



Evaluación de cebadores para la amplificación del gen *its1* de *Leishmania* spp. para caracterización de especies causantes de leishmaniosis cutánea en Guatemala.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



EVALUACIÓN DE CEBADORES PARA LA  
AMPLIFICACIÓN DEL GEN *ITS1* DE *LEISHMANIA* SPP.  
PARA CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES CAUSANTES  
DE LEISHMANIOSIS CUTÁNEA EN GUATEMALA

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

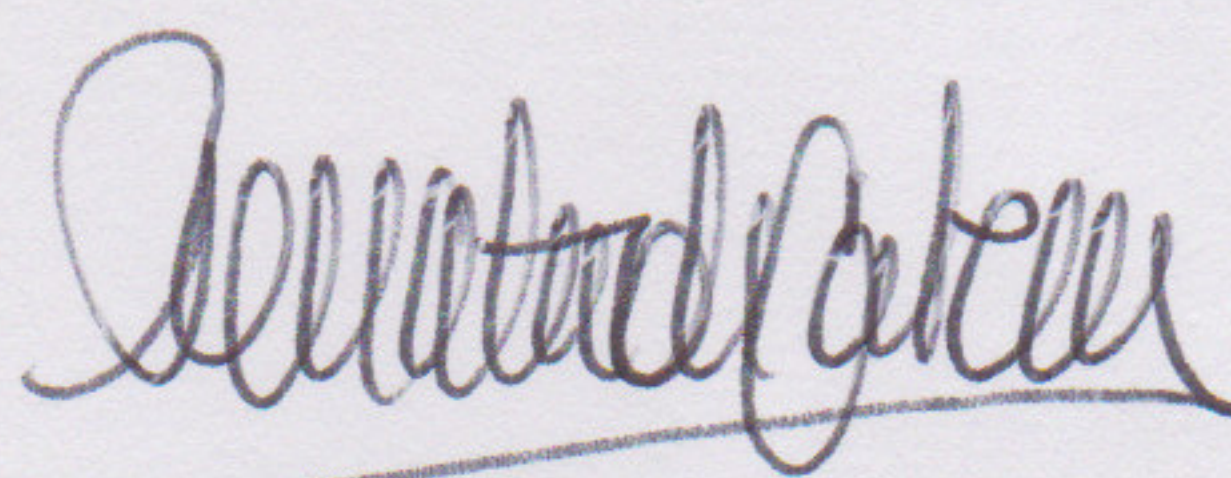
Lucía Isabel Illescas Brol

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019

Vo. Bo.:

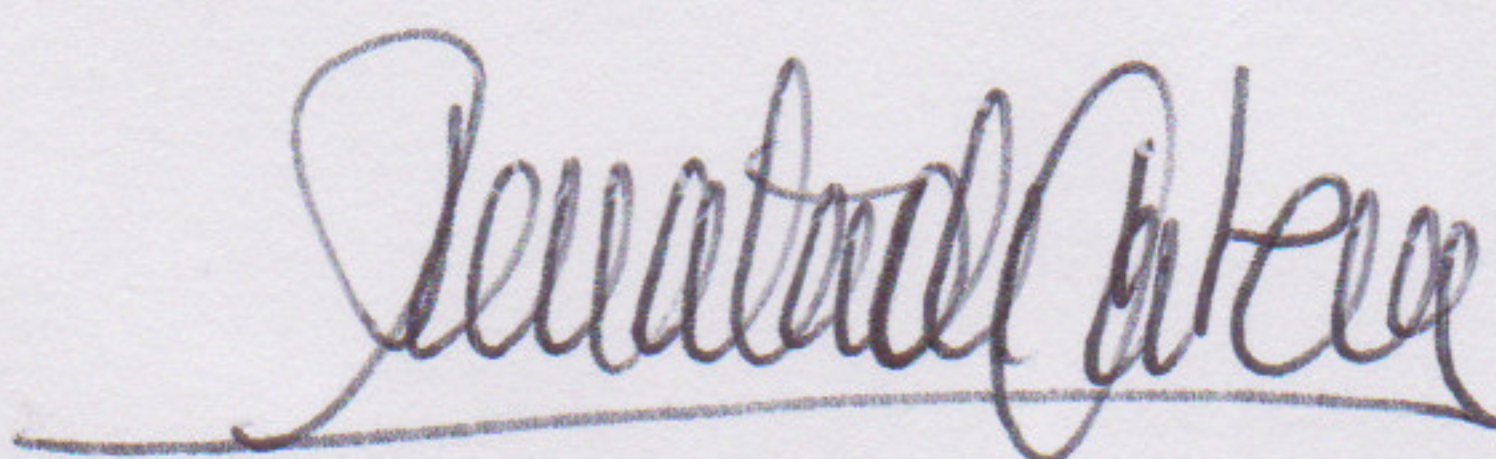


(f)

---

MSc. Renata Mendizábal de Cabrera  
Asesora

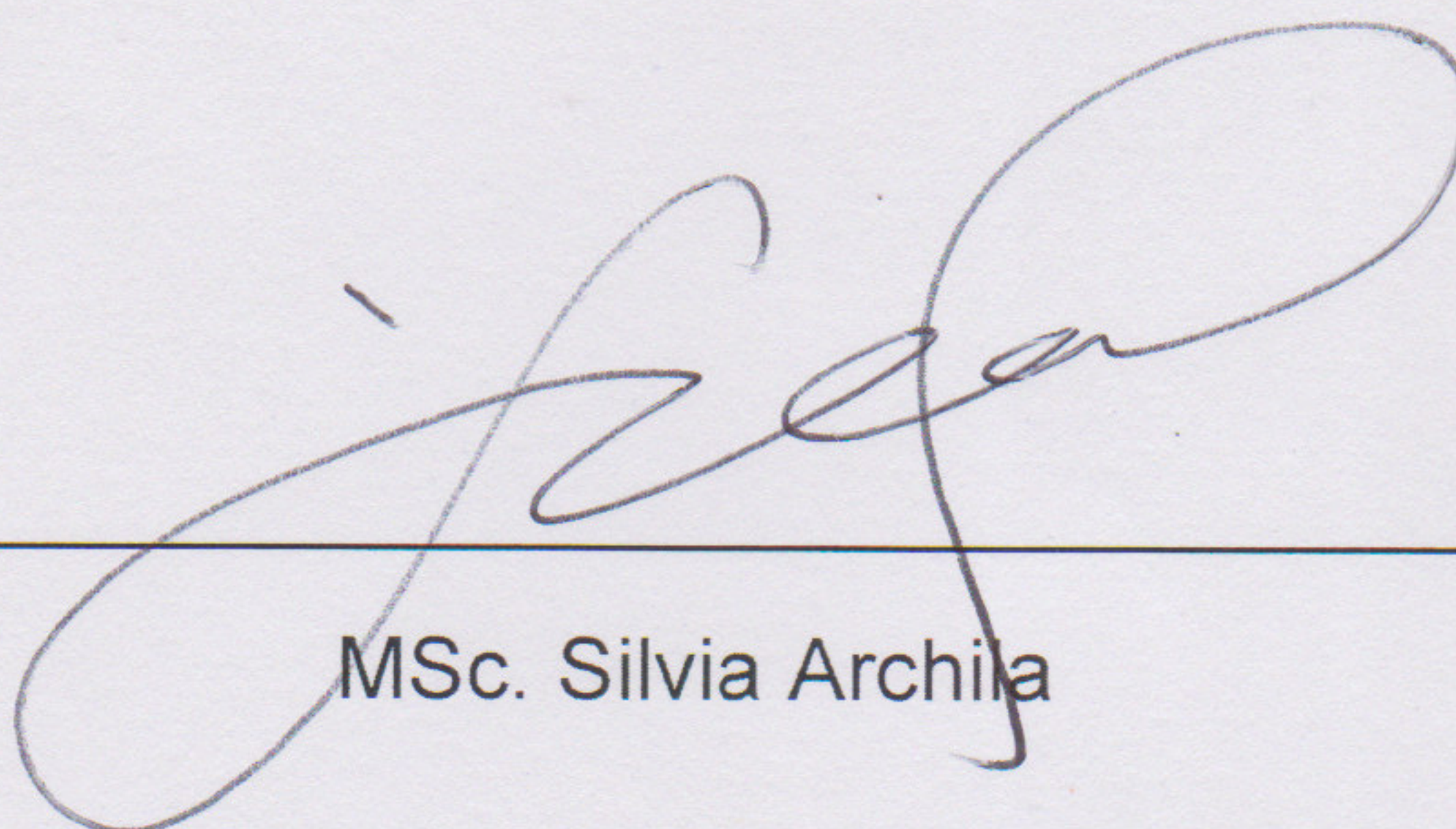
Tribunal Examinador:



(f)

---

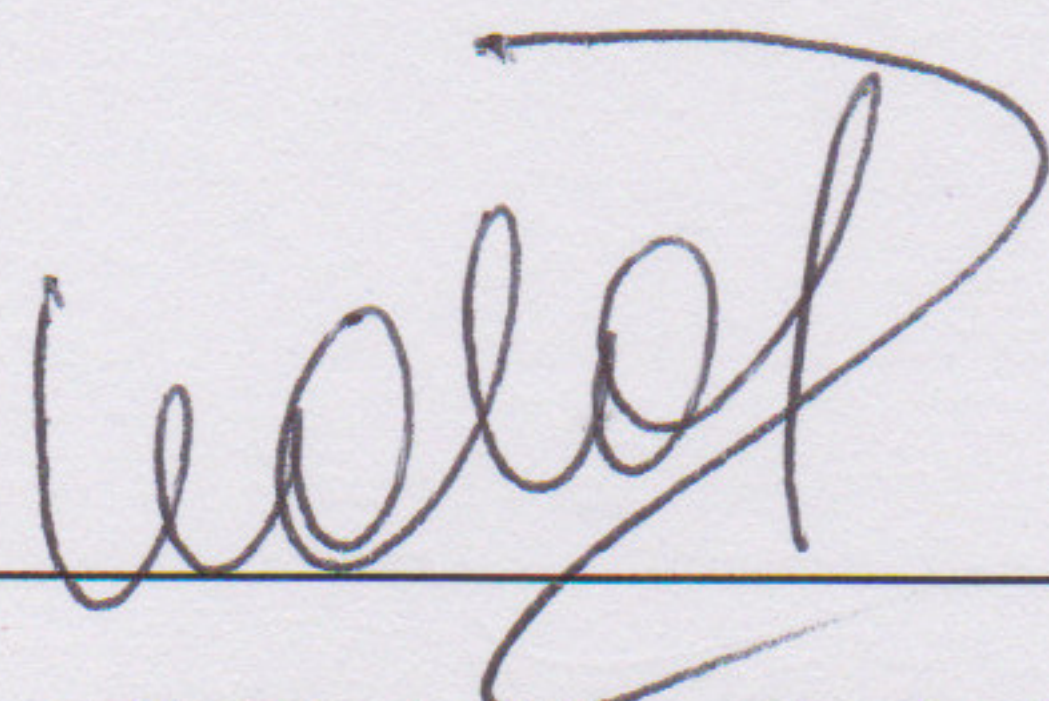
MSc. Renata Mendizábal de Cabrera



(f)

---

MSc. Silvia Archila



(f)

---

PhD. Leda Pedelini

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2019

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Leishmaniosis.....	6
1. Causa y transmisión.....	6
2. Tipos de leishmaniosis.....	8
3. Tratamientos.....	10
4. Epidemiología.....	13
5. Diagnóstico de leishmaniosis cutánea.....	16
B. <i>Leishmania</i> spp.....	18
1. Ciclo de vida.....	18
2. Tipificación: métodos moleculares.....	19
3. Especies reportadas en América y en Guatemala.....	21
4. Importancia de tipos de especie en infección cutánea.....	22
C. Algoritmos de alineamiento de múltiples secuencias.....	23
V. ANTECEDENTES.....	25
VI. METODOLOGÍA.....	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
VIII. CONCLUSIONES.....	40
IX. RECOMENDACIONES.....	41
X. BIBLIOGRAFÍA.....	42
XI. ANEXOS.....	50

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Incidencia de leishmaniosis cutánea reportada en las Américas.....	13
2. Especies de <i>Leishmania</i> spp. que provocan leishmaniosis en Guatemala, sus vectores y los reservorios en los que se han identificado.....	21
3. Tratamientos para leishmaniosis por especie de parásito.....	22
4. Operacionalización de variables.....	26
5. Mezcla de reacción para PCR SSUrRNA.....	28
6. Mezcla de reacción para PCR ITSr1.....	28
7. Programas de PCR para la región SSUrDNA.....	29
8. Programas de PCR para el gen <i>its1</i> .....	29
9. Presupuesto.....	31
10. Cronograma.....	31
11. Porcentajes de secuencias reportadas previamente que presentaron identidad con los cebadores utilizados.....	37
A1. Especies de <i>Leishmania</i> spp. y países en los que se han reportado.....	50
A2. Año y departamento de Guatemala del que se obtuvieron las muestras.....	53
A3. Composición de mezcla de reacción utilizadas para cada prueba de PCR.....	54
A4. Números de acceso de secuencias reportadas para el gen <i>its1</i> de especies de <i>Leishmania</i> spp. del nuevo mundo causantes de leishmaniosis cutánea.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de selección de tratamiento de leishmaniosis cutánea .....	12
2. Incidencia anual de leishmaniosis en Guatemala.....	14
3. Tasa de infección según la edad en Guatemala .....	14
4. Prevalencia de leishmaniosis en Guatemala por departamento .....	15
5. Ciclo de Vida de <i>Leishmania</i> spp.....	18
6. Ubicación de SSU rDNA e <i>ITS1</i> .....	20
7. Esquema de la posición de alineamiento de cebadores para PCR anidada para la amplificación del gen <i>its1</i> de <i>Leishmania</i> .....	27
8. Diagrama de flujo de metodología.....	30
9. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando algunas de las muestras y diluciones de ADN analizadas con los programas SSUTD4+ITSTD.....	33
10. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando algunas de las muestras y diluciones de ADN analizadas con los programas SSUTD2+ITSTD.....	34
11. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando algunas de las muestras y diluciones de ADN analizadas con los programas ITSTD.....	35
12. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando la amplificación de la muestra 2631 a distintas diluciones de ADN y programas ITSTD.....	36
A1. Alineamiento múltiple de secuencias para cada cebador utilizado.....	58

## RESUMEN

La leishmaniosis cutánea es una enfermedad causada por la infección por parásitos del género *Leishmania* spp., los cuales son transmitidos a mamíferos y roedores por flebótomos. La caracterización molecular de este parásito para fines epidemiológicos ha sido ampliamente abordada con el gen *its1* como blanco molecular, pero este método no se ha evaluado para cepas de Guatemala. Además, estudios previos realizados en Guatemala en los que se tipificaron los parásitos con el gen *hsp70* no fueron capaces de diferenciar entre especies de parásitos del mismo subgénero. Por eso, el objetivo de este estudio fue evaluar el método de PCR de punto final con cebadores previamente reportados para la amplificación del gen *its1* de *Leishmania* spp. para la identificación de especies responsables de la leishmaniosis cutánea en Guatemala. Para esto se trabajó con 25 muestras de raspados de lesiones colectadas entre 1987 y 2016 en los departamentos de Petén, Izabal, Alta y Baja Verapaz, previamente positivas para *hsp70*. Se variaron los componentes de la mezcla de reacción, la concentración de ADN y las condiciones de las reacciones de PCR anidada, semi-anidada, de gradiente y *Touchdown*. De estas variantes, solamente una (*Touchdown* PCR para *its1*) presentó la amplificación de una de las muestras, pero, al no amplificar las demás muestras ni los controles positivos, no puede concluirse que sea exitosa. Se realizó un análisis de homología de los cebadores por alineamiento múltiple de secuencias de las regiones *its1* de las cepas previamente reportadas para las especies de interés que resultó en bajos porcentajes de identidad de los cebadores analizados, por lo que se concluye que los cebadores R221/R332 y LITSR/L5.8S no son aptos para la caracterización molecular de las cepas de *Leishmania* spp. causantes de leishmaniosis cutánea en Guatemala, probablemente debido a la diversidad genética de las mismas. Se recomienda realizar un análisis por PCR del mismo gen pero utilizando cebadores que abarquen una región mayor, como el set IR1/IR2, y clonar y secuenciar su producto con el objetivo de identificar posibles variaciones puntuales.

# I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis cutánea es una enfermedad causada por la infección por parásitos del género *Leishmania* spp., los cuales son transmitidos a mamíferos por flebótomos. Sus síntomas incluyen el surgimiento de úlceras en la piel, las cuales pueden dejar cicatrices y discapacidades. Según el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), esta enfermedad afecta a aproximadamente 725 guatemaltecos al año y es endémica en cinco departamentos del país (2016).

Este trabajo se enfocó en la evaluación de cebadores previamente utilizados en la caracterización molecular de los parásitos causantes de la leishmaniosis cutánea. Los cebadores analizados amplifican una región del gen *its1* de los parásitos del género *Leishmania* spp., y son ampliamente utilizados para la caracterización molecular de especies del Viejo Mundo. Esto, porque este gen tiene un alto número de copias y posee regiones altamente conservadas, lo cual representa una ventaja para su sensibilidad y alineamiento. Sin embargo, su uso en especies del Nuevo Mundo no se ha evaluado. La importancia de evaluarlo en Guatemala radica en que, de ser efectivo, este método representaría una alternativa al uso de otros genes como blancos moleculares, como el *hsp70*, cuyo análisis por RFLP-PCR es incapaz de diferenciar entre miembros de algunos complejos de especies muy relacionadas. Además, los estudios epidemiológicos de caracterización molecular de *Leishmania* spp. utilizan diversos genes como blancos moleculares, lo cual deja la necesidad de un gen que pueda utilizarse como estándar para aumentar la comparabilidad de los resultados de estos estudios. Por eso, el uso del gen *its1* para este propósito significaría un paso más hacia la selección de un método de identificación molecular estándar.

Como fuente del ADN del parásito, se trabajó con muestras de raspado de lesión recolectadas entre 1987 y 2016 en los departamentos de Petén, Izabal, Alta y Baja Verapaz de personas infectadas con leishmaniosis cutánea. La evaluación de los cebadores se realizó con controles positivos para las especies prevalentes en América (*L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*) y con 25 muestras para las cuales se había amplificado el gen *hsp70*, pero cuya identidad no fue posible identificar y fueron reportadas como *L. braziliensis/L. naiffi* (6) o *L. panamensis/L. guyanensis* (6), o no se habían identificado por RFLP (2) o se sospechaba de una infección mixta (8). Se variaron los componentes de la mezcla de reacción, la concentración de ADN y las condiciones de las reacciones de PCR anidada, semi-anidada, de gradiente y *Touchdown*. De todas estas variantes, solamente con una (*Touchdown* PCR para *its1*) se obtuvo la amplificación de una de las muestras, pero, al no amplificar las demás muestras ni los controles positivos, no puede concluirse que sea exitosa. Se realizó un análisis de homología de los

cebadores por alineamiento múltiple de secuencias de las regiones *its1* de las cepas previamente reportadas para las especies de interés. Éste resultó en bajos porcentajes de identidad de los cebadores analizados con las regiones de alineamiento, por lo que se concluye que estos cebadores no son aptos para la caracterización molecular de las cepas de *Leishmania* spp. causantes de leishmaniosis cutánea en Guatemala, probablemente debido a la diversidad genética de las mismas.

## II. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Evaluar el método de PCR de punto final con cebadores previamente reportados para la amplificación del gen *its1* de *Leishmania* spp. para la identificación de especies responsables de la leishmaniosis cutánea en Guatemala.

### B. ESPECÍFICOS

Evaluar las condiciones de reacción de la técnica de PCR para la detección del gen *its1* en muestras previamente positivas para *hsp70* de *Leishmania* spp. de áreas endémicas de Guatemala.

Determinar el porcentaje de identidad de las variantes genéticas de las especies causantes de leishmaniosis cutánea publicadas para el gen *its1*.

### III. JUSTIFICACIÓN

Rutinariamente en Guatemala se realiza el diagnóstico parasitológico de la leishmaniosis cutánea, pero tiene como limitante el no permitir determinar la especie causante de la infección, lo que es importante para la toma de decisiones de tratamiento. Recientemente se estandarizó la prueba de PCR para el gen *hsp70* (Juárez, 2017), pero ésta no permite discriminar entre especies muy relacionadas. Por eso es importante estandarizar otros métodos para la caracterización molecular de especies de *Leishmania* spp. por medio de la amplificación de otros genes, que en combinación permitan diferenciar entre las especies de las muestras mencionadas.

Además, otra limitación de la caracterización de los parásitos causantes de leishmaniosis es que no hay unificación en cuanto a los marcadores que se utilizan para estudios genéticos de *Leishmania*, por lo que el estandarizar un set de cebadores para la caracterización de cepas de todo el mundo aumentaría la comparabilidad de los resultados reportados. De hecho, en Guatemala ha habido reportes de infecciones importadas por especies de sur América y del Medio Oriente, por lo que se hace necesario estandarizar una prueba que permita detectar parásitos de cualquier región. El set de cebadores utilizados para esto debe ser uno para el que ya haya habido reportes de amplificación para cepas del Nuevo y Viejo Mundo.

El objetivo de este estudio, entonces, fue evaluar el método de PCR de punto final para la amplificación del gen *its1* de *Leishmania* spp. para la identificación de especies responsables de la leishmaniosis cutánea en Guatemala. Es importante poder determinar las especies causantes de las infecciones en Guatemala debido a que cada especie tiene diferentes desarrollos clínicos y responde de forma distinta a los tratamientos. Una de las especies que afecta a Guatemala, *L. braziliensis* cuyas lesiones evolucionan rápidamente y rara vez se cura sin la aplicación de tratamiento con antimonio de meglumina, mientras que la segunda especie de mayor prevalencia en Guatemala, *L. mexicana*, cuyas lesiones evolucionan lentamente y la mayoría de casos se curan sin tratamiento, aunque en otros casos la infección persiste a pesar de su tratamiento (OPS, 2019).

Otros tratamientos presentan una variación en su efectividad según las especies responsables de las infecciones: las opciones de terapias locales, como la termoterapia, para *L. braziliensis* y *L. panamensis* no son recomendadas debido al riesgo de formación de metástasis, pero sí han demostrado ser efectivas para infecciones causadas por *L. mexicana* (Oliveira *et al*, 2011). Las terapias sistémicas muestran la misma variación en la efectividad del tratamiento para distintas especies. Respecto al uso de antimoniales pentavalentes, se ha encontrado que su efectividad es mayor para tratar *L. braziliensis* y *L. panamensis* que para *L. mexicana*. Algo similar se observó en el uso de la pentamidina, que es más efectiva para tratar *L. panamensis* que *L.*

*braziliensis*. La miltefosina demostró ser altamente efectiva contra *L. panamensis* pero su efecto contra *L. mexicana* o *L. braziliensis* fue limitado (OMS, 2010).

La selección de un tratamiento adecuado para cada especie evita el uso innecesario de fármacos con efectos secundarios que pueden variar desde efectos gastrointestinales como diarrea, náusea, etc. en el caso de la miltefosina, hasta efectos secundarios graves, como diabetes mellitus, nefrotoxicidad, hipoglicemia grave y miocarditis en el caso de la pentamidina, pasando por efectos como anorexia, dolor abdominal, mialgia y letargo en el caso de los antimoniales pentavalentes.

Además, importante, reduce el tiempo en el que el paciente logra la curación, lo cual reduce la morbilidad que ocasiona la enfermedad y el riesgo de coinfecciones con bacterias y hongos.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Leishmaniosis

#### 1. Causa y transmisión

La leishmaniosis es una enfermedad causada por parásitos protozoos del género *Leishmania* spp., el cual abarca más de 20 especies. Este parásito es transmitido a mamíferos por más de 90 especies de flebótomos. Se transmite por la mordedura de un flebótomo hembra infectado, y el tipo y gravedad de la enfermedad que provoque depende de factores como la especie del parásito, la exposición previa al mismo, y el comportamiento humano posterior a la mordedura (OMS, 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud –OMS- (2018), los factores de riesgo para contraer la leishmaniosis son los siguientes:

##### a. Condiciones socioeconómicas

Los flebótomos, también conocidos como mosca chiclera, palomillas, chitre, o papalotillas, son atraídos por ambientes húmedos, como cuevas, drenajes abiertos y acumulaciones de desechos no tratados (OPS, 2019). Además, al ser hematófagos, requieren sangre para obtener proteínas y otros nutrientes para el desarrollo de sus huevos, por lo que son atraídos áreas con una alta concentración poblacional tanto de humanos como de otros mamíferos. Ambas condiciones se dan frecuentemente en situaciones de pobreza, lo que aumenta la probabilidad de contraer leishmaniosis.

Además, la pobreza puede coincidir con cierto comportamiento humano, como: cercanía con roedores o perros, los cuales son reservorios de esta enfermedad; falta de higiene adecuada, que puede repercutir en agravar los síntomas de la enfermedad; o dormir al aire libre en ambientes abiertos, lo cual se traduce a una cercanía a flebótomos que facilita su mordedura.

Lo mismo es cierto para la tenencia de gallineros en áreas cercanas a las viviendas, ya que las gallinas pueden atraer animales carnívoros que sean reservorios de leishmaniosis (OMS, 2010).

#### b. Desnutrición

La desnutrición, concretamente, la falta de vitamina A, zinc o hierro reduce la función inmune (Marcos *et al*, 2003), por lo que aumenta el riesgo de que una infección leve avance a leishmaniosis visceral o leishmaniosis dérmica kala-azar en el caso de infecciones de leishmaniosis del Viejo Mundo.

#### c. Comportamiento humano

Además de los factores anteriormente mencionados relacionados al comportamiento humano, el riesgo de contraer leishmaniosis aumenta según la ocupación. Ocupaciones como militares, recolectores de chicle, de caucho o trabajadores agrícolas corren un mayor riesgo de infección debido a su exposición a flebótomos por su exposición a focos de infección con temperatura, humedad y otros factores favorables para los vectores (OPS, 2019).

#### d. Movilidad poblacional

Existen poblaciones inmunizadas contra especies de *Leishmania* spp. debido a que habitan áreas endémicas del parásito. Sin embargo, el movimiento de poblaciones no inmunizada es un factor de gran importancia en la epidemiología y el riesgo de infección en el Nuevo Mundo. Esto, porque provoca que haya áreas en las que coexistan distintas especies de *Leishmania* spp. Además, hace que las distintas especies se dispersen a áreas donde no se encontraban previamente.

#### e. Cambios ambientales

Los cambios ambientales pueden tener un efecto en varias etapas de la infección: en el vector, en el parásito en sí y en el comportamiento humano relacionado al aumento de riesgo de infección. Los cambios en la urbanización y en el medio ambiente pueden favorecer que se den las condiciones socioeconómicas que propician la infección (pobreza y desnutrición). Estos, a su vez, pueden provocar la formación de ambientes propicios para los vectores de esta enfermedad. Además, el cambio en factores como la temperatura y la humedad pueden cambiar la distribución de los flebótomos, lo cual se traduce a una dispersión mayor del parásito. Los cambios en la temperatura también pueden tener un efecto en el ciclo de vida del parásito en sí, lo cual también podría provocar el aumento en su dispersión. De esta forma la enfermedad podría llegar a áreas en las que no es endémica.

## 2. Tipos de leishmaniosis

Existen distintos tipos de leishmaniosis, los cuales dependen principalmente de la especie de parásito y de las células fagocíticas invadidas por dicho parásito. Estos tipos pueden dividirse según su ocurrencia geográfica en dos grandes grupos: la leishmaniosis del Viejo Mundo y la del Nuevo Mundo. La leishmaniosis del Viejo Mundo es endémica al hemisferio oriental (Asia, África y el sur de Europa), mientras que la del Nuevo Mundo es endémica a las Américas desde el sur de Texas hasta Sudamérica (excluyendo a Chile y Uruguay) (Kevric *et al*, 2015). Ambas pueden dividirse según sus síntomas y áreas de infección en tres grandes grupos: leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea.

### a. Leishmaniosis visceral o kala-azar

Este tipo de leishmaniosis comienza por la infección de macrófagos de la piel por parásitos transmitidos por la mordedura de un flebótomo infectado. Estos macrófagos se lisan cuando la concentración del parásito aumenta, y viajan por la sangre hasta el sistema retículo-endotelial de los órganos internos (Steverding, 2017). Los síntomas comienzan a presentarse desde semanas hasta meses después de la mordedura, y consisten en fiebre, hepatoesplenomegalia, pérdida de peso y pancitopenia. Afecta órganos internos como el bazo, el hígado y la médula ósea (Handler *et al*, 2015). La leishmaniosis visceral tiene una incidencia de 50,000 a 90,000 casos anuales a nivel mundial, la mayoría de los cuales se dan en niños menores de 10 años en el este de África, Brasil y el Sudeste asiático. El 95% de estos casos son fatales si no se tratan (OMS, 2018).

### b. Leishmaniosis dérmica poskala-azar

Se da como una complicación de la leishmaniosis visceral en el 10 – 50% de los casos. Principalmente se da en el Viejo Mundo, en Sudán, África e India. Consiste en la aparición de un sarpullido macular o nodular en un paciente que se ha recuperado de leishmaniosis visceral y que no presenta otros síntomas. Usualmente comienza en la boca, pero puede expandirse al resto del cuerpo e infectar mucosas. Los síntomas son similares a lepra o a vitíligo, y en algunos casos (especialmente en África) pueden curarse espontáneamente, pero en la mayoría de los casos, requiere de tratamiento (especialmente en la India y Sudán) (Zijlstra *et al*, 2003).

### c. Leishmaniosis mucocutánea

Este tipo de leishmaniosis es único de Latinoamérica y se da tras una infección cutánea, cuando la infección progresa a la formación de metástasis en la mucosa nasal, bucal y dentro de la garganta. Es más severa que una infección cutánea porque las úlceras en la mucosa provocan la destrucción del paladar, el septum nasal y los labios, lo cual se traduce a deformaciones faciales (Steverding, 2017). Se da como una complicación de la leishmaniosis cutánea, al diseminarse por

la sangre o la linfa. Puede aparecer desde meses hasta 20 años después de una infección cutánea (Handler *et al*, 2015).

Los principales factores de riesgo para esta complicación son la malnutrición, la localización de la lesión cutánea inicial (hay un mayor riesgo si es por encima de la cintura), y la falta de acceso a un tratamiento para la lesión cutánea (OMS, 2018).

La leishmaniosis mucocutánea puede provocar la muerte debido a que aumenta el riesgo de infecciones secundarias causadas por bacterias, de las cuales es común la neumonía (OMS, 2010).

#### d. Leishmaniosis cutánea localizada

La leishmaniosis cutánea en general consiste en la infección de macrófagos de la piel por el parásito de *Leishmania* spp. Se extiende porque los macrófagos originalmente infectados se lisan por la alta cantidad de parásitos que contienen e infectan macrófagos vecinos (Steverding, 2017). Este es el tipo de leishmaniosis más común, con una incidencia de 0.7 – 1.3 millones de casos anuales a nivel mundial (OMS, 2018). Se caracteriza por lesiones en la piel y úlceras en partes expuestas del cuerpo (oídos, nariz, labio superior, mejillas, piernas, manos, antebrazos y tobillos), que se desarrollan para formar lesiones crateriformes o nodulares. Los periodos de incubación pueden variar de semanas a años.

Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y pueden requerir de un tratamiento o curarse espontáneamente, dependiendo de factores como la especie de parásito que provoca la infección. La especie del parásito también determina la evolución de la leishmaniosis cutánea a leishmaniosis visceral o mucocutánea, las cuales presentan síntomas más graves y representan un mayor riesgo (OMS, 2010).

#### e. Leishmaniosis cutánea difusa

Se diferencia de la leishmaniosis cutánea localizada por la formación de máculas o nódulos de crecimiento lento, las cuales se encuentran diseminadas o infiltradas difusamente en la piel, principalmente en la cara. Se caracteriza por la presencia de anergia (falta de respuesta inmune contra el parásito), lo cual permite su diseminación por el tejido, linfa y sangre (Torres-Guerrero *et al*, 2017). Los síntomas pueden parecerse a lepra sin ulceración (Vega-López, 2003).

Esta enfermedad no se cura espontáneamente y, a pesar de que al inicio responde al tratamiento, después deja de responder y hay recaídas (OMS, 2010).

### 3. Tratamientos

#### a. Fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis

Según la Iniciativa de Drogas para Enfermedades Desatendidas (2019), los tratamientos actuales para la leishmaniosis son antimoniales pentavalentes, anfotericina B (como deoxicolato y en formulación liposómica), miltefosina y paromomicina.

##### 1) Antimoniales

Los antimoniales pentavalentes, que se utilizan en sus formas químicas como antimonio de meglumina y el estibogluconato de sodio, son el único tratamiento satisfactorio para todas las formas clínicas de leishmaniosis. Se administran por vía intramuscular, intravenosa o directamente en las lesiones en el caso de la leishmaniosis cutánea. También existen antimoniales trivalentes de administración parenteral que son otra opción terapéutica de alta efectividad (Minodier y Parola, 2006).

Los efectos secundarios de los antimoniales incluyen irritación local, anorexia, mialgia, cefaleas, aumento en enzimas hepáticas, urea y creatinina, leucopenia, trombocitopenia y alteraciones cardíacas que pueden ser fatales (Torres-Guerrero *et al*, 2017).

##### 2) Anfotericina B

Es un antifúngico cuyo uso convencional tiene efectos secundarios serios (fiebres altas, tromboflebitis, nefrotoxicidad y miocarditis), pero su formulación dentro de un liposoma ha disminuido significativamente dichos efectos y ha mostrado ser efectiva, a pesar de tener un alto costo económico. Se usa en India, Estados Unidos, Europa y algunos países de Latinoamérica (como Guatemala y Brasil) como tratamiento para la leishmaniosis visceral (Andrade-Neto *et al*, 2018; Romero y Boelaert, 2010). Es altamente efectiva en pacientes inmunodeprimidos y en casos en los que se deba detener el tratamiento con antimoniales, especialmente para leishmaniosis visceral y moco-cutánea (Torres-Guerrero *et al*, 2017). Debe administrarse en un hospital, lo cual representa una desventaja grande para países en vías de desarrollo.

##### 3) Miltefosina

Es la única droga para tratamiento de leishmaniosis que se administra oralmente, lo cual es altamente ventajoso, ya que facilita su acceso para un mayor número de pacientes. Su uso ha reportado ser exitoso en la gran mayoría de los casos al inicio, pero se ha reportado recaídas años después de su uso. Además, tiene potencial teratogénico y puede provocar daños en el tracto gastrointestinal y los riñones (Andrade-Neto *et al*, 2018).

#### 4) Paromomicina

Es un antibiótico de amplio espectro que se administra parenteralmente para tratar leishmaniosis visceral y de forma tópica para leishmaniosis cutánea. Sus ventajas incluyen una alta tasa de éxito, pocos efectos secundarios y bajo costo. Sin embargo, es posible que se desarrolle resistencia en una monoterapia (Andrade-Neto *et al*, 2018).

#### b. Terapias combinadas

Las terapias combinadas contra leishmaniosis se basan en el uso de fármacos junto con un modificador de la respuesta inmune para acelerar y exacerbar una respuesta inmune Th1. Para esto la mejor opción, según Arana (2018), es la combinación de termoterapia (una aplicación de 50°C por 30 min) y miltefosina (2.5 mg/kg/día por 21 días). Entre las ventajas se encuentra que la eficiencia y seguridad de cada tratamiento independiente ha sido evidenciada, que se espera que el uso de un tratamiento tópico y uno sistémico resulte en la sumatoria de su efectividad (porque se tratan los parásitos de la lesión y los circulantes simultáneamente), y que puede reducir el tiempo y, por lo tanto, los efectos adversos de los tratamientos.

#### c. Fármacos reposicionados

En los últimos años se ha probado la efectividad de drogas anti parasíticas cuyos blancos originales no eran *Leishmania* spp. sino *Giardia* o *Plasmodium* spp. También se ha probado el uso de tratamientos antitumorales, como hidroxurea para *L. mexicana*, la carmustina para *L. donovani*, la camptotecina para *L. infantum*, o el tamoxifeno para *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* y *L. major*. Otros fármacos reposicionados incluyen antidepresivos, como triciclinas y sertralina para *L. donovani*, la fenelzina para *L. infantum* y el diazepam para *L. mexicana*. También se han probado antihipertensivos, como bloqueadores de canales de calcio para *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi*, y *L. major* (Andrade-Neto *et al*, 2018).

Otros fármacos anteriormente usados son la pentamidina, los derivados azólicos y el cloruro de metilbencetonio. La pentamidina se usaba en casos de resistencia a antimoniales, pero tenía efectos secundarios como cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, hipertensión y la inducción de desórdenes metabólicos, como diabetes, por lo que se evita su uso (Torres-Guerrero *et al*, 2017). Los derivados azólicos tenían una tasa de éxito variable según el tipo de leishmaniosis y el parásito causante (López-Carvajal *et al*, 2016). El cloruro de metilbencetonio se usaba principalmente en terapias combinadas junto con paromomicina, por ejemplo (Arana *et al*, 2001).

#### d. Inmunoquimioterapia

Las personas inmunocompetentes que han padecido de leishmaniosis obtienen una inmunidad protectora tras haberse curado de la infección. La inmunoquimioterapia busca estimular el sistema inmune del paciente por medio de vacunas formadas por una especie del parásito

muerto, BCG como adyuvante y antimoniales. En Venezuela se ha utilizado este tratamiento por más de 10 años y en Sudán se ha reportado una tasa de éxito del 87%. Sin embargo, esta terapia no se recomienda para uso sistemático (OMS, 2010).

e. Termoterapia

La termoterapia consiste en aplicar calor localizado al área de la mordedura. Comúnmente se aplican 50°C en intervalos de 30 segundos. Este procedimiento es doloroso, por lo que requiere de anestesia local. Se ha probado su efectividad contra *L. mexicana* y *L. major*, y su efecto es limitado contra *L. braziliensis*. Esta terapia tiene como ventaja que reduce los efectos adversos, la falta de adherencia y el costo de los fármacos para tratar la leishmaniosis (Cardona-Arias *et al*, 2015; Minodier y Parola, 2007).

Importantemente, el tratamiento que se seleccione no depende únicamente del tipo de leishmaniosis sino de factores como la especie del parásito causante de la infección, el avance de la enfermedad, características del paciente, etc. A continuación, se muestra un diagrama de flujo de un ejemplo de selección de tratamiento para leishmaniosis cutánea, según el Centro de Referencia de Leishmaniosis de Francia (Copeland y Aronson, 2015):

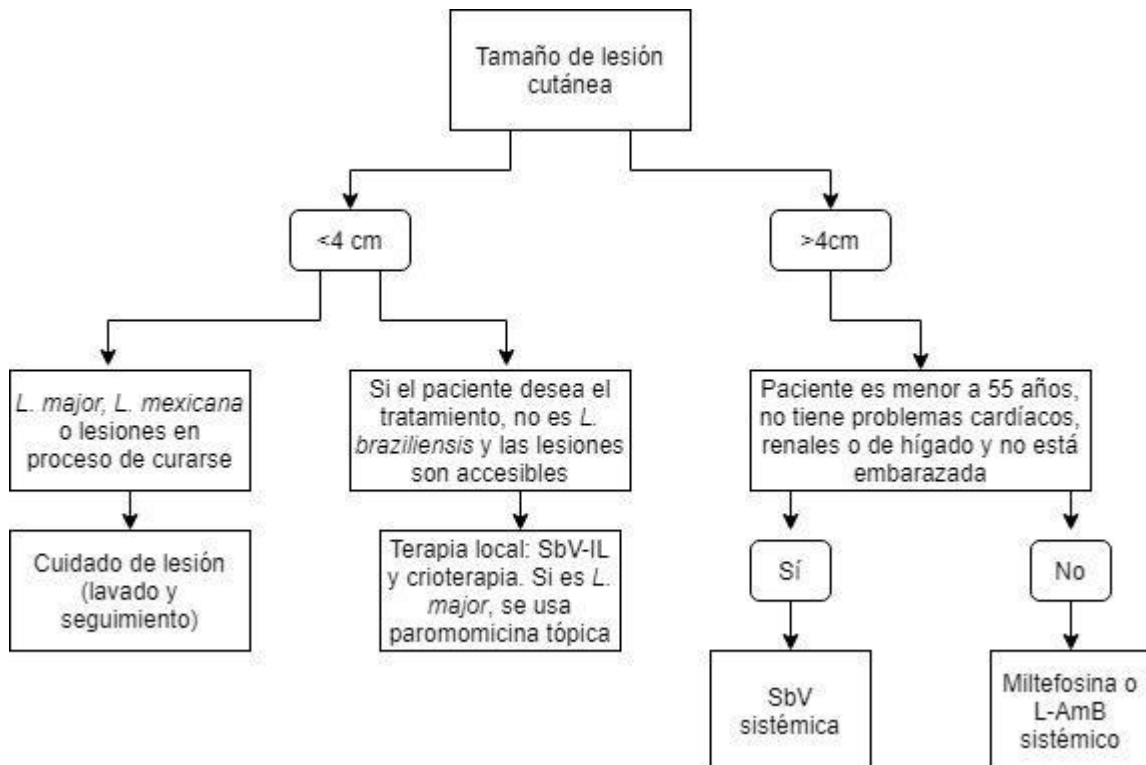


Figura 1. Esquema de selección de tratamiento de leishmaniosis cutánea (adaptado de Copeland y Aronson, 2015). SbV = antimonio pentavalente, SbV-IL = antimonio pentavalente intralesional, L-AmB = anfotericina B liposomal

#### 4. Epidemiología

##### a. Mundial

Según la OPS (2019), la leishmaniosis es endémica en Asia, África, el Mediterráneo y las Américas, afectando 102 países.. Entre 12 y 15 millones de personas se ven afectadas mundialmente, y hay entre 1.5 y 2 millones de casos nuevos al año. Alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de contraer algún tipo de leishmaniosis y 70,000 mueren por esta enfermedad al año.

Los principales países afectados por la forma visceral son Kenia, Brasil, Etiopía, India y Sudán, que representan el 90% de los casos reportados. En cuanto a la forma cutánea, los países más afectados son Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Sudán y Siria, donde ocurren el 70% de los casos

Respecto a las Américas, Alvar (2012) resume la incidencia de leishmaniosis cutánea y visceral por país en el siguiente cuadro:

*Cuadro 1. Incidencia de leishmaniosis cutánea reportada en las Américas*

	Reported CL cases/year	Years of report	Estimated annual CL incidence	
Argentina	261	2004-2008	730	to 1200 <sup>1</sup>
Belize		no data		
Bolivia	2647	2004-2008	7400	to 12,200 <sup>1</sup>
Brazil	26,008	2003-2007	72,800	to 119,600 <sup>1</sup>
Colombia	17,420	2005-2009	48,800	to 80,100 <sup>1</sup>
Costa Rica	1249	2002-2006	3500	to 5700 <sup>1</sup>
Dominican Republic		no data	0	to 0
Ecuador	1724	2004-2008	4800	to 7900 <sup>1</sup>
El Salvador		no data	0	to 0
French Guyana	233	2004-2008	650	to 1100 <sup>1</sup>
Guatemala	684	2004-2008	1900	to 3100 <sup>1</sup>
Guyana	16	2006-2008	50	to 70 <sup>1</sup>
Honduras	1159	2006-2008	3200	to 5300 <sup>1</sup>
Mexico	811	2004-2008	2300	to 3700 <sup>1</sup>
Nicaragua	3222	2003-2007	9000	to 14,800 <sup>1</sup>
Panama	2188	2005-2009	6100	to 10,100 <sup>1</sup>
Paraguay	431	2004-2008	1200	to 2000 <sup>1</sup>
Peru	6405	2004-2008	17,900	to 29,500 <sup>1</sup>
Suriname	3	2005-2007	8	to 14 <sup>1</sup>
Venezuela	2480	2004-2008	6900	to 11,400 <sup>1</sup>
REGION	66,941		187,200	307,800

<sup>1</sup>Underreporting considered mild (2.8-4.6-fold) based on data from Argentina [29].

(Alvar, 2012)

b. Estadísticas en Guatemala

Según el Departamento de Epidemiología del MSPAS (2016), del 2002 al 2016 se ha reportado un promedio de 725 casos anuales (Fig.2). Los hombres de 20 a 29 años tienen la mayor tasa de infección (Fig.3).

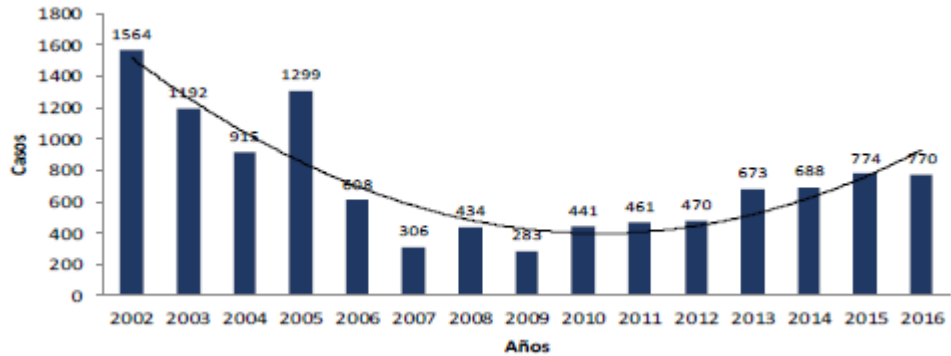


Figura 2. Incidencia anual de leishmaniosis en Guatemala

(MSPAS, 2016)

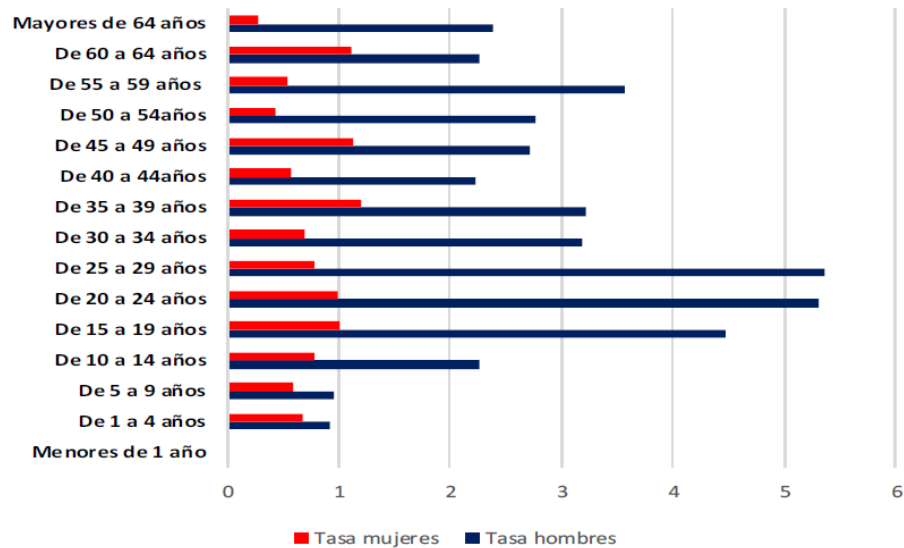
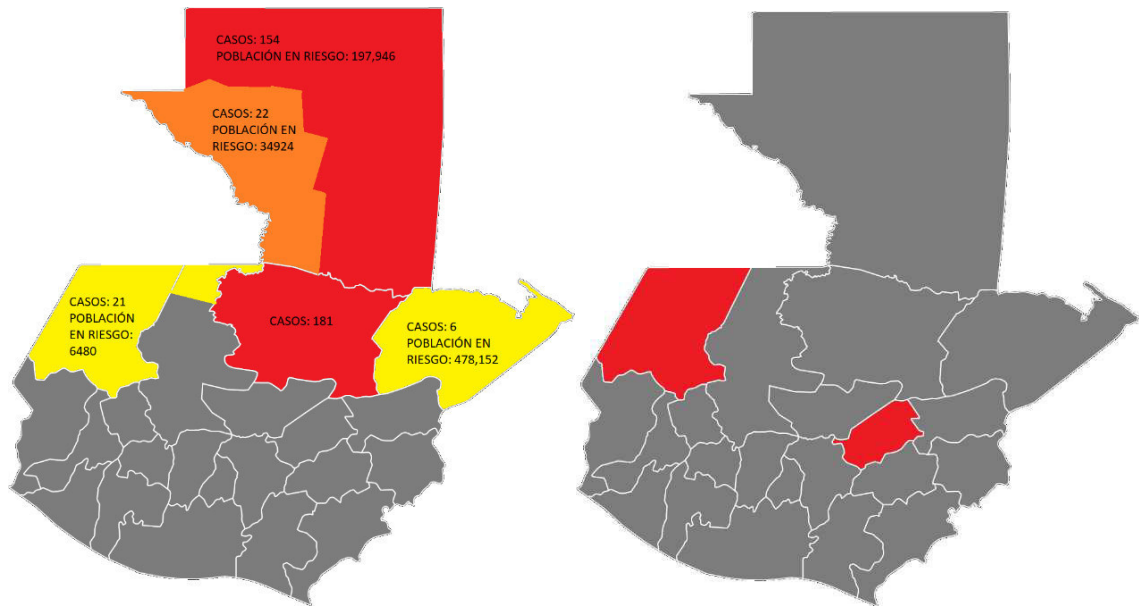


Figura 3. Tasa de incidencia de infección por leishmaniosis (visceral y cutánea) en Guatemala, según la edad

(MSPAS, 2016)

Según el MSPAS (2016), los departamentos con mayor incidencia de leishmaniosis cutánea son Petén, Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Baja Verapaz y Jalapa, en ese orden. Petén y Alta Verapaz tienen la mayor prevalencia de leishmaniosis en general. Los departamentos con mayor incidencia de leishmaniosis visceral son Petén, Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Huehuetenango y Chiquimula (Fig.4). Además, se estima que hay cerca de 4.3 millones de personas en riesgo de contraer leishmaniosis, distribuidas en 6 departamentos.



*Figura 4. Prevalencia y población en riesgo de leishmaniosis cutánea y visceral en Guatemala por departamento*

*(adaptado de MSPAS, 2016)*

Además, según el MSPAS (2016), la mayor incidencia de la enfermedad se da de la forma cutánea, ya que, de los casos reportados en 2016, el 94.8% fueron del tipo cutáneo, el 1.9% no fueron identificados, y el 1.1% fueron del tipo visceral.

## 5. Diagnóstico de leishmaniosis cutánea

La confirmación parasitológica del diagnóstico clínico de leishmaniosis es importante para su tratamiento efectivo. Para esto, se realizan raspados de lesiones tanto ulceradas como no ulceradas. También se pueden hacer biopsias de los bordes de las lesiones. Estas muestras pueden revelar al parásito de forma libre, en macrófagos o rara vez en leucocitos polimorfonucleares en concentraciones de 2 a 20 parásitos por célula (de Vries, Reedijk y Schallig, 2015).

### a. Diagnóstico parasitológico

Según Vega-López (2003), el diagnóstico parasitológico se realiza por medio de tinciones con eosina y hematoxilina, las cuales muestran atrofia epidermal e hiperplasia con un infiltrado de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas con focos necróticos. Al inicio de la infección se pueden observar los parásitos en vacuolas citoplasmáticas (cuerpos de Leishman), pero en las etapas avanzadas, los macrófagos infectados son menos numerosos y hay menos parásitos en su forma amastigota. En estas etapas se observan granulomas. Esta técnica tiene una exactitud del 85%. Los parásitos también pueden observarse en tinciones con Giemsa o Wright a partir de raspados, lo cual tiene una exactitud que varía entre 60 y 90%. En el caso de la leishmaniosis visceral, este procedimiento también se puede realizar a partir de aspirados de bazo (con 93-99% de sensibilidad), de médula ósea (con 53-86% de sensibilidad) o de ganglios linfáticos (con 53-95% de sensibilidad) (OPS, 2019).

### b. Cultivo

Se hace a partir de la inoculación de tejido triturado, y se cultiva en medio Novy-McNeal-Nicolle, o en una variante del medio Evans. El primer cultivo muestra la forma sin flagelo del parásito, y a partir del segundo se observa su forma flagelada. Esta técnica tiene una exactitud del 85% (Torres-Guerrero *et al*, 2017).

### c. Pruebas rápidas

La prueba de Montenegro es una prueba de índice alérgico que resulta positiva para las formas localizadas de la enfermedad y negativa para la forma anérgica. Sirve para determinar si ha habido exposición al parásito. Si es positivo, confirma un diagnóstico clínico (lo cual es útil para casos que se den en áreas no endémicas), pero si es negativo no puede excluirse que se trate de leishmaniosis (Vera-Izaguirre *et al*, 2006).

Además, para leishmaniosis visceral existe una prueba serológica rápida rK39 que ha mostrado tener alta sensibilidad y exactitud, y que cuenta con ventajas como su bajo costo, rapidez y facilidad de realización. Esta prueba es serológica y se basa en la detección de anticuerpos IgG

anti-*Leishmania* y anti-K39, cuya exactitud varía según la especie del parásito que provoque la infección, pero puede llegar hasta un 90%. Esto puede detectarse por aglutinación directa.

d. Métodos serológicos

Además de la prueba rK39, existen otras pruebas que pueden utilizarse, como aglutinación directa, inmunofluorescencia directa, o ELISA. Sin embargo, estos métodos no se utilizan frecuentemente por su poca disponibilidad, alto costo y variación en efectividad (Massae *et al*, 2016).

e. Métodos moleculares

Los métodos de diagnóstico de leishmaniosis con mayor exactitud son los moleculares, de hecho, la técnica de PCR ha demostrado tener un 100% de exactitud. Sin embargo, su alto costo y baja disponibilidad hace que se utilicen predominantemente para tipificación en estudios epidemiológicos o filogenéticos y rara vez para un diagnóstico (aunque sí se utiliza para leishmaniosis visceral) (Torres- Guerrero *et al*, 2017; OPS, 2019).

Los métodos moleculares para tipificación de especies de *Leishmania* spp. para estudios epidemiológicos se describen a mayor profundidad en el apartado de *Tipificación: métodos moleculares* de esta misma sección.

B. *Leishmania* spp.

1. Ciclo de vida

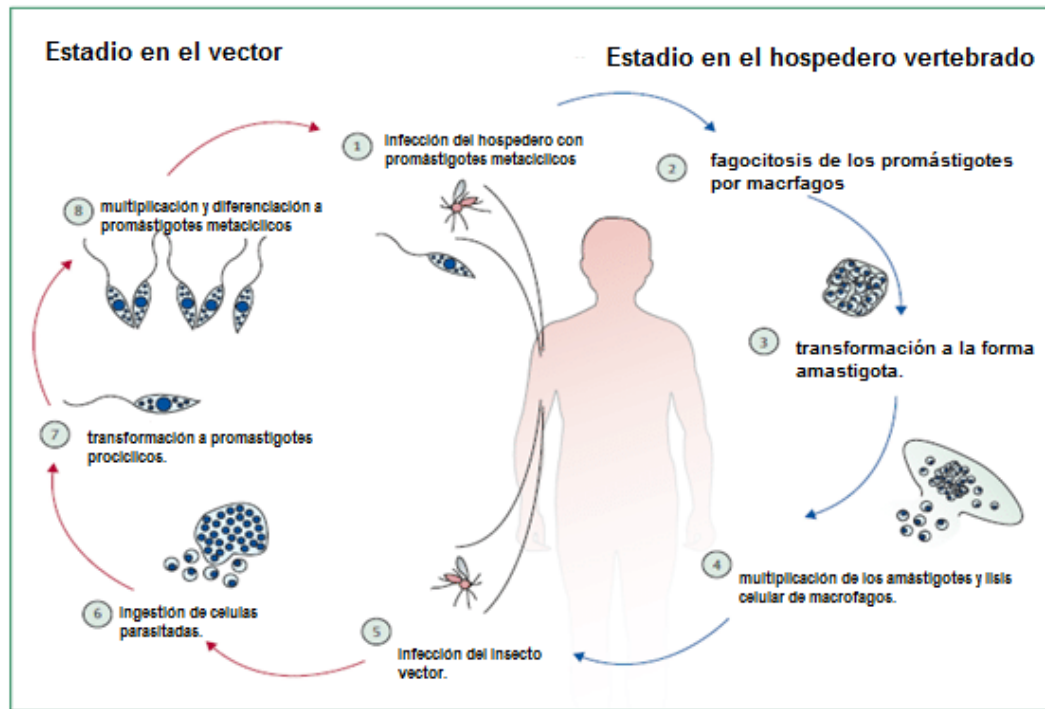


Figura 5. Ciclo de Vida de *Leishmania* spp.

(Peláez-Sánchez et al, 2010)

Según el Centro para Prevención y Control de Enfermedades [CDC] (2018), el ciclo de vida del parásito es el siguiente:

Los flebótomos hembra se infectan al ingerir células fagocíticas infectadas cuando se alimentan de sangre de un reservorio. Dentro de los flebótomos, el estadio de amastigote pasa a promastigote y migra a la proboscis.

Los flebótomos hembra infectados inyectan el estadio infeccioso (promastigotes) de su proboscis cuando se alimentan de la sangre del mamífero. Los promastigotes que llegan a la herida de la mordida son fagocitados por células fagocíticas mononucleares, como fagocitos. Los promastigotes se transforman dentro de estas células al estadio tisular del parásito (amastigotes), los cuales se multiplican por división simple e infectan otras células fagocíticas mononucleares.

En este punto entran en juego factores del hospedero (nutrición, higiene, acceso a tratamientos, etc.) y del parásito (especie, cantidad de parásito al que haya sido expuesta, etc.) para determinar si la infección será sintomática o asintomática, y si será cutánea, mucocutánea o visceral.

## 2. Tipificación: métodos moleculares

Como se mencionó anteriormente, la técnica de PCR ha sido utilizada en sus variaciones para la tipificación de *Leishmania* spp. para estudios epidemiológicos. Dentro de los tipos que se utilizan existe PCR convencional, PCR-RFLP (polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción) y qPCR (cuantitativa). Las tres técnicas son altamente exactas (se ha reportado exactitud del 100%, según Nath-Chowdhury *et al*, 2016).

Sin embargo, una principal ventaja de la técnica de PCR-RFLP es lo altamente estandarizada que se encuentra para genes como *hsp70*, espaciador interno transcrito 1 (*its1*), hexoquinasa, fosfoglucomutasa, subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA), miniexones, quinetoplasto, ARN polimerasa II, minicírculo kADN, manosa fosfato isomerasa, o microsatélites (Marfurt *et al*, 2003; Montalvo *et al*, 2016; Simon *et al*, 2017; Feiz *et al*, 2016; Koarashi *et al*, 2016; Mohammadiha *et al*, 2016). Estas técnicas pueden corroboradas por medio de secuenciación, y representa una opción rápida y exacta para la identificación especie-específica de *Leishmania* spp.

### 1) *hsp70*

HSP70 corresponde a la proteína de choque térmico de 70 kDa. Este tipo de proteína se encuentra en casi todos los seres vivos y cumple el propósito de proteger a las células de estrés inducido por calor u oxidación, además de colaborar en el plegamiento proteico para evitar la formación de agregados (Torres Ávila *et al*, 2018).

Una de las ventajas del uso de *hsp70* como marcador molecular es que el producto de su amplificación y análisis RFLP permite diferenciar entre 14 especies de *Leishmania* spp. de importancia clínica utilizando únicamente un par de cebadores y dos enzimas de restricción (Montalvo *et al*, 2016). Su uso como blanco molecular ha presentado un 90% de exactitud para la identificación de especies de *Leishmania* spp. (Torres Ávila *et al*, 2018). Además, presenta un relativamente amplio rango reportable anticipado (ARR) que abarca diluciones entre  $1 \times 10^4$  y 10 equivalentes de parásito/mL, y un límite de detección bajo (10 equivalentes de parásito/mL) (León *et al* (2017). Ambos valores son aceptables, pero son inferiores a aquellos del kDNA e *its1* debido a que hay menos números de copias del gen de *hsp70* en el genoma que de los otros dos.

## 2) SSU rRNA e ITS1

La mayoría de copias de rDNA de eucariotas son homogéneas, y dentro de cada repetición de rDNA hay dos espaciadores internos transcritos (its1 e ITS2) entre los genes que codifican para las subunidades pequeña y grande del ARN ribosomal. Lo que divide ambos espaciadores es el gen 5.8S (Mohammadiha *et al*, 2017). La Figura 6 muestra la distribución de estos genes ribosomales. La amplificación inicial de los genes correspondientes a la subunidad pequeña, seguida de la amplificación de its1 desde 5.8S resulta en un producto que puede analizarse con RFLP como *HaeIII* para distinguir entre especies con una alta sensibilidad y exactitud (León *et al*, 2017).



Figura 6. Ubicación de SSU rDNA e *its1*

(adaptada de Mwangi *et al*, 2009)

La secuencia de *its1* es ampliamente utilizada para estudios filogenéticos por características como su tamaño relativamente pequeño, estar asociada a secuencias altamente conservadas, un alto número de copias de clusters de rRNA – lo cual permite su detección a partir de pequeñas cantidades de ADN – y su alta variación entre especies (Song *et al*, 2012).

Dentro de las ventajas de utilizar estas secuencias como blanco molecular para identificación de especies se encuentra su ARR, que abarca diluciones entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^0$ , y, según León *et al* (2017), es el segundo mejor rango para la detección de *Leishmania* spp. después de kDNA, que es ADN circular que se encuentra dentro de la doble membrana de la mitocondria, y que contiene varias copias del genoma mitocondrial. El mismo estudio determinó que su límite de detección es bajo (1 equivalente de parásito/mL), y que su exactitud es alta (100% para diluciones de hasta 10 equivalentes de parásito/mL).

### 3. Especies reportadas en América y en Guatemala

En el Cuadro 7 de Anexos se muestran las especies de *Leishmania* spp. que han sido reportadas en el Nuevo y Viejo Mundo, la enfermedad clínica que causan, su vector y su distribución. Las especies reportadas en América son: *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. panamensis*, *L. colombiensis*, *L. garnhami.*, *L. peruviانا*, *L. pifanoi*. y *L. venezuelensis* (OPS, 2019).

Según Alvar (2012), las especies de *Leishmania* spp. que se han reportado como causantes de la LC en Guatemala son *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. mexicana*; y *L. infantum*, responsable de la LV. Estas especies se muestran en el Cuadro 3, junto con los vectores que las transmiten y los reservorios de donde se han aislado.

*Cuadro 2. Especies de Leishmania spp. responsables de la leishmaniosis en Guatemala, sus vectores y los reservorios en los que se han identificado .*

<b>Especie de <i>Leishmania</i></b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Vector</b>	<b>Reservorio</b>
<i>L. braziliensis</i>	Mucocutánea y zoonótica cutánea	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i>	<i>Rattus rattus</i>
<i>L. panamensis</i>	Mucocutánea y zoonótica cutánea	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>	Desconocido
<i>L. mexicana</i>	Cutánea difusa y zoonótica cutánea	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Desconocido
<i>L. infantum</i>	Zoonótica visceral	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i> <i>Lu. pseudolongipalpis</i>	<i>Canis familiaris</i>

(adaptado de Alvar, 2012)

De las especies reportadas, las más comunes en Guatemala son *L. mexicana* (30% de los casos) y *L. braziliensis* (cerca del 70% de los casos) (OPS, 2019).

#### 4. Importancia de tipos de especie en infección cutánea

Como se ha mencionado anteriormente, las distintas especies del parásito de *Leishmania* spp. provocan diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, por lo que es importante la identificación del parásito específico que la causa. Sin embargo, más importante que eso, la identificación de la especie de parásito que provoca la enfermedad es indispensable para la selección de un tratamiento adecuado.

Según la OMS (2010), en el caso de la leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo, la terapia local es igual para la mayoría de especies y consiste en a) la aplicación de una pomada de paromomicina al 15% y cloruro de metilbencetonio al 12% dos veces al día durante 20 días, b) 1 a 3 sesiones de termoterapia localizada, o c) 1 a 5 ml de antimoniales intralesionales cada 3 a 5 días. Sin embargo, tanto la efectividad como el riesgo de estas terapias varía según cada especie: la terapia local no debe utilizarse para infecciones por *L. braziliensis* ni *L. panamensis* porque significa un alto riesgo de formación de metástasis, pero el uso de paromomicina tiene una efectividad de entre el 70 y 90% para tratar *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. mexicana*. Por eso la selección de la terapia a utilizar debe hacerse tomando en cuenta el riesgo de efectos secundarios.

Por otro lado, los tratamientos sistémicos varían entre especies, como se muestra en el siguiente cuadro adaptado de la OMS (2010):

*Cuadro 3. Tratamientos para leishmaniosis por especie de parásito*

<b>Especie de <i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Tratamiento</b>
<i>L. mexicana</i>	Ketoconazol: 600 mg/día vía oral por 28 días Miltefosina: 2.5 mg/kg/día vía oral por 28 días
<i>L. guyanensis</i> o <i>L. panamensis</i>	Isetionato de pentamidina: 3 dosis de inyecciones intramusculares o infusiones breves de 4 mg/kg en días alternos Antimoniales pentavalentes: 20 mg/kg/día de Sb <sup>5+</sup> intramuscular o intravenoso por 20 días Miltefosina: 2.5 mg/kg/día vía oral por 28 días
<i>L. braziliensis</i>	Antimoniales pentavalentes: 20 mg/kg/día de Sb <sup>5+</sup> intramuscular o intravenoso por 20 días Desoxicolato de amfotericina B: infusión de 2-3 mg/kg/día por dosis por 25-30 dosis. Amfotericina B liposómica: infusión de 2-3 mg/kg/día por dosis hasta llegar a 20-40 mg/kg.
<i>L. amazonensis</i> , <i>L. peruo</i> o <i>L. venezuelensis</i>	Antimoniales pentavalentes: 20 mg/kg/día de Sb <sup>5+</sup> intramuscular o intravenoso por 20 días

(adaptado de OMS, 2010)

En el caso de los antimoniales pentavalentes, su uso ha sido más efectivo para *L. braziliensis* y *L. panamensis* que para *L. mexicana*, y su efectividad varía para *L. guyanensis* según la zona, ya que en algunos países hay resistencia de los parásitos a estos medicamentos (López-Carvajal *et al*, 2016). Respecto a la pentamidina, ha demostrado ser tan efectiva como los antimoniales pentavalentes para tratar *L. panamensis* y *L. guyanensis*, pero menos efectivo que dicho fármaco para tratar *L. braziliensis*. La miltefosina ha tenido una efectividad de entre 79 y 90% para tratar *L. panamensis*, pero sus efectos son limitados al tratar *L. braziliensis* o *L. mexicana* (OMS, 2010).

El tratamiento de las recidivas no varía entre especies que provocan leishmaniosis cutánea en el Nuevo Mundo, y consiste en el uso de desoxicolato de amfortericina B, antimoniales pentavalentes y amfotericina B liposómica (infusión de 3 mg/kg/día hasta un total de 20-40 mg/kg) (OMS, 2010).

Cabe mencionar que para especies como *L. mexicana* es posible que la infección se resuelva sola y que no sea necesario tratarla directamente o sólo con una terapia local (de Vries *et al*, 2015).

### C. Algoritmos de alineamiento de múltiples secuencias

El alineamiento de múltiples secuencias de nucleótidos o aminoácidos es importante para análisis filogenéticos como predictores de relaciones evolutivas, para la identificación de motivos conservados dentro de familias de proteínas, las cuales podrían estar asociadas a estructura y función, para la identificación de secuencias conservadas entre miembros de la misma especie, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores moleculares, etc. (Sutton, 2018).

Existen distintos algoritmos para este tipo de análisis, y la selección de cuál utilizar debe tomar en cuenta características de las secuencias de interés, como su número, su identidad compartida o su longitud. Algunos de estos algoritmos son CLUSTAL W, T-Coffee, PROBCONS y MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation). Estos algoritmos se basan en el alineamiento de un set de N secuencias que se logra al realizar N-1 alineamientos en pares para formar una matriz de distancia. Los resultados de esta matriz son utilizados para crear un árbol filogenético guía que permite que las secuencias del set sean alineadas en orden de las más relacionadas a las menos relacionadas. En su forma más lineal y global, este algoritmo es del tipo progresivo, y es el método en el que se basa CLUSTAL W (Edgar, 2004).

CLUSTAL W ha probado ser efectivo y útil para muchos análisis por su exactitud y rapidez, pero últimamente se ha tenido una tendencia al uso de algoritmos progresivos e iterativos, como MUSCLE, que buscan optimizar una función de puntaje que refleje eventos biológicos (Kaya *et al*, 2014). El hecho de que MUSCLE sea un algoritmo progresivo e iterativo significa que trabaja en

dos etapas: primero formula un borrador de alineamiento de secuencias múltiples al dividir las secuencias en dos grupos, y después realinea las secuencias para refinar el borrador inicial hasta que se obtiene un alineamiento óptimo. Esto lo logra porque no solo utiliza la distancia de k-meros (distancia de secuencias de números  $k$  de nucleótidos) para los pares no-alineados, sino que también usa la distancia Kimura para pares alineados. Esto le da la ventaja de ser más exacto y dar resultados más reales, por lo que estudios como el realizado por País *et al* (2014) recomiendan su uso para alineamientos de secuencias múltiples, es especialmente si las secuencias analizadas son de distintas longitudes.

## V. ANTECEDENTES

La utilidad de la caracterización molecular de la especie del género *Leishmania spp.* causante de de leishmaniosis cutánea radica en su importancia epidemiológica y para la selección del tratamiento a utilizar. En un estudio realizado por Ruiz (2018) se realizó la caracterización molecular de muestras de raspados de lesión de infecciones de leishmaniosis cutánea, recolectadas en un período de 40 años, por medio del gen *hsp70*. Sin embargo, según Van der Auwera y colaboradores (2015), la caracterización por medio de la amplificación de este gen ha mostrado entre 60 y 90% de sensibilidad a comparación de la caracterización enfocada a genes con mayores números de copias, como el *its1*.

Varios estudios han utilizado PCR anidado del gen *its1* para identificar las especies causantes de leishmaniosis cutánea, con cebadores R221/R332, cuyo producto se amplifica posteriormente se amplifica con cebadores L5.8S y LITSR (El Tai *et al*, 2001; Echchakery *et al*, 2017). Van der Auwera y colaboradores (2014) reportaron que este blanco molecular puede ser utilizado para la identificación de *L. mexicana*, *L. naiffi* y *L. braziliensis* aunque no pudieron asegurar su utilidad para la identificación de *L. panamensis*, ya que incluyeron en el análisis solamente una muestra de esta especie. El análisis continua por secuenciación del amplicón o bien, si se trata de infecciones que se sospecha sean mixtas, se realiza el análisis de estos productos con enzimas de restricción, como *HaeIII* cuyos patrones se comparan con los reportados para especies de las cuales hay sospecha (Schönian *et al*, 2003).

## VI. METODOLOGÍA

### A. Sitio de estudio

Las muestras con las que se trabajó provienen de varios municipios de los departamentos de Petén, Alta y Baja Verapaz e Izabal, Guatemala.

### B. Sujetos de estudio

Se seleccionaron 25 muestras de raspado de lesión recolectadas previamente de pacientes con leishmaniosis cutánea que acudieron en búsqueda de diagnóstico a la estación de campo o a jornadas organizadas por el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, en Petén o Alta Verapaz entre los años 1987 a 2016. Los detalles de cada muestra se muestran en el cuadro A2 de Anexos.

### C. Criterios de selección:

Los criterios de selección de las muestras para la estandarización fueron los siguientes:

- Muestras de leishmaniosis cutánea confirmadas por parasitología
- Con resultado positivo de PCR-RFLP del gen *hsp70* (Ruiz, 2018).

### D. Variables

Cuadro 4. Operacionalización de variables

Nombre	Definición	Clasificación		
		Naturaleza	Escala de medición	Clasificación
Tamaño de amplicón	Número de pares de bases del producto de la segunda PCR ( <i>its1</i> )	Cuantitativa	Razón	Número de pares de base
Porcentaje de homología de secuencias	Porcentaje de correspondencia de nucleótidos en el amplicón, en comparación con el gen reportado para una especie de <i>Leishmania</i> spp.	Cuantitativa	Razón	Número de bases iguales / número de bases comparadas

## E. Metodología

1. Objetivo 1. Evaluar las condiciones de reacción de la técnica de PCR del gen *its1* en muestras previamente positivas para el gen *hsp70* de *Leishmania spp.*
  - a. Evaluación de los componentes de la mezcla de reacción y templado de ADN para *its1*

Se llevó a cabo un PCR anidado, el primero una para la amplificación de la *SSU rDNA* (El Tai *et al*, 2001; Echchakery *et al*, 2017), a cuyos productos se les realizó un segundo PCR para amplificar la región *its1* (figura 7). Esto se realizó con las 25 muestras seleccionadas y controles positivos para *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

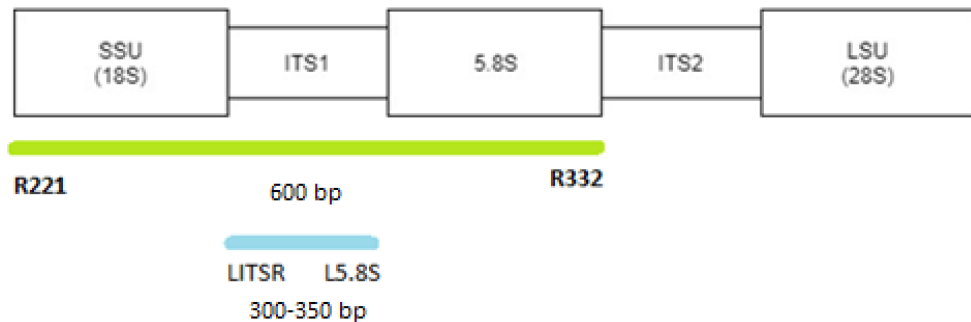


Figura 7. Esquema de la posición de alineamiento de cebadores para el PCR anidado para la amplificación del gen *its1* de *Leishmania*

A continuación se describen los componentes de las mezclas de reacción y los programas evaluados para cada amplificación. El Cuadro A3 (Anexos) describe en detalle la combinación de mezclas de reacción y programas evaluados durante el estudio.

1) PCR SSUrDNA de *Leishmania*

Se utilizaron los siguientes cebadores: R221 (5'-GGTTCCTTTCTGATTTACG-3') y R332 (5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3') (Integrated DNA Technologies, CO, USA), con los siguientes rangos de concentraciones de los reactivos de la mezcla de reacción:

*Cuadro 5. Mezcla de reacción para el PCR del SSUrDNA*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentraciones evaluadas</b>
<b>dNTPs</b>	0.25 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1.5-1.65 mM
<b>Taq polimerasa*</b>	0.5-1 U
<b>Primer R221</b>	0.2-2 mM
<b>Primer R332</b>	0.2-2 mM
<b>ADN</b>	1-2 ul de muestras concentradas, diluciones 1:2, 1:10 y 1:100 (0.5-250 ng)
<b>Reactivo Q</b>	0-1X

\*Se evaluaron 3 Taq polimerasas: Una hotstart (Roche), una convencional (Invitrogen) y una que forma parte del Platinum® PCR SuperMix de Invitrogen.

2) PCR *its1* de *Leishmania*

Se utilizaron los siguientes cebadores: LITSR (5'-CTGGATCATTTCGGATG-3') y L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (Integrated DNA Technologies, CO, USA), con los siguientes rangos de concentraciones de los reactivos de la mezcla de reacción:

*Cuadro 6. Mezcla de reacción para el PCR its1*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
<b>dNTPs</b>	0.25 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1.5-1.65 mM
<b>Taq polimerasa*</b>	0.5-1 U
<b>Primer LITSR</b>	0.2-2 mM
<b>Primer L5.8S</b>	0.2-2 mM
<b>ADN</b>	1-2 ul de muestras concentradas, diluciones 1:2, 1:10 y 1:100 (0.5-250 ng)
<b>Reactivo Q</b>	0-1X

\*Se evaluaron 3 Taq polimerasas: Una hotstart (Roche), una convencional (Invitrogen) y una que forma parte del Platinum® PCR SuperMix de Invitrogen

b. Evaluación del programa de PCR para *its1*

Se evaluaron los siguientes programas de PCR para la región SSUNDA:

Cuadro 7. Programas de PCR para la región SSUNDA

Etapa	PCR anidado (SSU)	PCR por gradiente (SSUG)	Touchdown PCR			
			SSUTD	SSUTD2	SSUTD3	SSUTD4
Desnaturalización inicial	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min
Desnaturalización	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s
Alineamiento	56°C 30 s	45.9-58.3°C 30 s	72°C 45 s	68°C 45 s	72°C 45 s	80°C 45 s
Extensión	72°C 1 min	72°C 2 min	(-0.5°C/ciclo) 30 s	(-1°C/ciclo) 30 s	(-0.5°C/ciclo) 30 s	(-1°C/ciclo) 30 s
Ciclos	34	30	28	14	14	14
Desnaturalización			94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s	94°C 30 s
Alineamiento			60°C 45 s	60°C 45 s	62°C 45 s	60°C 45 s
Extensión			72°C 30 s	72°C 30 s	72°C 30 s	72°C 30 s
Ciclos			24	24	24	24
Extensión final	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 8 min	72°C 8 min	72°C 8 min	72°C 8 min

Se evaluaron los siguientes programas de PCR para el gen *its1*:

Cuadro 8. Programas de PCR para el gen *its1*

Etapa	PCR anidado (ITS)	PCR semi-anidado (ITS-221)*	Touchdown PCR	
			ITSTD	ITSTD2
Desnaturalización inicial	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min
Desnaturalización	94°C 30 s	94°C 40 s	94°C 30 s	94°C 30 s
Alineamiento	53°C 30 s	53°C 1 min	65°C (-1°C/ciclo) 45 s	67°C (-0.5°C/ciclo) 45 s
Extensión	72°C 1 min	72°C 2 min	72°C 30 s	72°C 30 s
Ciclos	34	38	14°C 20°C	20°C
Desnaturalización			94°C 30 s	94°C 30 s
Alineamiento			53°C 45 s	56°C 45 s
Extensión			72°C 30 s	72°C 30 s
Ciclos			24	24
Extensión final	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 8 min	72°C 10 min

\*Para esta variante se utilizaron los cebadores R221 y L5.8S, y se utilizó el producto de la PCR de los cebadores R221/R332

c. Control de PCR

Se realizó una PCR anidada para el gen *hsp70* con los cebadores HSP70R61/HSP70F25 y HSP70SEN/HSP70ANT siguiendo el programa utilizado por Juárez (2017). Este PCR se utilizó como un control para confirmar la integridad, del ADN de las muestras utilizadas.

d. Detección de productos por PCR

Los productos de cada variante de mezcla de reacción, programa o ambos se separaron en geles de agarosa al 1.0%(p/v) en TBE 1X. Se aplicó una corriente de 16.67V/cm por 25 min.

2. Objetivo 2. Análisis de homología de las variantes genéticas disponibles en bases de datos internacionales para el gen *its1*.

a. Análisis de homología de las secuencias amplificadas

Se realizó un análisis de homología para determinar la identidad de las secuencias para el gen *its1* de las especies de *Leishmania* spp. de interés, previamente reportadas (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*) en NCBI, con el objetivo de confirmar que la amplificación no se haya dado de forma inespecífica. El Cuadro A4 (anexos) muestra los números de acceso de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de las secuencias analizadas, las cuales fueron seleccionadas bajo los criterios de que (1) correspondieran a alguna de las especies de interés, y (2) reportara el gen *its1* completo. Para esto se utilizó el programa ClustalW en línea (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con todos los parámetros en modo default.

Estas secuencias se compararon con las de los cebadores utilizados, y se calculó un porcentaje de homología a partir del número de secuencias que presentaron una identidad mayor al 85% con los cebadores sobre el número de secuencias totales reportadas en GenBank para *its1* de cada especie de interés (Cuadro 11 de resultados).

En la Figura 8 se muestra el algoritmo utilizado para el procesamiento de las muestras del estudio.

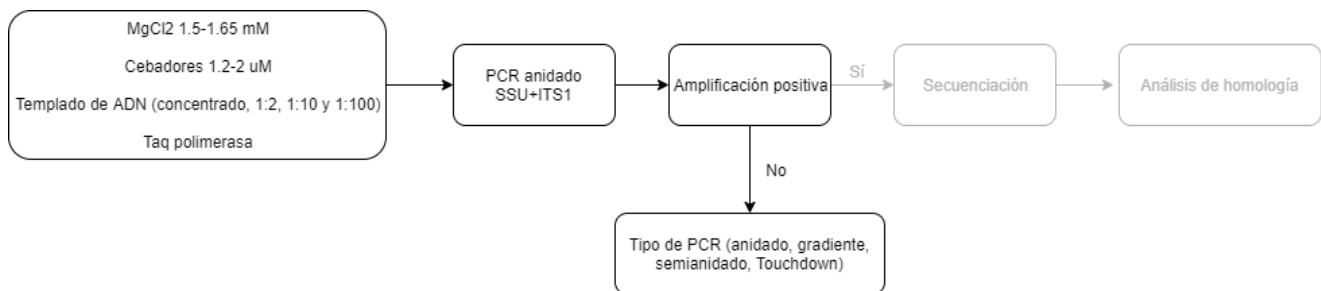


Figura 8. Diagrama de flujo de metodología

### 3. Aspectos éticos

Durante el desarrollo de este estudio no se tuvo ningún contacto o interacción con sujetos humanos ni se manejó información privada identificable de los pacientes que proporcionaron las muestras. Las muestras con las que se trabajó fueron colectadas tanto durante actividades de diagnóstico como investigación en estaciones de campo o jornadas realizadas en las regiones endémicas de Petén, Alta y Baja Verapaz e Izabal. Solamente las muestras utilizadas después del 2001 fueron recolectadas en estudios aprobados por un comité de ética, ya que fue en este año que inició su funcionamiento el Comité de Ética del Centro de Estudios en Salud.

### 4. Presupuesto

*Cuadro 9. Presupuesto*

Reactivo/Material	Precio unitario	Cantidad	Precio (Q)
Uso de equipo e instalaciones		5% de subtotal	379.90
Buffer Platinum	6.88/rxn	160 reacciones	1100.58
Agua DEPC	4.94/mL	100 mL	493.52
Par de cebadores SSUrDNA	0.11/pM	8,000 pM	923.07
Par de cebadores <i>its1</i>	0.11/pM	8,000 pM	923.07
Tubos 0.2 mL	0.25/tubo	100	25.00
Agarosa	25.91/g	10 g	259.10
Buffer TBE 10X	1196.74/L	50 mL	598.37
Escalera 100 bp	24.08/U	20 U	481.60
GelRed 10,000X	2.69/uL	40 uL	53.80
Puntas 10 uL	6.62/punta	200	1325.00
Puntas 200 uL	6.62/punta	100	662.50
Puntas 1000 uL	6.62/punta	100	662.50
Total			5,481.79

### 5. Cronograma

*Cuadro 10. Cronograma de actividades*

Mes	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct
Elaboración de protocolo	■	■	■	■	■				
Evaluación de componentes de mezcla de reacción					■	■	■		
Evaluación de programas de PCR						■	■	■	
Análisis de datos							■	■	■
Redacción de resultados, discusión y conclusiones								■	■

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Evaluación de las condiciones de reacción de la técnica de PCR del gen *its1* en muestras previamente positivas para el gen *hsp70* de *Leishmania* spp.

Existen diversos métodos moleculares para la tipificación de los parásitos de *Leishmania*, pero algunas de las metodologías descritas no logran diferenciar entre especies muy relacionadas. Este es el caso del PCR para la amplificación del gen *hsp70* de *Leishmania*, la única técnica molecular disponible en Guatemala para la caracterización de los parásitos responsables de la leishmaniasis cutánea, que no permite discriminar entre complejos de especies como *L. braziliensis/L. naiffi* o *L. panamensis/L. guyanensis*. En Guatemala se estandarizó el PCR del gen *hsp70* y se utilizó para tipificar los parásitos responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea a lo largo de los años.

Sin embargo, no se logró discriminar entre los complejos mencionados anteriormente, por lo que se hace necesario evaluar otros marcadores moleculares como el *its1*. Para esto, se analizaron 25 muestras (cuadro A2 de Anexos) cuyo gen *hsp70* había sido previamente amplificado, pero cuya identidad no se había definido a nivel de especie, ya que se encontraban identificadas como *L. braziliensis/L. naiffi* (6) o *L. panamensis/L. guyanensis* (6), no se habían identificado por RFLP (2) o se sospechaba de una infección mixta (8). Para evaluar las condiciones para la amplificación del gen *its1* en muestras de pacientes con infecciones confirmadas de leishmaniasis cutánea, se probaron diversos tipos y concentraciones de reactivos, mezclas de reacción y programas de amplificación.

La optimización de los componentes de la mezcla de reacción comenzó variando las concentraciones de  $MgCl_2$ , con el objetivo de encontrar una concentración óptima de este cofactor de Taq polimerasa que resultara en una productividad alta, pero la menor amplificación inespecífica, y probando la efectividad de tres Taq polimerasas. Sin embargo, no se obtuvo amplificación con ninguna de estas combinaciones, por lo que se optó por una mezcla comercial con concentraciones previamente estandarizadas.

Los primeros programas siguieron las temperaturas de alineamiento reportadas en estudios para los que se había obtenido una amplificación positiva para muestras de las especies de interés. Sin embargo, éstos no fueron exitosos. Esto podría deberse primero a una variabilidad genética presente en las muestras analizadas, la cual, según estudios anteriores (El Tai, 2001, Cupolillo *et al*, 1995), podría encontrarse en las posiciones 26-35, 60-90 o 121-131 de *its1*. Segundo, podría deberse a que las temperaturas de fusión de los cebadores reportados mostraban

diferencias altas (6.3°C). Para reducir esta diferencia de temperaturas se optó por una reacción semi-anidada en la que se utilizaron los cebadores de la región externa de la PCR anidada (R221/R332), y se mantuvo el cebador *forward* para la segunda reacción, cambiando el *reverse* (R221/L5.8S). Esto representaría dos ventajas: primero, la diferencia entre las temperaturas de fusión de ambos cebadores se reduciría, lo cual es importante porque una alta diferencia de fusión puede resultar en el alineamiento inespecífico que posiblemente fue la causa de los barridos presentes en algunas de las primeras amplificaciones (datos no mostrados); y, segundo, porque se utilizarían dos cebadores que, según el análisis de homología de las secuencias reportadas para el gen *its1* de las especies de interés, han presentado porcentajes mayores de identidad respecto a los otros dos.

Sin embargo, no se obtuvo amplificación con la modalidad semi-anidada, por lo que se optó por una PCR en gradiente, en la que se evaluaron temperaturas en un rango de 45.9°C hasta 58.3°C, cuyo límite superior sería la temperatura de fusión del cebador R332 (SSUrDNA). Esto, con el objetivo de aumentar la eficiencia de las pruebas para determinar la temperatura de alineamiento óptima. Con esta variante tampoco se obtuvo amplificación de las muestras y controles, por lo que se utilizó una tercera variante de PCR: *Touchdown* en ambas reacciones de la PCR anidada, cuyos resultados se muestran en la Figura 9:

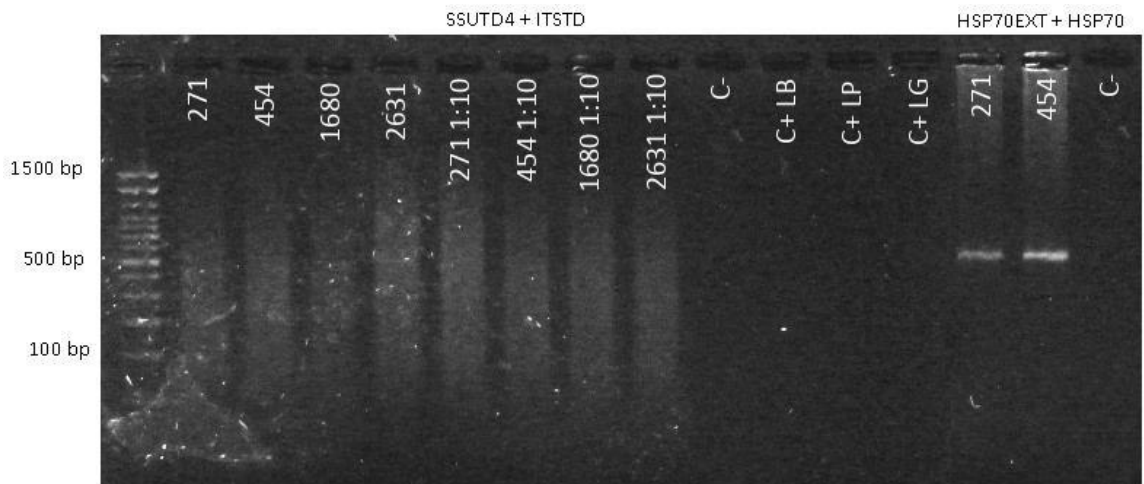


Figura 9. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando algunas de las muestras y diluciones de ADN analizadas con los programas SSUTD4+ITSTD. Los detalles de los componentes de la mezcla de reacción se encuentran en el cuadro A3 (Anexos). Los carriles 271, 454, 1680 y 2631 corresponden a las muestras de ADN concentrado; los pozos 271 1:10, 454 1:10, 1680 1:10 y 2631 1:10 corresponden a las muestras de ADN diluido 1:10. C- es el control negativo (todos los componentes de la mezcla de reacción menos ADN), C+ LB representa el control positivo de *L. braziliensis*, C+LP representa el control positivo de *L. panamensis*, C+LG representa el control positivo de *L. guyanensis*.

Ninguna de las muestras o de los controles positivos mostró bandas de amplificación, sino que se obtuvo un barrido. También en la figura 9 se muestra la amplificación exitosa del gen *hsp70*, el cual se utilizó para confirmar que la integridad, concentración y pureza del ADN utilizado como templado eran adecuadas para la amplificación. La presencia de estas bandas confirma que la falta de amplificación no se debió a degradación del material genético o a la presencia de inhibidores del PCR.

En total se realizaron cuatro variantes del PCR *Touchdown* para la amplificación del fragmento externo (SSUrDNA), y dos variantes del PCR *Touchdown* para la amplificación del fragmento interno (*its1*). Se realizó una combinación de estas variantes, pero no se logró amplificación. La figura 10 muestra un gel representativo de los resultados del PCR *Touchdown* anidado, donde se observa que se obtuvieron barridos para todas las muestras y diluciones.

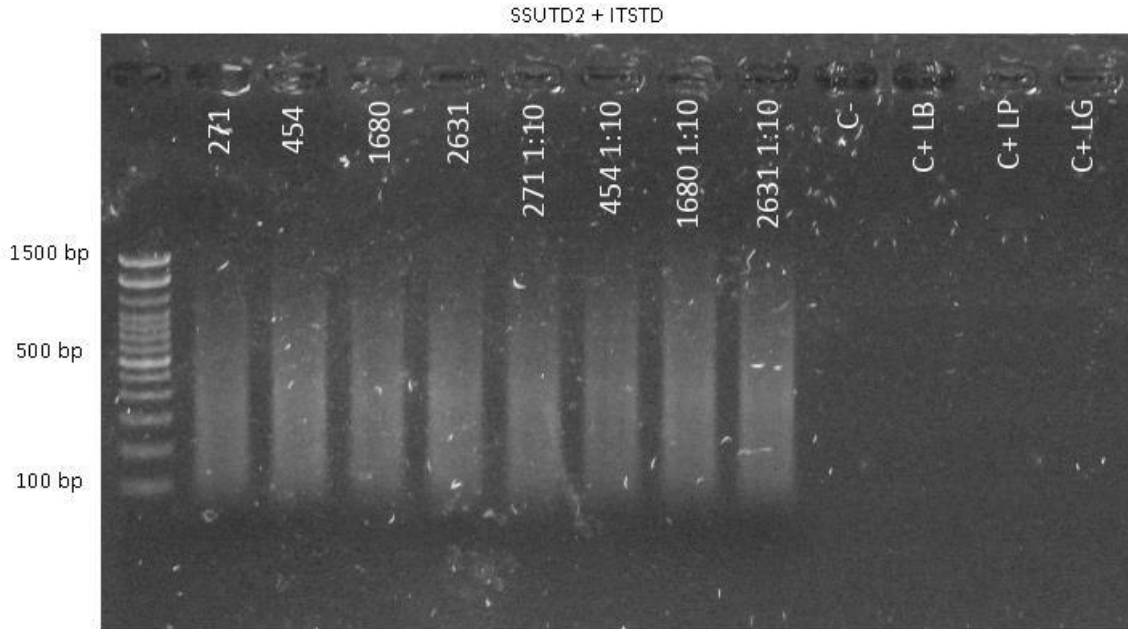


Figura 10. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación de algunas de las muestras y diluciones de ADN para las regiones SSUTD2+ITSTD de *Leishmania*. Los detalles de los componentes de la mezcla de reacción se encuentran en el cuadro A3 (Anexos). Los carriles 271, 454, 1680 y 2631 corresponden a las muestras de ADN concentrado; los pozos 271 1:10, 454 1:10, 1680 1:10 y 2631 1:10 corresponden a las muestras de ADN diluido 1:10. C- es el control negativo (todos los componentes de la mezcla de reacción menos ADN), C+ LB representa el control positivo de *L. braziliensis*, C+LP representa el control positivo de *L. panamensis*, C+LG representa el control positivo de *L. guyanensis*.

El propósito de llevar a cabo una PCR anidada es reducir la amplificación inespecífica provocada por la presencia de varios sitios de unión del cebador, y aumentar la sensibilidad del método, al contar con más material genético para la amplificación. Sin embargo, al ser la variante de *Touchdown* PCR una técnica para reducir la amplificación inespecífica (Heckel y Roux, 1996), se consideró innecesario llevar a cabo una *Touchdown* PCR anidada. Por eso se realizó una PCR *Touchdown* únicamente del fragmento interno (*its1*), cuyos resultados se muestran en la Figura 11:

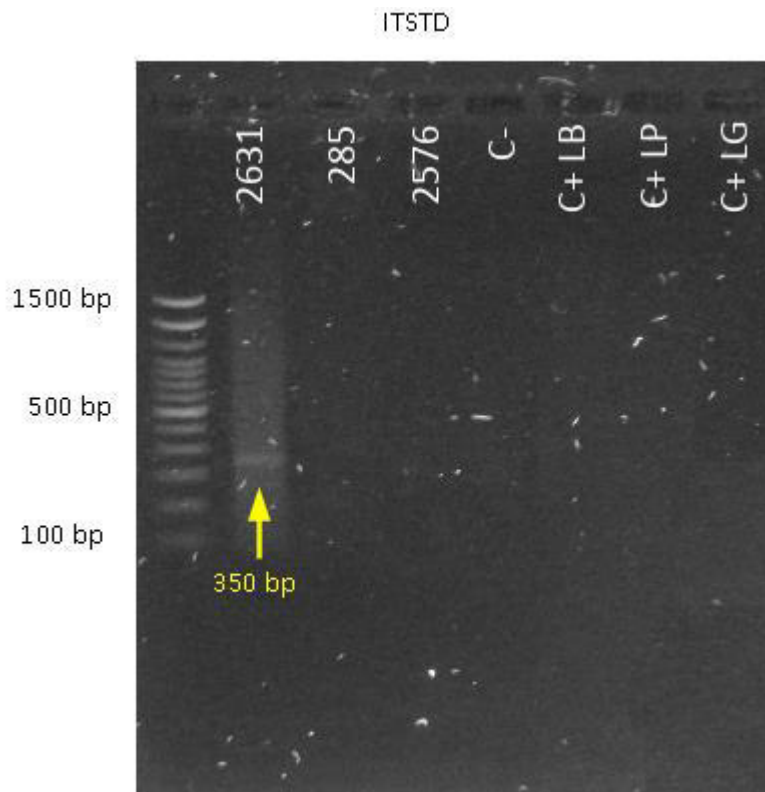


Figura 11. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación de algunas muestras y diluciones de ADN para la región ITSTD. Los detalles de los componentes de la mezcla de reacción se encuentran en el cuadro A3 de Anexos. Los carriles 2631, 285 y 2576 corresponden a las muestras de ADN concentrado; los pozos 2631 1:10, 285 1:10 y 2576 1:10 corresponden a las muestras de ADN diluido 1:10. C- es el control negativo (todos los componentes de la mezcla de reacción menos ADN), C+ LB representa el control positivo de *L. braziliensis*, C+LP representa el control positivo de *L. panamensis*, C+LG representa el control positivo de *L. guyanensis*.

Esta combinación de condiciones (mezcla de reacción y programa de PCR *Touchdown*) resultó en una banda de amplificación para la muestra 2631 únicamente, que, según el análisis previamente realizado con el gen *hsp70* (Ruiz, 2018), correspondía a una infección cuya especie no pudo determinarse entre *L. braziliensis*/*L. guyanensis*. El tamaño del fragmento obtenido correspondió a la del producto esperado para el gen *its1* (350 bp), pero presentó una baja

intensidad, por lo que se variaron concentraciones de cebadores (1 y 2 uM) y de ADN (1 ul concentrado, 1 ul 1:2, 1 ul 1:10 y 2 ul concentrado) y el resultado de las pruebas realizadas a 1uM de cebadores se muestra en la Figura 12. Esto, con el doble propósito de corroborar la amplificación positiva de esta muestra e identificar condiciones de amplificación exitosas.

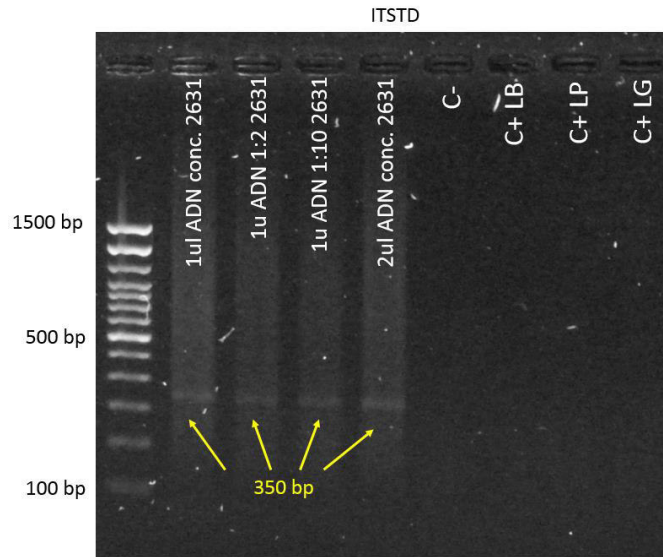


Figura 12. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando la amplificación de la muestra 2631 a distintas diluciones de ADN y programas ITSTD. Los detalles de los componentes de la mezcla de reacción se encuentran en el cuadro A3 de Anexos. Los carriles 2-5 corresponden a pruebas realizadas con la muestra 2631: el carril 2 corresponde a 1 ul de ADN concentrado, el carril 3 corresponde a 1 ul de ADN diluido 1:2, el carril 4 corresponde a 1 ul de ADN diluido 1:10 y el carril 5 corresponde a 2 ul de ADN concentrado. C- es el control negativo (todos los componentes de la mezcla de reacción menos ADN), C+ LB representa el control positivo de *L. braziliensis*, C+LP representa el control positivo de *L. panamensis*, C+LG representa el control positivo de *L. guyanensis*.

Se obtuvo amplificación para las diluciones de ADN evaluadas (1:2 y 1:10) para una concentración de cebadores de 1 uM, aunque las bandas obtenidas fueron de baja intensidad y se observó un barrido en el gel. Como puede notarse, el control positivo de *L. braziliensis* no mostró amplificación, lo cual puede atribuirse a la misma razón de la falta de amplificación de las demás muestras: una posible variabilidad genética del gen *its1*. Esto, porque este control fue aislado de parásitos provenientes de Colombia, donde, al igual que en otros países de Centro y Sudamérica se ha reportado alta variabilidad genética en la región *its1* (Guevara *et al*, 1992). También es posible que la falta de amplificación del control positivo se deba a la degradación del ADN del mismo, por lo que se recomienda confirmar su integridad por amplificación de *hsp70*. Además, las bandas obtenidas fueron de baja intensidad, y cada carril presentó barridos sobre y debajo de las bandas.

## B. Análisis de homología de las variantes genéticas disponibles en bases de datos internacionales para el gen *its1* y los cebadores utilizados

La región *its1* de *Leishmania* es una región conservada y de alto número de copias que se ha utilizado para la caracterización molecular de esta especie. Su amplificación por medio de los cebadores R221/R332 (SSU) y LITSR/L5.8S (*its1*) ha sido reportada principalmente para especies del Viejo Mundo, pero también se ha reportado para el Nuevo Mundo. Sin embargo, dada la falta de amplificación de la mayoría de las muestras analizadas (todas menos una) y de los controles positivos, se realizó un alineamiento de las secuencias reportadas para la región SSU e *its1* del ADN ribosomal de *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. naiffi*, y especies del Viejo Mundo (*L. major* y *L. tropica*). A este alineamiento se agregó la secuencia de cada cebador con el objetivo de determinar si existía homología para la hibridación del cebador. Los resultados se muestran en la Figura A1 de la sección de Anexos, y se resumen en el Cuadro 11, donde se muestra el porcentaje de secuencias reportadas con las que cada cebador mostró una identidad mayor al 85%.

Cuadro 11. Porcentajes de secuencias reportadas en bases de datos internacionales que mostraron más de 85% de identidad con los cebadores evaluados en el estudio.

Región	Especie	R221	R332	LITSR	L5.8S	Total de secuencias reportadas para <i>its1</i>
Viejo mundo	<i>L. major</i>	57.47%	57.47%	57.47%	57.47%	174
	<i>L. tropica</i>	64.94%	62.99%	64.29%	64.94%	154
	<i>L. braziliensis</i>	11.63%	0.00%	0.00%	6.98%	88
	<i>L. mexicana</i>	7.95%	0.00%	0.00%	1.14%	43
Nuevo mundo	<i>L. panamensis</i>	40.00%	0.00%	0.00%	0.00%	10
	<i>L. guyanensis</i>	10.00%	0.00%	0.00%	20.00%	20
	<i>L. naiffi</i>	16.67%	0.00%	0.00%	16.67%	6

Se observa que dos de los cebadores evaluados (R332 y LITSR) no mostraron homología con las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo analizadas en este estudio, pero sí mostraron homología con el 57% de las especies del Viejo Mundo analizadas en este estudio. Esto coincide con el hecho de que la mayoría de los estudios que utilizan estos cebadores lo hacen para la identificación molecular de especies del Viejo Mundo (Van der Awerda *et al*, 2015). Además, los otros dos cebadores (R221 y L5.8S) presentaron porcentajes de homología bajos, a excepción del cebador R221 que mostró homología con el 40% de las secuencias reportadas para *its1* de *L. panamensis*. Sin embargo, esto puede deberse al bajo número de secuencias reportadas para el gen *its1* de esta especie.

De acuerdo con dos estudios realizados en Brasil por Fernandes (2019) y Ávila (2018), sí se ha obtenido amplificación de *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. naiffi*, utilizando los cebadores LITSR1/L5.8S. La falta de amplificación de las muestras analizadas podría deberse a que las variantes genéticas de las especies de *Leishmania* circulantes en Guatemala presenten variabilidad de nucleótidos en la región de hibridación de los cebadores evaluados en el estudio, lo que pudo afectar la amplificación de los fragmentos.

Este tipo de variabilidad se ha reportado en países del Viejo Mundo, como Sudán, India, Kenia y China, según un estudio realizado por El Tai *et al.*(2001) que analizó la región *its1* de especies de *Leishmania* encontradas en muestras de aspirados de médula ósea y raspados de lesiones cutáneas de pacientes con leishmaniosis visceral, post Kala-azar o cutánea. Este estudio encontró una alta variabilidad genética intraespecífica para la región *its1*, ya que se identificaron tres perfiles genéticos distintos de la misma especie (*L. donovani*) en la misma área geográfica del Este de Sudán, dos perfiles para la misma región de la India, dos perfiles para la misma región de Kenia, y dos para la misma región de China. Los autores de estos estudios sugieren que esta variabilidad se debe a cambios evolutivos rápidos, caracterizados principalmente por deleciones de AT, lo cual podría deberse a la debilidad del enlace de estos nucleótidos.

Khan y colaboradores (2017) sugieren que la importancia de estudiar esta heterogeneidad genética en las especies causantes de leishmaniasis cutánea radica en la posibilidad de que provoque resistencias a tratamientos que se utilizan actualmente para esta enfermedad, como los antimoniales pentavalentes, o para generar un mayor tropismo por ciertos tejidos. También proponen que esta heterogeneidad se encuentra subestimada debido a un muestreo insuficiente o a un bajo poder de discriminación de los marcadores generalmente utilizados.

Importantemente, estos estudios fueron realizados en países del Viejo Mundo, donde, según el análisis de alineamiento realizado, la homología del gen *its1* con los cebadores evaluados en el estudio fue mayor. Tomando esto en cuenta podría sospecharse de una heterogeneidad genética aún mayor en las especies del Nuevo Mundo que mostraron un menor porcentaje de homología con el gen *its1*.

Estudios realizados en el Nuevo Mundo han concluido que hay un alto grado de polimorfismos intraespecíficos para poblaciones de *L. naiffi*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*, y que estos polimorfismos pueden deberse a episodios de reproducción sexual del parásito, atribuidos a presión evolutiva y cambios ambientales (Cupolillo *et al.*, 1995; Cupolillo *et al.*, 1998; Guevara *et al.*, 1992). El posible aumento en la reproducción sexual del parásito se volvió a reportar para *L. braziliensis* en el 2003, donde un estudio realizado por Cupolillo y colaboradores encontró que esta especie es altamente variable, ya que se han identificado hasta cinco perfiles de *its1* en una misma región del norte de Brasil. El hecho de que los cambios ambientales estén relacionados a un aumento en la variabilidad genética de las especies de interés podría significar que las cepas

provenientes de países como Guatemala presenten una mayor cantidad de polimorfismos, ya que Centro América representa una región altamente diversa en cuanto a microambientes y flujo genético entre especies de Norte y Sudamérica (Kuhls *et al*, 2011).

Esta variabilidad genética explicaría por qué solamente con 1 de las 25 muestras analizadas (la 2631) se obtuvo amplificación; es posible es que esta muestra en particular correspondiera a una cepa con un mayor porcentaje de homología con respecto a los cebadores utilizados.

Una de las limitaciones de este estudio fue la falta de secuenciación de la banda amplificada, lo cual impide la certeza de que su amplificación haya sido debida a una alta homología de su secuencia con la de los cebadores analizados. Para esto, se recomienda realizar un análisis por PCR del mismo gen pero utilizando cebadores que abarquen una región mayor, como los el set IR1/IR2 utilizado por Oliveira *et al.* (2007). Su producto podría clonarse y secuenciarse individualmente con el objetivo de identificar posibles variaciones. También se recomienda realizar un análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) de la región amplificada de *its1* tras el uso de los cebadores recomendados anteriormente, con el objetivo de identificar mutaciones puntuales en la región de interés.

## VIII. CONCLUSIONES

De las 57 condiciones de PCR evaluadas, solamente se obtuvo una amplificación exitosa de 1 de las 25 muestras con las condiciones de *Touchdown* PCR para *its1* (ITSTD) y utilizando un kit de mezcla de reacción comercial (1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.22 mM dNTPs y 0.5 U *Platinum*® Taq) con concentraciones de cebadores de 0.8 o 1 uM, y con concentraciones de ADN desde aproximadamente 15 a 250 ng.

El análisis de homología de los cebadores por alineamiento múltiple de secuencias de las regiones *its1* de las cepas reportadas en bases de datos internacionales para las especies de *Leishmanias* de interés (*L. braziliensis* (0-11.63%), *L. mexicana* (0-7.95%), *L. panemensis* (0-40.00%), *L. guyanensis* (0-20.00%) y *L. naiffi* (0-16.67%)) resultó en bajos porcentajes de homología, lo cual indica una alta heterogeneidad genética para esta región.

Se concluye que los cebadores R221/R332 y LITSR/L5.8S no son aptos para la caracterización molecular de las cepas de *Leishmania* spp. causantes de leishmaniosis cutánea en Guatemala, probablemente debido a que fueron diseñados para especies del Viejo Mundo, que presentan variabilidad genética respecto a las especies del Nuevo Mundo.

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un análisis por PCR del mismo gen pero utilizando cebadores que abarquen una región mayor, como los el set IR1/IR2, o bien utilizar cebadores aleatorios, como RAPD. Su producto podría clonarse y secuenciarse individualmente con el objetivo de identificar posibles deleciones AT, o bien algún otro tipo de variación puntual, que permita el diseño de nuevos cebadores específicos para las cepas circulantes en Guatemala.

Realizar un análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) de la región amplificada de *its1* tras el uso de los cebadores recomendados anteriormente, con el objetivo de identificar mutaciones puntuales en la región de interés.

Evaluar los cebadores con las condiciones de amplificación exitosas, utilizando controles de ADN de parásito del Viejo Mundo que hayan sido confirmados por análisis de homología. Esto con el objetivo de corroborar que la causa de la falta de amplificación de las muestras analizadas haya sido la baja homología de los cebadores respecto a las especies del Nuevo Mundo de interés.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Adgar, R. (2004). *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research*, 32(5):1792-97.
- Alvar, J.; Vélez, I.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J. y den Boer, M. (2012). *Leishmaniosis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE* 7(5):1-12.
- Alves Souza, N., Souza Leite, R., de Oliveira Silva, S., Groenner Penna, M., Figueiredo Felicori Vilela, L., Melo, M. N., & de Andrade, A. S. R. (2019). *Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. Acta Tropica*, 193, 12–17.
- Andrade-Neto, V.; Cunha, E.; dos Santos, V.; Pereira, T.; Lopes, R.; León, L. y Torres-Santos, E. (2018). *Drug repurposing for leishmaniases. Frontiers in Bioscience*, 23, 967-996.
- Arana, B.; Mendoza, C.; Rizzo, N. y Kroeger, A. (2001). *Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniosis with Paromomycin plus Methylbenzethonium Chloride Ointment in Guatemala. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(5): 466–470.
- Arana, B. (2018). *Cutaneous Leishmaniosis: Treatment needs and combination therapies. International Journal of Infectious Diseases*, 73, 47.
- Ávila, M.; Fernandes, A.; Ferreira, C.; Días, P.; Bianchi, E. y Pecanha, R. (2018). *Ecology, feeding and natural infection by Leishmania spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. Parasites & Vectors* 11(64):1-10.
- Badirzadeh, A.; Mohebbali, M.; Sabzevari, S.; Ghafoori, M.; Arzamani, K.; Seyyedini, M. y Hashemi, S. (2018). *Case Report: First Coinfection Report of Mixed Leishmania infantum/Leishmania major and Human Immunodeficiency Virus–Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniosis in Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 98(1), 122–125.

- Bastrenta, B., Mita, N., Buitrago, R., Vargas, F., Flores, M., Machane, M., Yacsik, N., Torrez, M., Le Pont, F. y Brenière, F. (2003). *Human mixed infections of Leishmania spp. and Leishmania-Trypanosoma cruzi in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 98(2), 255–264.*
- Centro de Control y Prevención de Enfermedades [CDC]. (2018). *Leishmaniosis: Recursos para Profesionales de Salud.* Disponible en: [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniosis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniosis/health_professionals/index.html) [con acceso el 14 de marzo del 2019]
- Centro de Estudios en Salud [CES]. (2015). *Leishmaniosis.* Disponible en: <http://www.ces.uvg.edu.gt/page/leishmaniosis/> [con acceso el 15 de marzo del 2019].
- Copeland, N. K., y Aronson, N. E. (2015). *Leishmaniosis. Current Opinion in Infectious Diseases, 28(5), 426–437.*
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., y Beverley, S. M. (1995). *Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. Molecular and Biochemical Parasitology, 73(1-2), 145–155.*
- Cupolillo, E.; Momen, H. y Grimaldi, G. (1998). *Genetic Diversity in Natural Populations of New World Leishmania. Mem Inst Oswaldo Cruz, 93(5): 663-668.*
- Cupolillo, E.; Brahmin, L.; Toaldo, C.; Paes, M.; Felinto, M.; Falqueto, A. y Farias, M. (2003). *Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. Journal of Clinical Microbiology, 20(41): 3126–3132.*
- Dalimi, A.; Mohammadiha, A.; Mohebale, M.; Mirzaei, A. y Mahmoudi, M. (2018). *Molecular Identification and Intra-species Variations among Leishmania infantum Isolated from Human and Canine Visceral Leishmaniasis in Iran. Iran J Parasitol 13,(4), 567-576.*
- Dávila, A. M. R., y Momen, H. (2000). *Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 94(6), 651–654.*
- De Oliveira, J.; Fernandes, F.; Cruz, A.; Trombela, V. y Monteiro, E. (2007). *Genetic diversity of Leishmania amazonensis strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. Kinetoplastid Biology and Disease 2007, 6(5):1-8.*

- De Vries, H. J. C.; Reedijk, S. H., Henk, H., y Schallig, D. F. H. (2015). *Cutaneous Leishmaniosis: Recent Developments in Diagnosis and Management. Am J Clin Dermatol*, 16:99–109
- Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud de Guatemala. (2016). *Leishmaniosis en Guatemala*. Disponible en: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202017/Malaria/Leishmaniosis%202016.pdf> [con acceso el 4 de febrero del 2019]
- Drogas para Enfermedades Desatendidas. (2019). *Current Treatments for Leishmaniosis*. Disponible en: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniosis/leish-current-treatments/> [con acceso el 7 de abril del 2019].
- Dweik, A.; Schönian, G.; Mosleh, I. M. y Karanis, P. (2007). *Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 andHaeIII) for the detection of Leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(5), 399–407.
- El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. A., Oskam, L., El Safi, S. H., Schönian, G. (2001). *Leishmania donovani: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. Experimental Parasitology*, 97(1), 35–44.
- Feiz, M.; Ghasemi, E.; Maraghi, S. y Tavala, M. (2016). *Identification of Leishmania Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniosis in Mehran, Western Iran Using Nested PCR. Iran J Parasitol*, 11(1):65-72.
- Fernandes, A.; Lima, L.; Andrade, R.; Brandao, V.; Cavalheiros, M. y Nunes, P. (2019). *Leishmania (Viannia) braziliensis type 2 as probable etiological agent of canine cutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazon. PLOS ONE*.
- Ferreira, E.; Cruz, I.; Cañavate, C.; Amaral, L.; Sampaio, A.; Madeira, F.; Nogueira, S.; Morais, H.; Pereira, A. y Ferreira, C. (2015). *Mixed infection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in rodents from endemic urban area of the New World. BMC Veterinary Research* 11(71):1-7.
- Guevara, P., Alonso, G., da Silveira, J., de Mello, M., Scorza, J., Añez, N., & Ramírez, J. (1992). *Identification of new world Leishmania using ribosomal gene spacer probes. Molecular and Biochemical Parasitology*, 56(1), 15–26.
- Handler, M. Z.; Patel, P. A.; Kapila, R.; Al-Qubati, Y., y Schwartz, R. A. (2015). *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 897–908.

- Hecker, K. y Roux, K. (1996). *High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR*. *BioTechniques* 20:478-485.
- Juárez, D. (2017). *Caracterización y filogenia de especies de Leishmania (Tripanosomatida) responsables de infecciones de leishmaniasis cutánea humana en Guatemala*. (Tesis de licenciatura no publicada). Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Kahn, N.; Llewellyn, M.; Schönian, G. y Sutherland, C. (2017). *Variability of Cutaneous Leishmaniasis Lesions Is Not Associated with Genetic Diversity of Leishmania tropica in Khyber Pakhtunkhwa Province of Pakistan*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 97(5): 1489–1497
- Kaya, M.; Sarhan, A.; Alhajj, R. (2014). *Multiple Sequence Alignment with Affine Gap by Using Multi-Objective Genetic Algorithm*. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 114(1):38-49.
- Kevric, I.; Cappel, M. A., y Keeling, J. H. (2015). *New World and Old World Leishmania Infections*. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593.
- Koarashi, Y.; Cáceresc, A.; Zúniga Sacae, F.; Palacios Flores, E.; Trujillo, A.; Abanto, J.; Yoshimatsu, K.; Arikawab, J.; Katakuraa, K.; Hashiguchi, Y. y Katoa, H. (2016). *Identification of causative Leishmania species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniosis in Peru using PCR-RFLP*. *Acta Tropica* 158 83–87.
- León, C. M., Muñoz, M., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A., Ramírez, J. D. (2017). *Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real Time PCR (qPCR) Assays for the Detection of Six Leishmania Species DNA in Colombia*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1907.
- López-Carvajal, L. Palacio-Barco, M. y Cardona-Arias, A. (2016). *Eficacia de los azoles en el tratamiento de la Leishmaniosis Cutánea*. *iMedPub*, 12(2)1-10.
- Madeira, M. F., Schubach, A., Schubach, T. M. P., Pacheco, R. S., Oliveira, F. S., Pereira, S. A., ... Marzochi, M. C. A. (2006). *Mixed infection with Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(5), 442–445.

- Mahnaz, T.; Katrin, K.; Amer, A.-J.; Isabel, M.; Gabriele, S.; Safar, F. y Hossein, A. M. (2006). *Leishmania major: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Tropica*, 98(1), 52–58.
- Marcos, A.; Nova, E., y Montero, A. (2003). *Changes in the immune system are conditioned by nutrition. European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), 66–69.
- Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C. L., Beck, H.-P., y Felger, I. (2003). *Identification and Differentiation of Leishmania Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Journal of Clinical Microbiology*, 41(7):3147–3153.
- Martinez, E., Mollinedo, S., Torrez, M., Muñoz, M., & Bañuls, A. L. (2002). *Co-infection by Leishmania amazonensis and L. infantum/L. chagasi in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96:529-532.
- Massae Sato, C., Carmen Arroyo Sanchez, M., Julieta Celeste, B., Duthie, M. S., Guderian, J., Reed, S. G., ... Heitor Vieira Dourado, F. (2017). *Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. Journal of Clinical Microbiology*, 55(2):495-503.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. (2008). *Leishmaniasis: Situación epidemiológica*. Disponible en: <http://www.proyectomesoamerica.org/documentos/08%20-%20Guatemala.pdf>. [con acceso el 9 de marzo del 2019]
- Minodier, P., & Parola, P. (2007). *Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3), 150–158.
- Mohammadiha. A.; Dalimi, A.; Reza Mahmoodi, M.; Parian, M.; Pirestani, M. y Mohebbali, M. (2016). *The PCR-RFLP-Based Detection and Identification of the Leishmania Species Causing Human Cutaneous Leishmaniasis in the Khorasan-Razavi Province, Northeast of Iran. J Arthropod-Borne Dis*, 11(3): 383–392.

- Montalvo, A.; Fraga, J.; Montano, I.; Monzote, L.; Van der Auwera, G.; Marín, M. y Muskus, C. (2016). *Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de Leishmania spp. en Colombia. Biomédica*, 36(1):37-44
- Mwangi, T.; Mcodimba, F.; Mosi, R.; & O Jung'a, J. (2009). *Comparative evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood. Parasites & vectors*. 1(46):1-7.
- Nath-Chowdhury, Sangaralingam, M.; Bastien, P.; Ravel, C.; Pratlong, F.; Mendez, J.; Libman, M. y Ndao, M. (2016). *Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniosis species differentiation. Parasites & Vectors*, 9:255.
- Oliveira, L.; Schubach, A.; Martins, M.; Passos, S.; Oliveira, R.; Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). *Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniosis treatment in the New World. Acta Tropica*, 118(2), 87–96.
- Oliveira-Neto, M.; Marzochi, M.; Grimaldi, G.; Pacheco, R.; Toledo, L. y Momen, H. (1985). *Concurrent human infection with Leishmania donovani and Leishmania braziliensis braziliensis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 80(6):587-592.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2010). *Control de la leishmaniosis*. OMS: Italia.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). *Leishmaniosis*. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniosis> [con acceso el 10 de marzo del 2019].
- País, A.; de Cássia, P.; Oliveira, G. y Santos, R. (2014). *Assessing the efficiency of multiple sequence alignment programs. Algorithms for Molecular Biology* 9(4):1-8.
- Romero, G. y Boelaert, M. (2010). *Control of Visceral Leishmaniosis in Latin America - A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis*. 4(1):584.
- Ruiz, C. (2018). *Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método PCR-RFLP/hsp70*. (Tesis de licenciatura), Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Schönian, G., El Fari, M., Lewin, S., Schweynoch, C., y Presber, W. (2001). *Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. Medical Microbiology and Immunology*, 190(1-2), 61–63.

- Schönian, G., Schnur, L., El Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., Sokolowska-Köhler, W., y Presber, W. (2001). *Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed by different PCR-based methods. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 217–224.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D. F. ., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). *PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), 349–358.
- Shirian, S.; Oryan, A.; Reza, G.; Daneshbod, Y. (2012). *Mixed Mucosal Leishmaniosis Infection Caused by Leishmania tropica and Leishmania major. Journal of Clinical Microbiology* 50(11):3805-08.
- Silveira, F. T.; R., Shaw, J. J. y Ribeiro, R. da S. M. (1984). *Leishmaniose cutanea na Amazonia. Registro do primeiro case humano de infeccao mista, determinado por duas especies distintas de leishmanias: Leishmania braziliensis e Leishmania mexicana amazonensis. Revista do Institute de Medicina Tropical de Sao Paula*, 26, 272-275.
- Simon, S., Nacher, M., Carme, B., Basurko, C., Roger, A., Adenis, A., Couppie, P. (2017). *Cutaneous leishmaniosis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. Tropical Medicine and Health*, 45:5.
- Song, J., Shi, L., Li, D., Sun, Y., Niu, Y., Chen, Z., Chen, S. (2012). *Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA. PLoS ONE*, 7(8), e43971.
- Steverding, D. (2017). *The history of Leishmaniosis. Parasites & Vectors* 10:82.
- Sutton, S. (2008). *Multiple Sequence Alignment: A Critical Comparison of Four Popular Programs*
- Torres Ávila, L.; Rodríguez, G.; Sosa, W.; Jafet, J.; Martínez, D. (2018). *Implementación de un PCR-RFLP/hsp70 para identificar y tipificar especies de Leishmania en una zona endémica a Leishmaniosis Cutánea Atípica en Honduras. Revista Ciencia y Tecnología*, 23:81-90.
- Torres-Guerrero, E.; Quintanilla, M. Ruiz, J. y Arenas, R. (2017). *Leishmaniosis: a review. F1000Res*,6: 750.
- Van der Awera, G.; Ravel, C.; Verwij, J.; Schönian, G. y Felger, I. (2014). *Evaluation of Four Single-Locus Markers for Leishmania Species Discrimination by Sequencing. Journal of Clinical Microbiology* 52(4):1098-1104.

- Vega-López, F. (2003). *Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(2), 97–101.
- Veland, N.; Valencia, M.; Alba, M.; Adai, A.; Llanos-Cuentas, A.; Arévalo, J. y Boggild, A. (2013). *Case Report: Simultaneous Infection with Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) lainsoni in a Peruvian Patient with Cutaneous Leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 88(4): 774–777.
- Vera-Izaguirre, D.; Vega-Memije, E. Quintanilla, M, et al. (2006). *Leishmaniasis revisión. DCMQ* 4(4): 252–260.
- Zijlstra, E. E.; Musa, A. M.; Khalil, E. A. G.; el-Hassan, I. M., y el-Hassan, A. M. (2003). *Post-kala-azar dermal leishmaniasis. The Lancet. Infectious Diseases*, 3(2), 87–98.

## XI. ANEXOS

Cuadro A1. Especies de *Leishmania* spp. y países en los que se han reportado

Pais o territorio	<i>Leishmania</i> spp.	Forma clínica	Vector (probado o sospechoso)	Reservorio animal (probado o sospechoso)	
Argentina	<i>L. guyanensis</i>	LC	Desconocido	Desconocida	
	<i>L. amazonensis</i>	LC	Desconocido	Desconocida	
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. neivai</i> <i>Lu. migonei</i>	Perro	
	<i>L. infantum</i>	IV	<i>Lu. longipalpis</i>	Perro	
Belice	<i>L. braziliensis</i>	LC	<i>Lu. ovallesi</i>	Desconocida	
	<i>L. mexicana</i>	LC	<i>Lu. almeida almeida</i>	<i>Heteromys</i> spp., <i>Nyctomys</i> spp., <i>Otodylomys</i> spp., <i>Sigmodon</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp.	
Bolivia	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. nuneztovari anglesi</i> <i>Lu. carrerai carrerai</i> <i>Lu. llanasmartinsi</i> <i>Lu. shawi</i> <i>Lu. ayraoi</i> <i>Lu. yucumensis</i>	Desconocida	
	<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>Oryzomys</i> spp.	
	<i>L. infantum</i>	IV	<i>Lu. longipalpis</i>	Perro	
	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. shawi</i>	<i>Choloepus</i> spp., <i>Didelphis</i> spp., <i>Tamandua</i> spp.	
	<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. nuneztovari anglesi</i>	<i>Agouti paca</i>	
Brasil	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i> <i>Lu. whitmani</i>	<i>Choloepus</i> spp. <i>Tamandua</i> spp. <i>Didelphis</i> spp., <i>Proechimys</i> spp. <i>Proechimys</i> spp.	
	<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. longipalpis</i>	<i>Oryzomys</i> spp. <i>Wiedomys</i> spp.	
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. intermedia</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. complexa</i> <i>Lu. neivai</i> <i>Lu. edwardsi</i> <i>Lu. migonei</i>	Perro, <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon arviculoides</i> , <i>Bolomys</i> spp. <i>Nectomys</i> spp. <i>Thrichomys</i> spp.	
	<i>L. infantum</i>	IV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. cruzi</i> <i>Lu. almerio</i> <i>Lu. salesi</i>	Perro, <i>Lycalopex vetulus</i> , <i>Cedocyon thous</i> , <i>Didelphis albiventris</i> .	
	<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. ubiquitatis</i>	<i>Agouti paca</i>	
	<i>L. shawi</i>	LC	<i>Lu. whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> <i>Bradypus tridactylus</i> <i>Choloepus didactylus</i>	
	<i>L. naiffi</i>	LC	<i>Lu. squamiventris</i> <i>Lu. paraensis</i> <i>Lu. amazonensis</i> <i>Lu. ayraoi</i>	<i>Dasypus novemcinctus</i>	
	<i>L. lindenbergi</i>	LC	Desconocido	Desconocida	
	Colombia	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. colombiana</i> <i>Lu. pia</i> <i>Lu. towsendi</i>	Perro, <i>Akodon</i> spp., <i>Micoureus demerarae</i> , <i>Melanomys caliginosus</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> .
		<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. yuillii</i>	Perro <i>Choloepus hoffmanni</i> <i>Metachirus nudicaudatus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> , <i>Coendou</i> spp.

Pais o territorio	<i>Leishmania</i> spp.	Forma clínica	Vector (probado o sospechoso)	Reservorio animal (probado o sospechoso)
Colombia (continuación)	<i>L. guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. longiflocosa</i>	Desconocido
	<i>L. colombiensis</i>	LC	<i>Lu. hartmanni</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Desconocido
	<i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i>	LC LV	<i>Lu. colombiana</i> <i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	<i>Didelphis marsupialis</i> Perro <i>Didelphis marsupialis</i>
Costa Rica	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. trapidoi</i>	<i>Bradypus griseus</i> , <i>Choloepus hoffmanni</i> , <i>Heteromys desmarestianus</i>
	<i>L. mexicana</i>	LC, LM,	<i>Lu. olmeca olmeca</i> , <i>Lu. olmeca bicolor</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LCD	<i>Lu. youngi</i>	Desconocido
	<i>L. garnhami</i>	LC, LM	<i>Lu. youngi</i>	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LC LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Perro <i>Didelphis marsupialis</i>
República Dominicana	<i>L. mexicana*</i>	LCD	Desconocido	Desconocido
Ecuador	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	Desconocido	Desconocido
	<i>L. panamensis</i>	LC	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. hartmanni</i> <i>Lu. gomezi</i>	<i>Potus flavus</i> , <i>Tamandua tetradactyla</i> , <i>Sciurus vulgaris</i> <i>Choloepus didactylus</i>
	<i>L. guyanensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i>	LC, LCD LC, LCD	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>Sciurus</i> spp. Desconocido
El Salvador	<i>L. infantum</i>	LV, LC	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi*</i>	Perro
Estados Unidos de la América	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lu. anthophora</i> <i>Lu. diabolica</i>	<i>Neotoma</i> spp.
	<i>L. infantum</i>	Desconocido	Desconocido	Perro
Guyana Francés	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i>	<i>Choleopus didactylus</i> <i>Proechimys</i> spp. <i>Didelphis marsupialis</i>
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. intermedia</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>Proechimys</i> spp.
	<i>L. naiffi</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. lainsoni</i>	LC	Desconocido	Desconocido
Guatemala	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi**</i>	Perro
	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. ylephiletor</i>	<i>Rattus rattus</i>
	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Desconocido
Guyana	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i>	Desconocido
Honduras	<i>L. infantum</i>	LV, LC	<i>Lu. longipalpis</i>	Perro
	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. ylephiletor</i>	Desconocido

Pais o territorio	<i>Leishmania</i> spp.	Forma clinica	Vector (probado o sospechoso)	Reservorio animal (probado o sospechoso)
México	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. cruciata</i>	Desconocido
	<i>L. mexicana</i>	LC, LM, LCD	<i>Lu. olmeca olmeca</i> <i>Lu. cruciata</i> , <i>Lu. shannoni</i>	<i>Heteromys</i> spp. <i>Nyctomys</i> spp. <i>Oryzomys</i> spp. <i>Sigmodon</i> spp. <i>Peromyscus</i> spp.
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Pero
Nicaragua	<i>L. infantum</i>	LV, LC	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Pero
	<i>L. panamensis</i>	LC	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. cruciata</i> <i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
Panamá	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. sanguinaria</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>	<i>Choloepus hoffmanni</i>
	<i>L. braziliensis</i>	LC	<i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L. colombiensis</i>	LC	Desconocido	<i>Choloepus hoffmanni</i>
Paraguay	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. intermedia</i>	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i>	Pero
Perú	<i>L. peruviana</i>	LC, LM	<i>Lu. peruviana</i> <i>Lu. verrucarum</i> <i>Lu. ayacuchoensis</i>	Pero <i>Didelphis albiventris</i> <i>Phyllotis andinum</i> <i>Akodon</i> spp.
	<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. ubiquitatis</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. guyanensis</i>	LC, LM	Desconocido	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM, LCD	<i>Lu. tejadai</i> <i>Lu. pescei</i>	Desconocido
Surinam	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Desconocido
	<i>L. lainsoni</i>	LC	Desconocido	Desconocido
Venezuela	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. trinidadensis</i> <i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L. colombiensis</i>	LC	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>	Desconocido
	<i>L. venezuelensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. olmeca bicolor</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. reducta</i>	Desconocido
	<i>L. pifanoi</i>	LCD	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Desconocido
	<i>L. garnhami</i>	LC	<i>Lu. youngi</i>	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i> <i>Lu. pseudolongipalpis</i>	Pero
<i>L. guyanensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido	
Uruguay	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i>	Pero

(OPS, 2019)

Cuadro A2. Año, procedencia y resultado de caracterización por *hsp70* de las muestras utilizadas para este estudio.

Resultado caracterización por <i>hsp70</i>	ID	Año	Departamento de Guatemala
Posible infección mixta	GE-0216	1990	Petén
	GE-0222	1990	Petén
	GE-0591	1998	Petén
	GE-1083	2000	Petén
	GE-1088	2000	Alta Verapaz
	GE-1101	2000	Petén
	GE-1298	2007	Petén
	GE-2368	2008	Petén
	GE-2525	2009	Petén
	GE-2591	2016	Alta Verapaz
Indeterminada	GE-1120	2000	Petén
	GE-2602	2009	Izabal
<i>L. bra/L. nai</i>	GA-0201	1987	Baja Verapaz
	GA-0819	1995	Izabal
	GE-0306	1993	Petén
	GE-0454	1995	Petén
	GE-2502	2008	Petén
	GE-2631	2013	Alta Verapaz
<i>L. pan/L. guy</i>	GE-0078	1989	Petén
	GE-0095	1989	Alta Verapaz
	GE-0118	1989	Petén
	GE-0271	1993	Petén
	GE-0360	1994	Petén
	GE-2519	2008	Petén

*Cuadro A3. Composición de mezcla de reacción y programas utilizados para cada prueba de PCR*

Variante	MgCl <sub>2</sub> (mM)	dNTPs (mM)	Taq	Reactivo Q	Cebadores (uM)	ADN (ul)	Programa	Muestras**	Amplificación
PCR anidada	1.5 y 2*	0.25	Hotstart y Convencional, 1U	0 y 1X	0.2, 0.5, 0.8, 1	1 ul: concentrado, 1:10, 1:100	SSU + ITS	GE-2525 GE-1120 GE-0454 GE-2631 GE-0271	Nula
		1.65	Platinum, 0.5 U	-	0.8	1	SSU + ITS-221		Nula
PCR semi-anidada						SSUG + ITS	Nula		
PCR en gradiente						SSU-TD + ITS	Nula		
Touch-down PCR							SSU-TD + ITS-TD		Nula
							SSU-TD2 + ITS-TD		Nula
							SSU-TD3 + ITS-TD		Nula
							SSU-TD4 + ITS-TD		Nula
							SSU-TD + ITS-TD2		Nula
							SSU-TD2 + ITS-TD2		Nula
							SSU-TD3 + ITS-TD2		Nula
							SSU-TD4 + ITS-TD2		Nula
							ITS-TD		GE-2631
				1 y 2	1 ul concentrado, 1:2 y 1:10, y 2 ul concentrado	ITS-TD	GE-2631	Todas las diluciones de ADN para cebadores 1 uM	
				1	1	ITS-TD	GE-0216 GE-0222 GE-0591 GE-1083 GE-1088 GE-1101 GE-1298 GE-2368 GE-2525 GE-2591 GE-2700 GE-1120 GE-2602 GA-0201 GA-0819 GE-0306 GE-0454 GE-2502 GE-2631 GE-0078 GE-0095 GE-0118 GE-0271 GE-0360 GE-2519	GE-2631	

\*Dos opciones por cuadro significa que se probó la mezcla de reacción completa utilizando cada una de las dos variantes.

\*\* Para todas las pruebas se analizaron controles positivos para *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. mexicana*, y un control negativo de mezcla sin ADN.

Cuadro A4. Números de acceso de secuencias reportadas para el gen *its1* de especies de *Leishmania* spp. del Nuevo Mundo causantes de leishmaniasis cutánea

Especie de <i>Leishmania</i> spp.	Número de acceso GenBank	País de origen de la muestra	Organismo del que se recolectó la muestra
<i>L. braziliensis</i>	KY249639.1	Brasil	Humano
	KY249638.1	Brasil	Humano
	KY249637.1	Brasil	Humano
	KY249636.1	Brasil	Humano
	KY249635.1	Brasil	Humano
	KY249634.1	Brasil	Humano
	KY249633.1	Brasil	Humano
	MH382108.1	Brasil	Perro
	MH382107.1	Brasil	Perro
	MH231225.1	Brasil	Perro
	MH231224.1	Brasil	Perro
	MF802824.1	Brasil	Humano
	MF802823.1	Brasil	Humano
	MF802822.1	Brasil	Humano
	MF802821.1	Brasil	Humano
	MF802820.1	Brasil	Humano
	MF802819.1	Brasil	Humano
	MF802818.1	Brasil	Humano
	MF802817.1	Brasil	Humano
	MF802815.1	Brasil	Humano
	MF802814.1	Brasil	Humano
	MF802813.1	Brasil	Humano
	MF802812.1	Brasil	Humano
	KU550594.1	Argentina	Humano
	KU550593.1	Argentina	Humano
	KU550592.1	Argentina	Humano
	KU550591.1	Argentina	Humano
	KU550590.1	Argentina	Humano
	KU550589.1	Argentina	Humano
	KU550588.1	Argentina	Humano
	KU550587.1	Argentina	Humano
	KU550586.1	Argentina	Humano
	KP274863.1	Brasil	Perro
	HG512966.1	Perú	Humano
	HG512942.1	Brasil	Humano
	HG512940.1	Brasil	Humano
	HG512938.1	Bolivia	Humano
	HG512937.1	Perú	Humano
	HG512930.1	Perú	Humano
	HG512929.1	Colombia	Humano
	HG512901.1	Perú	Humano
	HG512898.1	Perú	Humano
	JN936955.1	Brasil	Humano
	MN508061.1	Brasil	Humano
	MG136700.1	Brasil	Humano
	MG136699.1	Brasil	Humano
MG136698.1	Brasil	Humano	
MG136697.1	Brasil	Humano	
MG136696.1	Brasil	Humano	
KF985166.2	Brasil	Humano	
JX030146.1	Brasil	Humano	
JX030145.1	Brasil	Humano	
JX030144.1	Brasil	Humano	
JX030143.1	Brasil	Humano	

<b>Especie de <i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Número de acceso GenBank</b>	<b>País de origen de la muestra</b>	<b>Organismo del que se recolectó la muestra</b>	
<i>L. braziliensis</i>	JX030142.1	Brasil	Humano	
	JX030141.1	Brasil	Humano	
	JX030094.1	Brasil	Humano	
	JX030093.1	Brasil	Humano	
	JX030092.1	Brasil	Humano	
	JX030091.1	Brasil	Humano	
	JX030090.1	Brasil	Humano	
	JX030089.1	Brasil	Humano	
	JX448549.1	Argentina	Humano	
	JX448548.1	Argentina	Humano	
	JX448547.1	Argentina	Humano	
	FN398338.1	Brasil	Humano	
	FN398337.1	Perú	Humano	
	FN398336.1	Perú	Humano	
	FN398335.1	Brasil	Humano	
	FN398334.1	Paraguay	Humano	
	FN398333.1	Perú	Humano	
	DQ182537.1	Brasil	Humano	
	JQ061322.1	Brasil	Humano	
	AJ300484.1	Colombia	Humano	
	AJ300483.1	Brasil	Humano	
	<i>L. mexicana</i>	MH885526.1	México	Humano
		KY769940.1	Ecuador	Humano
		AB558251.1	Venezuela	Humano
		AB558250.1	Venezuela	Humano
		AB558249.1	Venezuela	Humano
		AB558248.1	Venezuela	Humano
		AB558247.1	Venezuela	Humano
		AB558246.1	Venezuela	Humano
		AB558245.1	Venezuela	Humano
		AB558244.1	Venezuela	Humano
		AB558243.1	Venezuela	Humano
		AB558242.1	Venezuela	Humano
AB558241.1		Venezuela	Humano	
AB558240.1		Venezuela	Humano	
AB558239.1		Venezuela	Humano	
AB558238.1		Venezuela	Humano	
HG512965.1		Perú	Humano	
HG512934.1		Ecuador	Humano	
HG512931.1		México	Humano	
HG512912.1		Brasil	Humano	
HM163470.1		México	Humano	
KU177477.1		México	Humano	
AF466383.1		Brasil	Humano	
AF466382.1		México	Humano	
AF466381.1		México	Humano	
AF466380.1		México	Humano	
AF339752.1		Venezuela	Humano	
<i>L. panamensis</i>	HG512959.1	Costa Rica	Humano	
	FJ948446.1		Humano	
	FJ948445.1		Humano	
	FJ948444.1		Humano	
	FJ948443.1		Humano	
	FJ948442.1		Humano	
	FJ948441.1		Humano	
	FJ948440.1		Humano	
	FJ948439.1		Humano	

<b>Especie de <i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Número de acceso GenBank</b>	<b>País de origen de la muestra</b>	<b>Organismo del que se recolectó la muestra</b>	
<i>L. panamensis</i>	FJ948438.1		Humano	
<i>L. guyanensis</i>	MF802816.1	Brasil	Humano	
	HG512961.1	Guyana Francesa	Humano	
	HG512960.1	Guyana Francesa	Humano	
	HG512935.1	Ecuador	Humano	
	HG512915.1	Colombia	Humano	
	HG512905.1	Guyana Francesa	Humano	
	HF968630.1	Grecia	Humano	
	FN398332.1	Perú	Humano	
	FN398331.1	Brasil	Humano	
	FN398330.1	Perú	Humano	
	FN398329.1	Brasil	Humano	
	<i>L. naiffi</i>	KY769937.1	Ecuador	Humano
		HG512950.1	Guyana Francesa	Humano
HG512939.1		Costa Rica	Humano	
HG512903.1		Brasil	Humano	
FN398152.1		Brasil	Humano	
	DQ182543.1	Brasil	Humano	

**Figura A1. Alineamiento múltiple de secuencias para cada cebador utilizado. Los alineamientos se realizaron para todas las secuencias disponibles para el gen *its1* de cada especie de interés reportadas en estudios previos, utilizando el software ClustalW. Los guiones representan espacios insertados por el programa para obtener un mejor alineamiento.**

Cebador 221 y <i>L. tropica</i>		
cebador221	-----GGTTCCTTTCTGATTACG-----	20
HG512927.1	-----	290
HG512925.1	-----	289
HG512922.1	-----	280
HG512919.1	-----	287
FN677345.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	470
FN677343.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	470
FN677341.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	470
AB787190.1	-----	283
AB787189.1	-----	281
LC342871.1	-----	37
LC342870.1	-----	37
LC342867.1	-----	37
LC342866.1	-----	37
LC342865.1	-----	37
LC342864.1	-----	37
LC342863.1	-----	38
AJ300485.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	367
MG755821.1	-----	240
MG755820.1	-----	241
MG755819.1	-----	211
JX289881.1	GATAAAAAAAAA-----	296
JX289870.1	GTATCAAAAA-----	297
JX289854.1	-----	278
MH347951.1	TATCAAAA-TCA-----	298
MH347950.1	-----	397
MH347949.1	GTATAAAAAACAA-----	300
MH347948.1	-----	456
MH347947.1	-----	391
MH347946.1	-----	339
MH347945.1	-----	302
MH347944.1	GTATCAAAATCAAA-----	297
MH347943.1	-----	358
MH347942.1	-----	390
MH347941.1	GTATCAAAATCAA-----	302
MH347940.1	-----	371
MH347939.1	TATCAAAA-TCAAA-----	301
MH347938.1	-----	298
MH347937.1	GTATCAAAATCAAA-----	301
MH347936.1	-----	404
MH347935.1	-----	403
MH347934.1	-----	0
MH347933.1	-----	361
MH347932.1	-----	302
MH347931.1	GTATCAAAATCAAA-----	301
MH347930.1	-----	299
MH347929.1	CGGGGAGGCTTATTCTATATAT--ATATAGTATAGGCTTTTCCACATACACAGCAAAC	131
MH347928.1	-----	380
MG515730.1	-----	273
MG515729.1	-----	278
MG515728.1	-----	276
KY524300.1	-----	212
KU194963.1	GGTATCAA-----	322
KU194956.1	GGTATCAA-----	322
KU194945.1	GTATCAA-----	327
KU194940.1	GGTATCAA-----	322
KU194938.1	GGTATCAA-----	322
KU194937.1	GTATCAA-----	320
KU194936.1	GTATCAA-----	327
KU194932.1	GGTATCAA-----	322
KU194931.1	GTATCAA-----	319
KU194930.1	GGTATCAA-----	322
KU194929.1	GTATCAA-----	326

KU194928.1	GTATCAA-----	327
KU194927.1	GGTATCAA-----	322
KU194926.1	GTATCAA-----	327
KU194925.1	GGTATCAA-----	322
KU194924.1	GTATCAA-----	327
KU194923.1	GGTATCAA-----	322
KC609747.1	-----	275
JX827424.1	-----	238
JQ517279.1	ATAGCC-----	59
JQ229828.1	ATAGCC-----	61
EU683618.1	G-----	300
EU683617.1	-----	300
HM101131.1	-----	241
KP335147.1	-----	295
KP335146.1	-----	295
KP335145.1	-----	294
KP335144.1	-----	295
KP335143.1	-----	295
KP335142.1	-----	294
KP335141.1	-----	294
KP335140.1	-----	295
KP335139.1	-----	295
KP335138.1	-----	294
KP335137.1	-----	294
KP335136.1	-----	295
KP335135.1	-----	294
KP335134.1	-----	294
KP335133.1	-----	295
KP335132.1	-----	294
KP335131.1	-----	295
KP335130.1	-----	294
KP335129.1	-----	294
KP335128.1	-----	295
KP335127.1	-----	294
MF612154.1	-----	257
KU680854.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	380
KU680853.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	382
KU680852.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	379
KU680851.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	376
KU680850.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	375
KU680849.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	380
KR706374.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAGCGCGCATGGGGCACGGGAGAA	383
KP893242.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	377
KC686338.1	GGTATCAA-----	291
KC679052.1	GTATCAA-----	291
KC145161.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	340
KC145160.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	339
KC145159.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	339
KC145158.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAAGGGCGCATGGGAGAA	340
KC145157.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	341
KC145156.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	339
KC145155.1	GTATCAATTGCAAAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCAGGGGAGAA	339
JX289851.1	TGATAAAAAACAAA-----	282
JX289850.1	TGATAAAAAACAAA-----	298
JX289849.1	TGATCAAAAAACAAA-----	293
JX289848.1	TGATAAAAAACAAA-----	296
JX289846.1	-----	268
JX289845.1	-----	271
JN860725.1	GTATAAAATAAA-----	296
JN860724.1	GTATAAAAAAAA-----	294
JN860723.1	-----	261
JN860722.1	AAT-----	304
JN860719.1	-----	276
JN860717.1	-----	273
JN860716.1	-----	222
JN860715.1	-----	272
JN005822.1	-----	281
JN005821.1	-----	284
HM004586.1	GTATCA-----	325
EU604811.1	GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA	344
EF095751.1	-----	304

HM060590.1 ----- 306  
 HM060589.1 ----- 306  
 HM060588.1 ----- 306  
 KJ420585.1 GGTATCAT----- 322  
 KJ420584.1 GGTATCA----- 317  
 KJ420583.1 GGTATCA----- 320  
 KJ420582.1 GGTATCA----- 320  
 EU482829.1 ----- 232  
 EU871037.1 GTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAA 342  
 GQ332363.1 CGGGAGTGGTTCTTTCTGATTTACGCATGTCATGCATG--CCAGGGGGCGTCCGTGAT 821

Cebador 332 y *L. tropica*

cebador332 ----- **GGCC-GGTAAAGGCCGAATAG** 20  
 HG512927.1 ----- 0  
 HG512925.1 ----- 0  
 HG512922.1 ----- 0  
 HG512919.1 ----- 0  
 FN677345.1 CGAAAGTTCACCG-----ATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAG 56  
 FN677343.1 CGAAAGTTCACCG-----ATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAG 56  
 FN677341.1 CGAAAGTTCACCG-----ATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAG 56  
 AB787190.1 ----- 0  
 AB787189.1 ----- 0  
 LC342871.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342870.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342867.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342866.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342865.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342864.1 -----GCTCACATAACGTGT----- 15  
 LC342863.1 -----AGCTCACATAACGTGT----- 16  
 AJ300485.1 ----- 0  
 MG755821.1 ----- 0  
 MG755820.1 ----- 0  
 MG755819.1 ----- 0  
 JX289881.1 ----- 0  
 JX289870.1 ----- 0  
 JX289854.1 ----- 0  
 MH347951.1 ----- 0  
 MH347950.1 CCCACTTTCGCGTTCTTTAACGAAAAGGAAGCCAGGGCAGTCATCCGACACGTGCAAAGC 75  
 MH347949.1 ----- 0  
 MH347948.1 CCCACGTCC-TGCGTTTAAACG-AAACA---C-CGCTCAATC-ACCCACGCAAACGTGAT 136  
 MH347947.1 -----ACCCGCTACACGCT-GGTAAAGGC----- 70  
 MH347946.1 -----TTTTTTATTGGA 12  
 MH347945.1 ----- 0  
 MH347944.1 ----- 0  
 MH347943.1 -----AAGAAATAGAGG---C-CAGTCTTCC-ACCCCAA--CACGGATG 37  
 MH347942.1 CCCCCCTGGGCCTTTTGTACTCCCCCCTGCGCTCTTAC--AAGGGGGCAGGCACC 59  
 MH347941.1 ----- 0  
 MH347940.1 ----- 81  
 MH347939.1 ----- 0  
 MH347938.1 ----- 0  
 MH347937.1 ----- 0  
 MH347936.1 CACCCTTTTGCCCTTTTAAACAACCCCCCGCTCTCCCGAAAAAGAGGGGCATCCC 72  
 MH347935.1 CCCTTTTCC-CCGTTCTCACCAAATAGAAGCCAGGCCTCCCTCGCGCCACGGGTCAAAA 75  
 MH347934.1 ----- 0  
 MH347933.1 -----TTTTTCTCTATATCCC-C-CCCCGCTCCTCCCCAA--AAAAAAA 43  
 MH347932.1 ----- 0  
 MH347931.1 ----- 0  
 MH347930.1 ----- 0  
 MH347929.1 ----- 0  
 MH347928.1 CCCTCCTCCCCGCTCTCAACGAACGCG---C-AATCATTG-ACCGCCAC---CGTTCT 57  
 MG515730.1 ----- 0  
 MG515729.1 ----- 0  
 MG515728.1 ----- 0  
 KY524300.1 ----- 0  
 KU194963.1 ----- 0  
 KU194956.1 ----- 0  
 KU194945.1 ----- 0  
 KU194940.1 ----- 0  
 KU194938.1 ----- 0  
 KU194937.1 ----- 0

KU194936.1	-----	0
KU194932.1	-----	0
KU194931.1	-----	0
KU194930.1	-----	0
KU194929.1	-----	0
KU194928.1	-----	0
KU194927.1	-----	0
KU194926.1	-----	0
KU194925.1	-----	0
KU194924.1	-----	0
KU194923.1	-----	0
KC609747.1	-----	0
JX827424.1	-----	0
JQ517279.1	-----	53
JQ229828.1	-----	55
EU683618.1	-----	0
EU683617.1	-----	0
HM101131.1	-----	0
KP335147.1	-----	0
KP335146.1	-----	0
KP335145.1	-----	0
KP335144.1	-----	0
KP335143.1	-----	0
KP335142.1	-----	0
KP335141.1	-----	0
KP335140.1	-----	0
KP335139.1	-----	0
KP335138.1	-----	0
KP335137.1	-----	0
KP335136.1	-----	0
KP335135.1	-----	0
KP335134.1	-----	0
KP335133.1	-----	0
KP335132.1	-----	0
KP335131.1	-----	0
KP335130.1	-----	0
KP335129.1	-----	0
KP335128.1	-----	0
KP335127.1	-----	0
MF612154.1	-----	0
KU680854.1	-----	0
KU680853.1	-----	0
KU680852.1	-----	0
KU680851.1	-----	0
KU680850.1	-----	0
KU680849.1	-----	0
KR706374.1	-----	0
KP893242.1	-----	0
KC686338.1	-----	0
KC679052.1	-----	0
KC145161.1	-----	0
KC145160.1	-----	0
KC145159.1	-----	0
KC145158.1	-----	0
KC145157.1	-----	0
KC145156.1	-----	0
KC145155.1	-----	0
JX289851.1	-----	0
JX289850.1	-----	0
JX289849.1	-----	0
JX289848.1	-----	0
JX289846.1	-----	0
JX289845.1	-----	0
JN860725.1	-----	0
JN860724.1	-----	0
JN860723.1	-----	0
JN860722.1	-----	0
JN860719.1	-----	0
JN860717.1	-----	0
JN860716.1	-----	0
JN860715.1	-----	0

JN005822.1 ----- 0  
 JN005821.1 ----- 0  
 HM004586.1 ----- 0  
 EU604811.1 ----- 0  
 EF095751.1 -----TTTCTTCAATAGAGGAAGC-----AAAAGTCGTAA 30  
 HM060590.1 ----- 0  
 HM060589.1 ----- 0  
 HM060588.1 ----- 0  
 KJ420585.1 ----- 0  
 KJ420584.1 ----- 0  
 KJ420583.1 ----- 0  
 KJ420582.1 ----- 0  
 EU482829.1 ----- 0  
 EU871037.1 ----- 0  
 GQ332363.1 GCTTGTTCGGCGTCTTTTACGAACAACGCCCCATCAGCT-GGTGATGGCCGTGTAGT 359

Cebador LITSR y *L. tropica*

cebadorLITSR -----CTGGATCATTTCGGATC----- 18  
 MG694422.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694421.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694420.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694419.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694418.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694417.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694416.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694415.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694414.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694413.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694412.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694411.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694410.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694409.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694408.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694407.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694406.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694405.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694404.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694403.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694402.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694401.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694400.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694399.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694398.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694397.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694396.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694395.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694394.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694393.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694392.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694391.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694390.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694389.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694388.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694387.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694386.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694385.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694384.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MG694383.1 -----CACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 KY964634.1 -----GATTACACCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 35  
 KY964633.1 -----GATTACC--CCCCAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 36  
 KY964632.1 -----GATTACACCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 38  
 MH492002.1 -----ACATATACAAAACTCGG 17  
 MH488993.1 -----ACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MH488992.1 -----ACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 33  
 MH347951.1 -----TCCGTAACCATATACACATCTCTGCG 27  
 MH347950.1 GGTCT-GGTTTTTT-TTTC-GTGGATCCACCCCCCAAAAAAAAAACATTTCCAGGACTCGG 155  
 MH347949.1 -----CCACCAAAATATATACACCTCTCTCG 27  
 MH347948.1 TTTCT-GGATCATT-TTTC-GATGATTACACCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACTCGG 216  
 MH347947.1 TCCGGGCTCGGGGCCCGTGGGTGATT-CCACCCCAACATA---TACACAT-CTACGGG 147  
 MH347946.1 GTGTGCAAAACACTCTTCGCGAGTCGCCCCCAACAAATAAAACATATAGCACACTCGC 97

MH347945.1	TCGGTTTCGGTTTTTTTTTTGTTGATTCCCCCCCCCAAAAAAATATACAAAAGTCGG	61
MH347944.1	-----ACGCGAACTATATACACCTCTCGG	24
MH347943.1	TTTTG-GGTCTTTT-TTGG-GGGTTTCCCCCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	118
MH347942.1	CTTTCGGTTTTC----TTTTCCCGATGGTTTTCCCCCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	144
MH347941.1	-----CC-CCAAAAAATATATAAAATCTCGCG	29
MH347940.1	GGCCGGGTCGGGTCCATTCCGAGGCTT-AAGCCCCAAAAAATATACAAA-ATTCGGG	141
MH347939.1	-----ACACAACTATATATACATCTCTGCG	27
MH347938.1	-TTCG-GGTCTTTT-TTCG-GAGGTTTCCCCCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	56
MH347937.1	-----CCAACCAAAATATACACCTCTCTGCG	27
MH347936.1	GTC----CGGGATCCGGTCCCAGGGATGCCTCCACAC--ACACACATATACAAAATCTCGG	157
MH347935.1	TTTCTGGATTCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	163
MH347934.1	---TTTGGGGGCCCTTTTTTGTGTGT-CCACACACACATTT---TTTTACC-----	45
MH347933.1	GTGA--AAAACCCGGGCCCAACGTCCAGGCGCCGAAAAAATATATCCAGAGTCGG	121
MH347932.1	---TTCGGTTT---CTTTTTTCGGTGGTTTTCCCCCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	53
MH347931.1	-----ACCCGAAAATATACACCTCTCTGCG	27
MH347930.1	GTCTC-GTTTTCTT-TTTG-ATGATTCCACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	58
MH347929.1	--CCCTCTGGATCATTTCGATGATT-ACACCCCAAAAAAC---ATATACA-ACTCGGG	77
MH347928.1	CTGGA-TCATTTTT-TCCG-ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	134
MF977312.1	-----TTACCCCAAAAAAATATACAGAACTCGG	33
KX808125.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	55
KJ364131.1	-----TACACCCCAAAAA-AAACATATACAAAACCTCGGG	36
KJ364130.1	-----GATTACCCCAAAAA-AAACATATACAAAACCTCGGG	36
KJ364129.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGGG	53
KJ364128.1	-----AAATCGGGG	9
JX560482.1	-----GAACACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
JX560481.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
JX560480.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	37
JX560479.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
JX560478.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
JX560477.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	37
JX560476.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	37
JX560475.1	-----GAACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KJ002554.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACA--CCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	51
KM393220.1	-----TGGCTCATTTTCCGAAGATTACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	52
KJ002559.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGGG	53
JX289881.1	-----CAAAGGACATCTGGGGATCTCGG	23
JX289870.1	-----CGGGTTGGTGAATAACAAAACCTCGCG	27
JX289854.1	-----CCGATT-GGGGAAC-----AACAAAG-ATATCGG	27
GQ913688.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACA--CCCCAAAAAATATACAAAACCTCGG	53
KC505440.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505439.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505438.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	40
KC505437.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	40
KC505436.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505435.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505434.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	40
KC505433.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505432.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	40
KC505431.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505430.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	40
KC505429.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505428.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	37
KC505427.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505426.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505425.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505424.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505423.1	-----ATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
KC505422.1	-----ATGATTCCCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	36
MH763643.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACA--CCCCAAAAAATATACAAAACCTCGG	53
MF197904.1	-----	0
MF197903.1	-----	0
MF197902.1	-----	0
MF197901.1	-----	0
MF197900.1	-----	0
MF197899.1	-----	0
KY963132.1	--T---CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAAA-AAACAT--ATACAACCTCGGG	51
KY963131.1	--T---CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAAA-AAACATATACAAAACCTCGGG	53
KY963130.1	-TT---CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAAA-AAACATATACAAAACCTCGGG	54
MF926263.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACA--C-CCAAAAAATATACAAAACCTCGG	52
MF926261.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	55
MF926257.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAATATACAAAACCTCGG	55

MF926256.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	55
MF926255.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	55
KX890198.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890197.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890196.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890195.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890194.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890193.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890192.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890191.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890190.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KX890189.1	-----ACACCCCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	34
KY974310.1	-GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATT--ACACCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KY612611.1	-----	0
KY612610.1	-----	0
KY612609.1	-----	0
KY612608.1	-----AGAACTCGG	9
KX380988.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KX380987.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KT376744.1	-----	0
KT376743.1	-----	0
KT376742.1	-----	0
KT376741.1	-----	0
KT376740.1	-----CGACTTTGTTAGRTACCACAAAAAAAAAACAATCAGGCTCGG	42
KT376739.1	-----	0
KT376738.1	-----	0
KT376737.1	-----	0
KT376736.1	-----	0
KT376735.1	-----GCCT-GCAT-----TACTACA-TATTGGG	22
KT363799.1	TCTGTGCTTTGTTTCTTTTTCGTTGTTTTCCTCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	64
KT363798.1	--GTAGTGGGATCACTTTTCGAAGATT-ACACCCCCAAAACA---AATACAA-ATCGGGG	57
KT363797.1	GCTGAAGAGGGTTCGTTTTGCGATGTTTACTGCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	64
KT363796.1	TCGGAAGATAGGTGGTTTTGCGTTGTTTTCTCCCGAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	62
KT363795.1	GTGGAAGATGGGTGGCTTTGCGTTGTTTTGCCCCAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	64
KT363794.1	CATGGAGGTGGCTTGTTTTTGCGTTGTTTACCACCGAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	64
KT363793.1	AA-GTTGATGG-CAAGATGACCTTTTT-T--TACATATAAAAAAGCCTCCTAT-TAGGAGG	102
KT363792.1	TTCTCCCTGCTCCGTTTGGCTTCA-----AG	78
KT363791.1	TTGCTGTTGGTTCTTTTTTTTGTTC-ACACCCCCAAAAAAAAACAGATGCAAACTGGG	64
KT363790.1	AA-GTTCACGG-CAAGATGACCTTTTT-T--TACATATAAAAAAGCCTCCTAT-TAGGAGG	95
KT363789.1	GTGGAGGCGGCTTGTTTTTGCGTTGTTTCAACACCCAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	65
KT363788.1	CTGCAGCTTGTTCCTTTTCGACGCTC-AAAAAAAAAAAAAAAAACATATGCAGGACTCGG	65
KT363787.1	ATTCGCTGGGTCATGTTTTGAACGATAAAAA-CAAAAAAAAAACATATACAAAAGTCCG	66
KT363786.1	-----TTGTGATGAGCACACATA-AAAAAAAAACATATACAAAGTGGG	45
KT363785.1	TCGG----TCCTCATTCCTCGATACACMCACAAACCAAAAAAAAAAAAAATAGAAAAGCGC	56
KT363784.1	TGCGCGGTGGG-CGAGAGGCGGTAAC- GAATGATCAGCAATGTTTCC-AA-AACAAGA	115
KT363783.1	TTGCAGCTGGGTCATTTTCCGATGAAAACACC-CAAAAAAAAAATATACAAAACCTCGG	64
KT363782.1	RTATATGCAGAAGAGGGGGGGGGGTTTTTTTTTAAAAACACAATAAATATCGCGG	63
KT363781.1	TTCC-----CTCTGGCCGTTT-GGTTT-----GAAG	79
KT363779.1	TATGAAAACGGATGAGTTTTAATGGAGTGCGCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	63
KT363778.1	GTGCAGCTGGCTCGGTTGTTTGCCTCAAAAC-CAAAAAAAAAAAATATACAGGTGTCGG	65
KT363777.1	ATATCAGATGGGTCGTTTTTCGATGATTATAGCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	66
KT363776.1	GTGGTGTGAGTCCCTTTTTTTCGCC-CAACCCCAAAAAAAAAACATATACAGGAGTCCG	65
KT363775.1	ATGGGGCGTTTTGGGTTTTTTTCGCC-AAAAAAAAAAAAAAAAACATATGCAGGAGTCCG	67
KT363774.1	TTGTAGCGGGTCATTTTGGAGGGGACACACCCCAAAAATACAAATATACTACACTCGG	64
KT363773.1	TATTTGTCGGGGGAGGGGGGGGATTTTTTTTTTAAATATACAATATACAATACTCGG	63
KP689599.1	-----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	53
KM454156.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454155.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454154.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAGAACTCGG	56
KM454153.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454152.1	CAG----CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAACATACACAAAACCTCGGG	56
KM454151.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454150.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454149.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454148.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	57
KM454147.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAGAACTCGG	56
KM454146.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAGAACTCGG	56
KM454145.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454144.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAACATATACAGAACTCGG	56
KM454143.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KM454142.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56

KM454141.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCC--AAAAAACATATACAAAACCTCGG	55
KP202115.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAGAACCTCGG	56
KP202114.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAGAACCTCGG	56
KP202113.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAGAACCTCGG	56
KP202112.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56
KP202111.1	---GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCCAAA-AAAAAACATATACAAAACCTCGG	56

Cebador L5.8S y *L. tropica*

cebador5.8	-----TGATACCACTTAT	13
MG694422.1	-----	0
MG694421.1	-----	0
MG694420.1	-----	0
MG694419.1	-----	0
MG694418.1	-----	0
MG694417.1	-----	0
MG694416.1	-----	0
MG694415.1	-----	0
MG694414.1	-----	0
MG694413.1	-----	0
MG694412.1	-----	0
MG694411.1	-----	0
MG694410.1	-----	0
MG694409.1	-----	0
MG694408.1	-----	0
MG694407.1	-----	0
MG694406.1	-----	0
MG694405.1	-----	0
MG694404.1	-----	0
MG694403.1	-----	0
MG694402.1	-----	0
MG694401.1	-----	0
MG694400.1	-----	0
MG694399.1	-----	0
MG694398.1	-----	0
MG694397.1	-----	0
MG694396.1	-----	0
MG694395.1	-----	0
MG694394.1	-----	0
MG694393.1	-----	0
MG694392.1	-----	0
MG694391.1	-----	0
MG694390.1	-----	0
MG694389.1	-----	0
MG694388.1	-----	0
MG694387.1	-----	0
MG694386.1	-----	0
MG694385.1	-----	0
MG694384.1	-----	0
MG694383.1	-----	0
KY964634.1	-----	0
KY964633.1	-----	0
KY964632.1	-----	0
MH492002.1	-----	0
MH488993.1	-----	0
MH488992.1	-----	0
MH347951.1	-----	0
MH347950.1	CAGTCATCCGA-----CACGTGCAAAGCCGGCTCCAGCA---CTG--GGCGGGTTTG	99
MH347949.1	-----	0
MH347948.1	CACCCACGCA-----A--ACG-TGA-TGTGGGCCAATA---AAC--AGCAGGAAAT	160
MH347947.1	CT-----ACA-CGCTGGTAAAGGCGGGCGTGCAATAAAAAGCGGAAT-----CCG	96
MH347946.1	-----TTTTTTATTGGAGCCCAAGCCATCC---ATC--CCCGACACGG	38
MH347945.1	-----	TT 2
MH347944.1	-----	0
MH347943.1	CTTCCACCC-----AACACG-GATGCCCCCTGATCC---ACA--AACGGCGGTT	62
MH347942.1	CTTACAAGGG-----GGGCAGGCACCTCCCACCCGGGAGCAAGCG--GGCCCAAACC	89
MH347941.1	-----	0
MH347940.1	ATCA---TCG-CGAA-----CGTGCAAAGCG---TGCTCCAAGCCCTGGG	85
MH347939.1	-----	0
MH347938.1	-----	0
MH347937.1	-----	0

MH347936.1	CTCCCGAAAAAGAGGGGCA---TCCCCCCCCGGAAGGCGGGGCAGG--AACCAAAGGG 104
MH347935.1	CTCCCTCGCGCCACGGGTCAAAGCCCCGGCCCAATCAC-----CGG--GCCGGGTCGT 104
MH347934.1	GGGCCCTTTTT-TGTGTGTCCA----- 27
MH347933.1	CTCCTCCCA-----AAAAAAAAACCAAGC--ACCTC--CCCCCCCCGG 64
MH347932.1	----- 0
MH347931.1	----- 0
MH347930.1	-----GG 2
MH347929.1	-----TCCTCCCGACCCTCCCCCCCC 22
MH347928.1	CATTCACCGC-----C-----ACCGTTCTTTTACCAG---CCA--ACACGGTTTC 78
MF977312.1	----- 0
KX808125.1	----- 0
KJ364131.1	----- 0
KJ364130.1	----- 0
KJ364129.1	----- 0
KJ364128.1	----- 0
JX560482.1	----- 0
JX560481.1	----- 0
JX560480.1	----- 0
JX560479.1	----- 0
JX560478.1	----- 0
JX560477.1	----- 0
JX560476.1	----- 0
JX560475.1	----- 0
KJ002554.1	----- 0
KM393220.1	----- 0
KJ002559.1	----- 0
JX289881.1	----- 0
JX289870.1	----- 0
JX289854.1	----- 0
GQ913688.1	----- 0
KC505440.1	----- 0
KC505439.1	----- 0
KC505438.1	----- 0
KC505437.1	----- 0
KC505436.1	----- 0
KC505435.1	----- 0
KC505434.1	----- 0
KC505433.1	----- 0
KC505432.1	----- 0
KC505431.1	----- 0
KC505430.1	----- 0
KC505429.1	----- 0
KC505428.1	----- 0
KC505427.1	----- 0
KC505426.1	----- 0
KC505425.1	----- 0
KC505424.1	----- 0
KC505423.1	----- 0
KC505422.1	----- 0
MH763643.1	----- 0
MF197904.1	----- 0
MF197903.1	----- 0
MF197902.1	----- 0
MF197901.1	----- 0
MF197900.1	----- 0
MF197899.1	----- 0
KY963132.1	----- 0
KY963131.1	----- 0
KY963130.1	----- 0
MF926263.1	----- 0
MF926261.1	----- 0
MF926257.1	----- 0
MF926256.1	----- 0
MF926255.1	----- 0
KX890198.1	----- 0
KX890197.1	----- 0
KX890196.1	----- 0
KX890195.1	----- 0
KX890194.1	----- 0
KX890193.1	----- 0
KX890192.1	----- 0

```

KX890191.1 ----- 0
KX890190.1 ----- 0
KX890189.1 ----- 0
KY974310.1 ----- 0
KY612611.1 ----- 0
KY612610.1 ----- 0
KY612609.1 ----- 0
KY612608.1 ----- 0
KX380988.1 ----- 0
KX380987.1 ----- 0
KT376744.1 ----- 0
KT376743.1 ----- 0
KT376742.1 ----- 0
KT376741.1 ----- 0
KT376740.1 ----- 0
KT376739.1 ----- 0
KT376738.1 ----- 0
KT376737.1 ----- 0
KT376736.1 ----- 0
KT376735.1 TGAGCTGTTTG-CGTTCAAAGATTCGGTAATGAACGGACCTC----- 95
KT363799.1 -----TGTTT 5
KT363798.1 -----TAGTGGGATCACTTTT 21
KT363797.1 -----TGTTG 5
KT363796.1 -----TTT 3
KT363795.1 -----TTTGT 5
KT363794.1 -----TGTGC 5
KT363793.1 ACAAAAA-GTT-GATGGCAAGATGACCTTTTTT--TACATATAAAAAG----- 87
KT363792.1 CTGCTCCGTTT-GCGTTCAAGAAACGGAAATGAATGATTCTG-CATTGATACCTCTTAT 116
KT363791.1 -----TGGTCT 6
KT363790.1 AGAAKAA-GTT-CACGGCAAGATGACCTTTTTT--TACATATAAAAAG----- 80
KT363789.1 -----TTTATT 6
KT363788.1 -----TTGCGGC 7
KT363787.1 -----TTTGTGTA 8
KT363786.1 ----- 0
KT363785.1 -----T 1
KT363784.1 AGACCTGCGCG-GTGGCGGAGAGGCGTAACGAATGATCAGCAAATG----- 101
KT363783.1 -----TGCTGT 6
KT363782.1 -----TTTR 4
KT363781.1 CTGGCCGTTTG-CGTTCGAAGATTCGGTTATTGAATGAGTCTACAATTGATACCCTTAT 118
KT363779.1 -----TTTT 4
KT363778.1 -----TTGCCTG 7
KT363777.1 -----TTTTTTA 7
KT363776.1 -----TTCTTTG 7
KT363775.1 -----TATTTGTA 9
KT363774.1 -----TTATT 5
KT363773.1 -----TTAT 4
KP689599.1 ----- 0
KM454156.1 ----- 0
KM454155.1 ----- 0
KM454154.1 ----- 0
KM454153.1 ----- 0
KM454152.1 -----GC 2
KM454151.1 ----- 0
KM454150.1 ----- 0
KM454149.1 ----- 0
KM454148.1 ----- 0
KM454147.1 ----- 0
KM454146.1 ----- 0
KM454145.1 ----- 0
KM454144.1 ----- 0
KM454143.1 ----- 0
KM454142.1 ----- 0
KM454141.1 ----- 0
KP202115.1 ----- 0
KP202114.1 ----- 0
KP202113.1 ----- 0
KP202112.1 ----- 0
KP202111.1 ----- 0

```

Cebador 221 y *L. major*

primer221	GGTTCCTTTCCTGATTACG	20
AJ272383.1	GACAAGTCAGAGTTGGACA---AATACACACGCGTGTGCAC-----	595
HG512963.1	-----	300
HG512962.1	-----	300
HG512958.1	-----	300
HG512954.1	-----	300
HG512952.1	-----	300
HG512945.1	-----	300
HG512924.1	-----	302
HG512914.1	-----	300
HG512910.1	-----	300
HG512909.1	-----	300
HG512906.1	-----	300
FN677357.1	-----	481
FN677342.1	-----	483
LC342872.1	GACAAGTCAGAGTTGGAC---AAATACACACGCGTGTGCACTCTCTTTTG-----	408
LC342869.1	GACAAGTCAGAGTTGGAC---AAATACACACGCGTGTGCACTCTCTTTTG-----	406
LC342868.1	GACAAGTCAGAGTTGGAC---AAATACACACGCGTGTGCACTCTCTTTTG-----	410
AJ300482.1	GACAAGTCAGAGTTGGACA---AATACACACGCGTGTGCAC-----	599
AJ300481.1	GACAAGTCAGAGTTGGACA---AATACACACGCGTGTGCAC-----	601
JX289878.1	-----	311
JX289877.1	-----	306
JX289876.1	-----	309
JX289875.1	-----	309
JX289874.1	-----	275
JX289873.1	-----	318
JX289872.1	-----	273
JX289871.1	-----	308
JX289869.1	-----	319
JX289868.1	-----	277
JX289867.1	-----	305
JX289866.1	-----	345
JX289865.1	-----	341
JX289864.1	-----	315
JX289863.1	-----	313
JX289862.1	-----	310
JX289861.1	-----	310
JX289860.1	-----	292
JX289859.1	-----	303
JX289858.1	-----	310
JX289857.1	-----	293
JX289856.1	-----	310
JX289855.1	-----	310
GQ466354.1	-----	191
GQ466353.1	-----	297
GQ466352.1	-----	297
GQ466351.1	-----	297
GQ466350.1	-----	297
MK463629.1	-----	213
MK463628.1	-----	214
MK463627.1	-----	213
MK463626.1	-----	219
MK463625.1	-----	213
MK463624.1	-----	215
MK463623.1	-----	214
MK463622.1	-----	214
MK463621.1	-----	215
MG755824.1	-----	213
MG755823.1	-----	213
MG755822.1	-----	213
MH347927.1	-----	0
MH347926.1	---GCAAGAAATCAACCTATTAAGGAG---GCCAGTCATCCATCG-----CGACA	44
MH347925.1	-----	397
MH347924.1	-----	404
MH347923.1	-----	313
MH347922.1	-----	342
MH347921.1	-----	413
KY524299.1	-----	217
KJ425408.1	-----	336
KJ425407.1	-----	336

JN860757.1	-----	315
JN860754.1	-----	308
JN860750.1	-----	318
JN860746.1	-----	311
JN860745.1	-----	305
JN860742.1	-----	308
JN860741.1	-----	355
JN860740.1	-----	323
JN860739.1	-----	328
JN860738.1	-----	219
JN860737.1	-----	254
JN860736.1	-----	234
JN860735.1	-----	282
JN860734.1	-----	249
JN860732.1	-----	268
JN860731.1	-----	274
JN860730.1	-----	255
GQ471900.1	-----	338
KX821679.1	-----	338
KX619443.1	-----	287
KX619442.1	-----	291
KU680848.1	-----	478
KU680847.1	-----	477
KU680846.1	-----	477
KU680845.1	-----	477
KU949582.1	-----	417
KU949581.1	-----	418
KR868689.1	CACAACACAGAGGTACACA----TACACACACGCGTGCGCTC-----	619
KP874100.1	CACAAGACAGAGTTGGACA----AATACACACGCGTGCGCTC-----	616
KM056403.1	-----	338
KM052753.1	-----	336
KJ577708.1	-----	338
KJ577707.1	-----	338
KJ577706.1	-----	338
KJ577705.1	-----	338
KJ577704.1	-----	338
KJ577703.1	-----	338
KF152937.1	-----	460
JX289847.1	-----	308
JX289844.1	-----	316
JN860721.1	-----	312
JN860720.1	-----	314
JN860718.1	-----	315
JN005830.1	-----	303
JN005829.1	-----	298
JN005828.1	-----	303
JN005827.1	-----	286
JN005826.1	-----	297
JN005825.1	-----	282
JN005824.1	-----	312
JN005823.1	-----	298
GQ402544.1	-----	439
GQ402543.1	-----	439
EF413078.1	-----	424
EF413077.1	-----	439
EF413075.1	-----	462
DQ295825.1	-----	326
DQ295824.1	-----	326
AY283793.1	CACAAGTGAGAGGGGCACA----CACACACACGCGTGCGCTC-----	600
AY260965.1	GACAAGTCAGAGTTGGACA----AATACACACGCGTGTGCAC-----	602
MN604141.1	-----	227
MN604140.1	-----	202
MN604139.1	-----	255
MN604137.1	-----	292
MN604136.1	-----	277
MN604135.1	-----	232
MN604134.1	-----	291
MN604133.1	-----	260
MN604132.1	-----	212
MN604131.1	-----	276
MN604130.1	-----	217

MN604127.1	-----	237
MN604122.1	-----	278
MN604121.1	-----	278
MN604120.1	-----	253
MN604119.1	-----	241
MN604117.1	-----	272
MN604114.1	-----	291
MN604113.1	-----	286
MN604112.1	-----	286
MN604111.1	-----	293
MN604107.1	-----	263
MN604106.1	-----	279
MN604104.1	-----	274
MN604103.1	-----	282
MN604101.1	-----	276
MH029155.1	-----	338
MH029154.1	-----	338
KP995129.1	-----	291
KP995128.1	-----	297
KP995127.1	-----	277
KJ420587.1	-----	338
KJ420586.1	-----	337
KF899865.1	-----	293
KF899864.1	-----	296
KF899863.1	-----	296
KF899862.1	-----	304
KF899861.1	-----	296
KF899860.1	-----	288
KF899859.1	-----	311
KF899858.1	-----	288
KF899857.1	-----	288
KF899856.1	-----	291
KF899855.1	-----	297
KF899854.1	-----	300
KF899853.1	-----	289
KF899852.1	-----	241
KF899851.1	-----	295
KF899850.1	-----	297
KF899849.1	-----	297
KF899848.1	-----	297
JF831925.1	-----	338
JF831924.1	-----	340
EU482830.1	-----	303
GQ332361.1	AGCCCGTGAACATTCAAAGAAACAAGAAACACGGGAGTGGTTCCTTTCCTGATTTACGCA	792
AY573188.1	-----	338
AY573187.1	-----	338
AY550178.1	-----	338

Cebador 332 y *L. major*

cebador332	CGGTAAAGGC-----CGAATAG-----	20
AJ272383.1	T-AACGGCT--CAC-TAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	298
HG512963.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512962.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512958.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512954.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512952.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512945.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512924.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	295
HG512914.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512910.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512909.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
HG512906.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	293
FN677357.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	399
FN677342.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	401
LC342872.1	TCGCGATGGA-----TGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	52
LC342869.1	TCGCGATGGA-----TGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	52
LC342868.1	TCGCGATGGA-----TGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	52
AJ300482.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	300
AJ300481.1	T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	300
JX289878.1	TAACGGCTCACAT--AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA	283

JX289877.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 278  
 JX289876.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 278  
 JX289875.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 281  
 JX289874.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCT-ATTTTCGTTGAAGAA 244  
 JX289873.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCT-ATTTTCGTTGAAGAA 287  
 JX289872.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 244  
 JX289871.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 277  
 JX289869.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 290  
 JX289868.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 247  
 JX289867.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 276  
 JX289866.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 285  
 JX289865.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 286  
 JX289864.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 286  
 JX289863.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 283  
 JX289862.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 282  
 JX289861.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 281  
 JX289860.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 262  
 JX289859.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 275  
 JX289858.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 280  
 JX289857.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 262  
 JX289856.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 282  
 JX289855.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 281  
 ----- 191  
 GQ466354.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 297  
 GQ466353.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 GQ466352.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 GQ466351.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 GQ466350.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 297  
 MK463629.1 AT-AAC----- 213  
 MK463628.1 AT-AAC----- 214  
 MK463627.1 AT-AAC----- 213  
 MK463626.1 ATAAC----- 219  
 MK463625.1 AT-AAC----- 213  
 MK463624.1 ATAAC----- 215  
 MK463623.1 AT-AAC----- 214  
 MK463622.1 AT-AAC----- 214  
 MK463621.1 AT-AAC----- 215  
 MG755824.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 185  
 MG755823.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 185  
 MG755822.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 185  
 MH347927.1 TGGAGCACGGCTTTCCGCCGTGCCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 170  
 MH347926.1 ----- 0  
 MH347925.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCCTATTCGTTGACAATCCT 397  
 MH347924.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 286  
 MH347923.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATCGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 285  
 MH347922.1 TCACGGCTC--ACACTAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGACC 339  
 MH347921.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 286  
 KY524299.1 ----- 217  
 KJ425408.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ425407.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 JN860757.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 287  
 JN860754.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 279  
 JN860750.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 287  
 JN860746.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 283  
 JN860745.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 277  
 JN860742.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 280  
 JN860741.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 281  
 JN860740.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 278  
 JN860739.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 279  
 JN860738.1 ----- 219  
 JN860737.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGAAGACTTGGCTTCCTTTTTCTTTGAAAAA 250  
 JN860736.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 218  
 JN860735.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 257  
 JN860734.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 233  
 JN860732.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 250  
 JN860731.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 259  
 JN860730.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 240  
 GQ471900.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KX821679.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KX619443.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGA----- 287  
 KX619442.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 261  
 KU680848.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 316

KU680847.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 315  
 KU680846.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 315  
 KU680845.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 315  
 KU949582.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 275  
 KU949581.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 276  
 KR868689.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 318  
 KP874100.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 315  
 KM056403.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KM052753.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577708.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577707.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577706.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577705.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577704.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ577703.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KF152937.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA- 298  
 JX289847.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 278  
 JX289844.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 288  
 JN860721.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 282  
 JN860720.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 281  
 JN860718.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 286  
 JN005830.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 303  
 JN005829.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 298  
 JN005828.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 303  
 JN005827.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 286  
 JN005826.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 297  
 JN005825.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 282  
 JN005824.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 312  
 JN005823.1 ATAACGGCT--CACATAACTTGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 298  
 GQ402544.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 297  
 GQ402543.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 297  
 EF413078.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 261  
 EF413077.1 TAACGGCTCACAT---AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 276  
 EF413075.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 299  
 DQ295825.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 299  
 DQ295824.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 299  
 AY283793.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 301  
 AY260965.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 302  
 MN604141.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCG----- 227  
 MN604140.1 ----- 202  
 MN604139.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGCTC----- 255  
 MN604137.1 TAAACGGCTTCNCACATAACGTGTCGCGATGGAGAC----- 292  
 MN604136.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 277  
 MN604135.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 232  
 MN604134.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGCTC----- 291  
 MN604133.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGAT----- 260  
 MN604132.1 ----- 212  
 MN604131.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGC----- 276  
 MN604130.1 ----- 217  
 MN604127.1 ----- 237  
 MN604122.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGCTCCTA----- 278  
 MN604121.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGCTCCTA----- 278  
 MN604120.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGCTCGAGTG----- 253  
 MN604119.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGCTCGAG----- 241  
 MN604117.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTCTC----- 272  
 MN604114.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGTCTC----- 291  
 MN604113.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGCTCCTATC----- 286  
 MN604112.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 286  
 MN604111.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGCTCCTATCG----- 293  
 MN604107.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCACA----- 263  
 MN604106.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGCTCCAT----- 279  
 MN604104.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGCTCG----- 274  
 MN604103.1 GATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCTATGC----- 282  
 MN604101.1 TA-ACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTC----- 276  
 MH029155.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 MH029154.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KP995129.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTG----- 291  
 KP995128.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCA----- 297  
 KP995127.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCG----- 277  
 KJ420587.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 KJ420586.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311

KF899865.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCT----- 293  
 KF899864.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 296  
 KF899863.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 296  
 KF899862.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGT----- 304  
 KF899861.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 296  
 KF899860.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 288  
 KF899859.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTCAGGACCCGCCCGG 311  
 KF899858.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 288  
 KF899857.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACT----- 288  
 KF899856.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG----- 291  
 KF899855.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCC----- 297  
 KF899854.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATT----- 300  
 KF899853.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTT----- 289  
 KF899852.1 ATAAC----- 241  
 KF899851.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTC----- 295  
 KF899850.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 KF899849.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 KF899848.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTCCC----- 297  
 JF831925.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 JF831924.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 313  
 EU482830.1 ATAACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTGGC----- 303  
 GQ332361.1 TGGTGTAGTGGC-----CGTGTAGTGGACTGCCATGGCCTTGACGGG 381  
 AY573188.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 AY573187.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311  
 AY550178.1 T-AACGGCT--CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA 311

Cebador LITSR y *L. major*

cebadorLITSR **CATTTTCCGATG**----- 18  
 AQ850195.1 ----- 0  
 AQ845869.1 ----- 0  
 DQ300195.1 -----CTCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT--- 52  
 MG755824.1 ----- 0  
 MG755823.1 ----- 0  
 MG755822.1 ----- 0  
 MH347927.1 ----- 0  
 MH347926.1 ----- 0  
 MH347925.1 CATTTTTTCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 151  
 MH347924.1 -----ACCCCAAAACTATACAGCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 39  
 MH347923.1 -----ACCCCAAAACTATACAGCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 39  
 MH347922.1 CATTTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 93  
 MH347921.1 -----CCCCGAAAATCGTATCCTCTCGGGGAGGCT--TATTCT-AT 38  
 KJ002553.1 CATTTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 65  
 JN860757.1 -----GCCAGTTGATTCATCGTGCGAGGTTAGGCTTATTCTAT-AT 41  
 JN860754.1 -----CGAAGGGACACTCGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT 33  
 JN860750.1 -----AGAAAATGGAACAACTGCGAGAAGTAGGCTTATTCT-AT 39  
 JN860746.1 -----CGAAGTGGTCTCTGCGATCATAGTCTGATGCTAT-GC 37  
 JN860745.1 -----GGGAAAAACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 31  
 JN860742.1 -----CGGAATGTCTCTGCGACATTTTCTTATGCTAT-GT 34  
 JN860741.1 -----GGAAGTGAATAGGCGAGGGACGCTCATGAGA-TG 34  
 JN860740.1 -----GCTGACAACAAGAGAGGGGAAGCTCAGGATA-TG 32  
 JN860739.1 -----GATGAACGCAGGAGAGAAGCAAGCTCAAAGA-TG 33  
 JN860738.1 -----GGGAAGGGACAGCGGTGACGTTTTCCGATAA-GA 33  
 JN860737.1 -----AT 2  
 JN860736.1 ----- 0  
 JN860735.1 -----TTATTCTAT-AT 11  
 JN860734.1 ----- 0  
 JN860732.1 -----AT-AT 4  
 JN860731.1 -----GCTTATTCTAT-AT 13  
 JN860730.1 ----- 0  
 KF815222.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 KF815221.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 KF815220.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 KF815219.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 KF815218.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 KF815217.1 -----GCTTATTCTAT--- 11  
 JX289878.1 -----CCGGCGGAATACACTGCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT 37  
 JX289877.1 -----AATGGACTCTGCGAGGGAGGCTTATTCT-A-TA 31  
 JX289876.1 -----AATGTTCTCTGCGAGGGAGGCTTATTCT-AT 30  
 JX289875.1 -----TCCCAGGAAAACGCGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT 35  
 JX289874.1 ----- 0

JX289873.1	-----CGGGTTTGGGGACAACATGGGGGATATGGCTGATAAG-AT	40
JX289872.1	-----	0
JX289871.1	-----AATAAAGCACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	31
JX289869.1	-----CCAAAAAGTAAAACCAACTTTCGGGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	44
JX289868.1	-----	1
JX289867.1	-----AGAGACAACCTCGGGGAGGCTTATTCT-A-TA	29
JX289866.1	-----CGAGAAGGGAGCTACTGCGAGAAGAGGCTTATTCTAT-AT	39
JX289865.1	-----CGGGGGGGGTTGCTACTGCGAGGGTAGGCTTATTCTAT-GT	41
JX289864.1	-----CAAAGGAGGATCAACTGCGGAGGGCAGGCTTATTCTAT-AT	40
JX289863.1	-----AAAAGTGTACAACCTGCGAGGGTAGGCTTATTCTAT-AT	37
JX289862.1	-----CCCAAGTGGTACAACCTCGGGGAGGCTTATTCT-A-TA	35
JX289861.1	-----CCGGGTGTACAACCTGCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
JX289860.1	-----AGGACTTATTCTA-TA	15
JX289859.1	-----GTTCACTGCGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
JX289858.1	-----CTTATGGCACCTGCGAGGGAG-GCTTATTCTA-TA	33
JX289857.1	-----ACCTGTATTACTA-TA	15
JX289856.1	-----ACTAGTGTAGCTGGGGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT	36
JX289855.1	-----AACTGAGGAGCTGCGAGGGGAGGCTTATTCTA-TA	34
KC505421.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	66
KY882282.1	-----	0
KY882281.1	-----	0
KY882280.1	-----	0
KY882279.1	-----	0
KY882278.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	174
KY882277.1	CAATTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTTTTCTAT-AT	174
KY882276.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	174
KY882275.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	174
KY982652.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
KY612607.1	-----TCTAT-GT	7
KY612606.1	-----TCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	21
KY612605.1	-----ACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	28
KY612604.1	-----GGAGGCTTATTCTAT-AT	17
KY612603.1	-----	0
KY612602.1	-----	0
KY612601.1	-----T-AT	3
KY612600.1	-----AGGCTTATTCTAT-AT	15
KU975160.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	66
KC880116.1	-----TATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
KC880115.1	-----TATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
KC880114.1	-----TATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
KC880113.1	-----TATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
KC880112.1	-----TATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	29
KF612022.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
KF981817.1	-----	0
KF981816.1	-----	0
KF981815.1	-----	0
KF981814.1	-----	0
KF981813.1	-----	0
KF981812.1	-----	0
KF981811.1	-----	0
KF981810.1	-----	0
KF981809.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981808.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981807.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981806.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981805.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981804.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981803.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KF981802.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	176
KJ194181.1	-----CACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	24
KJ194180.1	-----CACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	24
KJ194179.1	-----CACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	24
KJ194178.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	66
KJ194177.1	-----TCTAT-AT	7
AB759713.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
AB759712.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
AB759711.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512963.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512962.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512958.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512954.1	-----ATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47

HG512952.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512945.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512924.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512914.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512910.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512909.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
HG512906.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
JX289847.1	-----AGGTACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	32
JX289844.1	-----ACCAAACGTTAAACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	42
JF719996.1	-----AATATACAAAACCTCGGGGAGGCTTATATATATTA	34
JN860721.1	-----GAAAGGGACATGCGATCATTTTCTTATTCTAT-GT	36
JN860720.1	-----CAAAGGTACTGCGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
JN860718.1	-----CAGGAATAAGAACAACCTGCGAGGGAGGCTTATTCTAT-AT	40
JN860714.1	-----ACGGAATAT--ACT-AT	14
JN860713.1	-----AAGTGGTTCCTGCGGAGCGGTAGGCTTATTCTAT-AT	37
JN242001.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	69
FJ753395.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	63
FJ753394.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	63
FJ753393.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	63
FJ753392.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	63
FJ753391.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	63
FJ460456.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
EF653269.1	----TCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	54
AY283793.1	----TTCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT---	53
MN604138.1	TTTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	67
MN604128.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	68
MN604126.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	67
MN604125.1	CTTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	67
MN604110.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATA-TACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	61
MN604109.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACATCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	68
MN604105.1	-----GATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	48
MN604102.1	ATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	67
MN604099.1	TTTTTGCAGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	59
MN604098.1	TTTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	67
MN604097.1	-----CTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	22
MH932572.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932571.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932570.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932569.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932568.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932567.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932566.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932565.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932564.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH932563.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
MH428844.1	-----GCTACTATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	33
MF598342.1	TCTATACCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	105
MF598341.1	----CCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	53
MF598340.1	----CCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	53
MF598339.1	----CCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	53
MF522259.1	-----ATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	47
LC342872.1	-----	0
LC342869.1	-----	0
LC342868.1	-----	0
KP773413.1	-----CCAAACATATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
KP773412.1	-----ACAAACATATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
KP773411.1	-----GGGGGGCCGCTCGGGCACATCAGGGAGGCTTATTCTAT-AT	42
KP773410.1	-----TCAAATATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	33
KP773409.1	-----CCCAACATATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
KP773408.1	-----GCAGATAAGGGCAACAGCTGCGATAGGTGGTATCTATGT-AG	41
KP773407.1	-----ACCACTATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	33
KP773406.1	-----CCTAACTATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
KP691596.1	CATTTTCCGATGATTACCCCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	65
KP340521.1	-----TCTACTATACACTCGGGGAGGCTTATTCT-AT	31
KP340520.1	-----CCCAGCTATACACTCGGGGAGGCTTATTCTAT-AT	35
KM016967.1	-----	0
JX183383.1	-----	0
JX025361.1	-----	0
JN541337.1	-----TATTCTATA-TA	11
JN541336.1	-----CT-TATTCTA-TA	11
JN541335.1	-----ATTCTA-TA	8

JN541334.1	-----CTTATTCTA-TA	11
JN541333.1	-----	0
JN541332.1	-----TTTTCTATA-TA	11
JN541331.1	-----CT-TATTCTA-TA	11
JN541330.1	-----CTTATTCTA-TA	11
JN541329.1	-----CTTATTCTA-TA	11
JN541328.1	-----CTTATTCTA-TA	11
JN541327.1	-----TCTA-TA	6
JN541326.1	-----CTTAT-TCTA-TA	11
EU326229.1	CATTTTCCGATGATTACACCCCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGGCTTATCTAT-AT	65
XR_002460819.1	-----	0
XR_002460818.1	-----	0
XR_002460817.1	-----	0
XR_002460816.1	-----	0
XR_002460815.1	-----	0
XR_002460814.1	-----	0

Cebador L5.8S y *L. major*

cebador5.8	-----TGATACCACTTATC	14
AQ850195.1	ATACAGGTGGATTCCCCGCCGTAAGCAGATCTGAGTTGGCAATTTGTGGGACGCGGCACA	174
AQ845869.1	ATCGAGAATGAG-----CCCATAAAGTTTGTGACGCCACATATC	186
DQ300195.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATA--	539
MG755824.1	-----	213
MG755823.1	-----	213
MG755822.1	-----	213
MH347927.1	-----	0
MH347926.1	CGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTCCAAGCACTGGGCGTGTGTTTGTGTTGTACACACTGC	97
MH347925.1	-----	397
MH347924.1	-----	404
MH347923.1	-----	313
MH347922.1	-----	342
MH347921.1	-----	413
KJ002553.1	-----	339
JN860757.1	-----	315
JN860754.1	-----	308
JN860750.1	-----	318
JN860746.1	-----	311
JN860745.1	-----	305
JN860742.1	-----	308
JN860741.1	-----	355
JN860740.1	-----	323
JN860739.1	-----	328
JN860738.1	-----	219
JN860737.1	-----	254
JN860736.1	-----	234
JN860735.1	-----	282
JN860734.1	-----	249
JN860732.1	-----	268
JN860731.1	-----	274
JN860730.1	-----	255
KF815222.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATATA	500
KF815221.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATATA	500
KF815220.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATATA--	498
KF815219.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATAT-	499
KF815218.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATATA	500
KF815217.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCATATATATATA	500
JX289878.1	-----	311
JX289877.1	-----	306
JX289876.1	-----	309
JX289875.1	-----	309
JX289874.1	-----	275
JX289873.1	-----	318
JX289872.1	-----	273
JX289871.1	-----	308
JX289869.1	-----	319
JX289868.1	-----	277
JX289867.1	-----	305
JX289866.1	-----	345
JX289865.1	-----	341
JX289864.1	-----	315

JX289863.1	-----	313
JX289862.1	-----	310
JX289861.1	-----	310
JX289860.1	-----	292
JX289859.1	-----	303
JX289858.1	-----	310
JX289857.1	-----	293
JX289856.1	-----	310
JX289855.1	-----	310
KC505421.1	-----	330
KY882282.1	TTAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATTTATAT-	139
KY882281.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KY882280.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATTT-	139
KY882279.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KY882278.1	-----	502
KY882277.1	-----	502
KY882276.1	-----	502
KY882275.1	-----	502
KY982652.1	-----	270
KY612607.1	-----	280
KY612606.1	-----	296
KY612605.1	-----	302
KY612604.1	-----	292
KY612603.1	-----	239
KY612602.1	-----	261
KY612601.1	-----	278
KY612600.1	-----	289
KU975160.1	-----	338
KC880116.1	-----	303
KC880115.1	-----	303
KC880114.1	-----	303
KC880113.1	-----	303
KC880112.1	-----	303
KF612022.1	-----	320
KF981817.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981816.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	137
KF981815.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981814.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981813.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981812.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981811.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981810.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT-	139
KF981809.1	-----	504
KF981808.1	-----	504
KF981807.1	-----	504
KF981806.1	-----	504
KF981805.1	-----	504
KF981804.1	-----	504
KF981803.1	-----	504
KF981802.1	-----	504
KJ194181.1	-----	418
KJ194180.1	-----	418
KJ194179.1	-----	418
KJ194178.1	-----	418
KJ194177.1	-----	418
AB759713.1	-----	301
AB759712.1	-----	301
AB759711.1	-----	301
HG512963.1	-----	300
HG512962.1	-----	300
HG512958.1	-----	300
HG512954.1	-----	300
HG512952.1	-----	300
HG512945.1	-----	300
HG512924.1	-----	302
HG512914.1	-----	300
HG512910.1	-----	300
HG512909.1	-----	300
HG512906.1	-----	300
JX289847.1	-----	308
JX289844.1	-----	316

JF719996.1	-----	296
JN860721.1	-----	312
JN860720.1	-----	314
JN860718.1	-----	315
JN860714.1	-----	288
JN860713.1	-----	311
JN242001.1	-----	309
FJ753395.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGGGCCATATATATATA	549
FJ753394.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT---	549
FJ753393.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT---	549
FJ753392.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATA--	550
FJ753391.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATA--	550
FJ460456.1	-----	338
EF653269.1	-----	330
AY283793.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATATA	542
MN604138.1	-----	344
MN604128.1	-----	344
MN604126.1	-----	342
MN604125.1	-----	331
MN604110.1	-----	339
MN604109.1	-----	346
MN604105.1	-----	281
MN604102.1	-----	330
MN604099.1	-----	323
MN604098.1	-----	331
MN604097.1	-----	299
MH932572.1	-----	339
MH932571.1	-----	339
MH932570.1	-----	339
MH932569.1	-----	339
MH932568.1	-----	339
MH932567.1	-----	339
MH932566.1	-----	339
MH932565.1	-----	339
MH932564.1	-----	339
MH932563.1	-----	339
MH428844.1	-----	448
MF598342.1	-----	257
MF598341.1	-----	205
MF598340.1	-----	205
MF598339.1	-----	205
MF522259.1	-----	300
LC342872.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATAT-	340
LC342869.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATAT---	338
LC342868.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATATA	341
KP773413.1	-----	309
KP773412.1	-----	309
KP773411.1	-----	315
KP773410.1	-----	309
KP773409.1	-----	309
KP773408.1	-----	316
KP773407.1	-----	307
KP773406.1	-----	309
KP691596.1	-----	341
KP340521.1	-----	308
KP340520.1	-----	311
KM016967.1	-----TGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTCTTTTGCACATATATATATAT-	51
JX183383.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATAT-	92
JX025361.1	ATAATATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCCCATATATATATAT-	84
JN541337.1	-----	340
JN541336.1	-----	367
JN541335.1	-----	417
JN541334.1	-----	342
JN541333.1	-----	289
JN541332.1	-----	350
JN541331.1	-----	345
JN541330.1	-----	420
JN541329.1	-----	367
JN541328.1	-----	420
JN541327.1	-----	416
JN541326.1	-----	421

EU326229.1	-----	338
XR_002460819.1	-----	283
XR_002460818.1	-----	283
XR_002460817.1	-----	283
XR_002460816.1	-----	283
XR_002460815.1	-----	283
XR_002460814.1	-----	283

Cebador R221 y *L. braziliensis*

cebadorR221	-----CTTTCCTGATTACG-----	20
KY249639.1	TCTA-----TATATGTATATATATAGACACACCATCCAGTAGAAAAAGGCCGATGGA	127
KY249638.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	144
KY249637.1	AATCTATATATATGTATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
KY249636.1	TC-----TATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	141
KY249635.1	TC--TATATATATAT-----ATATAATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
KY249634.1	----CAATACAATCTATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	131
KY249633.1	AATCTATATATGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	151
MH382108.1	AATCTATATATATGT----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	106
MH382107.1	AATCTATATATATGTATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	108
MH231225.1	AATCTATATGTGTATAT--ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	143
MH231224.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	143
MF802824.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	151
MF802823.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	150
MF802822.1	AATCTATATGTGTATAT--ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
MF802821.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
MF802820.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	150
MF802819.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	137
MF802818.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
MF802817.1	AATCTATATGTGTATA----TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
MF802815.1	-----CAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	28
MF802814.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
MF802813.1	AATCTATATGTGTATATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
MF802812.1	AATCTATATGTGTATAT--ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
KU550594.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550593.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550592.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550591.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550590.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550589.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550588.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550587.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KU550586.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	105
KP274863.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	151
HG512966.1	AATCTATATATATGTATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	131
HG512942.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
HG512940.1	AATCTATATATAT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
HG512938.1	AATCTATATATGTATA----TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HG512937.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
HG512930.1	AATCTATATATATGTATA--TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	131
HG512929.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
HG512901.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
HG512898.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	127
JN936955.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	146
MN508061.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	146
MG136700.1	AATCTATATATGTATA----TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	104
MG136699.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	102
MG136698.1	AATCTATATATGTATATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	108
MG136697.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	69
MG136696.1	-----ACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	31
KF985166.2	AATMTATATGTGTATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	216
JX030146.1	-----	186
JX030145.1	-----	191
JX030144.1	-----	191
JX030143.1	-----	191
JX030142.1	-----	191
JX030141.1	-----	191
JX030094.1	-----	186
JX030093.1	-----	179
JX030092.1	-----	189
JX030091.1	-----	189

JX030090.1	-----	196
JX030089.1	-----	189
JX448549.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	125
JX448548.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	125
JX448547.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	125
FN398338.1	AATCTATATATAT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
FN398337.1	AATCTATATATGTATA---TATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FN398336.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
FN398335.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
FN398334.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
FN398333.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	145
DQ182537.1	AATCTATATATAT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	913
JQ061322.1	AATCTATATATGT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	167
AJ300484.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	140
AJ300483.1	AATCTATATGTGTATATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	140

Cebador R221 y *L. mexicana*

cebadorR221	-----CTTTCCTGATTACG-----	20
MH885526.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	735
KY769940.1	-----	330
AB558251.1	TC-----T---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558250.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558249.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558248.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCACCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558247.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGTGA	724
AB558246.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558245.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558244.1	TC-----C---ATTCTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558243.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	724
AB558242.1	TT-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGTGAGGAGCGA	719
AB558241.1	TT-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGTGAGGAGCGA	719
AB558240.1	TT-----TCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	715
AB558239.1	TT-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGTGAGGAGCGA	719
AB558238.1	TT-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-TCATCAAAAAGAGGGGAGCGA	723
HG512965.1	-----	295
HG512934.1	-----	298
HG512931.1	-----	298
HG512912.1	-----	298
HM163470.1	-----	487
KU177477.1	-----	617
AF466383.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	766
AF466382.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	766
AF466381.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	768
AF466380.1	-----CCTCCATTCTCCTCTCTTTTTT-CATCAAAAAGAGGGGAGCGA	766
AF339752.1	TC-----TCTCCATTCTCCTCTCTTTTTTTCATCAAAAAGAGGGGAGAGA	760

Cebador R221 y *L. panamensis*

cebadorR221	-----CTTTCCTGATTACG-----	20
HG512959.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
FJ948446.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FJ948445.1	AATCTATATATATATA--TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
FJ948444.1	AATCTATATATATATA--TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
FJ948443.1	AATCTATATATATATAT--ATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
FJ948442.1	AATCTATATATATATATATATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	151
FJ948441.1	AATCTATATATATATA--TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
FJ948440.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FJ948439.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FJ948438.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147

Cebador R221 y *L. guyanensis*

cebadorR221	-----CTTTCCTGATTACG-----	20
MF802816.1	AATCTATATATTTCTATAT--GTATATAGACCACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149
HG512961.1	AATCTATATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HG512960.1	AATCTATATATATAT---ATGTATATASACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	130
HG512935.1	AATCTATATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HG512915.1	AATCTATATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HG512905.1	AATCTATATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HF968630.1	AATCTATATATATAT---ATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	203
FN398332.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FN398331.1	AATCTATATATATA---TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147

FN398330.1	AATCTATATATATA----TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	147
FN398329.1	AATCTATATATATATA--TATGTATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	149

Cebador R221 y *L. naiffi*

cebadorR221	-----CTTTCCTGATTACC-----	20
KY769937.1	CGACACGTTATG--TGAGCCGTTATCCACCGACACAGTCGCAGCAAAAACAGGAGAACCC	70
HG512950.1	TCTATATATATATATCTATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	137
HG512939.1	TCTATATATAT-----ATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	129
HG512903.1	TCTATATATATATATCTATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	137
FN398152.1	TCTATATATATATATCTATATATATATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGA	155
DQ182543.1	ACTCAACTCGTGTACCTTCAGGGGTATACGCACATAACATACAGAAAAAAGGCCGATCGA	916

Cebador R332 y *L. braziliensis*

cebadorR332	-----GTAAAGGCCGAATAG-----	20
KY249639.1	-----	0
KY249638.1	-----	0
KY249637.1	-----	0
KY249636.1	-----	0
KY249635.1	-----	0
KY249634.1	-----	0
KY249633.1	-----	0
MH382108.1	-----	0
MH382107.1	-----	0
MH231225.1	-----	0
MH231224.1	-----	0
MF802824.1	-----	0
MF802823.1	-----	0
MF802822.1	-----	0
MF802821.1	-----	0
MF802820.1	-----	0
MF802819.1	-----	0
MF802818.1	-----	0
MF802817.1	-----	0
MF802815.1	-----	0
MF802814.1	-----	0
MF802813.1	-----	0
MF802812.1	-----	0
KU550594.1	-----	0
KU550593.1	-----	0
KU550592.1	-----	0
KU550591.1	-----	0
KU550590.1	-----	0
KU550589.1	-----	0
KU550588.1	-----	0
KU550587.1	-----	0
KU550586.1	-----	0
KP274863.1	-----	0
HG512966.1	-----	0
HG512942.1	-----	0
HG512940.1	-----	0
HG512938.1	-----	0
HG512937.1	-----	0
HG512930.1	-----	0
HG512929.1	-----	0
HG512901.1	-----	0
HG512898.1	-----	0
JN936955.1	-----	0
MN508061.1	-----	0
MG136700.1	-----	0
MG136699.1	-----	0
MG136698.1	-----	0
MG136697.1	-----	0
MG136696.1	-----	0
KF985166.2	-----	0
JX030146.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	144
JX030145.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	149
JX030144.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	149
JX030143.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	149
JX030142.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	149

JX030141.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	149
JX030094.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	144
JX030093.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	137
JX030092.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	147
JX030091.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	147
JX030090.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	154
JX030089.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	147
JX448549.1	-----	0
JX448548.1	-----	0
JX448547.1	-----	0
FN398338.1	-----	0
FN398337.1	-----	0
FN398336.1	-----	0
FN398335.1	-----	0
FN398334.1	-----	0
FN398333.1	-----	0
DQ182537.1	CGACTTTTGTCGAACCTACTTGATCAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCC	530
JQ061322.1	-----	0
AJ300484.1	-----	0
AJ300483.1	-----	0

Cebador R332 y *L. mexicana*

cebadorR332	-----GTAAAGGCCGAATAG-----	20
MH885526.1	AATCATTC-ATTTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	382
KY769940.1	GGGGGGTTTTCCG----GTTTTGGGTGGGGGTTTTTTCT-----	330
AB558251.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558250.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558249.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558248.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558247.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558246.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558245.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558244.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558243.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	371
AB558242.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	370
AB558241.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	370
AB558240.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	370
AB558239.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	370
AB558238.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	370
HG512965.1	-----	295
HG512934.1	-----	298
HG512931.1	-----	298
HG512912.1	-----	298
HM163470.1	TATCACCT---GTACGCCTC-TACAATAGTG---GCCGGCCCCCAAGATAATAATTC	337
KU177477.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	348
AF466383.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	413
AF466382.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	413
AF466381.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	413
AF466380.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	413
AF339752.1	AATCATTC-AATTACCGAATCTTTGAAC-----GCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTC	418

Cebador R332 y *L. panamensis*

cebadorR332	-----GTAAAGGCCGAATAG-----	20
HG512959.1	-----	0
FJ948446.1	-----	0
FJ948445.1	-----	0
FJ948444.1	-----	0
FJ948443.1	-----	0
FJ948442.1	-----	0
FJ948441.1	-----	0
FJ948440.1	-----	0
FJ948439.1	-----	0
FJ948438.1	-----	0

Cebador R332 y *L. guyanensis*

cebadorR332	-----GTAAAGGCCGAATAG-----	20
MF802816.1	-----	0
HG512961.1	-----	0
HG512960.1	-----	0

HG512935.1	-----	0
HG512915.1	-----	0
HG512905.1	-----	0
HF968630.1	-----	0
FN398332.1	-----	0
FN398331.1	-----	0
FN398330.1	-----	0
FN398329.1	-----	0
Cebador R332 y <i>L. naiffi</i>		
cebadorR332	-----GTAAAGGCCGAATAG-----	20
KY769937.1	-----	0
HG512950.1	-----	0
HG512939.1	-----	0
HG512903.1	-----	0
FN398152.1	-----	0
DQ182543.1	CGACTTTTGTCGAACCTACTTGATCAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCC	530

Cebador LITSR y <i>L. braziliensis</i>		
cebadorLITSR	---CTGGATCATTTTCCGATG-----	18
KY249639.1	-----ATTAAACAACAAAAAATACCGGGCGG-----	27
KY249638.1	-----CTGGATCATTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	44
KY249637.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
KY249636.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
KY249635.1	---CTGGATCATTTTYY-GATGATW--ACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	45
KY249634.1	-----CTGGATCATTTTCCGAGATTACACAAAA-----AACAAAATCCGG-----	40
KY249633.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MH382108.1	-----CCGG-----	4
MH382107.1	-----CCGG-----	4
MH231225.1	-----CATTTTCCGATGATTA-CACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	39
MH231224.1	-----CATTTTCCGATGATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	39
MF802824.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802823.1	---TCTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	46
MF802822.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802821.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802820.1	---TCTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	46
MF802819.1	-----GATGATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	31
MF802818.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802817.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802815.1	-----	0
MF802814.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802813.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
MF802812.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
KU550594.1	-----TCCGG-----	5
KU550593.1	-----TCCGG-----	5
KU550592.1	-----TCCGG-----	5
KU550591.1	-----TCCGG-----	5
KU550590.1	-----TCCGG-----	5
KU550589.1	-----TCCGG-----	5
KU550588.1	-----TCCGG-----	5
KU550587.1	-----TCCGG-----	5
KU550586.1	-----TCCGG-----	5
KP274863.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
HG512966.1	-----ATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512942.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512940.1	-----ATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512938.1	-----ATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512937.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512930.1	-----ATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512929.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512901.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
HG512898.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
JN936955.1	---CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCA--AAAAACATACAACCTCCGG-----	46
MN508061.1	---TCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	46
MG136700.1	-----GG-----	2
MG136699.1	-----GG-----	2
MG136698.1	-----GG-----	2
MG136697.1	-----	0
MG136696.1	-----	0

KF985166.2	TCTCTGGATCATTTTCCGATGATTACAC-C--AAAAACATACAACCTCCGG-----	110
JX030146.1	-----	186
JX030145.1	-----	191
JX030144.1	-----	191
JX030143.1	-----	191
JX030142.1	-----	191
JX030141.1	-----	191
JX030094.1	-----	186
JX030093.1	-----	179
JX030092.1	-----	189
JX030091.1	-----	189
JX030090.1	-----	196
JX030089.1	-----	189
JX448549.1	-----TACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	25
JX448548.1	-----TACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	25
JX448547.1	-----TACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	25
FN398338.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FN398337.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FN398336.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FN398335.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FN398334.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FN398333.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	45
DQ182537.1	CAGCTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	813
JQ061322.1	CAGCAGCTGGATC-ATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	67
AJ300484.1	-----TCCGATGATTACACCAAAAAACACACAACCTCCGG-----	34
AJ300483.1	-----TCCGATGATTACACCAAAAAACACACAACCTCCGG-----	34

Cebador LITSR y *L. mexicana*

cebadorLITSR	---CTGGATC-ATTTTCCGATG-----	18
MH885526.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	655
KY769940.1	-----	330
AB558251.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558250.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558249.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558248.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558247.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558246.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558245.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558244.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558243.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	644
AB558242.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	627
AB558241.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	627
AB558240.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	627
AB558239.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	627
AB558238.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	643
HG512965.1	-----	295
HG512934.1	-----	298
HG512931.1	-----	298
HG512912.1	-----	298
HM163470.1	-----	487
KUI77477.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	617
AF466383.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	686
AF466382.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	686
AF466381.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	688
AF466380.1	CATGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	686
AF339752.1	CGCGTGTGCACTCTCCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAA	675

Cebador LITSR y *L. panamensis*

cebadorLITSR	---CTGGATC-ATTTTCCGATG-----	18
HG512959.1	-----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG-----	27
FJ948446.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948445.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948444.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948443.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948442.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948441.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948440.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948439.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45
FJ948438.1	---CTGGATC-ATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAACATACAACCTCCGG-----	45

Cebador LITSR y *L. guyanensis*

cebadorLITSR ---CTGGATCATTTTCCGATG----- 18  
 MF802816.1 ---CTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 45  
 HG512961.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG----- 27  
 HG512960.1 -----ATCACCCCAAAAACACACAACCTCCGG----- 28  
 HG512935.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG----- 27  
 HG512915.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG----- 27  
 HG512905.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGG----- 27  
 HF968630.1 CAGCTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 101  
 FN398332.1 ---CTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 45  
 FN398331.1 ---CTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 45  
 FN398330.1 ---CTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 45  
 FN398329.1 ---CTGGATCATTTTCCGATGATTAC-ACC--AAAAAACATACAACCTCCGG----- 45

Cebador LITSR y *L. naiffi*  
 cebadorLITSR ---CTGGATCATTTTCCGATG----- 18  
 KY769937.1 ----- 0  
 HG512950.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCTCCGG----- 29  
 HG512939.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCTCCGG----- 29  
 HG512903.1 -----ATTACACCAAAAAACATACAACCTCTCCGG----- 29  
 FN398152.1 ---CTGGATCATTTTCCGA-TGATTACACCAAAAAACATACAACCTCTCCGG----- 47  
 DQ182543.1 CAGCT---GGATC-----ATTTTCCGATGATTATACCAA 796

Cebador L5.8S y *L. braziliensis*  
 cebador5.8 -----C CACTTATCGCACTT----- 20  
 KY249639.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----ACAA 75  
 KY249638.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 90  
 KY249637.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 KY249636.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACATACGCAATAC-----AA-- 91  
 KY249635.1 TGTGTTTTCTATG-----CAAGCCTTTCCCACATGCGCAATAC-----AA-- 92  
 KY249634.1 TGTGTTGAGC-----AAG-CCTTTC--CCACATACG----- 75  
 KY249633.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MH382108.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 50  
 MH382107.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 50  
 MH231225.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 85  
 MH231224.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 85  
 MF802824.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802823.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 92  
 MF802822.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802821.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802820.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 92  
 MF802819.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 77  
 MF802818.1 TGCCTTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802817.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802815.1 ----- 0  
 MF802814.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802813.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 MF802812.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 KU550594.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550593.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550592.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550591.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550590.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550589.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550588.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550587.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KU550586.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 51  
 KP274863.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 HG512966.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512942.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512940.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512938.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512937.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512930.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512929.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512901.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 HG512898.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 JN936955.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 92  
 MN508061.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 92  
 MG136700.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 48  
 MG136699.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 48

MG136698.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 48  
 MG136697.1 -----ACGCATT-----AC-- 9  
 MG136696.1 ----- 0  
 KF985166.2 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 156  
 JX030146.1 ----- 186  
 JX030145.1 ----- 191  
 JX030144.1 ----- 191  
 JX030143.1 ----- 191  
 JX030142.1 ----- 191  
 JX030141.1 ----- 191  
 JX030094.1 ----- 186  
 JX030093.1 ----- 179  
 JX030092.1 ----- 189  
 JX030091.1 ----- 189  
 JX030090.1 ----- 196  
 JX030089.1 ----- 189  
 JX448549.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 71  
 JX448548.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 71  
 JX448547.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 71  
 FN398338.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FN398337.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FN398336.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FN398335.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FN398334.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FN398333.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 DQ182537.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 859  
 JQ061322.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 113  
 AJ300484.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 80  
 AJ300483.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 80

Cebador L5.8S y *L. mexicana*

cebador5.8 -----CCACTTATCGCACTT----- 20  
 MH885526.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTT----- 691  
 KY769940.1 ----- 330  
 AB558251.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558250.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558249.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558248.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558247.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558246.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558245.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558244.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTTTC-----C 682  
 AB558243.1 AGCAGTCCCTCTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTCTTT----- 680  
 AB558242.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTCTCTCTCCTCTTTCTCTCTTT 673  
 AB558241.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTCTCTCTCCTCTTTCTCTCTTT 673  
 AB558240.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----TTCCCTTCCCTTTTCTC---TCCCTTT 669  
 AB558239.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTCTCTCTCCTCTTTCTCTCTTT 673  
 AB558238.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTC-----TTT 677  
 HG512965.1 ----- 295  
 HG512934.1 ----- 298  
 HG512931.1 ----- 298  
 HG512912.1 ----- 298  
 HM163470.1 ----- 487  
 KU177477.1 ----- 617  
 AF466383.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTT----- 722  
 AF466382.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTT----- 722  
 AF466381.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTT----- 724  
 AF466380.1 AGCAGTCTCTTTCTCTTC-----CTCTTCTCTCTCTTTT----- 722  
 AF339752.1 AAAGCAGTCTTTCCCTTT-----CTCCTTCTCCTTTTCTCTTT-----C 713

Cebador L5.8S y *L. panamensis*

cebador5.8 -----CCACTTATCGCACTT----- 20  
 HG512959.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
 FJ948446.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948445.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948444.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948443.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948442.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948441.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948440.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
 FJ948439.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91

FJ948438.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91

Cebador L5.8S y *L. guyanensis*

cebador5.8 -----CCACTTATCGCACTT----- 20  
MF802816.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
HG512961.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
HG512960.1 TGTGTTTTCTAGC-----AMGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 74  
HG512935.1 TGTGTTTTYTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
HG512915.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
HG512905.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 73  
HF968630.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 147  
FN398332.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
FN398331.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
FN398330.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91  
FN398329.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----AC-- 91

Cebador L5.8S y *L. naiffi*

cebador5.8 -----CCACTTATCGCACTT----- 20  
KY769937.1 -----AGTCATCCATCG----- 12  
HG512950.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----ACAA 77  
HG512939.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----ACAA 77  
HG512903.1 TGTGCTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----ACAA 77  
FN398152.1 TGTGTTTTCTAGC-----AAGC-CTTCCCACAGATACGCAAT-----ACAA 95  
DQ182543.1 AAAACATACAAAACATATTTTCGGGGAGGCTTATTCCTGCGAGTACGTCTTCCCACATAC 856