *Lutzomyia diabolica*, and 1047, 192, 103, and 574 for *Neotoma albigula*, *Neotoma floridana*, *Neotoma mexicana*, and *Neotoma micropus*, respectively.

For three of the reservoir species, *Neotoma micropus*, *Neotoma floridana*, and *Neotoma mexicana*, an independently-derived data set was used to test the ENMs, with 31, 13 and 28 records available for the three species (respectively). This data set was obtained from US mammal collections listed below (see Acknowledgments). None of these data were used either in model construction or for the internal model validation (through the training and testing process in Maxent). For *Neotoma albigula*, these data were not available as most specimens deposited in Mexican mammal collections are currently under taxonomic revision. Nonetheless, a high number of point localities were used in model construction resulting in a reasonable robust ENM for this species (see Results).

Environmental layers and climate projections

Nineteen bioclimatic data layers were used as explanatory variables in the ENMs (see Table 1). For the present climate, the data were obtained from the WorldClim database (www.worldclim.org; last accessed 15-Nov-2009) where they were available at the resolution used in this analysis [58]. (For future climate scenarios, these layers had to be computed as discussed below.) Topographical variables (elevation, slope, and aspect) were obtained from the Hydro 1k data set [59]. These 22 layers were used for ENM construction.

For the future climate projections, monthly values for maximum and minimum temperature and precipitation were available at the WorldClim database at the resolution used in this analysis. For the A2 scenario, we used the CSIRO model because it predicts the highest temperature increase, for the B2 scenario, we used the Hadley model which predicts the lowest temperature increase. These layers had been interpolated from the Third IPCC Assessment Report. From these layers, the 19 bioclimatic variables used for ENM construction (Table 1) were computed using an ArcInfo AML script (mkBCvars.aml Ver 2.3) also provided at the WorldClim database.

Ecological niche models

ENMs were constructed using the Maxent software package (Version 3.2 [60–62]). Maxent has been shown to be robust for ENM construction from presence-only data [31]. Maxent allows predictive models based on current climatic and other environmental data to be fitted to future climate projections. The species and environmental data have already been described.

Following published recommendations, Maxent was run without the threshold feature or duplicates so that there was at most one sample per pixel; linear, quadratic, and product features were enabled; 75% of the data were used to construct the models

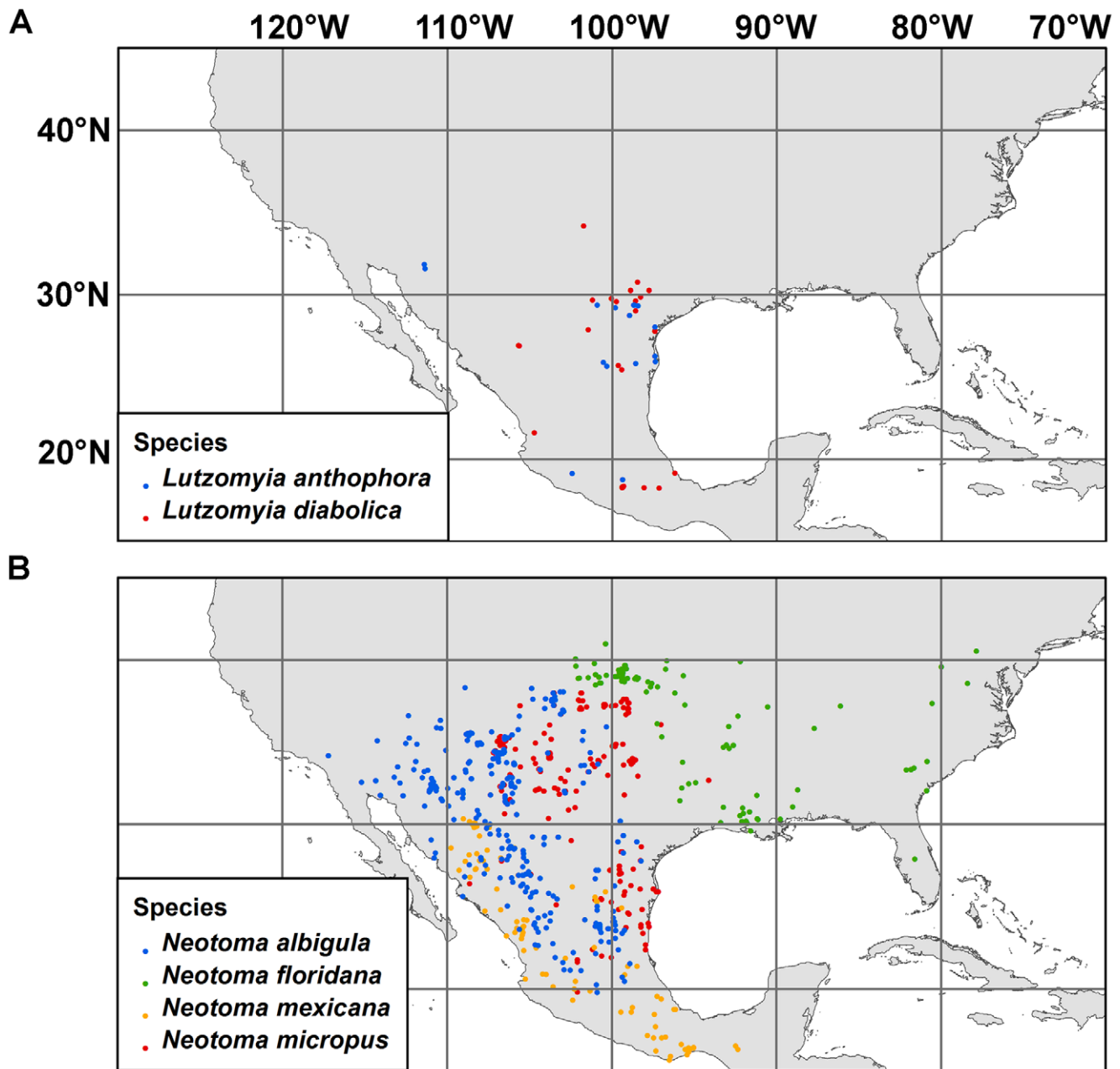


Figure 1. Vector and reservoir data points in North America. (a) Both vector species are shown. (b) All four reservoir species are shown. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g001

and 25% were used to test them [63]. The convergence threshold was set to a conservative value of 1.0×10^{-5} [61–63]. The accuracy of each model was assessed using three tests:

- (i) The AUC (area under the receiver operating characteristic [ROC] curve) was calculated for each model using the proportion of the study area in which the species is predicted to be present. This is automatically generated by Maxent which constructs ROC curves using randomly selected pseudoabsences. For acceptable models, the AUC threshold was set to an extreme conservative value of 0.95 for both training and test data.
- (ii) Eleven binomial tests of model performance [24,63] which are reported as part of Maxent output were performed on

the data. All eleven binomial tests were required to be significant at $p < 0.01$ which is also a conservative choice.

- (iii) Model predictions were compared with the independently derived data set of species' occurrences for the three species for which these data were available (*Neotoma micropus*, *Neotoma floridana*, and *Neotoma mexicana*). First, all predicted cells with probability < 0.01 were dropped from the potential habitat of a species. Next, from the remaining cells, the top 50% of the cells were retained; as explained below, these correspond to the middle threshold choice for the distribution of a species, as explained in the next paragraph. We then calculated how many of the new occurrence points for each species fell within the predicted distribution. To obtain the statistical significance of this result, we compared this number to that

Table 1. Explanatory variables used for the construction of niche models.

Variable	Explanation
BIO1	Annual Mean Temperature
BIO2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly [max. temp. – min. temp.]
BIO3	Isothermality
BIO4	Temperature Seasonality
BIO5	Maximum Temperature of Warmest Month
BIO6	Minimum Temperature of Coldest Month
BIO7	Temperature Annual Range
BIO8	Mean Temperature of Wettest Quarter
BIO9	Mean Temperature of Driest Quarter
BIO10	Mean Temperature of Warmest Quarter
BIO11	Mean Temperature of Coldest Quarter
BIO12	Annual Precipitation
BIO13	Precipitation of Wettest Month
BIO14	Precipitation of Driest Month
BIO15	Precipitation Seasonality
BIO16	Precipitation of Wettest Quarter
BIO17	Precipitation of Driest Quarter
BIO18	Precipitation of Warmest Quarter
BIO19	Precipitation of Coldest Quarter
	Elevation
	Slope
	Aspect

For details of the computation of these parameters from a basic set (BIO5, BIO6, BIO13, BIO14), see the WorldClim web-site [www.worldclim.org]. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.t001

which is obtained if 10 000 sets of points are randomly drawn from an area. However, this parameter is sensitive to the area from which the random points are drawn. If it is sufficiently large, we would get spurious significance results. To avoid this problem we drew the points from the smallest box, bounded by longitude and latitude lines, that included all the occurrence points. However, this test does not address the likely problem that the occurrence data were probably not collected using a randomized survey procedure. However, for rodents in México and Texas, which are the regions from which the new occurrence data are available, collection efforts have been fairly extensive and most areas are likely to have been sampled.

The second and third tests were used because the AUC alone may lead to misplaced confidence in an ENM [64,65]. Maxent models were first developed from all the topographic variables and the bioclimatic variables from 2003. These models were projected to the climate scenarios for 2020, 2050, and 2080 with the same topographic variables.

The logistic output from Maxent consists of the predicted probability of occurrence for each species in each cell. These probabilities represent the potential distribution of a species. The next step is to predict actual geographical distributions. In this analysis, the probabilities were converted to geographical distributions using three different thresholds. First, all cells with a predicted probability < 0.01 were dropped from the potential habitat of a species. Next, from the remaining cells, the top 10, 50,

and 90% of the cells were retained for the 10, 50, and 90 percentile models. Thus, the 10 percentile model is the most conservative, the 50 percentile model is less so, and the 90 percentile model is the least conservative about the occurrence of a species. Finally, for both the A2 and B2 scenarios, using these percentile models for the species, we constructed models consisting of areas in which at least one vector and one reservoir is present at the 10, 50 and 90 percentile levels.

Species dispersal

In general, environmental factors may influence species' spread to new habitat. Range shifts in response to climate change have now been empirically documented for a wide range of species [66]. However, a variety of contingent factors including dispersal ability, geographical barriers, and negative interactions with other species may prevent species from occupying the entirety of their environmentally suitable habitats [28]. When these complexities are taken into account, range shifts of species across landscapes remain poorly theoretically understood though models of dispersal have begun to receive the attention that they deserve [67].

Given that there is no dispersal model available for any of the leishmaniasis vector or reservoir species, two extreme models were used here: (i) the *universal* dispersal model assumed that each species occupied all of its suitable habitat, that is, there is no limit to dispersal beyond environmental suitability; and (ii) the *contiguous* dispersal model assumed that a species occupied a suitable cell only if it was connected to the range of the species at the last temporal stage through a pathway of suitable cells. Thus, between 2000 and 2020 the dispersal of a species is restricted only to those cells that are environmentally suitable and adjacent to an occupied cell in 2000. The same pattern is repeated for future time steps. Given the resolution of the analysis, this means that the species can at least disperse over a distance of about 1 km. over two decades (which is conservative).

Human population projections for risk assessment

Human population data for the year 2005 and projections for the years 2020, 2050, and 2080 under the A2 and B2 climate change scenarios were obtained from the Global 0.5-deg Gridded Population Dataset (www.sjziam.ac.cn/sjziam/kyxt/shenyj.htm; last accessed 01-April-2009; [68]) based on the IPCC Special Report on Emissions Scenarios [49]. The distribution layers had a resolution of 0.5° and were resampled to the resolution of this analysis using ArcMap 9.2 maintaining the same population density as in the original projections. These layers were overlaid with the models that predicted the presence of at least one vector and one reservoir species. The human population potentially exposed to leishmaniasis was computed as that of those cells in which at least one vector and reservoir species was present at the 10, 50, and 90 percentile levels.

Results

Model output

Figure 2 shows the present predicted distributions of *Lutzomyia anthophora* (2a) and *Lutzomyia diabolica* (2b). Figure 3 does the same for *Neotoma albigula* (3a), *Neotoma floridana* (3b), *Neotoma mexicana* (3c), and *Neotoma micropus* (3d). The AUCs ranged from 0.963 to 0.984 for both training and test data; these values are above our conservative threshold. For all six species, the 11 *p*-values for Maxent's internal binomial tests were all less than 0.01. When tested against the independently-derived data set, for *Neotoma floridana*, 0 out of 13 points fell outside the predicted range

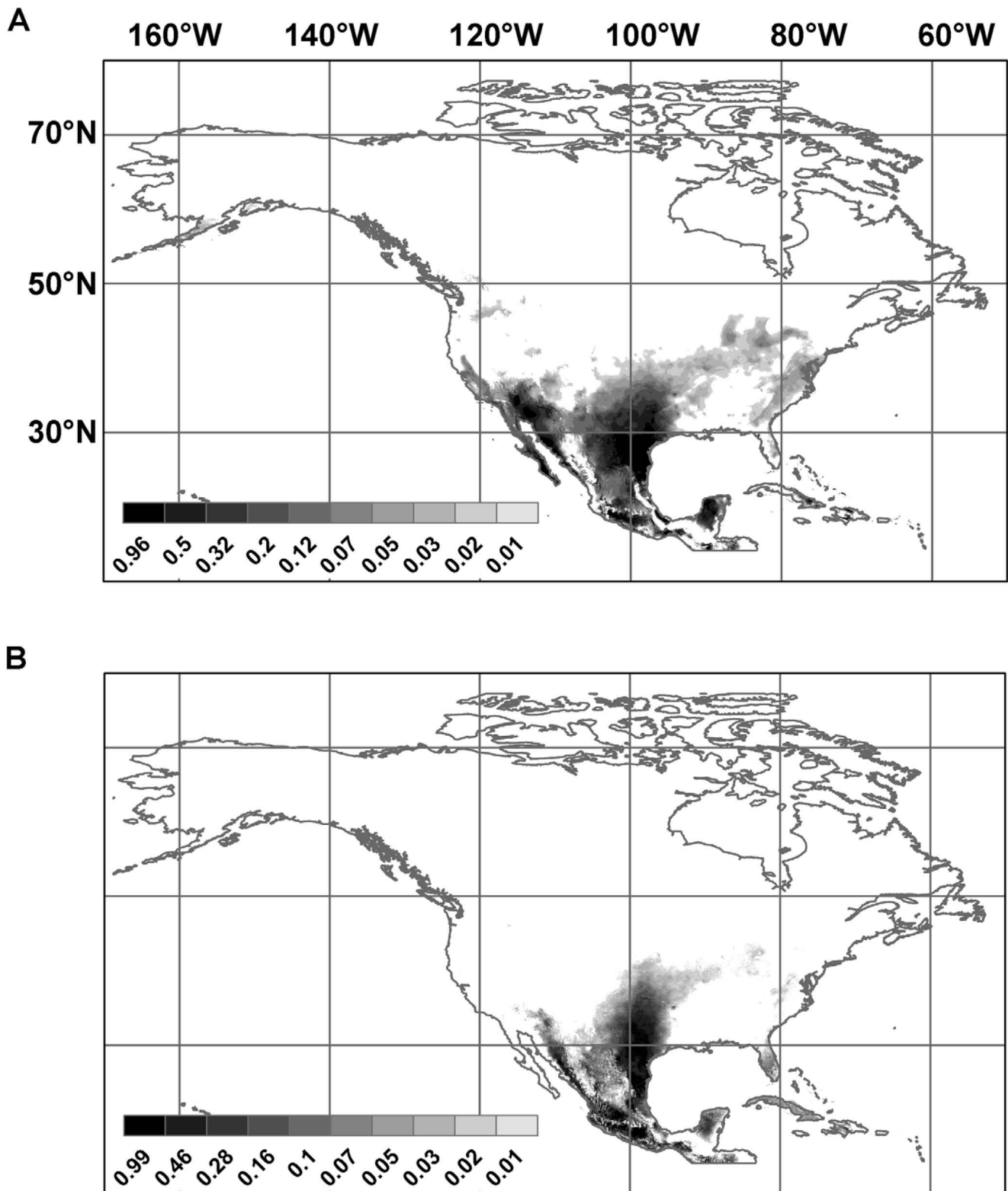


Figure 2. Predicted current distributions for leishmaniasis vector species. The figures show the geographical projection of the ecological niche model. (a) *Lutzomyia anthophora*; (b) *Lutzomyia diabolica*. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g002

($p < 0.0001$), for *Neotoma mexicana*, 1 out of 28 points fell outside ($p < 0.0001$), and for *Neotoma micropus*, 2 out of 31 points fell outside ($p < 0.0001$).

The topographic parameters were not explanatorily significant (data not shown). There was no obvious pattern with respect to the climatic parameters. For *Lutzomyia anthophora* the two most

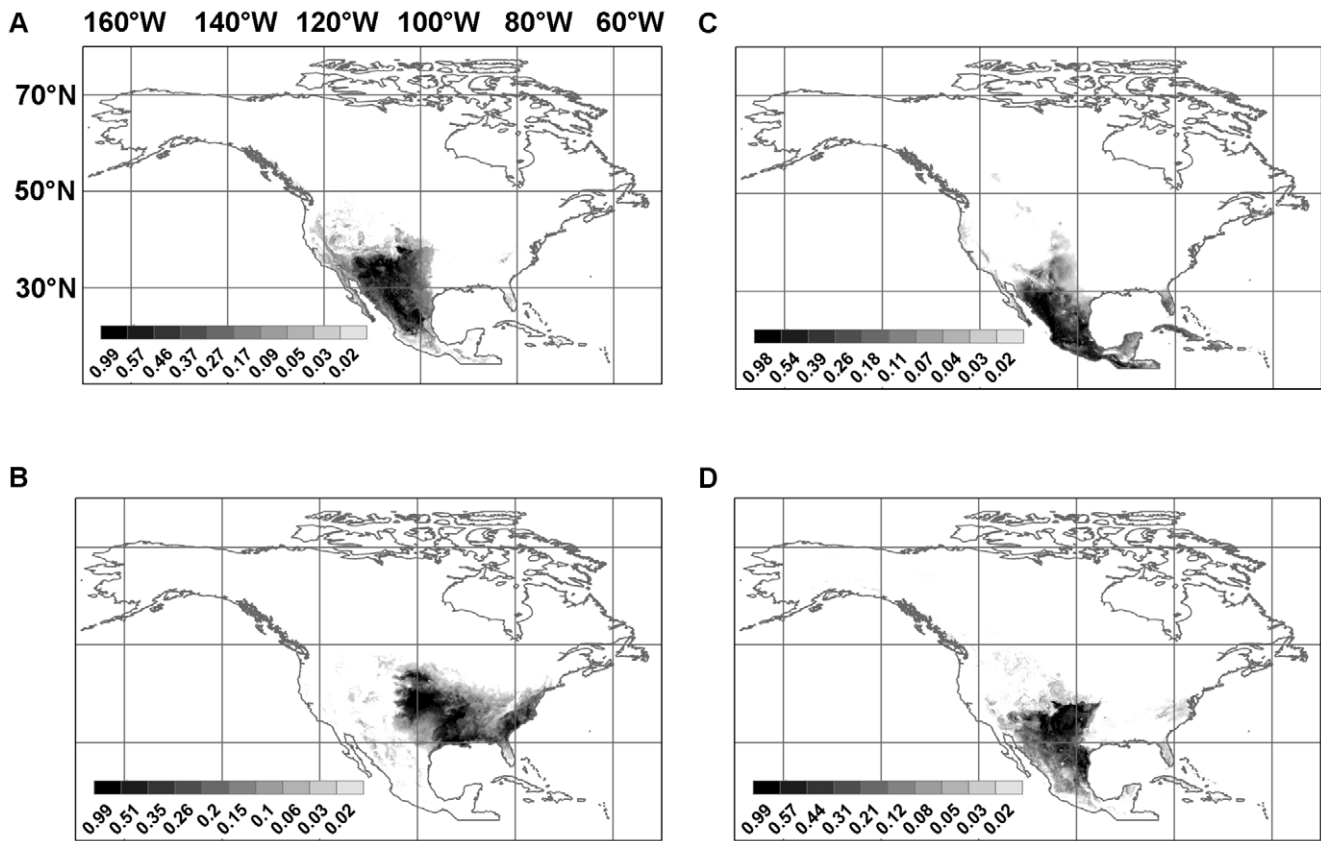


Figure 3. Predicted current distributions for leishmaniasis reservoir species. The figures show the geographical projection of the ecological niche model. (a) *Neotoma albigula*; (b) *Neotoma floridana*; (c) *Neotoma mexicana*; (d) *Neotoma micropus*. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g003

important parameters were the mean temperatures of the wettest and warmest quarters, for *Lutzomyia diabolica* they were the annual mean temperature and the minimum temperature of the coldest month, for *Neotoma albigula*, isothermality and mean diurnal temperature range, for *Neotoma floridana*, the maximum temperature of the warmest month and the minimum temperature of the coldest month, for *Neotoma mexicana*, isothermality and precipitation seasonality, and for *Neotoma micropus* the mean temperatures of the wettest and driest quarters.

Figure 4 shows the future predicted distributions for *Lutzomyia diabolica* in 2020, 2050, and 2080 under both the B2 (Hadley model) and A2 (CSIRO model) future climate scenarios. Figure 5 does the same for *Neotoma floridana*. These two species were chosen for presentation here because, on average, they show the largest range expansions that have the most relevance for the potential spread of leishmaniasis northwards. Results for the other four species (*Lutzomyia anthophora*, *Neotoma albigula*, *Neotoma mexicana*, and *Neotoma micropus*) are available in Figures S1, S2, S3, and S4.

Predicted distribution changes

Table 2 records the percent change in area of a species' range from one time stage to the next for the universal and contiguous dispersal models for the A2 and B2 climate change scenarios. The last three columns report the same numbers for the area occupied by at least one vector and one reservoir species. If we assume that each vector and reservoir is competent for human transmission, and that both vectors are associated with all four reservoirs, then these numbers are the most relevant ones for the risk of spread of

leishmaniasis. As expected, area changes are much larger for the universal model than for the contiguous model.

The change in total range is plotted in Figure 6 for the universal dispersal model and in Figure 7 for the contiguous model. For both dispersal models, for the (conservative) B2 climate change scenario, the predicted range of *Neotoma mexicana* ultimately contracts by 2080 irrespective of which quality of habitat (the top 10, 50, or 90 percentile ranges) is deemed to be occupied; under the (extreme) A2 scenario it increases only slightly after a decrease in 2020 except for the highest quality habitat (Figure 7d) which decreases. Otherwise predicted range expansions are ubiquitous though, in many cases, there is an initial decrease in 2020 only to be followed by rapid increase in 2050 and 2080. Though large range expansions are seen for *Lutzomyia anthophora*, much of this is not in the northerly direction which would increase the geographical range of leishmaniasis. If we consider areas in which at least one vector and one reservoir species are present and, therefore, there is potential human exposure to leishmaniasis, the range always expands and, as expected, the expansion is greater for the A2 scenario than the B2 scenario. In the latter case, there is no visible difference between the contiguous and universal dispersal models in the case for all habitat classes (Figures 6d-f, 7d-f) and the range is expected to expand by as much as 60%.

Potential human impacts

Figure 8 records the potential human exposure in terms of the number of individuals who would be present in a cell in which at least one vector species and one reservoir species is expected to

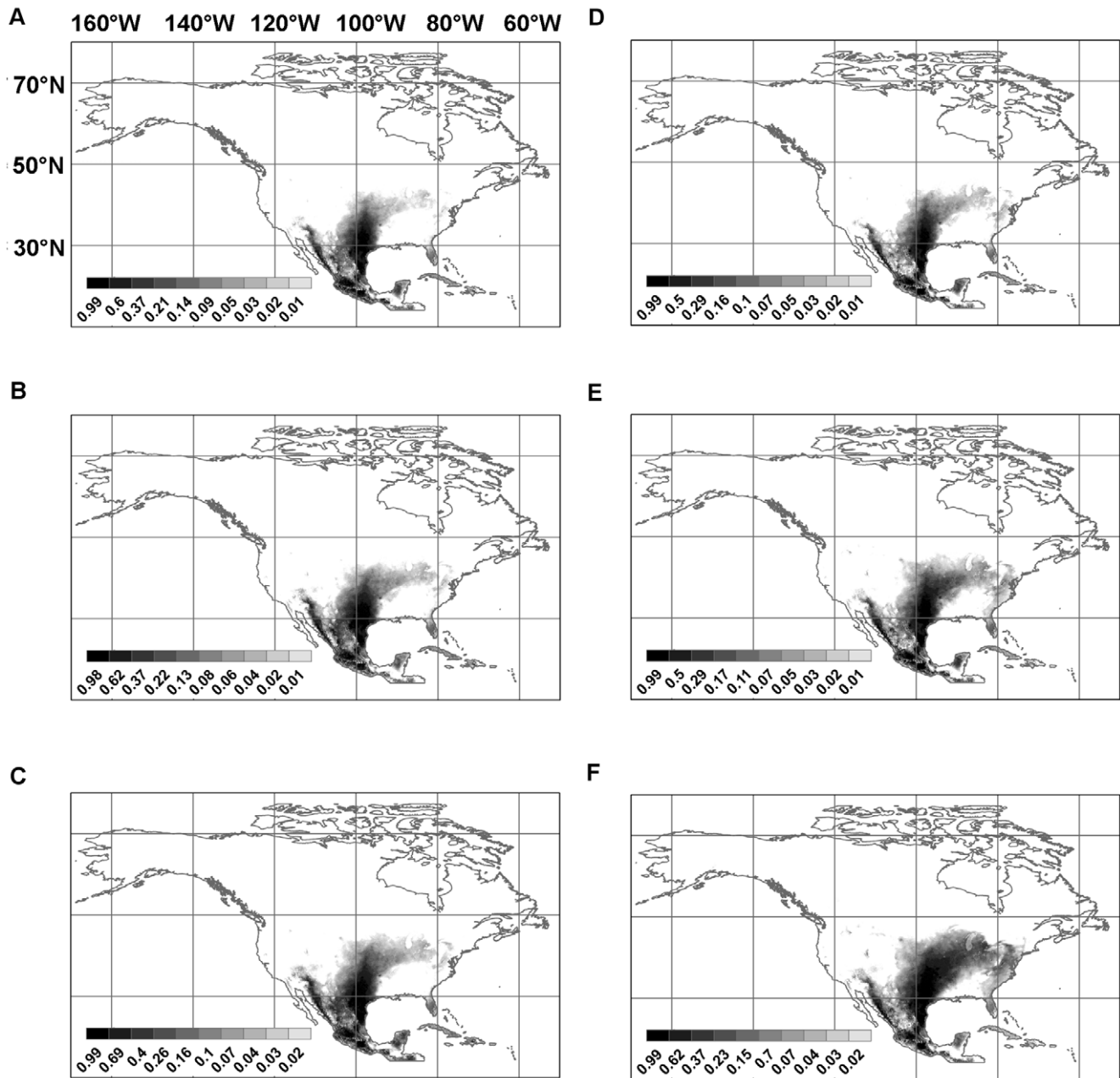


Figure 4. Predicted future distributions for *Lutzomyia diabolica*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g004

be present. This number is uniformly larger for the A2 scenario than the B2 scenario. If we restrict attention to the population in only the best habitat (the 10 percentile case), for the A2 scenario there is some difference between the contiguous and universal dispersal models with the latter, as expected, leading to more exposure. Otherwise the results are remarkably robust with respect to variation in dispersal behavior. The best case scenario is the one in which both the vector and reservoir species are restricted to the top 10% of their predicted habitat and climate changes according to the B2 scenario (Figure 8a, lower two graphs). Even though the range of the disease is predicted to decline after 2050, when it peaks, the value in 2080 is about 27×10^6 individuals, which is more than twice the current value of 12×10^6 individuals.

Discussion

There is a high potential for the spread of leishmaniasis in North America, north of México and Texas, because of climate change. The main reasons for this possibility are range shifts for *Neotoma floridana* and *Lutzomyia diabolica* in eastern North America, and for *Neotoma micropus* and *Lutzomyia anthophora* further west. Figure 5 shows the predicted distribution of *Neotoma floridana* in 2020, 2050, and 2080. Under both climate scenarios its range expands northwards and more so under the A2 scenario than the B2 scenario. The same pattern is predicted for *Lutzomyia diabolica* but to a lesser extent (Figure 4). Though the predicted range expansion of *Lutzomyia anthophora* is more extensive than that of *Lutzomyia diabolica*, the northward shift is not as pronounced. It is, therefore,

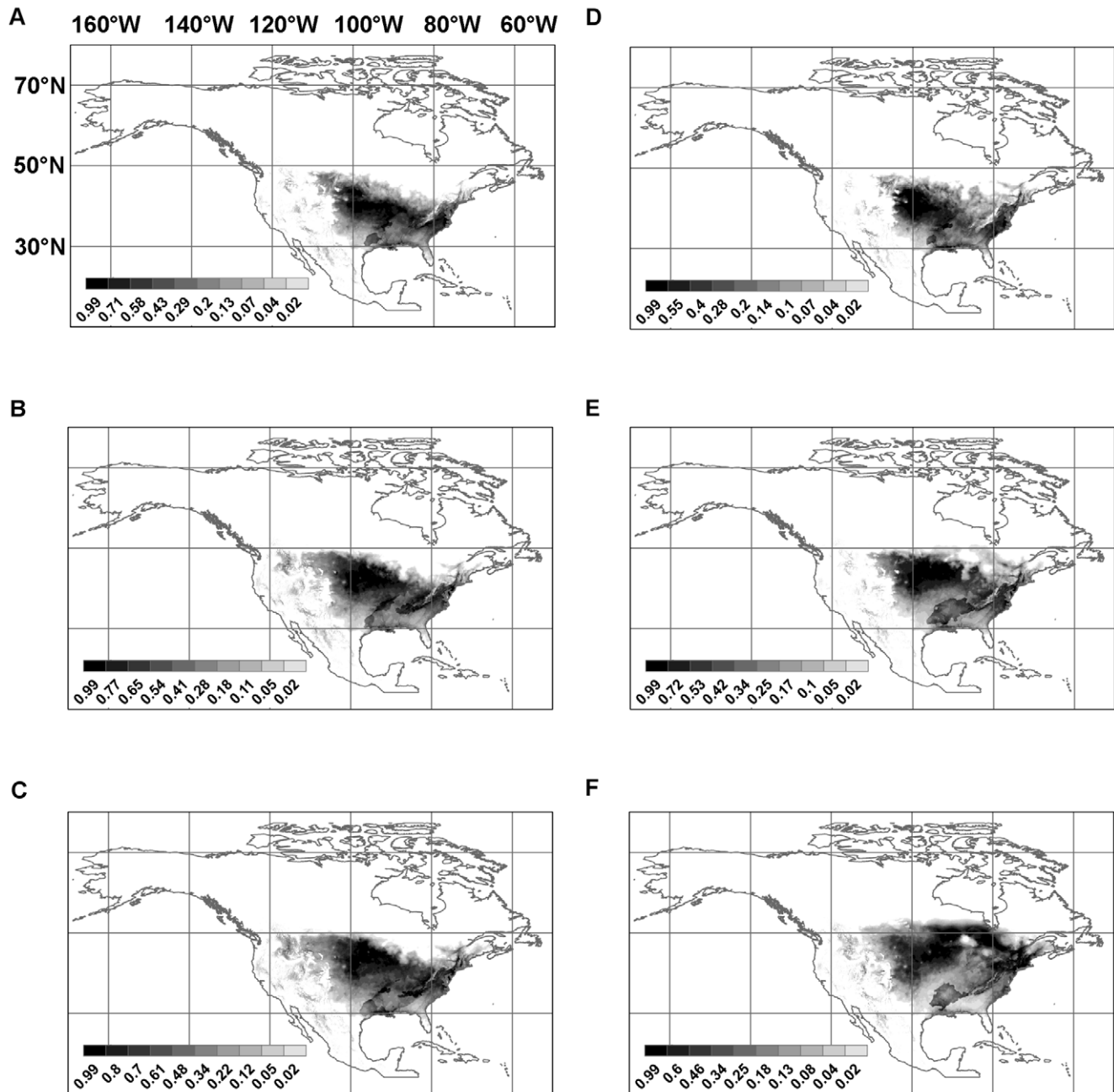


Figure 5. Predicted future distributions for *Neotoma floridana*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g005

likely that the risk of leishmaniasis spread in eastern North America will be limited by the range expansion of *Lutzomyia diabolica*. Much of the eastern half of the United States and, under the A2 scenario, a part of southeast Canada is at risk. The southern boundary of the range of *Neotoma floridana* also incrementally shifts northwards. This will make some of the southern extremities of its present range unsuitable in the future. However, if *L. m. mexicana* is already established within this species—as suggested by the evidence from Texas (see below)—and expanding its range, it will move north with *Neotoma floridana*.

For the central United States, the predicted increased risk comes from the northward expansion of *Lutzomyia anthophora* and *Neotoma*

micropus though this risk does not extend into Canada. While there is potential for range expansion of *Neotoma micropus* into Canada, the risk of leishmaniasis will be limited by the northern boundary of the range of *Lutzomyia anthophora* (see Figure S1 and Figure S2 of Supplementary Materials). In the western United States the predicted increased risk is due to the same vector and range expansion of *Neotoma albigula* (see Figure S3). Once again, it may be limited by the range of *Lutzomyia anthophora*. *Neotoma mexicana* is not predicted to play any significant role.

However, factors not taken into account here may impede the spread of leishmaniasis to the west. Mead and Cupp [69] found an association of *Lutzomyia anthophora* and *Neotoma albigula* in Pima

Table 2. Shift in distribution area of species.

		<i>Lu. anthophora</i>			<i>Lu. diabolica</i>			<i>N. albigula</i>			<i>N. floridana</i>			<i>N. mexicana</i>			<i>N. micropus</i>			At least one vector and reservoir		
		20	50	80	20	50	80	20	50	80	20	50	80	20	50	80	20	50	80	20	50	80
10	A2	20.8	27.6	34.7	-5.2	31.8	36.1	15	8.7	25.4	13.6	17.5	23.5	-11.8	0.9	11	-1.9	13.4	27.7	28.4	19.1	21.6
		19.4	26.6	33.5	-6.6	29.6	36.9	8.6	9.2	23.7	7.2	19.1	-6	-14.4	1.1	6	-9.6	15.1	23.2	22.4	8.8	34.9
	B2	20.1	1.9	7.7	-1.1	16.4	8.1	9.5	10.7	13.8	14.4	18.3	10.1	-19	10.1	-4.3	-6.4	18.2	5.2	18.9	8.6	12.1
		17.4	4.2	7.7	-2.4	15.3	9.4	2.9	11.4	15.8	14.4	28.1	13.9	-21.8	10.7	-6.5	-13.5	12.4	16.2	13.8	9.4	8.9
50	A2	21.5	25.9	28.2	-0.6	29.2	34.1	15.6	11.2	8.5	18.5	20.1	24	-8.9	1.5	7.7	0.1	16	23.6	22.1	24.3	17
		19.2	26.1	25.6	-2	27.2	35.3	14.1	10.7	8.6	15.7	22	23.5	-9.2	1.3	7.7	-1.9	16.1	23.6	22.1	23.3	16.9
	B2	19	3.5	4.6	2.3	16.8	7.7	13.8	10.2	11.2	19.3	16.7	12.8	-16.8	10.2	-5.4	-1.8	17	3.6	17.6	7.4	7.8
		18.2	3.4	5.1	1.6	15.45	8.7	11.9	10.7	10.7	16.3	18.7	13	-17.2	9.9	-5.4	-3	16.9	3.2	15.2	7.9	8.4
90	A2	8.8	27.8	21.5	27.1	19	23.2	21.8	12.6	21	24.6	19.6	26.5	-1.4	2.1	5.8	11.3	13	20.8	20.9	22.8	13.8
		8.1	23.8	17.6	24	20.6	23.5	19.9	13.5	20.6	23.9	19.6	26.1	-1.4	2.2	5.5	9.6	12.5	20.2	19.8	22.3	14.1
	B2	13.9	-1.2	4.8	15.2	15	9.3	18.8	11.1	9.4	24.1	17.8	10.5	-7.5	8.8	-6.7	11.5	11.2	4.9	17.4	7.4	5.3
		13.1	-1	4.7	13.6	15.3	9.6	17.7	13.5	8.9	22.6	18.4	10.6	-7.5	8.6	-6.5	9.7	11.2	4.9	16.6	7.3	5.6

Each cell records the percent change in the area of a species' range from one time stage to the next (upper entry: universal model; lower entry: contiguous model). The first column is the threshold percentile and the second is the climate scenario (A2: CSIRO; B2: Hadley). doi:10.1371/journal.pntd.0000585.t002

County, Arizona, which is in accordance of our predictions (Figures 2a and 3a). Subsequently Kerr et al. [38] confirmed the presence there of *L. m. mexicana* in *Neotoma albigula* individuals. However, this is the western limit of known leishmaniasis foci in the United States and occurs in a riparian zone in the Sonoran biotic province. If precipitation and water availability has been preventing the spread of the disease further west, this impediment may be relaxed with climate change. However, at the coarse resolution used in this study, precipitation-related variables were not the ones found to be most important in the ENMs for these two species. It is possible that other features of the habitat (including vegetation composition and structure, soil type, and presence or absence of water bodies) may prevent sufficiently high densities of vectors and reservoirs in this region for disease transmission.

The reliability of these predictions depends on how successful the ENMs are. In general, ENM predictions have been known to correct traditional range maps based on marginal records and expert judgments of appropriate contiguity and habitat suitability [25]. ENM predictions for mammal species have been successfully tested in México [70]. In this analysis, for three reservoir species (*Neotoma floridana*, *Neotoma mexicana*, and *Neotoma micropus*), the models showed high concordance with an independent data set and there are grounds for confidence. For *Neotoma albigula*, and for the two vector species, the internal tests within Maxent gave good results but data were not available for independent tests.

For Texas, the predicted potential distributions for both *Neotoma floridana* and *Neotoma micropus* (see Figures 3b and 3d) are more conservative than those found in traditional range maps [71]. In central Texas, according to our predicted distributions, there is a north-south band of habitat that is at best marginally suitable for any of the four *Neotoma* species modeled here. This may explain the temporal pattern in the spread of leishmaniasis cases in Texas. Leishmaniasis was recorded in 1903 at the southeastern tip of Texas at the border with México [20]. By the mid-1940s, it had spread to south-central Texas, by the early 1980s, it had spread to central Texas, and by the 1990s, to north Texas. However, throughout this period it did not spread east of Gonzales County (97.51° W) even though there was suitable habitat for both vector

species according to our ecological niche models. What seems to have restricted this eastward spread is the presence of at best marginal habitat for any of the *Neotoma* reservoir species along the north-south strip mentioned earlier. The pre-2000 records of leishmaniasis from Texas fall within the area predicted to be suitable habitat for *Neotoma micropus*.

By 2000, however, the disease had breached this barrier of unsuitable reservoir habitat in east-central Texas, and at least ten cases of leishmaniasis have been reported since, further north and east of the barrier [46,47]. Because the patients reported that they had not travelled outside the respective counties in at least five years, the infections were thus presumably because of the establishment of a local transmission cycle [46]. This region has good habitat for *Neotoma floridana* (see Figure 3b). These theoretical results support the earlier conclusion of McHugh et al. [21] who recorded *L. m. mexicana* in *Neotoma floridana* east of the presumed barrier in 2001 and presumed that the parasite had established a life-cycle with this host species. If this scenario is correct, except for ecological suitability for vector species, there is little impediment left for the further eastward spread of leishmaniasis from Texas to other states. The results of this study show that climate change will exacerbate the present risk.

In this analysis, the risk of human exposure to leishmaniasis was estimated using the projected human population under the A2 and B2 climate change scenarios in cells in which at least one vector and one reservoir species were predicted to be present. Even under the contiguous dispersal model, and assuming that a species will occupy only the top 10% of its potential habitat, the expected number of individuals exposed to leishmaniasis is predicted to more than double to 27×10^6 by 2080. Under less contiguous assumptions, this number becomes much higher. Because of the various uncertainties associated with such projections, the absolute numbers are open to question. Leishmaniasis typically affects only rural populations and much of the future population of this region will live in urbanized environments [3]. Consequently, the size of the human populations at serious risk will be much less than these absolute numbers. However, given that a large fraction of the population (76.9% in México and 81.4% in the United States [72]) already live in urban areas, the conclusion that the exposure risk

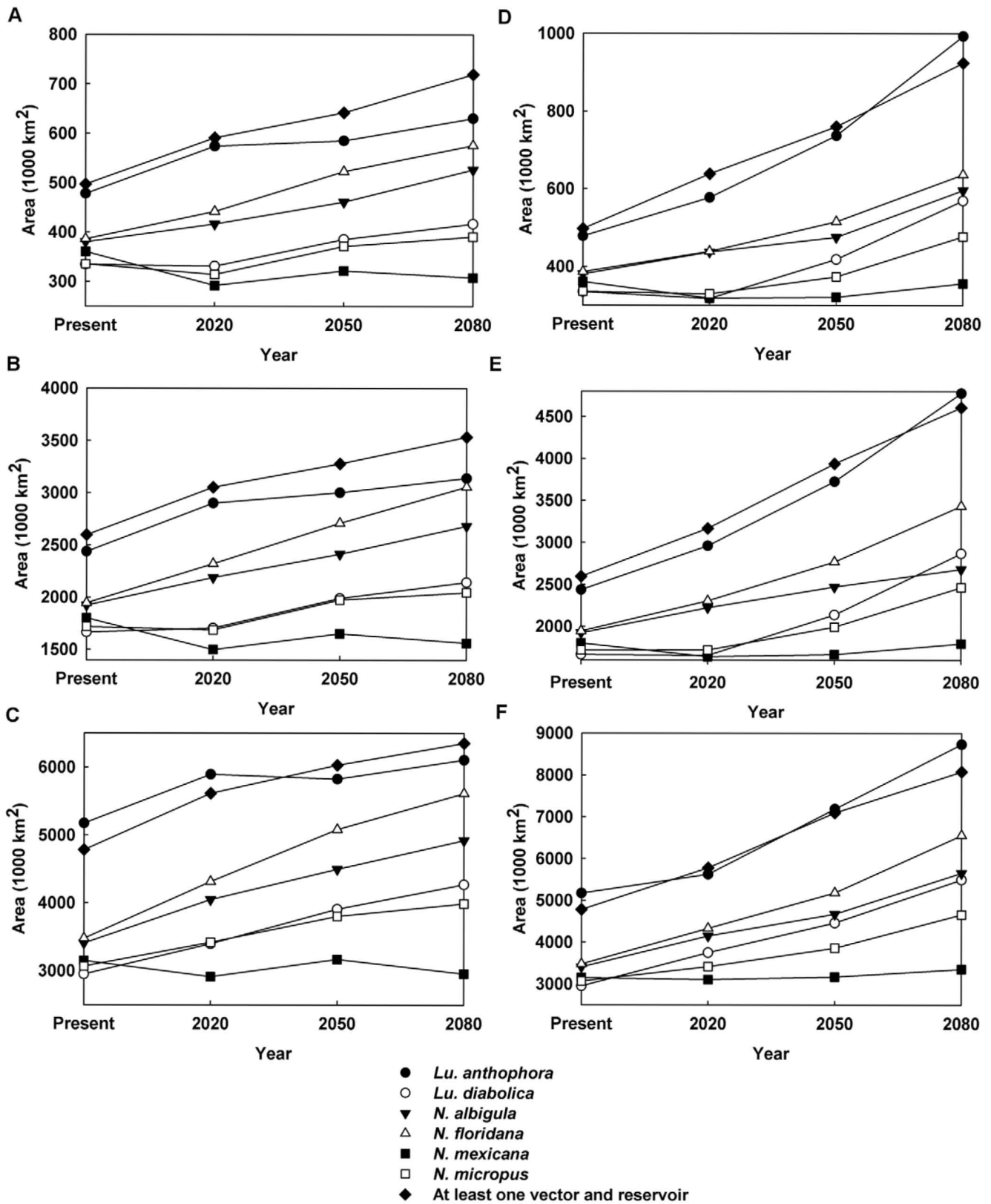


Figure 6. Range expansion of vector and reservoir species under the universal dispersal model. (a) B2 scenario, Hadley model, top 10% of the habitat; (b) B2 scenario, Hadley model, top 50% of the habitat; (c) B2 scenario, Hadley model, top 90% of the habitat; (d) A2 scenario, CSIRO model, top 10% of the habitat; (e) A2 scenario, CSIRO model, top 50% of the habitat; (f) A2 scenario, CSIRO model, top 90% of the habitat. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g006

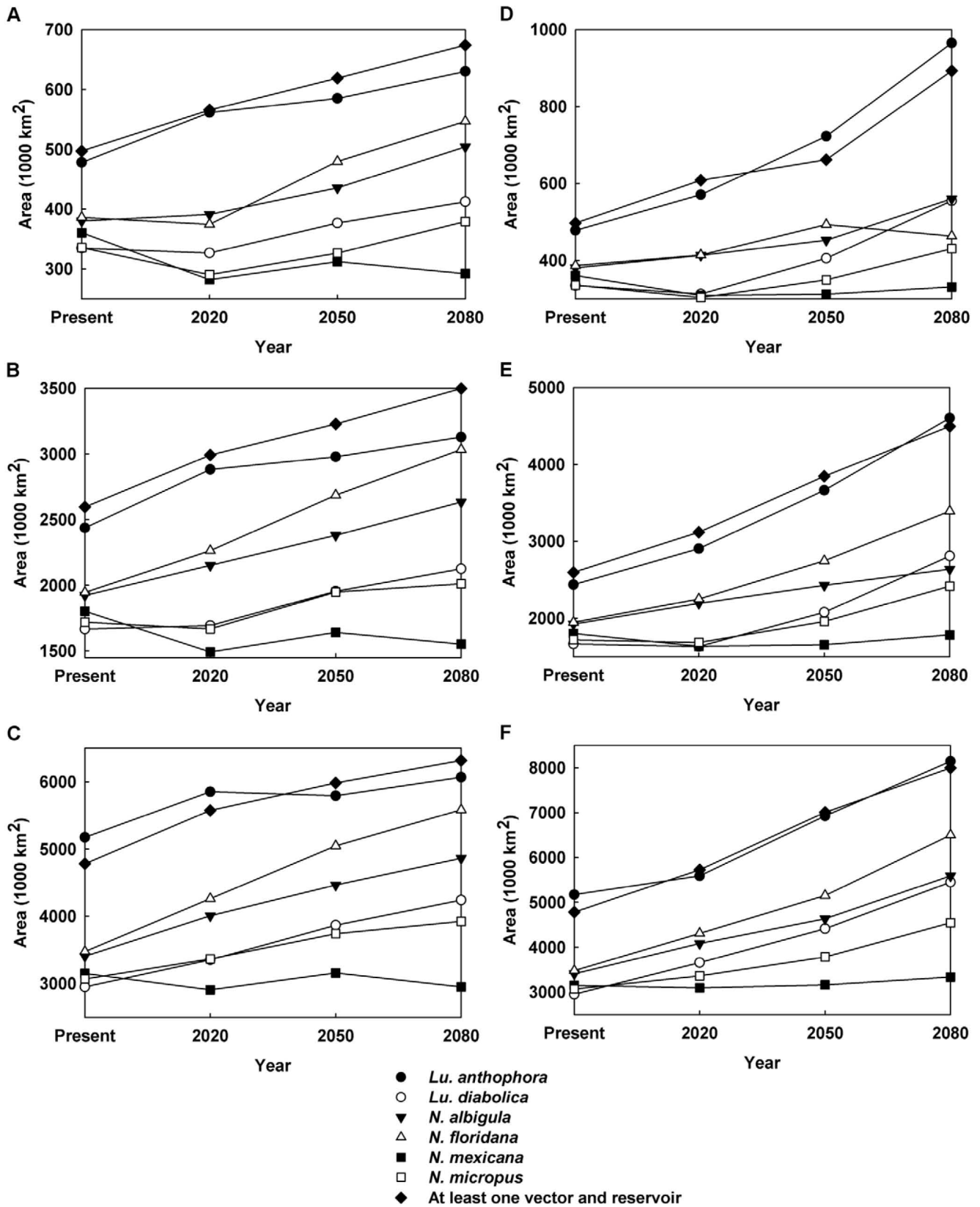


Figure 7. Range expansion of vector and reservoir species under the contiguous dispersal model. (a) B2 scenario, Hadley model, top 10% of the habitat; (b) B2 scenario, Hadley model, top 50% of the habitat; (c) B2 scenario, Hadley model, top 90% of the habitat; (d) A2 scenario, CSIRO model, top 10% of the habitat; (e) A2 scenario, CSIRO model, top 50% of the habitat; (f) A2 scenario, CSIRO model, top 90% of the habitat. doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g007

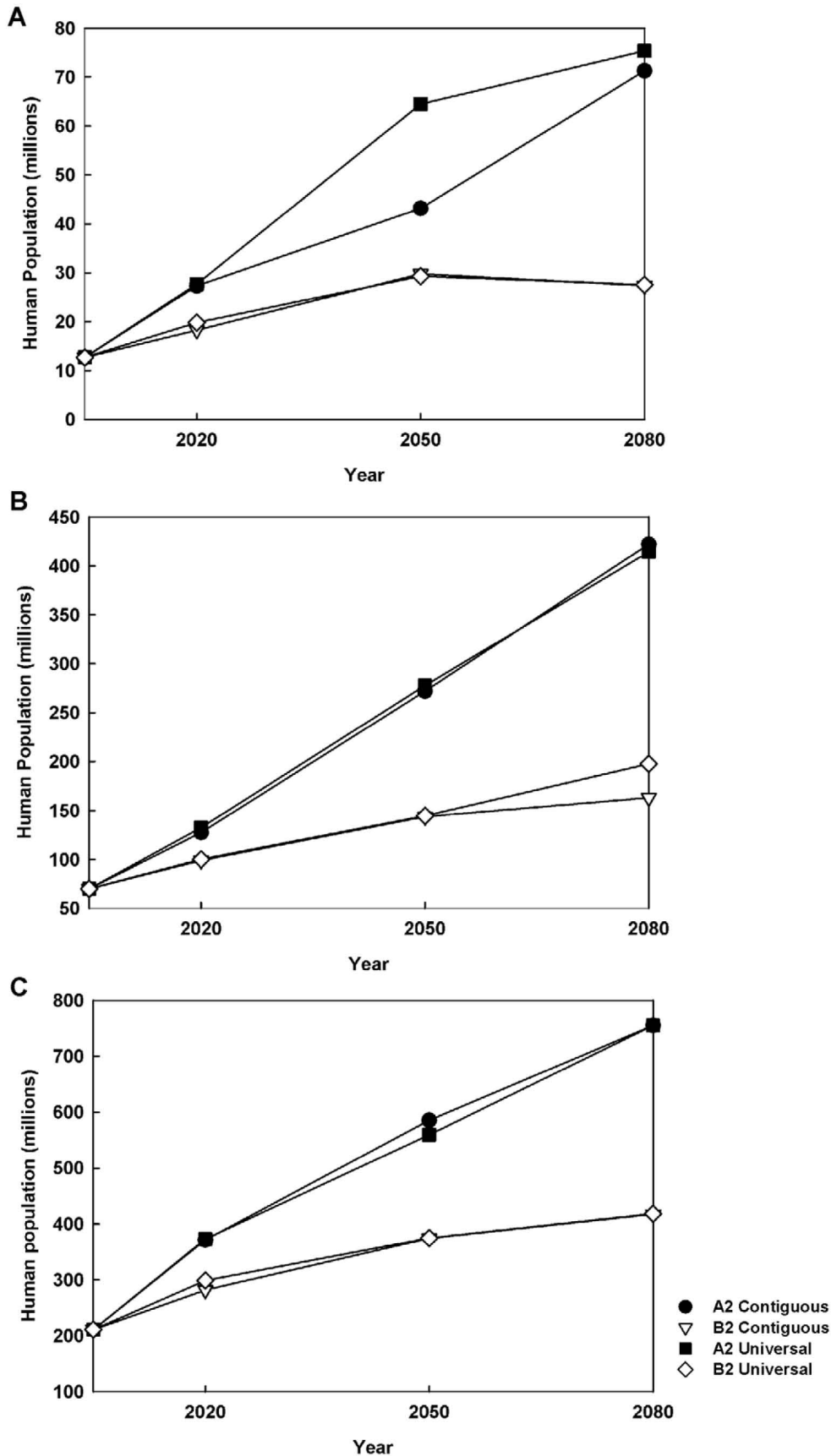


Figure 8. Human population risk due to the presence of at least one vector and reservoir species. (a) Top 10% of the habitat; (b) Top 50% of the habitat; (c) Top 90% of the habitat.
 doi:10.1371/journal.pntd.0000585.g008

will at least double is relatively robust and deserves attention from a public health perspective. Even if we assume urbanization will be 90%, and this is the percentage of non-exposure to leishmaniasis, 2.7×10^6 individuals may be at risk in 2080 under the most conservative scenario.

Increased exposure need not lead to increased disease cases provided that adequate preventive measures are in place (beyond relying on natural immunity in human populations). For leishmaniasis, potential public health measures could include an expanded surveillance and control program beyond the northern boundary of the present range of the disease in the southern United States. Surveillance must expand northwards as the disease advances in that direction. Other components include expanded efforts at vector and reservoir control. If the conclusion that rodent reservoir distributions have controlled the spread of the disease in Texas is correct, a focus on rodent control may be attractive since many of these rodent species are also implicated as agricultural pests in much of their range.

Finally, eight limitations of this analysis should be emphasized. First, there is necessarily considerable uncertainty about the future, including the projected climate scenarios and human population changes. This analysis also does not consider the possible emergence of new vector species as the disease spreads north. Second, whereas ENMs have been successfully tested with present-day species distributions, it is an open question whether they are being successfully fitted to future climatic layers. Third, land use and land cover changes were not taken into account because they are hard to predict with much confidence. For this reason, land cover was also not used in constructing the ENMs (though it is likely that, in general, they would lead to increased accuracy of predictions). Fourth, as explicitly noted earlier, species' dispersal remains poorly understood. Though many conclusions remain robust under the two extreme dispersal models considered here, other patterns of dispersal may lead to different conclusions. Fifth, we have no definitive estimate of how much of a species' potential habitat it will occupy in the future even beyond uncertainty about dispersal. We used three percentile ranges (10, 50, and 90) and many quantitative conclusions depend on these values. The most important point is that, even under the most conservative assumptions, there is a serious risk of both the increase of the geographical range of leishmaniasis and the number of human individuals potentially exposed to it.

Sixth, as explained in the Introduction, this analysis only considers ecological risk and it remains possible that other human determinants of disease risk (for instance, public health initiatives) and natural determinants (such as regional variation in immunity) may qualify some of the conclusions arrived at here. These factors are beyond the scope of this analysis but must be acknowledged when interpreting its results. Seventh, even within the ecological context, we did not take into account differences between the vector and reservoir species, in effect assuming that each vector has the same affinity for each reservoir, and that all vectors and reservoirs are equally competent at maintaining the parasite and transferring it to humans. At present there is insufficient data for such differences to be incorporated into our models. Finally, we did not take into account the ecological factors that may directly affect the life-history of the parasite itself and just presumed that it can flourish wherever an appropriate vector-reservoir cycle is established. This is also open to question.

Conclusions

Climate change will exacerbate the ecological risk of human exposure to leishmaniasis in areas north of the present range of the disease in the United States (particularly the east-central part of

the country) and possibly even in parts of south-central Canada. The risk of spread is greater for the extreme A2 climate change scenario than the conservative B2 scenario. Even in the latter case, with contiguous models for dispersal of vector and reservoir species, and occupancy restricted to only the top 10% of potential habitat, the number of human individuals exposed to leishmaniasis is predicted to double by 2080. These predictions point to the importance of public health measures such as surveillance for leishmaniasis immediately north of the southern United States and, potentially, further north as disease cases are identified. Vector and reservoir control strategies should also be further investigated as part of adaptability to climate change. It is likely that other presently primarily tropical vector-borne diseases will show a similar pattern of range expansion and poleward shift due to climate change.

Supporting Information

Figure S1 Predicted future distributions for *Lutzomyia anthophora*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000585.s001 (0.79 MB TIF)

Figure S2 Predicted future distributions for *Neotoma albigula*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000585.s002 (0.77 MB TIF)

Figure S3 Predicted future distributions for *Neotoma mexicana*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000585.s003 (0.67 MB TIF)

Figure S4 Predicted future distributions for *Neotoma micropus*. (a) B2 scenario, Hadley model, 2020; (b) B2 scenario, Hadley model, 2050; (c) B2 scenario, Hadley model, 2080; (d) A2 scenario, CSIRO model, 2020; (e) A2 scenario, CSIRO model, 2050; (f) A2 scenario, CSIRO model, 2080.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000585.s004 (0.78 MB TIF)

Acknowledgments

We thank curators from the following consulted museum mammal collections: Colección Nacional de Mamíferos, Universidad Nacional Autónoma de México; Colección de Mamíferos, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; University of Kansas Natural History Museum; American Museum of Natural History, New York; National Museum of Natural History, Washington, D.C.; Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois; Museum of Zoology, University of Michigan, Ann Arbor; Michigan State University Museum, East Lansing; Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley; Texas Tech University Museum, Lubbock, and Texas Cooperative Wildlife Collections, Texas A&M University, College Station. For discussions and technical help, we thank Trevon Fuller, Jonathan Glass, Chad McHugh, Alexander Moffett, Camille Parmesan, and Yanjun Shen. Chad McHugh also provided data points used for model construction.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS. Analyzed the data: CG OW SES VSC SS. Wrote the paper: CG VSC SS. Built computer models. Built computer models: CGS.

References

- Center for Disease Control CDC (2008) Parasitic disease information: fact sheet on *Leishmania* infection. http://www.cdc.gov/ncidod/dpdx/parasites/leishmania/factsht_leishmani.htm#common; last accessed 24-February-2009.
- Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169–1180.
- Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269–1281.
- Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Romero SZ, Pérez-Becker R, Saavedra-Lira E, et al. (2000) *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Exp Parasitol* 95: 277–284.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, et al. (2000) The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos Saude Publica* 16: 925–950.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239–251.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in Leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmze C, Alexander B, et al. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581–596.
- Couppie P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, et al. (2004) Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* 71: 558–560.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP (2005) Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 525–534.
- Velez I, Agudelo S, Robledo S, Jaramillo L, Segura I, et al. (1994) Diffuse cutaneous leishmaniasis with mucosal involvement in Colombian caused by an enzymatic variant of *Leishmania panamensis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88: 1999.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64: 1–199.
- Ashford RW (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 14: 523–532.
- Chaves LF, Pascual M (2006) Climate cycles and forecasts of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector-borne disease. *PLoS Med* 3: e295. doi:10.1371/journal.pmed.0030295.
- Chaves LF, Hernández MJ, Dobson AP, Pascual M (2007) Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trend Parasitol* 23: 311–316.
- Rotureau B (2006) Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg* 74: 81–96.
- Saliba EK, Oumesh OY (1999) Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 17: 275–277.
- Lainson R, Killick-Kendrick R, Flisser A (1988) Ecological interactions in the transmission of leishmaniasis (and discussion). *Philos Trans R Soc Lond* 31: 389–404.
- Peterson AT, Shaw J (2003) *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol* 33: 919–931.
- McHugh CP, Melby PC, LaFon SG (1996) Leishmaniasis in Texas: epidemiology and clinical aspects of human cases. *Am J Trop Med Hyg* 55: 547–555.
- McHugh CP, Thies ML, Melby PC, Yantis LD, Raymond RW, et al. (2003) Short report: a disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern wood rat, *Neotoma floridana* collected in Texas. *Am J Trop Med Hyg* 69: 470–472.
- Cardenas R, Sandoval CM, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C (2006) Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 75: 273–277.
- Dobson A, Carper R (1992) Global warming and potential changes in host-parasite and disease-vector relationships. In: Peters RL, Lovejoy TE, eds. *Global warming and biodiversity*. New Heaven CT: Yale University Press.
- Moffett A, Shackelford N, Sarkar S (2007) Malaria in Africa: vector species' niche models and relative risk maps. *PLoS ONE* 2: e824. doi:10.1371/journal.pone.0000824.0000822.
- Peterson AT (2008) Biogeography of disease: a framework for analysis. *Naturwissenschaften* 95: 483–491.
- Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Beard CB, Ramsey JM (2002) Ecologic niche modeling and potential reservoirs for Chagas disease, México. *Emerg Infect Dis* 8: 662–667.
- Holt RD, Gomulkiewicz R (1996) The evolution of species niches: a population dynamic perspective. In: Adler FR, Lewis MA, Dallon JC, eds. *Case studies in mathematical modeling: ecology, physiology, and cell biology*. Saddle Hill New Jersey: Prentice-Hall. pp 25–50.
- Sánchez-Cordero V, Stockwell DB, Sarkar S, Wang H, Stephens CR, et al. (2008) Competitive interactions between felid species may limit the southern distribution of bobcats *Lynx rufus*. *Ecography* 31: 757–764.
- Soberón J (2007) Grinnellian and eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecol Lett* 10: 1115–1123.
- Soberón J, Peterson AT (2005) Interpretation of models of ecological niches and species' distributional areas. *Biodiv Inform* 2: 1–10.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129–151.
- Margules GR, Sarkar S (2007) Systematic conservation planning. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Sarkar S, Pressey RL, Faith DP, Margules CR, Fuller T, et al. (2006) Biodiversity conservation planning tools: present status and challenges for the future. *Annu Rev Env Resour* 31: 123–159.
- Canto-Lara SB, Van Wynsberghe NR, Vargas-Gonzalez A, Ojeda-Farfán FF, Andrade-Narvaez FJ (1999) Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania spp.* isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 305–309.
- Rebollar-Téllez E, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narvaez FJ (1996) A two years study on vectors of cutaneous leishmaniasis: evidence for sylvatic transmission in the state of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 555–560.
- van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG, Itzá-Ortiz MF, Andrade-Narvaez FJ (2000) Retention of *Leishmania mexicana* in naturally infected rodents from the state of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 595–600.
- Kerr SF, McHugh CP, Dronen NOJ (1995) Leishmaniasis in Texas: prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *Neotoma micropus*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 73–77.
- Kerr SF, McHugh CP, Merkel R (1999) Short report: a focus of *Leishmania mexicana* near Tucson, Arizona. *Am J Trop Med Hyg* 61: 378–379.
- McHugh CP, Grogl M, Kreutzer RD (1993) Isolation of *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae) collected in Texas. *J Med Entomol* 30: 631–633.
- McHugh CP, Ostrander BF, Raymond RW, Kerr SF (2001) Population dynamics of sand flies (diptera: psychodidae) at two foci of leishmaniasis in Texas. *J Med Entomol* 38: 268–277.
- Raymond RW, McHugh CP, Witt LR, Kerr SF (2003) Temporal and spatial distribution of *Leishmania mexicana* in a population of *Neotoma micropus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 171–180.
- Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ramsey JM, Beard CB (2002) Identifying mammal reservoirs for Chagas' disease in Mexico via ecological niche modeling of primary point occurrence data of parasites and hosts. *Emerg Infect Dis* 8: 662–667.
- Laboratorio de Medicina Tropical UNAM (2009) Leishmaniasis. <http://www.medicina-tropical.com/LEISHMANIASIS.htm>; last accessed 14-November-2009.
- Furner BB (1990) Cutaneous leishmaniasis in Texas: report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 23: 368–371.
- Gustafson TL, Reed CM, McGreevy PB, Pappas MG, Fox JC, et al. (1985) Human cutaneous leishmaniasis acquired in Texas. *Am J Trop Med Hyg* 34: 58–63.
- Wright NA, Davis LE, Aftergut KS, Parrish CA, Cockerell CJ (2008) Cutaneous leishmaniasis in Texas: a northern spread of endemic areas. *J Am Acad Dermatol* 58: 650–652.
- Maloney DM, Maloney JE, Dotson D, Popov VL, Sanchez RL (2002) Cutaneous leishmaniasis: Texas case diagnosed by electron microscopy. *J Am Acad Dermatol* 47: 614–616.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguera M, van der Linden PJ, et al. (2001) Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Nakicenovic N, Swart R, eds (2000) Emissions scenarios. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Lai OC, So FM, Chan KW (2009) Spatial epidemiological approaches in disease mapping and analysis. Boca Raton: CRC Press.
- Peterson AT (2008) Biogeography of disease: a framework for analysis. *Naturwissenschaften* 95: 483–491.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trend Ecol Evol* 20: 328–336.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, et al. (2002) The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiol* 13: 364–367.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* 22: 552–557.
- Moffett A, Strutz S, Guda N, González C, Ferro MC, et al. (2009) A global public database of disease vector and reservoir distributions. *PLoS Negl Trop Dis* 3(3): e378. doi:10.1371/journal.pntd.0000378.
- Young DG, Perkins PV (1984) Phlebotomine sandflies of North America. *Mosq News* 44: 263–304.
- McHugh CP (1991) Distributional records for some North American sand flies, *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Entomol News* 102: 192–194.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25: 1965–1978.

59. United States Geological Survey USGS (1998) GTOPO30 Global 30 arc second digital elevation model. <http://erosusgs.gov/products/elevation/topo30.php>; last accessed 24-February-2009.
60. Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Model* 190: 231–259.
61. Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161–175.
62. Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE (2004) A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*. pp 655–662.
63. Pawar S, Koo MS, Kelley C, Ahmed FM, Choudhury S, et al. (2007) Conservation assessment and prioritization of areas in Northeast India: priorities for amphibians and reptiles. *Biol Conserv* 136: 346–361.
64. Lobo JM, Jiménez-Valverde A, Real R (2008) AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecol Biogeogr* 17: 145–151.
65. Peterson AT, Papes M, Eaton M (2007) Transferability and model evaluation in ecological niche modeling: a comparison of GARP and Maxent. *Ecography* 30: 550–560.
66. Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37: 637–669.
67. Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD, eds (2003) *Dispersal*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
68. Bengtsson M, Shen Y, Oki T (2006) A SRES-based gridded global population dataset for 1990–2100. *Popul Environ* 28: 113–131.
69. Mead DG, Cupp EW (1995) Occurrence of *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae) in Arizona. *J Med Entomol* 32: 747–748.
70. Illoldi-Rangel P, Sánchez-Cordero V, Peterson AT (2004) Predicting distributions of Mexican mammals using ecological niche modeling. *J Mammal* 85: 658–662.
71. Davis W, Schmidly D (1994) *The mammals of Texas*. Texas: Texas Parks and Wildlife.
72. United Nations Department of Economic Affairs UN (2008) *2008 World Urbanization Prospects: the 2007 revision highlights*. New York: United Nations.