

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis eco-epidemiológico de leishmaniasis cutánea en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Carlos Arturo Enriquez Sandoval

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019



## Análisis eco-epidemiológico de leishmaniasis cutánea en Guatemala

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades



## Análisis eco-epidemiológico de leishmaniasis cutánea en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por


Carlos Arturo Enriquez Sandoval

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019

Vo. Bo.:

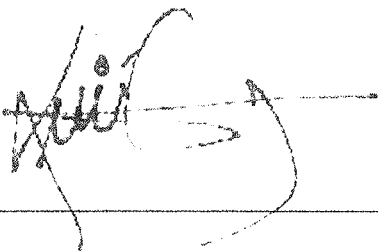
(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Renata Mendizábal de Cabrera


Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Renata Mendizábal de Cabrera

(f)   
\_\_\_\_\_

PhD. Luis Escobar

(f)   
\_\_\_\_\_

MSc. Elizabeth Solorzano

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre del 2019

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre conmigo durante cada etapa de mi vida y haberme dado la fuerza para nunca rendirme. Porque sin Él nada de esto sería posible.

A mis padres, Mildred Sandoval y Carlos Enriquez por apoyarme durante muchos años, confiar en mí y siempre motivarme a encontrar mi pasión y dar lo mejor.

A mi abuelo, Carlos Enríquez Cojulún por haber apoyado mi educación por ya más de una década. Gracias por creer en mí y cumplir el deseo de mi abuela Nivea Montúfar (Que en Paz Descanse).

A mi novia, Claudia Alfaro, que amo con todo mi ser y siempre me apoyó y motivó a brillar y ser la mejor persona que puedo ser.

Al departamento de Ayuda Financiera por su apoyo brindado durante los últimos cinco años y medio.

A mi asesora, MSc. Renata Mendizabal por darme esta oportunidad, por siempre apoyarme y guiar mi trabajo y dedicar incalculables horas a la culminación de este proyecto.

A mi coasesor externo, PhD. Luis Escobar, por contribuir con su tiempo y conocimiento al desarrollo de este proyecto incluso con las limitaciones de tiempo.

A MSc. Elizabeth Solórzano por su valiosa retroalimentación a mi trabajo de graduación.

Al estudiante de doctorado Joaquín Escobar-Dodero por ayudarme remotamente en el desarrollo de los modelos de nicho ecológico de este estudio sin importar el día o las horas a invertir.

Al Centro de Estudios en Salud por su apoyo en cuanto a la proporción de instalaciones, reactivos y equipo.

A Aura Paniagua, Cristian Ruiz y Carlos Serrano por su apoyo en diferentes etapas del desarrollo de este trabajo de graduación.

A distintos catedráticos que contribuyeron a mi formación como profesional y me motivaron a trabajar con excelencia, especialmente a: Dr. Schuster, Lic. Carlos Chiquín, Lic. Elena Dardón, Lic. Andrés Ávalos, PhD. Diego Archila, PhD. Dalia Lau.

A mi directora de carrera, PhD. Pamela Pennington por contactarme con mi coasesor y guiarme desde el año 2018 a cumplir con los requisitos de graduación a tiempo y a aprovechar nuestro potencial como estudiantes de esta carrera llena de oportunidades.

A mis amigos de la promoción 2018 (Cristian, Gaby, Paula, Quetzaly, Elena, Katia, Luisa y Analu) por haberme dado una increíble bienvenida a la universidad con su amistad y apoyarme siempre.

A mis amigos del colegio (Leonel, Gabriel, Daniel, Óscar y María Jimena) por siempre recordarme que con mi carrera siempre tuve un inmenso potencial.

A mis amigos de la promoción 2019 (mi novia- Claudia-, Mariandré, Sofía, Meches, Mynor, Adriana, Carmen, Enma, Marco y Alexia) por todos los buenos momentos y amistad que compartimos.

# ÍNDICE

LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
A. Objetivo general.....	2
B. Objetivos específicos.....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
A. Leishmaniasis.....	5
B. Epidemiología de la leishmaniasis cutánea .....	14
C. Eco-epidemiología de la leishmaniasis cutánea .....	18
D. Reservorios Leishmania .....	23
V. METODOLOGÍA.....	29
A. Sitio de estudio.....	29
B. Sujetos de estudio.....	29
C. Diseño, enfoque y tipo de investigación.....	29
D. Tipo y tamaño de muestra .....	30
E. Criterios de inclusión .....	30
F. Variables .....	30
G. Hipótesis.....	32
H. Procedimiento .....	33
VI. RESULTADOS.....	37
A. Componente filogenético .....	37
B. Componente eco-epidemiológico.....	45
VII. DISCUSIÓN .....	53
VIII. CONCLUSIONES .....	64
IX. RECOMENDACIONES .....	65

X. BIBLIOGRAFÍA.....	66
XI. ANEXOS .....	83



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especificidad de vectores por distintas especies del género <i>Leishmania</i> .....	7
Cuadro 2. Conjunto de cebadores utilizados para la amplificación de distintos fragmentos* del gen <i>hsp70</i> en <i>Leishmania</i> a partir de un PCR anidado. ....	13
Cuadro 3. Mamíferos reservorios de leishmaniasis en distintos países y regiones del mundo. ....	24
Cuadro 4. Resumen epidemiológico de la leishmaniasis cutánea.....	26
Cuadro 5. Variables del estudio.....	30
Cuadro 6. Programa para la amplificación del fragmento PCR-G del gen <i>hsp70</i> . ....	34
Cuadro 7: Programa para la amplificación del fragmento PCR-N del gen <i>hsp70</i> . ....	34
Cuadro 8. Prevalencia de leishmaniasis en análisis retrospectivo de tejido proveniente de mamíferos según el marcador molecular <i>hsp70</i> .....	37
Cuadro 9. Distribución en tiempo y espacio de las muestras de mamíferos con diagnóstico positivo para leishmaniasis. ....	38
Cuadro 10. Resultados del análisis de identidad utilizando la herramienta BLASTn de NCBI para las secuencias de <i>hsp70</i> (fragmento N) amplificadas en las muestras. ....	40
Cuadro 11. Conjuntos de variables predictivas climáticas y topográficas seleccionadas para la calibración del modelo. ....	47
Cuadro 12. Distribución de datos de infecciones en humanos en Guatemala <i>Leishmania</i> spp recopilados por el CES-UVG. ....	47
Cuadro 13. Distribución de casos para la base de datos global de leishmaniasis cutánea utilizada en el modelo de nicho ecológico.....	48
Cuadro 14. Selección final de modelos a partir de criterios de significancia, tasa de omisión y complejidad (AICc) usando <i>kuenm</i> .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del ciclo de vida de la leishmaniasis en hospederos caninos (reservorios), humanos y en la etapa vectorial. ....	5
Figura 2. Distintos fragmentos del gen <i>hsp70</i> amplificados que pueden utilizarse para la genotipificación de muestras de <i>Leishmania</i> . ....	13
Figura 3. Incidencia de la leishmaniasis cutánea a nivel mundial según casos reportados en el 2015. ....	16
Figura 4. Distribución de casos (izquierda) e incidencia (derecha) de la leishmaniasis cutánea en Latinoamérica a partir de datos obtenidos a partir de los Programas Nacionales de Leishmaniasis/Vigilancia. ....	17
Figura 5. Casos de leishmaniasis cutánea en Guatemala entre los años 2002-2017 como conteo absoluto y tasa de prevalencia por cada 100 000 habitantes ....	18
Figura 6. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> basado en MLEE.....	20
Figura 7. Evolución de géneros <i>Leishmania/Endotrypanum</i> a partir de análisis moleculares, así como la distribución geográfica y patología típica. ....	21
Figura 8. Diagnóstico molecular (PCR anidado) de leishmaniasis para muestras de mamíferos basado en la amplificación del fragmento N del gen <i>hsp70</i> (593 bp). ....	39
Figura 9. Árbol filogenético de las 15 secuencias consenso obtenidas para hospederos mamíferos (ver cuadro 1) utilizando los modelos filogenéticos de (A) “Nearest Neighbor Joining” e (B) inferencia Bayesiana. ....	42
Figura 10. Árbol filogenético más plausible de las 15 secuencias consenso obtenidas para hospederos mamíferos y 36 secuencias de hospederos humanos (Ruiz, 2018) (ver Cuadro 12) construido con el método “Maximum Likelihood” y clasificado por hospedero de origen. ....	44
Figura 11. Área de estudio para la calibración de modelos de nicho ecológico. ....	46
Figura 12. Riesgo pronosticado de leishmaniasis cutánea en el área de estudio con base en el modelo de nicho ecológico de mejor rendimiento. ....	50
Figura 13. Mapas de riesgo en modalidad presencia/ausencia (binarios) utilizando los umbrales logísticos preestablecidos por MaxEnt A) Presencia Mínima de los puntos del entrenamiento (MTP en inglés), B) Presencia de entrenamiento percentil 5 y C) Presencia de entrenamiento percentil 10. ....	51

## RESUMEN

La leishmaniasis es la décima enfermedad tropical desatendida con mayor prevalencia. En el caso de Guatemala, la leishmaniasis cutánea (LC) es la forma clínica más común para la que solo en 2018 se reportaron 997 casos. Debido a la coevolución entre el parásito *Leishmania*, el vector y el reservorio, el sistema de transmisión es complejo y difícil de predecir. Para determinar cuáles son las características ecológicas de la LC en Guatemala y la región Centroamericana. Se reconstruyó la historia evolutiva del parásito a nivel nacional a partir del análisis de muestras biológicas provenientes de mamíferos usando el marcador *hsp70*. Además, se caracterizó el nicho ecológico de *Leishmania* spp. generando modelos a escala regional con base en variables climáticas y topográficas, y el algoritmo MaxEnt aplicado a las ocurrencias de infección para mamíferos en Guatemala, y de casos humanos para Centroamérica descritas en estudios anteriores. Se comprobó la infección – con una prevalencia de 6.1% – por parásitos causantes de LC (*Leishmania naiffi*/ *L. braziliensis* y *L. guyanensis/panamensis*) de manera predominante en los mamíferos *Oryzomys couesi*, *Urocyon cinereoargenteus* y *Artibeus jamaicensis* y se infirió que mantenían una relación filogenética estrecha con parásitos de tejidos humanos, lo cual es indicativo de la participación de dichos mamíferos en el ciclo de transmisión. Asimismo, los cuatro modelos seleccionados pronosticaron zonas habitables de 90% para LC y se determinó que el rango y promedio de temperatura, la estacionalidad y el valor promedio de la humedad específica son las variables más relevantes para la idoneidad climática de LC. Por lo tanto, se contribuyó al conocimiento sobre la biogeografía, el nicho fundamental e historia evolutiva de la LC en Guatemala y la región Centroamericana.

# I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 25 años se ha descrito un aumento en la prevalencia de casos de leishmaniasis a nivel mundial, lo cual se ha atribuido a diversos factores como la globalización, el cambio climático y la guerra. Asimismo, puesto que los programas locales de cada país han tenido dificultades para enfrentar la enfermedad derivado de su epidemiología y ecología compleja que requiere de una significativa cooperación técnica, operativa y política, la leishmaniasis se considera una enfermedad tropical desatendida. En el caso de Guatemala, la cutánea es la leishmaniasis más común; en el periodo 2004-2008 se llegó a reportar hasta 683 casos anuales y esta cifra ha ido en aumento –997 casos fueron reportados en el 2018 –. Incrementos similares se han documentado en la región centroamericana a partir del año 2016.

El único estudio realizado en el país para incriminar a un mamífero como reservorio de la leishmaniasis cutánea se basó principalmente en ensayos serológicos en perros de una región endémica de Petén. Sin embargo, el alcance de dicho estudio se vio limitado a un animal sinantrópico, mientras que los que han sido vinculados a la infección son los mamíferos silvestres y sinantrópicos. La ausencia de conocimiento con respecto a la ecología de la enfermedad así como la identidad y localización de dichos organismos reservorios limita las estrategias que podrían emplearse a nivel nacional para reducir la incidencia de la leishmaniasis cutánea (LC). En efecto, impide que puedan darse lineamientos específicos a pobladores en riesgo para que cooperen en la ejecución de intervenciones ecológicas que buscan reducir las actividades humanas que contribuyen a la zoonosis. Asimismo, la ausencia de evidencia obstaculiza el establecimiento de políticas públicas que regulen actividades que posiblemente contribuyen a aumentar la incidencia, como la modificación de ecosistemas, la expansión agrícola y las migraciones. Por último, la ausencia de conocimiento ecológico respecto a una enfermedad con un complejo sistema de transmisión, como la LC, impide que la vigilancia pasiva actualmente existente pueda predecir con certeza dónde podrían surgir brotes y bajo qué circunstancias.

Por consiguiente, para que la LC pueda controlarse y vigilarse de manera efectiva es necesario que tener un mayor conocimiento sobre: 1) qué regiones del país representan un mayor riesgo para la presencia de LC – lo cual supone la presencia de reservorios y mamíferos– y 2) qué mamíferos podrían estar involucrados en el ciclo de transmisión y en qué grado. Los organismos que causan enfermedades en humanos, tal como la leishmaniasis, pueden estudiarse desde el punto de vista ecológico describiendo la distribución espacial del parásito, vectores, reservorios, hospederos susceptibles y otros agentes epidemiológicamente relevantes. Por lo tanto, en este estudio se propuso los siguientes objetivos: calcular porcentajes de positividad de LC en 309 muestras de mamíferos de 39 distintos grupos taxonómicos, determinar la asociación filogenética entre parásitos de tejidos de mamíferos silvestres y de humanos a partir de la secuencia del gen *hsp70* y desarrollar un modelo de nicho ecológico basado en variables climáticas y topográficas para predecir la distribución espacial de la leishmaniasis cutánea en Centroamérica.

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

1. Identificar las características ecológicas de la leishmaniasis cutánea en Guatemala y Centroamérica.

### B. Objetivos específicos

1. Identificar el porcentaje de positividad de *Leishmania* spp. para mamíferos silvestres en Guatemala.
2. Evaluar si existen divergencias en función del hospedero representadas como la relación filogenética entre parásitos aislados de mamíferos silvestres y humanos.
3. Predecir la distribución espacial de la leishmaniasis cutánea en Centroamérica utilizando modelamiento de nicho ecológico basado en variables climáticas y topográficas.

### III. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es la décima enfermedad desatendida con mayor prevalencia nivel mundial (Herricks *et al.*, 2017). En el caso de Guatemala, uno de los países endémicos para la enfermedad, la leishmaniasis cutánea es la manifestación más común (Chávez, 2019). Sin embargo, los programas nacionales han tenido dificultades para enfrentar la enfermedad derivado de que tiene una epidemiología y ecología compleja que requiere de una significativa cooperación técnica, operativa y política (Alvar *et al.*, 2012). Por lo tanto, a pesar de que existen diversos tratamientos para la leishmaniasis, no existen vacunas u otras medidas preventivas que aparte del control vectorial. No obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado el control de reservorios como una estrategia para reducir la morbilidad de la LC de origen zoonótico (Marinkelle, 2010). Identificar especies de mamíferos que posiblemente propician la circulación de parásitos, así como la determinación de paisajes con mayor riesgo, permitirá tomar medidas preventivas adicionales contra brotes de LC en Guatemala. A partir de dicha información pueden complementarse o hasta reducir la necesidad de utilizar métodos convencionales como la erradicación de mamíferos, el uso de trampas y la deforestación (Gebremichael, 2018; Marinkelle, 2010; Wijerathna, Gunathilaka, Gunawardana, & Rodrigo, 2017) en favor de intervenciones ecológicas para la prevención de brotes zoonóticos como la zooprofilaxis, el control biológico, el aumento de regulaciones de bioseguridad aplicadas al manejo de animales en la industria alimenticia y la regulación de actividades antropogénicas que afectan la biodiversidad y el riesgo de exposición (Kaabi & Ahmed, 2013; Karesh *et al.*, 2012; Sokolow *et al.*, 2019). Asimismo, esta información podría guiar políticas públicas que regulen la modificación de ecosistemas, las expansiones agrícolas y las migraciones que favorezcan la coexistencia de vectores, reservorios y personas susceptibles (Ferro *et al.*, 2015; Gebremichael, 2018). Por lo tanto, una mayor información sobre la identidad y los sitios de mayor riesgo para la leishmaniasis cutánea podría ser de utilidad para el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) en el desarrollo de vigilancia activa y la creación de protocolos para programas integrados de control (Gálvez, Descalzo, Guerrero, Miró, & Molina, 2011).

La evaluación de patrones filogenéticos entre patógenos de distintas poblaciones utilizando marcadores moleculares conservados representa una fuente de evidencia robusta para la determinación de reservorios, puesto que permite evaluar la diversidad y la correspondencia genética entre patógenos de hospederos humanos y potenciales reservorios (Fountain-Jones *et al.*, 2018; Haydon, Cleaveland, Taylor, & Laurenson, 2002). Previamente, la identidad de mamíferos silvestres que podrían estar implicados en la transmisión de LC se ha evaluado en Belice, El Salvador, Costa Rica y Panamá, pero no en Guatemala (Ashford, 1996; Beumer, Christensen, & Herrer, 1973; Disney, 1968; K. González *et al.*, 2015; Roque & Jansen, 2014; Zeledón, McPherson, & Ponce, 1977). Sin embargo, el único estudio guatemalteco enfocado en mamíferos reservorios estuvo dirigido a animales domésticos (P. R. Ryan *et al.*, 2003). Por lo tanto, tomando en cuenta la disponibilidad de muestras de mamíferos silvestres en el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG), se podría llevar a cabo un primer acercamiento

usando las técnicas descritas anteriormente para identificar infecciones por agentes etiológicos de LC e inferir su relación con infecciones en humanos.

Por otro lado, la presencia del parásito y sus reservorios en el ecosistema se ve restringida a paisajes que forman parte la cobertura de las especies de insectos transmisoras (Akhoundi *et al.*, 2016). En efecto, las especies del género *Lutzomyia*, vector originario América Latina, suelen ser especialistas para hábitats específicos y tienen una dispersión restringida. No obstante, el alcance del parásito en un sitio endémico puede variar dependiendo del reservorio (Roque & Jansen, 2014). Es por ello que el acceso a información respecto a los paisajes habitados por potenciales reservorios de leishmaniasis ha permitido el desarrollo de estrategias de control en otras regiones. Por ejemplo, en África, se ha iniciado una cooperación con Estados Unidos que ha permitido la organización de un programa de monitoreo y predicción de brotes basado en el modelamiento de nichos, el mapeo geoespacial de vectores y la vigilancia de hospederos mamíferos para detectar eventos de exposición al vector (Palatnik-de-sousa & Day, 2011). Es por ello que conocer los paisajes que principalmente explican el origen de infecciones en humanos provee de información respecto al alcance del parásito en un sitio endémico y favorece la ejecución de programas de control.

En cuanto a LC, previamente se ha evaluado su distribución espacial y se ha modelado el nicho de las especies que participan en su transmisión en Guatemala y otros países de la región de Mesoamérica/Centroamérica (C. González *et al.*, 2010; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2011; D. A. Moo-Llanes, Pech-May, Ibarra-Cerdeña, Rebollar-Téllez, & Ramsey, 2019; D. Moo-Llanes *et al.*, 2013; David A. Moo-Llanes, 2016; Pigott, Bhatt, *et al.*, 2014; Purse *et al.*, 2017; Rodríguez-Rojas *et al.*, 2017). Sin embargo, la influencia de datos de presencia y de fondo provenientes de Norte América y Sudamérica genera un sesgo perceptible en los modelos que limita la identificación de zonas habitables para Guatemala y el resto de Centroamérica. Asimismo, no se toma en cuenta la influencia de barreras geográficas presentes en el istmo de Tehuantepec y el istmo panameño, las cuales influyen en la biodiversidad de flebótomos y mamíferos (Guevara & Sánchez-Cordero, 2018; Valderrama, Tavares, Dilermando, & Filho, 2014). Por lo tanto, la disponibilidad de ocurrencias de LC para la región centroamericana a partir de estudios anteriores (Pigott, Golding, *et al.*, 2014; Ruiz, 2018) y los datos que se generarán en este estudio, es viable desarrollar un modelo de nicho ecológico que prediga la distribución espacial de LC –la cual supone la presencia de vectores y reservorios– en Guatemala y el resto de la región. Por consiguiente, para que la LC pueda controlarse y vigilarse de manera efectiva es necesario que tener un mayor conocimiento sobre: 1) regiones del país representan un mayor riesgo para la presencia de LC – lo cual supone la presencia de reservorios y mamíferos – y 2) qué mamíferos podrían estar involucrados en el ciclo de transmisión.

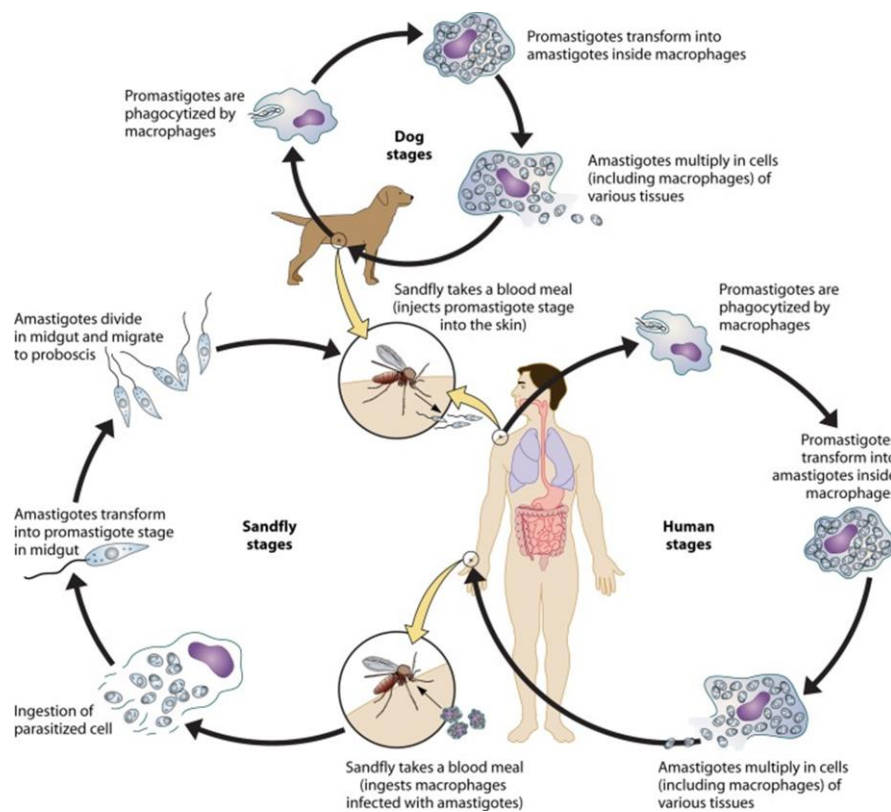
## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad tropical provocada por el parásito intracelular de género *Leishmania* y familia *Kinetoplastidae*, el cual se transmite a humanos a partir de la picadura del vector *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Esch & Petersen, 2013). Además, como establece la Organización Mundial de la Salud en su último reporte del año 2010, esta enfermedad mantiene su puesto entre las más desatendidas, puesto que principalmente afecta a grupos vulnerables que viven bajo la carga de la pobreza. Sin embargo, gracias a recientes avances de este milenio en cuanto al tratamiento, diagnóstico y prevención de leishmaniasis, se cuenta con mayor información sobre la biología del organismo, incluyendo su fisiología, genética y ecología (Marinkelle, 2010). Dichos temas se discuten a continuación.

#### 1. Ciclo de vida

Figura 1. Etapas del ciclo de vida de la leishmaniasis en hospederos caninos (reservorios), humanos y en la etapa vectorial.



(Esch & Petersen, 2013)



Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida polimórfico que abarca procesos de transmisión entre vector, hospedero reservorio y hospedero incidental. En estos casos, el parásito usualmente lleva a cabo una transición entre dos fases: (a) amastigote, un estadio intracelular obligado con una afinidad principal por macrófagos y otros leucocitos fagocitantes y (b) promastigote, un estadio flagelar móvil y extracelular (Esch & Petersen, 2013). Por lo tanto, cuando dichos vectores hematófagos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* adquieren sangre de un hospedero, este insecto ingiere los macrófagos contaminados con amastigotes de *Leishmania*. Luego, dichos macrófagos atraviesan un proceso de lisis en el sistema digestivo del vector. Es en este punto donde los amastigotes se transforman en la etapa promastigote, donde el parásito genera un flagelo y se convierte en un promastigote procíclico (Esch & Petersen, 2013; Killick-Kendrick, 1990).

Media vez el parásito logra alojarse en el sistema digestivo medio, este se diferencia en una variedad promastigote elongada y móvil llamada nectomonado, la cual escapan la matriz peritrófica y se adhiere a las microvellosidades del sistema digestivo medio de este artrópodo. Luego, dicho promastigote no replicativo migra del sistema digestivo posterior al anterior, donde se diferencia en la morfología leptomonada, a partir de la cual continúa la replicación en dicha región. Finalmente, después de 4-14 días se alcanzan los suficientes números para colonizar la mucosa el parásito alcanza la probóscide del insecto a partir de las glándulas salivales en su forma infectiva, el promastigote metacíclico (Esch & Petersen, 2013; Oghumu, Natarajan, & Satoskar, 2015; Sunter & Gull, 2017). Entonces, cuando vuelve a darse el proceso de alimentación con un mamífero no infectado, los promastigotes acceden al torrente sanguíneo y son fagocitados por macrófagos. Es en este punto donde los promastigotes se transforman en amastigotes y se cumple el ciclo completo. Posteriormente, los amastigotes se reproducen por fisión binaria en una vacuola (Esch & Petersen, 2013).

## 2. Vectores

La leishmaniasis se transmite a nuevos hospederos a partir de la picadura por moscas de arena, dípteros también llamadas flebótomos o jejenes (Marinkelle, 2010). Incluso si no hay un acuerdo predominante sobre la taxonomía de estos organismos, se reconoce la existencia de 600 especies que se pueden dividir en dos géneros del Viejo Mundo, *Phlebotomus* y *Sergentomyia* y tres géneros del nuevo mundo, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*. No obstante, incluso si existen otras especies hematófagas que se alimentan de sangre humana únicamente los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* han sido reconocidos como vectores de la enfermedad (Alemayehu & Alemayehu, 2017).

El ciclo de vida de las moscas de arena atraviesa cuatro estadios larvarios que proceden de embriones que se desarrollan en ambientes húmedos. El tiempo de desarrollo usualmente tarda tres semanas, pero puede verse afectado por la temperatura ambiental (Chowdhury *et al.*, 2016). En cuanto a la alimentación, la ausencia de comportamiento hematófago en la mosca de arena macho representa un claro dimorfismo sexual que determina que únicamente la mosca hembra participe en la transmisión de la enfermedad. En

efecto, las moscas hembras únicamente pueden llevar a cabo unas cuantas ovoposiciones sin consumir sangre. Posteriormente, la sangre es necesaria para futuras ovoposiciones (Marinkelle, 2010).

Las moscas de arena tienden a preferir nichos fríos y húmedos, tales como letrinas, camas, cuevas, fisuras en paredes, entre otros (Marinkelle, 2010). Por ello, las moscas de arena se caracterizan por ser termofílicas, puesto que esta variable influye en la viabilidad del mosquito en todas las etapas de crecimiento. Asimismo, la humedad y la precipitación también influyen en la supervivencia de este vector, puesto se requiere de suficiente humedad para el desarrollo del huevo, mas no un exceso de lluvia que limite el descanso y movilización de adultos y elimine a estados inmaduros (Koch, Kochmann, Klimpel, & Cunze, 2017). Un ejemplo del efecto de las restricciones geográficas del nicho asociado a este artrópodo se corroboró con base en el modelaje bioclimático de *Lutzomyia cruzi* se logró comprobar que la presencia del vector se correlaciona con rangos de temperatura de 21.76-26.58 °C y valores de precipitación total entre 1005 y 2048 mm (Falcão de Oliveira, Galati, Oliveira, Rangel, & Carvalho, 2018). Por parte, en cuanto a la movilidad del vector, se ha visto que aquellas especies peridomésticas pueden migrar hasta más de 2 km a una rapidez de 1 m/s, pero aquellas especies de bosques neotrópicales no suelen migrar más de 1 km (Marinkelle, 2010).

Cuadro 1. Especificidad de vectores por distintas especies del género *Leishmania*.

Especie de <i>Leishmania</i>	Distribución geográfica	Vectores
<i>Leishmania aethiopica</i>	Etiopía, Kenya	<i>Phlebotomus longipes</i> <i>P. pedifer</i>
<i>L. major</i>	África del Norte, Medio Oriente, Asia Central, África Sub-Sahariana, Sudán, India del Norte y Pakistán	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>
<i>L. mexicana</i>	Centro América	<i>Lutzomyia olmeca</i>
<i>L. amazonensis</i>	Sudamérica, Amazonas del norte	<i>L. flaviscutella</i>
<i>L. braziliensis</i>	Sudamérica	<i>Psychodopygus</i>
<i>L. peruviana</i>	Andes Occidentales de Perú, Argentina	<i>L. verrucarum</i> , <i>L. pvmenis</i>
<i>L. infantum</i>	Cuenca mediterránea, Medio Oriente, Asia Central, Pakistán, China, América Central y Sudamérica, Europa del sur y el occidente Africano.	<i>P. prniciosufi</i> , <i>P. arias</i>
<i>L. donovani</i>	Etiopía, Sudán, Kenya, India, China, Bangladesh y Burma	<i>P. argentipes</i> , <i>P. orinntalis</i> y <i>P. martini</i>

(adaptado de Alemayehu & Alemayehu, 2017)

### 3. Formas clínicas

Distintas especies de *Leishmania* varían en su especificidad por el tejido de su hospedero y, a la vez, la respuesta inmune del hospedero también influye en la presentación clínica (CDC, 2018). Es por ello que el tropismo diferencial por los macrófagos de la dermis, la mucosa naso-orofaríngea y el sistema

reticuloendotelial resulta en las tres principales presentaciones o formas clínicas de leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Stark, 2018).

#### a. Visceral

También llamado kalazar, la leishmaniasis visceral representa la forma clínica con mayor tasa de mortalidad debido a su localización en órganos vitales. Clínicamente, este variante se caracteriza por un cuadro febril con oscurecimiento de la piel, pérdida de peso, hepatosplenomegalia, pancitopenia, niveles altos de proteína y reducida albumina en suero, así como hipergammaglobulinemia (Stark, 2018). Incluso si el tiempo de incubación es de entre semanas a meses, en algunos casos una infección asintomática puede llegar a manifestarse años o décadas después de la infección en un episodio de inmunosupresión (CDC, 2018). Asimismo, en el caso de los niños suele darse una diarrea crónica y retardación del crecimiento.

Debido a la naturaleza sistémica de la enfermedad, la ausencia de tratamiento provoca que el padecimiento evolucione a caquexia, hemorragia, infecciones secundarias y falla multiorgánica, lo cual puede llevar a un desenlace letal. Por otra parte, una complicación común de la leishmaniasis visceral en algunas regiones geográficas como Sudán y otros países de África oriental es la llamada leishmaniasis dermal post-kala-azar que se manifiesta como lesiones nodulares con alta carga parasitaria (Oghumu *et al.*, 2015; Satoskar & Durvasula, 2013). Las principales especies de *Leishmania* implicadas son *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. tropica* y *L. infantum* (también conocido como *L. chagasi*) (CDC, 2018; Torres-guerrero, Quintanilla-cedillo, Ruiz-esmenjaud, & Arenas, 2017).

A diferencia de las formas clínicas cutáneas que se mencionarán a continuación, la patogénesis visceral tiene un componente predominantemente inmunológico. Al inicio, la introducción de parásitos en la dermis resulta en su fagocitosis por macrófagos residentes e infiltrantes. Luego de transformarse en amastigotes, los parásitos resisten a la acidificación del fagolisosoma y persisten en vacuolas endosomales tardías (Esch & Petersen, 2013). Posteriormente, a partir de los macrófagos infiltrantes, el parásito viaja a través de la sangre para así lograr colonizar órganos del sistema retículo-endotelial, tal como los nódulos linfáticos, el bazo y el hígado, lo cual explica la presentación de hepatosplenomegalia (Satoskar & Durvasula, 2013).

Después del inicio de la infección, el balance entre respuestas inmunológicas robustas de inmunofenotipo Th1 y respuestas inmunomodulatorias dominadas por células T reguladoras determinan la tendencia hacia resistencia o susceptibilidad (R. Kumar & Nylén, 2012). Usualmente, la infección hepática tiende a resolverse rápidamente con mínimo daño tisular y se caracteriza por la formación de granulomas respecto a células de Kupffer infectadas. En este caso el balance entre interferón gamma y citoquinas inmunosupresoras permite erradicar el parásito sin un daño extensivo. En cambio, en el bazo la infección suele progresar hacia una patología severa. En este caso, la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-10 propician la persistencia del parásito y la creciente acumulación de daño en la estructura y función de dicho órgano al inhibir la activación de macrófagos (R. Kumar & Nylén, 2012; Satoskar & Durvasula, 2013).

## b. Mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea o “espundia” es una de las complicaciones de ciertos casos de la forma cutánea que se caracterizan por la infección de la mucosa naso-orofaringe. En efecto, 1-10% de los casos de leishmaniasis cutánea pueden resurgir con una patología mucosa (Torres-guerrero *et al.*, 2017). En consecuencia de un mecanismo inmunopatológico, esta forma clínica resulta en un cuadro con desfiguración del rostro a causa de granulación septal y perforación, así como la erosión y ulceración del paladar, úvula, labios, faringe y laringe. Asimismo, da lugar a gingivitis, periodontitis, linfadenopatía localizada y, en casos severos, se da una expansión hacia la mucosa óptica y genital (CDC, 2018; Stark, Craig, 2018). Es más, esta patología tiende a ser resistente a tratamientos quimioterapéuticos y, si no se detecta a tiempo, suele resultar en un desenlace fatal debido a infecciones secundarias y desnutrición (Satoskar & Durvasula, 2013).

Los principales agentes etiológicos de esta forma clínica son las especies del subgénero *Leishmania* (*Vianna*), lo cual incluye a las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*, pero también se han dado casos con *L. amazonensis* (CDC, 2018; Torres-guerrero *et al.*, 2017). Por consiguiente, las lesiones histológicas tienden a ser similares a las que se dan en la forma cutánea. Es por ello que la patogénesis puede apreciarse a partir de cómo la infección evoluciona de una respuesta celular inespecífica hacia una reacción necrótica y granulomatosa. Asimismo, la mucosa nasal presenta una infiltración celular perivascular severa y licuefacción del cartílago a causa de la proliferación de amastigotes en el endotelio vascular. Además, se evidencia un perfil inmunológico con hipersensibilidad retardada, linfoproliferación, células T de fenotipo Th1 y Th2 y alta secreción de interferón gamma y TNF- $\alpha$  (Marinkelle, 2010).

## c. Cutánea

La leishmaniasis cutánea representa la forma clínica más prevalente de esta infección parasitológica. Incluso si este término engloba a toda manifestación patológica en la piel, usualmente denomina a aquellos casos de leishmaniasis cutánea localizada, no otras formas atípicas como la leishmaniasis cutánea diseminada o difusa, leishmaniasis *recidivans* y Post-kala-azar (CDC, 2018). El cuadro clínico suele describirse como la presencia de pápulos que evolucionan a placas nodulares y posteriormente a lesiones ulcerativas con un borde elevado y depresión central. Incluso si no suelen ser dolorosas, son un punto de riesgo para las infecciones bacterianas secundarias, así provocando inflamación y dolor (CDC, 2018; Stark, 2018). De no tratarse, la infección puede evolucionar hasta presentar lesiones satélite, linfadenopatía regional y linfangitis nodular. Ahora, incluso si esta patología no tiende a ser letal, puede provocar marginalización social, daño psicológico y morbilidad cosmética (Burza, Croft, & Boelaert, 2018). Comúnmente, la infección suele resolverse por su cuenta sin intervención, pero en algunos casos es necesario iniciar un tratamiento para evitar un proceso crónico. Dicha resolución se da entre 3-9, 2-6 meses y 6-15 meses para distintos agentes etiológicos como *L. mexicana*, *L. major* o *L. braziliensis*, *L. tropica* y *L. panamensis*, respectivamente (Torres-guerrero *et al.*, 2017).

Además de los ya mencionados, otros agentes etiológicos de la enfermedad incluyen al complejo *L. major* (*L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*), al complejo *L. mexicana* (*L. mexicana* y *L. amazonensis*) y el complejo del subgénero *Vianna* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*). A diferencia de la forma visceral, dichos parásitos mantienen una infección local cuya evolución depende de la especie y la inmunología del paciente. En la fase temprana, los parásitos son fagocitados por células dendríticas y neutrófilos desde los primeros 30 minutos, los cuales se ven forzados a secretar quimioatrayentes como MIP-1 $\beta$  (Satoskar & Durvasula, 2013). Posteriormente, la llegada de macrófagos lleva a su infección por amastigotes, los cuales son eliminados por la actividad de interferón gamma y TNF- $\alpha$ . Luego, la eliminación de la infección o su transición a estado crónico depende del grado de la respuesta adaptativa T CD4+ Th1 y la actividad citotóxica mediada por células T CD8+ (Scott & Novais, 2016).

#### 4. Diagnóstico de la leishmaniasis cutánea

El diagnóstico clínico de la leishmaniasis cutánea puede subdividirse en tres categorías: i) exámenes parasitológicos, ii) ensayos serológicos y iii) ensayos moleculares. Cada grupo conlleva ventajas y desventajas relacionadas al costo, la calidad analítica del resultado, el riesgo para el paciente, el tiempo de espera, entre otras variables (C. A. M. Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012). Puesto que 1) la presentación clínica puede confundirse con otras patologías como las úlceras bacterianas, lepra, cáncer, entre otros, y 2) el tratamiento es costoso y conlleva varios riesgos, la confirmación de laboratorio es imprescindible para el diagnóstico de la enfermedad (Marinkelle, 2010).

##### a. Parasitológico

Debido a su alta especificidad y la detección directa del parásito, el diagnóstico parasitológico representa el estándar de referencia para la leishmaniasis cutánea. Todos los métodos asociados parten de técnicas comunes para la toma de muestra, entre ellas los extendidos, raspados, biopsias o aspirados dérmicos que se toman del borde de las lesiones. Luego, dichas biopsias se someten a la denominada tinción Giemsa, lo cual permite la observación de amastigotes por microscopía (Montalvo *et al.*, 2012). Dada la ausencia de equipo sofisticado y reactivos costosos, este suele ser el método de preferencia en los centros de salud de sitios endémicos. No obstante, los métodos parasitológicos se ven limitados por su reducida sensibilidad, la cual puede alcanzar rangos de 15-30% en las Américas, por lo que frecuentemente es necesario aplicar varias pruebas para corroborar un resultado negativo (Montalvo *et al.*, 2012; Reithinger & Dujardin, 2007).

##### b. Serológico

Los métodos de diagnóstico inmunológicos tienen la desventaja de no demostrar directamente la presencia o ausencia del agente etiológico, por lo que la especificidad puede ser subóptima. Existen varias modalidades de ensayos serológicos, tal como la inmunofluorescencia, inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), inmunoblot, aglutinación directa, inmunocromatografía y la prueba de Montenegro (Montalvo *et*

*al.*, 2012). Desafortunadamente, incluso si esta categoría de diagnóstico suele utilizarse en la parasitología para alcanzar una sensibilidad considerablemente mayor a las pruebas basadas en microscopía, este no es el caso de la leishmaniasis, donde la respuesta humoral tiende a ser pobre (de Vries, Reedijk, & Schallig, 2015). Por lo tanto, la única prueba usada para la leishmaniasis cutánea es la prueba de Montenegro, la cual se utiliza en algunos estudios epidemiológicos por su alta sensibilidad y especificidad. No obstante, suele limitarse a estudios de exposición previa, puesto que no puede diferenciar entre infecciones pasadas y presentes (Reithinger & Dujardin, 2007).

### c. Molecular

La mayoría de ensayos moleculares para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea se basan en a técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR en inglés), convencional o en tiempo real, para distintos genes marcadores del parásito. Este enfoque suele ser el más ventajoso, puesto que es el más sensible y específico, permite la detección directa de *Leishmania* y, en algunos casos, permite identificar linajes de la especie del agente etiológico, lo cual es clínicamente relevante (Vries *et al.*, 2015). Para ello, existen distintas dianas moleculares como: 1) espaciadores internos de transcripción (ITS), ADN del kinetoplasto (kDNA), subunidad de ARN ribosomal 18S, glucoproteína (*gp63*), cisteína proteínasa B (*cpb*) y *hsp70* (Montalvo *et al.*, 2017; M. Montalvo *et al.*, 2012).

#### 1) Kinetoplasto (kDNA)

El kDNA representa uno de las dianas moleculares más sensibles para determinar la presencia del parásito debido a que cada uno contiene 10 000 copias (Bensoussan, Nasereddin, Jonas, Schnur, & Jaffe, 2006; C. A. M. Montalvo *et al.*, 2012). kDNA ha demostrado su sensibilidad en comparación con el diagnóstico parasitológico y serológico (prueba de Montenegro) y el cultivo *in vitro* (Satow *et al.*, 2013). Sin embargo, si no se utilizan cebadores para regiones conservadas, en algunos casos podría requerirse el diseño de cebadores específicos para distintas especies *Leishmania*. De igual manera, dada la selección de cebadores apropiados, el uso de este marcador puede llegar a ser de mayor utilidad en el diagnóstico de la infección (Bensoussan *et al.*, 2006).

#### 2) ITS

La amplificación de genes que codifican para espaciadores internos de transcripción puede utilizarse para discriminar entre distintas especies de *Leishmania* utilizando técnicas de RFLP y revelado en gel. De igual forma, se ha demostrado que este marcador es más sensible que otros métodos tradicionales como los parasitológicos (Bensoussan *et al.*, 2006). Dicho método ha sido evaluado a partir de ADN de distintas matrices, incluyendo cortes histológicos (Hijjawi *et al.*, 2016).

### 3) *hsp70*

El gen *hsp70* de *Leishmania* codifica para una proteína chaperona que es esencial en la prevención de proteínas mal plegadas durante condiciones térmicas de estrés celular, específicamente, durante la transición de un vector artrópodo a un hospedero mamífero. Debido a su rol preponderante en la homeostasis y en los mecanismos de diferenciación entre distintas etapas del ciclo de vida de dicho agente protozoario, este gen tiende a ser evolutivamente conservado (Lindquist, 1986; Verghese, Abrams, Wang, & Morano, 2012). Inicialmente, la estructura y expresión de este gen se estudió usando a *L. major* y *L. infantum* como modelos y se describió un conglomerado génico con al menos seis copias en tándem o aisladas en distintos loci y con exones y regiones no traducidas (UTR por sus siglas en inglés) conservadas (Quijada, Soto, Alonso, & Requena, 1997). Posteriormente, Akora *et al.* investigó la heterogeneidad de *hsp70* en muestras de *L. donovani* y *L. tropica* provenientes de distintos orígenes geográficos. A partir de la generación de una genoteca con transgenes de 1.3 a 2.0 kb incluyendo a *hsp70* se llevó a cabo un análisis de polimorfismos por restricción de fragmentos (RFLP) y *Southern blotting* que permitió discriminar entre distintas cepas, así como su origen geográfico (Arora, Kapoor, & Sehgal, 1998). Fue hasta en el año 2004 que el equipo García *et al.* diseñó un ensayo basado en el análisis PCR-RFLP directamente de muestras clínicas a partir del gen *hsp70* con la enzima de restricción *HaeIII*, lo cual permitió discernir entre las especies *L. lainsoni*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, y los complejos *L. braziliensis/L. peruviana* y *L. guyanensis/L. panamensis* (García *et al.*, 2004; A. M. Montalvo *et al.*, 2010).

Para la genotipificación de *Leishmania*, suelen utilizarse diversos ensayos, tal como el análisis qPCR de la curva de punto de fusión FRET, la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) – el estándar de referencia establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) –, el análisis de SNPs en los genes de dichas enzimas y el análisis PCR-RFLP de los genes *hsp70* (Reithinger & Dujardin, 2007). En efecto, fue en el año 2010 cuando el equipo de Montalvo *et al.* buscó estandarizar el uso de PCR-RFLP basado en dicho gen para especies del Viejo Mundo y Nuevo Mundo, puesto que ya se había utilizado con anterioridad en Sudamérica para diferenciar ciertas especies del complejo *Leishmania (Vianna)*. Fue por ello que en dicho caso se realizó un análisis *in silico* con 51 secuencias para generar algoritmos que pudieran evaluarse en 139 cepas de 14 especies de interés mundial (A. M. Montalvo *et al.*, 2010).

A pesar de la exitosa validación que Montalvo *et al.* llevó a cabo, se comprobó que el protocolo en el cual se basó dicho proceso carecía de la especificidad y sensibilidad deseada, puesto que no permitía una suficiente amplificación de *hsp70* a partir de distintas matrices y en algunos casos amplificaba ADN de otros organismos como tripanosomas. Por lo tanto, en un futuro estudio se optimizó la metodología empleada al agregar un conjunto de nuevos cebadores (ver Cuadro2) que eventualmente llegaron a constituir un nuevo protocolo de PCR anidado (A. M. Montalvo, Fraga, Maes, Dujardin, & Van Der Auwera, 2012). Posteriormente, el equipo de Van der Auwera *et al.* logró estandarizar una versión del

protocolo adaptada a la secuenciación en vez de RFLP que se comparó con la MLEE, así representando el primer estudio en el que se utilizan distintos amplicones el gen *hsp70* (ver Figura 2) para dilucidar filogenias (Van der Auwera *et al.*, 2013). Asimismo, en un siguiente estudio se comparó al marcador *hsp70* con otros tres, MLEE y la tipificación de secuencia multilocus (MLST), lo cual permitió demostrar que dicho gen tiene de las mejores resoluciones para distintas especies médicamente relevantes (Gert Van Der Auwera *et al.*, 2014).

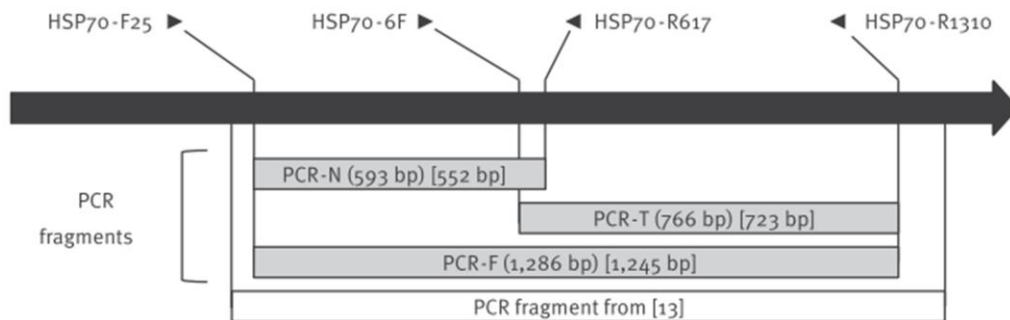
Cuadro 2. Conjunto de cebadores utilizados para la amplificación de distintos fragmentos\* del gen *hsp70* en *Leishmania* a partir de un PCR anidado.

<i>hsp70</i> -PCR <sup>a</sup>	Primer	Annealing <sup>b</sup>	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size
PCR-G	HSP70-sen	435-455	GACGGTGCCTGCCTACTTCAA	1422 bp
	HSP70-ant	1856-1836	CCGCCATGCTCTGGTACATC	
PCR-F	F25	480-498	GGACGCCGGCACGATTKCT	1286 bp
	R1310	1765-1744	CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC	
PCR-N	F25	480-498	GGACGCCGGCACGATTKCT	593 bp
	R617	1072-1051	CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA	
PCR-C	F251	706-726	GACAACCGCCTCGTCACGTTC	741 bp
	R991	1446-1425	GTCGAACGTCACCTCGATCTGC	

\*Posiciones de anillamiento relativas al gen XM\_001684512 (*L. major* Friedlin) en GenBank.

(Montalvo *et al.*, 2012)

Figura 2. Distintos fragmentos del gen *hsp70* amplificados que pueden utilizarse para la genotipificación de muestras de *Leishmania*.



(Van der Auwera *et al.*, 2013)

## 5. Tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Para el tratamiento de la LC esta suele diversificarse entre LC simple y LC compleja, puesto que en estos últimos casos suelen emplearse medidas más agresivas. En dichos casos complejos se contempla: el



riesgo de leishmaniasis mucocutánea vinculada al subgénero *Vianna*, la presencia de linfadenopatía, la presencia de múltiples lesiones o una sola lesión voluminosa, lesiones en la cara, dedos o genitales, la inmunosupresión o la existencia de síndromes inusuales como la leishmaniasis recidivans, difusa o diseminada (Aronson *et al.*, 2017). Sin embargo, en la mayoría de casos con leishmaniasis simple la lesión puede resolverse espontáneamente en 2-18 meses, especialmente cuando se trata de especies como *L. major* y *L. mexicana*. No obstante, aun así puede incluirse un tratamiento farmacéutico cuando se requiera acelerar la cura, reducir la cicatrización o cuando la identificación de la especie permite reevaluar el riesgo de complicaciones. De igual forma, los tratamientos sistémicos se reservan para los casos más complicados en donde se da inmunosupresión, lesiones extensas, falta de respuesta a tratamiento y un cuadro mucocutáneo. En el caso de manifestaciones por *L. major*, el tratamiento local suele incluir crioterapia con antimoniales intralesionales así como un ungüento con paromomicina. En el caso de infecciones por *L. major* o *L. infantum*, el tratamiento suele modificarse para incluir termoterapia en vez de crioterapia.

En cuanto a las manifestaciones del Nuevo Mundo, los tratamientos locales involucran paromomicina, termoterapia y antimoniales para *L. mexicana*, *L. braziliensis* y el complejo *L. guyanensis*, respectivamente (Burza *et al.*, 2018). Ahora, los tratamientos sistémicos suelen fundamentarse de preferencia en el uso de antimoniales pentavalentes. Es más, en el caso de especies como *L. mexicana* esta quimioterapia es prácticamente el único tratamiento efectivo. Sin embargo, en casos en los que se determina la existencia de resistencia a estas drogas, puede administrarse miltefosina o, en casos extremos, amfotericina B, una alternativa con mayor costo y efectos secundarios más severos (de Vries *et al.*, 2015; Torres-guerrero *et al.*, 2017). Además, la miltefosina es principalmente útil en el caso de infecciones *L. panamensis*, donde la efectividad es mayor al 90% (Soto *et al.*, 2004).

## B. Epidemiología de la leishmaniasis cutánea

Durante los últimos 25 años se ha descrito un aumento en la prevalencia de casos de leishmaniasis a nivel mundial, lo cual se ha atribuido a diversos factores como la globalización, el cambio climático y la guerra. Dichos cambios han provocado el surgimiento de brotes en el Medio Oriente, África del Norte y Siria (Steverding, 2017). La leishmaniasis es endémica en 97 países del mundo, lo cual representa hasta mil millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2019). Asimismo, se estima que en la población mundial, existen 12 millones de individuos que padecen de esta infección y que hay un incremento anual de 0.2-0.4 millones y 0.7-1.2 millones de casos de leishmaniasis visceral y cutánea, respectivamente (Georgiadou, Makaritsis, & Dalekos, 2015).

Puesto que los programas locales de cada país han tenido dificultades para enfrentar la enfermedad derivado de que tiene una epidemiología y ecología compleja que requiere de una significativa cooperación técnica, operativa y política confirma el por qué la leishmaniasis se considera una enfermedad tropical desatendida, (Alvar *et al.*, 2012). Lamentablemente, la enfermedad tiende a predominar en poblaciones vulnerables que se ven sujetas a la desnutrición, la migración, una reducida calidad de vivienda y cierto

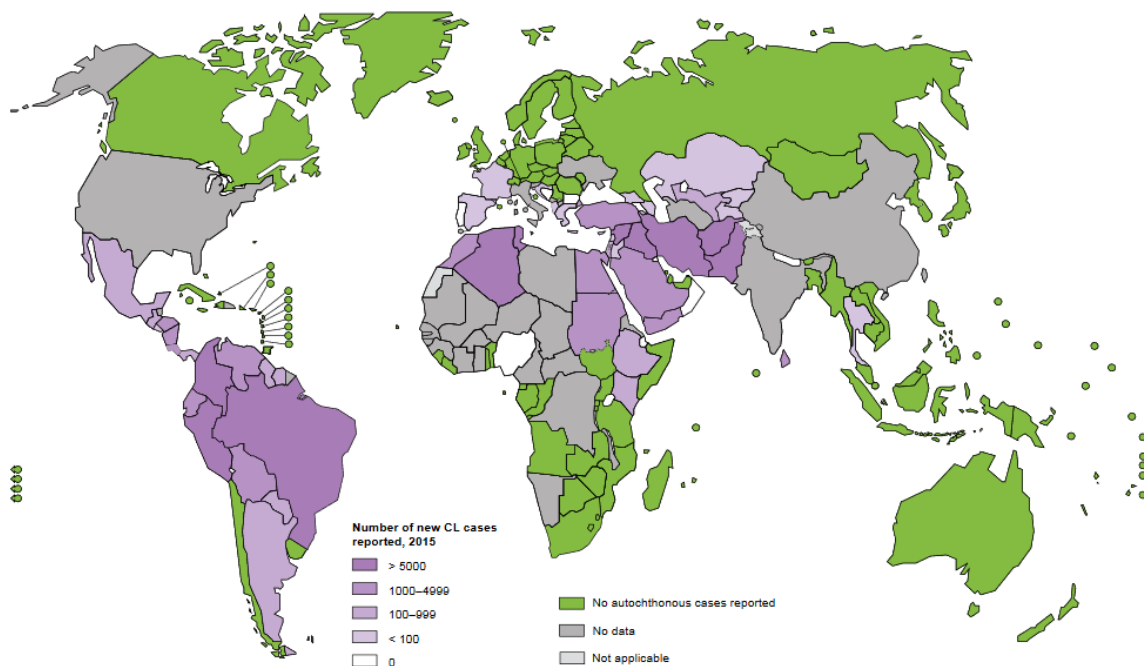
grado de inmunosupresión (Torres-guerrero *et al.*, 2017). De las distintas formas clínicas, la leishmaniasis cutánea es la más prevalente y dispersa, puesto que existen varias especies de *Leishmania* asociadas y existen casos desde Asia central y occidental hasta en las Américas (Marinkelle, 2010). A continuación, se presenta el panorama de la leishmaniasis cutánea a nivel mundial, en el Nuevo Mundo y en Guatemala.

## 1. Mundial

De los 97 países donde la leishmaniasis cutánea es endémica, 65 abarcan tanto la manifestación visceral (LV) como la cutánea (LC) mientras 22 son únicamente endémicos para LC. Dichos países abarcan distintas regiones como Asia, África, las Américas y el Mediterráneo (WHO, 2019). Para todos estos casos existe una amplia diversidad de parásitos y vectores, de tal forma que 20 especies de *Leishmania* causan esta patología y 30 especies de moscas de arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* la transmiten (ul Bari, 2006). Hasta el año 2008, un tercio de todos los casos ocurrían en América, la cuenca del Mediterráneo, Asia occidental, Medio Oriente y Asia central. Asimismo, el 70-75% de la prevalencia se concentraba en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Algeria, Irán, Costa Rica Brasil y Perú pero el número de países endémicos ha aumentado con el tiempo debido a la inmigración (Alvar *et al.*, 2012; Burza *et al.*, 2018).

Por otra parte, la enfermedad tiende a tener una carga considerable a nivel socioeconómico y psicosocial. Como se mencionó anteriormente, la enfermedad afecta de manera predominante a aquellas personas afectadas por la pobreza. Irónicamente, el tratamiento para la enfermedad tiene un alto costo (30-1500 USD), por lo que es un claro impedimento en el desarrollo personal y familiar. A pesar de la baja morbilidad y mortalidad de la leishmaniasis cutánea, esta manifestación clínica provoca lesiones que magnifican la inequidad de género. Esto se da por las limitaciones económicas de las mujeres y las cicatrices que provocan estigma social y provocan el rechazo de sus maridos (Okwor & Uzonna, 2016). En efecto, se ha comprobado que esta forma clínica reduce la calidad de vida y provoca sufrimiento psicológico (Bennis, De Brouwere, Belrhiti, Sahibi, & Boelaert, 2018).

Figura 3. Incidencia de la leishmaniasis cutánea a nivel mundial según casos reportados en el 2015.



(Rahinatu *et al.*, 2018)

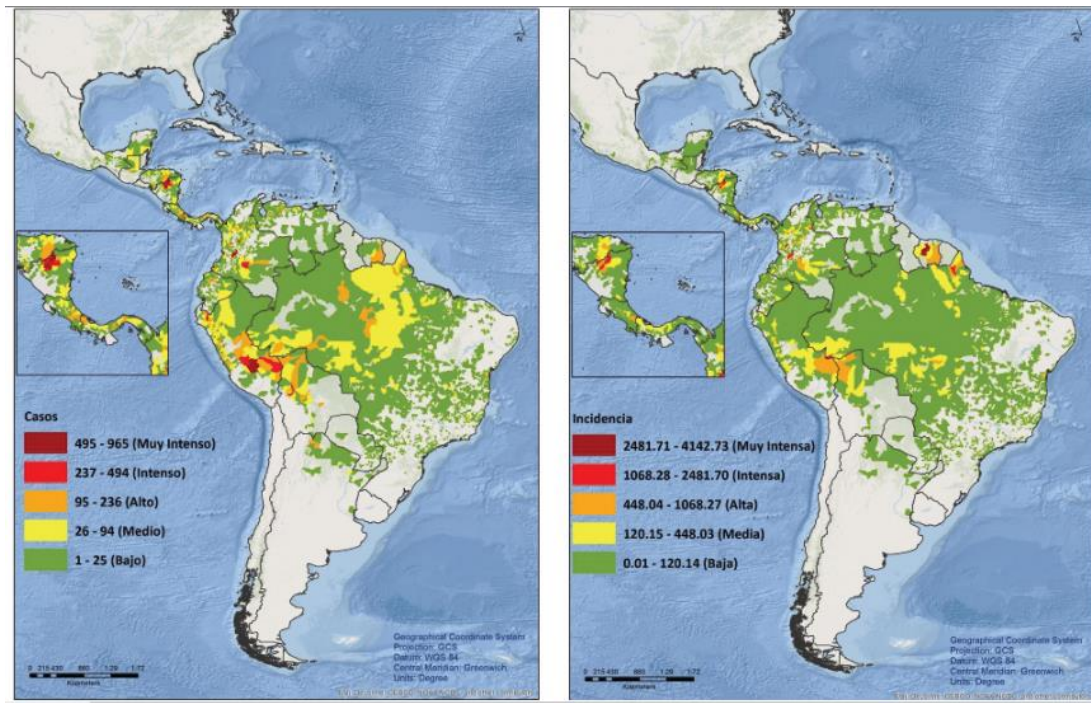
## 2. América

En las Américas, las infecciones humanas por dicho parásito mantienen una alta incidencia y distribución geográfica amplia. El 96% de casos de leishmaniasis visceral (LV), que presenta la manifestación clínica más letal, están focalizados en Brasil mientras que la LC se mantiene ampliamente distribuida en la región. Dicha forma clínica, así como la leishmaniasis mucosa, son endémicas en 18 países, principalmente en Brasil, Colombia, Nicaragua y Perú, donde se dan el 74.3% de los casos (Maia-Elkhoury *et al.*, 2018). Es más, se estima que en Latinoamérica surgen 60 000 nuevos casos anuales (Torres-guerrero *et al.*, 2017).

En esta región, las especies patogénicas pertenecen a los complejos *L. mexicana* o *L. braziliensis* (*Vianna*). Ahora, a pesar de que, como se había mencionado, la forma clínica tiene una reducida morbimortalidad en comparación con la leishmaniasis visceral, 1-10% de los casos de infección con el subgénero *Vianna* pueden hacer una transición hacia la forma mucosa (Burza *et al.*, 2018). En dichos casos, la ausencia de tratamiento puede llevar a consecuencias letales para el paciente. El principal nicho de la enfermedad que se da en Latinoamérica yace en sitios con altitud de entre 0 y 1500 m y 1500-3000 mm de precipitación. Además, existe un mayor riesgo de tipo ocupacional para aquellas personas que laboran al aire libre, tal como agricultores, taladores, cazadores, ornitólogos, entre otros. Esto sucede a causa de que los mayores factores de riesgo para la transmisión en América se dan cuando un determinado individuo:

tiene una mala calidad de vivienda, es menor de 15 años, se encuentra próximo a áreas rurales, descansa frecuentemente en sitios temporales y se encuentra en proximidad de animales peridomésticos o perros (Burza *et al.*, 2018; Torres-guerrero *et al.*, 2017).

Figura 4. Distribución de casos (izquierda) e incidencia (derecha) de la leishmaniasis cutánea en Latinoamérica a partir de datos obtenidos a partir de los Programas Nacionales de Leishmaniasis/Vigilancia.



(Maia-Elkhoury *et al.*, 2018)

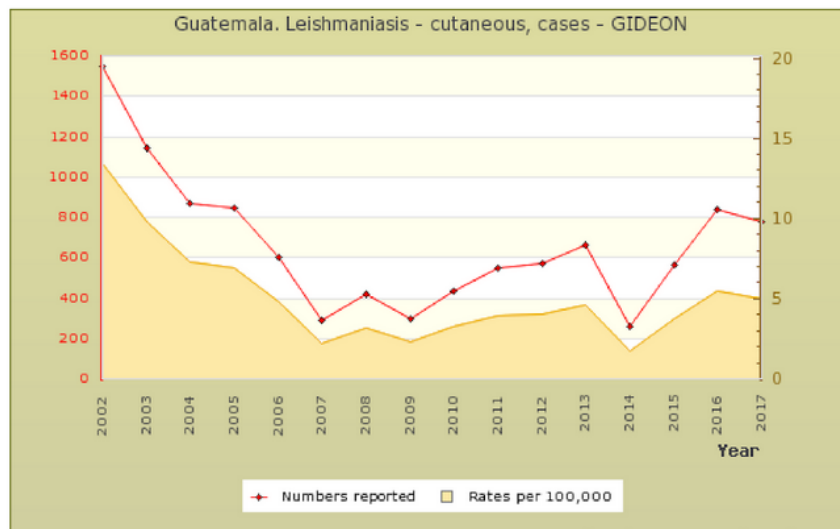
### 3. Guatemala

En el caso de Guatemala, uno de los países endémicos para la enfermedad, la leishmaniasis cutánea es la manifestación más común, por lo que en el periodo 2004-2008 se llegó a reportar hasta 683 casos anuales (Alvar *et al.*, 2012). Sin embargo, la incidencia reportada en la literatura no sobrepasa el 1.0%, se estima que podría haber una proporción de sub-reporte de hasta 1:40 (Copeland, Arana, & Navin, 1990). Con base en estudios epidemiológicos previos se sabe que, hasta el año 2008, existían 4, 262,387 personas en riesgo de contraer la enfermedad por parte de dos principales agentes etiológicos: *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Dichas especies provocan únicamente la manifestación cutánea, la cual es endémica en Petén, Izabal, Alta Verapaz, Quiché y Huehuetenango. De estos casos, el 84.7% se dan en mayores de 10 años y el 67% se dan en hombres (Alvar *et al.*, 2012).

Por otra parte, se sabe que las especies del vector en esta región endémica son *Lutzomyia olmeca olmeca* – la especie predominante –, así como *Lutzomyia ylephiletor*, *Lu. panamensis* y *Lu. ylephiletor*, donde estas últimas tres son vectores de *Leishmania braziliensis* (Berger, 2019; Rowton, de Mata, Rizzo,

Navin, & Porter, 1991). Por consiguiente, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) ha realizado las diligencias para que esta enfermedad forme parte de los protocolos nacionales de monitoreo, para que se cuente con tratamiento (antimoniato de meglumina) de acceso gratuito. No obstante, basado en un estudio transversal coordinado por MS-PAS y el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), se ha determinado que existe un reducido acceso a los centros de salud debido a factores como la distancia y el tiempo requerido – menos del 25% de infectados reportan haber buscado tratamiento– (Mendizábal-Cabrera R, de Leon O, Arana B, Duran E, Ramay B, Mendez L, 2015). Recientemente, se llevó a cabo un estudio que buscó identificar las especies de parásitos causantes de leishmaniasis cutánea en Guatemala entre los años 1980 y 2017 con base en la estandarización de la amplificación *hsp70* como método de genotipado PCR-RFLP (Ruiz, 2018). Por lo tanto, se determinó que la especie más prevalente es *L. braziliensis* (86.7%) seguido por las especies *Leishmania panamensis*/*Leishmania guyanensis* (3.33%). Además, se identificaron las especies *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi* y una variante de *L. braziliensis*.

Figura 5. Casos de leishmaniasis cutánea en Guatemala entre los años 2002-2017 como conteo absoluto y tasa de prevalencia por cada 100 000 habitantes



(Berger, 2019).

### C. Eco-epidemiología de la leishmaniasis cutánea

Como todo ser viviente, los organismos que provocan enfermedades en humanos, tal como la leishmaniasis, pueden estudiarse desde el punto de vista ecológico. En dicha línea surgió el campo de la “biogeografía de enfermedades”, una disciplina que se enfoca en describir la distribución espacial de patógenos, vectores, reservorios, hospederos susceptibles y otros agentes epidemiológicamente relevantes (Fountain-Jones *et al.*, 2018). Como se mencionó, un parásito representa a un agente biológico en una interacción o simbiosis con un hospedero u otros organismos que permiten la transmisión de la enfermedad (vectores) y su permanencia en el ecosistema (reservorios). Por consiguiente, deben existir factores

ambientales definidos que determinen la presencia o ausencia de dichos componentes en una región geográfica específica. Es por ello que los ciclos de transmisión reales suelen ser complejos e incluyen varias especies de vectores y hospederos en una misma localidad y con preferencias abióticas comunes. Por lo tanto, también ha surgido el campo de la eco-epidemiología, la cual busca pronosticar la presencia espacial de enfermedades a partir de su ecología (Escobar & Craft, 2016).

Uno de los conceptos esenciales en la eco-epidemiología de enfermedades es el concepto de “nicho ecológico”, el cual puede usarse para estudiar el sistema complejo de hospederos, vectores y parásitos que forman parte de una enfermedad infecciosa (Escobar & Craft, 2016). Previamente, existían dos conceptos contrapuestos de nicho ecológico: 1) el nicho Grinnelleano, cuyo enfoque estriba en los requerimientos abióticos de una especie y 2) el nicho Eltoniano que engloba el rol de una especie en su comunidad y las limitaciones que esto implica (Townsend Peterson, 2014). Posteriormente, a partir de una nueva definición que buscó unificar ambos conceptos llevó a que se redefiniera el nicho Grinnelleano como el nicho fundamental ( $N_f$ ), que describe las múltiples rangos de condiciones ambientales que pueden satisfacer los requerimientos fisiológicos de la especie a largo plazo (Escobar & Craft, 2016; Escobar, Qiao, Lee, & Phelps, 2017; Townsend Peterson, 2014). Consecuentemente, se definió un nuevo concepto, el nicho realizado ( $N_R$ ), que representa a la porción del nicho fundamental que realmente puede ser ocupado por la especie debido a que se dan las condiciones bióticas adecuadas (Escobar *et al.*, 2017). Sin embargo, el paradigma biótico/abiótico descrito sufrió un cambio reciente cuando surgió la idea de considerar a las barreras geográficas y las capacidades de dispersión de una especie al momento de delimitar el nicho realizado (Townsend Peterson, 2014). Por lo tanto, se designó a dicha variable como el factor de movimiento o “factor M” en un nuevo marco conceptual llamado “BAM” (biótico, abiótico y movimiento) y se redefinió el nicho realizado tomando en cuenta la limitación adicional que este factor ejerce en el área accesible de una especie (Barve *et al.*, 2011). Por lo tanto, con base en la síntesis de los distintos conceptos desarrollados se llegó a la siguiente definición de nicho ecológico: el conjunto de condiciones ambientales e interacciones bióticas que permiten a una especie o género ocupar un área geográfica delimitada en función de su respectiva capacidad de dispersión (Johnson, Escobar, & Zambrana-Torrelío, 2019).

Puesto que la información obtenida a partir de estos métodos puede llegar a ser de suma utilidad para investigadores y autoridades vinculadas a salud pública, así contribuyendo al control de enfermedades (Escobar *et al.*, 2017). Es por ello que, recientemente, han emergido investigaciones basadas en el modelo eco-epidemiológico para el pronóstico de alteraciones en la incidencia en función de la región y para la correlación de la presencia del vector con variables bioclimáticas y uso de tierra (Amro *et al.*, 2017; Chalghaf *et al.*, 2018; Falcão de Oliveira *et al.*, 2018; Ferro *et al.*, 2015; Moo Llanes, 2016).

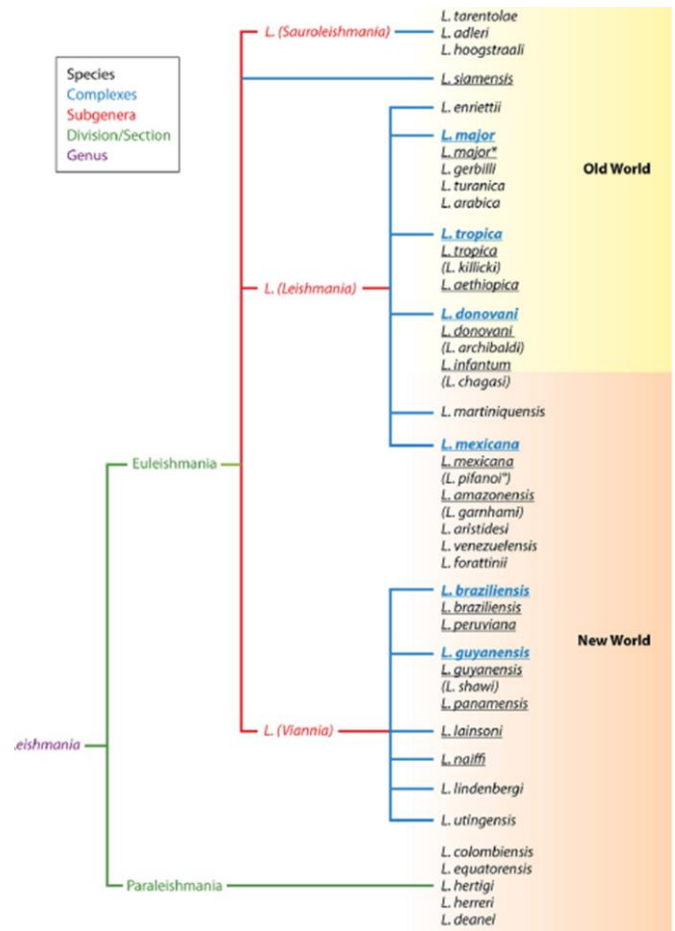
## 1. Biodiversidad del género *Leishmania*

El origen evolutivo del género *Leishmania* tiende a ser un tema controvertido, puesto que distintos autores han postulado hipótesis que establecen el origen de este clado en el Neotrópico, Paleártico o el

Neoártico. No obstante, partiendo de la evidencia en el registro fósil respecto al vector de la enfermedad (*Phlebotomus*) y la emergencia de mamíferos placentarios, puede estimarse el origen de este parásito alrededor de 50 millones de años atrás, durante el periodo paleógeno (Tuon, Amato Neto, & Sabbaga Amato, 2008). Por lo tanto, los organismos que forman parte de este género se describieron por primera vez en el año 1903, cuando se clasificó a *L. donovani*. Incluso si en un inicio se utilizaron sistemas de clasificación basados en Lineo, en 1964 se descartaron los sistemas taxonómicos fundamentados en características clínicas, puesto que dichas propiedades varían según la inmunidad y fisiología del hospedero. Después, en 1973 se propuso la división del género en cuatro complejos: *donovani*, *tropica*, *mexicana* y *braziliensis* (Akhoundi *et al.*, 2016). Posteriormente, se construyeron los primeros árboles filogenéticos a partir de métodos basados en MLEE, lo cual permitió confirmar la subdivisión de este grupo monofilético en dos subgéneros: *L. (Leishmania)* y *L. (Vianna)*. Luego, estudios moleculares confirmaron la divergencia y establecieron que la principal diferencia genética se da por la delección de la familia GP46/M-2 en *L. (Vianna)* (Schönian, Cupolillo, & Mauricio, 2013; Tuon *et al.*, 2008). Recientemente, nuevas clasificaciones moleculares han propuesto la separación del género en dos linajes: *Euleishmania* y *Paraleishmania*, donde el primer grupo se dividen en subgéneros *Leishmania*, *Vianna*, *Sauroleishmania* y el complejo *L. enrietti* (Akhoundi *et al.*, 2016).

Entre toda la filogenia del parásito *Leishmania*, aquellas especies clínicamente relevantes para la patología de la leishmaniasis cutánea pueden agruparse según los complejos que se describieron anteriormente: (1) *L. donovani*, (2) *L. tropica*, (3) *L. mexicana*, (4) *L. braziliensis* y (5) *L. guyanensis*, donde los primeros dos forman parte del subgénero *L. (Leishmania)* y el resto forma parte del subgénero *L. (Vianna)* (Gert van der Auwera & Dujardina, 2015). Partiendo del análisis por MLEE se ha podido caracterizar la filogenia de la leishmaniasis cutánea en muestras del Nuevo Mundo. Por consiguiente, en un estudio realizado en el siglo pasado se determinó que los parásitos *L. chagasi* forman parte de un zimodemo estrechamente relacionado con *L. major*. Asimismo, se confirmó la estrecha relación entre los

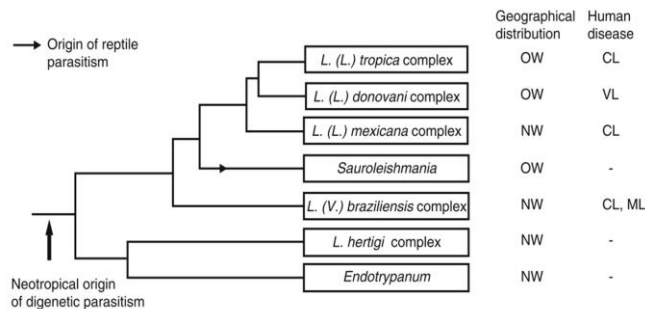
Figura 6. Taxonomía del género *Leishmania* basado en MLEE.



(Gert van der Auwera & Dujardina, 2015)

organismos del complejo *L. guyanensis* – *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. shawi* – y el alto grado de divergencia presente en el complejo *L. braziliensis* y *L. naiffi*, donde se presentaron 15 y 11 zimodemos, respectivamente. Posteriormente, en concordancia con los hallazgos obtenidos con MLEE, se dilucidó un árbol filogenético similar utilizando el análisis molecular por regiones no codificantes de genes ARNr (ITS) (Cupolillo, Momen, & Grimaldi, 1998). Por otra parte, estudios más recientes basados en la tipificación de secuencias multilocus (MLST) así como el análisis de marcadores moleculares individuales ha permitido corroborar varias características de la filogenia *Leishmania* que se describieron anteriormente (Boité, Mauricio, Miles, & Cupolillo, 2012; El Baidouri *et al.*, 2013; Gert Van der Auwera *et al.*, 2016; Gert Van Der Auwera *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). Por ejemplo, en el 2012 Boité *et al.* publicó un estudio en el que se analizaron 96 cepas pertenecientes al subgénero *L. (Vianna)* y se comprobó la pertenencia de *L. shawi* en el complejo *L. guyanensis*. De igual manera, El Baidouri *et al.* analizó 222 cepas de las regiones Africana y Eurásica, donde se confirma que la separación taxonómica entre especies de VL (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. archibaldi*) podría no estar justificado y, a la vez, se describen la relación entre la sub-estructuración genética y el origen geográfico.

Figura 7. Evolución de géneros *Leishmania/Endotrypanum* a partir de análisis moleculares, así como la distribución geográfica y patología típica.



(Croan, Morrison, & Ellis, 2002)

## 2. Influencia de variables climáticas y modelos de nicho ecológico

Como se había mencionado anteriormente, los enfoques eco-epidemiológicos permiten llevar a cabo decisiones de salud pública fundamentadas en modelos que utilizan distintas variables vinculadas al ecosistema. Entre dichos modelos se encuentran aquellos llamados modelos de nicho ecológico (MNE) de un agente infeccioso. Así como otras enfermedades vinculadas a artrópodos, la distribución puede correlacionarse con factores bióticos y abióticos que inciden sobre la supervivencia de los organismos involucrados en la cadena de infección (Morain *et al.*, 2012). Es por ello que los MNE más comúnmente empleados en el estudio de la leishmaniasis son los de tipo correlativo, puesto que estos permiten generar algoritmos que permiten inferir distribuciones futuras. Bajo dicho objetivo, se ha empleado software como



MaxEnt y GARP para modelar el nicho de la leishmaniasis y su vector utilizando variables bioclimáticas recopiladas en bases de datos como MERRAclim, WorldClim, entre otras (Fischer, Thomas, & Beierkuhnlein, 2011; Vega, Pertierra, & Olalla-Tárraga, 2018).

En el Viejo Mundo, varias investigaciones se han llevado a cabo desde 1998 para caracterizar la eco-epidemiología de la leishmaniasis. Para ello, se han evaluado variables tales como la precipitación, las temperaturas máximas y mínimas, el tipo de suelo, la vegetación, índices de temperatura superficial, entre otros. Diversos estudios en Sudan, Italia, India, Nepal, Kenia, Irán, entre otros, han utilizado tecnología tal como sistemas de información geográfica (GIS) y sensores remotos (RS) para correlacionarla con la presencia geográfica de ciertas especies del género *Leishmania* y sus respectivos vectores, tal como *Phlebotomus perniciosus*, *P. orientalis* y *P. argentipes* (Araujo Carreira, Figueiredo Mafra Magalhes, & da Silv, 2014; Gouri Sankar Bhunia, Kesari, Chatterjee, Kumar, & Das, 2013; Elnaiem *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2007; Salahi-Moghaddam, Mohebbi, Moshfae, Habibi, & Zarei, 2010). En cambio, en el Nuevo Mundo los estudios de esta clase comenzaron en Brasil alrededor del año 1996, donde se buscó relacionar la leishmaniasis cutánea con datos provenientes de LANDSTAT. Posteriormente, en Brasil y Colombia, se modelaron nichos ecológicos utilizando GARP y correlaciones con MaxEnt, respectivamente, en conjunto con datos bioclimáticos de WorldClim. Dichos resultados confirman estudios anteriores en Colombia donde se confirma la correlación de variables ambientales con el riesgo de leishmaniasis cutánea (Araujo Carreira *et al.*, 2014; C. González, Paz, & Ferro, 2013; Miranda, Massa, & Marques, 1996).

En general, los resultados de los estudios eco-epidemiológicos mencionados reflejan las condiciones de nicho necesarias para la presencia del vector en una determinada región (Araujo Carreira *et al.*, 2014). Por ello, en el Viejo Mundo, entre los hallazgos más comunes se encuentra la existencia de altas temperaturas mínimas y máximas, así como un mayor índice de vegetación en áreas rurales, lo cual corresponde a un clima tropical (Elnaiem *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2007). Asimismo, en un estudio basado en la presencia de seropositividad en perros determinó una mayor presencia de casos en asociación con una mayor precipitación anual y temperatura (Salahi-Moghaddam *et al.*, 2010). Así como las condiciones climáticas, también se ha evidenciado una correlación entre la seropositividad y factores como condiciones de vivienda de las personas, la edad y la cercanía a recintos de animales domésticos (J. R. Ryan *et al.*, 2006). No obstante, se han determinado resultados contrastantes en el caso de distintas especies de flebotomos como *P. argentipes* y formas clínicas, puesto que, en la India, se ha observado una mayor prevalencia de leishmaniasis visceral en regiones de baja altitud (<150 m) y bajo índice de vegetación, lo cual refleja la dependencia de estos modelos en los vectores que participan en el ciclo de transmisión (Gouri S. Bhunia, Kesari, Jeyaram, Kumar, & Das, 2010). Por otra parte, estudios más recientes en Europa y África han confirmado la alta probabilidad de que las alteraciones en temperatura y, por tanto, el cambio climático incida en la prevalencia de la leishmaniasis y se ha evidenciado su relación con climas tropicales (Amro *et al.*, 2017; Chalhaf *et al.*, 2018; Koch *et al.*, 2017).

De manera congruente con estudios en el Viejo Mundo, las investigaciones en América basadas en imágenes satelitales han confirmado la asociación entre casos de leishmaniasis cutánea y la presencia de personas en bosques nativos (Miranda *et al.*, 1996). De igual forma, el caso particular en el que la leishmaniasis visceral es más prevalente en climas calientes y semi-áridos que fue descrito en India por Bhunia *et al.* se corroboró en Brazil, donde se describieron las mismas condiciones abióticas (Nieto, Malone, & Bavia, 2006). Posteriormente, también se confirmó el potencial para generar modelos precisos que describen datos epidemiológicos en humanos utilizando variables como la densidad demográfica, índices de vegetación, edad, así como la presencia de vectores y reservorios (Araujo Carreira *et al.*, 2014). De manera similar al Viejo Mundo, en América se han llevado a cabo estudios recientes para el modelamiento de nicho ecológico de similar naturaleza y se han obtenido resultados que corroboran la mayor prevalencia de la leishmaniasis en regiones con temperaturas cálidas y un alto grado de precipitación, así apoyando una posible transición altitudinal en la distribución debido al cambio climático (Falcão de Oliveira *et al.*, 2018; Ferro *et al.*, 2015; C. González *et al.*, 2013, 2010; Moo Llanes, 2016).

## D. Reservorios Leishmania

Una de las principales propiedades de una enfermedad zoonótica es la existencia de hospederos animales en el ciclo de transmisión. No obstante, más que representar un simple intermediario, un reservorio cumple dos funciones: 1) mantener a un patógeno en la comunidad ecológica y 2) facilitar rutas de transmisión del patógeno hacia la población humana (Hallmaier-Wacker, Munster, & Knauf, 2017). Por consiguiente, para demostrar que un potencial reservorio tiene la capacidad de ejercer ambas funciones, este debe cumplir con ciertos criterios, como: a) mantener en simbiosis a patógenos con alta similitud genética, b) mantener patógenos con infectividad y viabilidad similar, c) asegurar el mantenimiento a largo plazo del patógeno, d) mantener una conectividad espacio-temporal entre el sistema del reservorio y la población objetivo, e) demostrar la participación y viabilidad del patógeno en una ruta de transmisión factible y f) permanencia del patógeno en la ruta de transmisión a largo plazo. Por lo tanto, para demostrar el cumplimiento de los criterios vinculados a la simbiosis entre los patógenos y potenciales reservorios se han implementado diversos métodos como la comparación de secuencias del patógeno entre dichos hospederos y la población humana objetivo, la evaluación de filodiversidad en hospederos y los análisis de seroprevalencia. Asimismo, las rutas de transmisión han sido tradicionalmente demostradas a partir de estudios de campo longitudinales que buscan aislar patógenos viables en distintos puntos del ciclo de transmisión (Hallmaier-Wacker *et al.*, 2017; Haydon *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2014).

En el caso de la leishmaniasis, existen la transmisión de la infección puede darse por dos mecanismos distintos: 1) infecciones zoonóticas en donde los hospederos reservorios son animales salvajes, comensales o animales domésticos; e 2) infecciones antroponóticas, donde otras personas actúan como reservorio. La naturaleza de dichos reservorios suele abarcar varias especies de mamíferos silvestres, domésticos y sinantrópicos. Por consiguiente, diversas especies han sido identificadas como reservorios en distintas

ocasiones tanto en el Viejo como el Nuevo Mundo, tal como: los caninos, el gran jerbo (*Rhombomys opimus*), el jird gordo (*Psammomys obesus*), *Meriones* spp., hiracoideos, la zarigüeya común (tacuazín), zorros, puercoespines, entre otros (Alemayehu & Alemayehu, 2017; Marinkelle, 2010). Por consiguiente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado la implementación de medidas para el control de reservorios en casos de leishmaniasis cutánea y visceral de origen zoonótico (Marinkelle, 2010). Por lo tanto, el panorama a nivel de Latinoamérica y Guatemala se presentan a continuación.

Cuadro 3. Mamíferos reservorios de leishmaniasis en distintos países y regiones del mundo.

Region	Countries	Reservoir hosts
Old world	North Africa, central and west Asia	Dog, human, rodent
	Ethiopia, Kenya	Rodents, dog, domestic animals, bats, human, rock hyrax
	Indian subcontinent, (India, Nepal, Bangladesh) and east Africa	Dog, human, rock hyrax, rodent
	Mediterranean basin, central, west Asia and west Africa	Dog, fox, rodent, human
	Europe	Dog, fox
New world	Argentina, Belize, Bolivia, Brazil, Colombia, Costa Rica, Dominican, Ecuador, El Salvador, French Guyana, Guadeloupe, Guatemala, Guyana, Honduras, Martinique, Mexico, Nicaragua, USA, Venezuela, Paraguay, Peru, Surinam, Panama,	Dog, cats, rodent, marsupials, anteater, fox, monkey, coati, sloth, armadillo, porcupines, kinkajou, raccoon, red squirrel,

(Alemayehu & Alemayehu, 2017)

## 1. Antecedentes

### a. Latinoamérica

Entre los principales objetivos que se establecieron en el “Plan de Acción para Mejorar el Monitoreo y Control de la Leishmaniasis en las Américas 2017-2022” por la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) se encuentra la ejecución de programas para el monitoreo y control de reservorios en áreas con transmisión activa del parásito (PAHO/WHO, 2017). La incriminación de reservorios en Latinoamérica ha sido un tema de investigación desde 1972 hasta la actualidad y ha permitido identificar numerosas especies de las órdenes taxonómicas Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata y Chiroptera (Roque & Jansen, 2014).

En cuanto al orden de marsupiales Didelphimorphia, el género más estudiado es *Didelphis*, que también han demostrado comportamientos sinantrópicos al consumir basura en el exterior de las casas. Este género se ha vinculado con *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. peruviana* en Brasil y Colombia (Dedet, Gay, & Chatenay, 1989; Grimaldi, Momen, Naiff, McMahon-Pratt, & Barrett, 1991; Quinnell & Courtenay, 2009). En el caso del orden Pilosa, el principal grupo que han determinado como reservorio son los perezosos del género *Choloepus* y *Bradypus*, en donde se ha determinado la presencia de *L. shawi* en Brasil y *L. colombiensis* y *L. panamensis* en Panamá. Asimismo, *Choloepus didactylus* es de los principales reservorios de *L. guyanensis* en el bosque de Brasil y la Guyana Francesa (Dedet *et al.*, 1989; Gentile, Le Pont, Pajot, & Besnard, 1981; Grimaldi *et al.*, 1991; Kreutzer *et al.*, 1991). En cuanto a la orden Cingulata,

conocida coloquialmente como armadillos, esta es la única donde se ha aislado *L. naiffi*; asimismo, se ha logrado aislar *L. guyanensis*. Ambos casos se dieron en las especies *Dasytus novemcinctus* (Lainson & Shaw, 1989; Lainson, Shaw, Ward, Ready, & Naiff, 1979; Naiff *et al.*, 1991). Otra orden prominente por su participación en el ciclo de transmisión de *Leishmania* es Rodentia, donde los géneros más relevantes son *Proechimys* y *Trichomys*. En efecto, se ha demostrado que las especies *P. guyanensis* y *P. cuvieri* son reservorios de *L. amazonensis*. Dicha especie de *Leishmania* también se ha descrito en otros géneros como *Akodon*, *Dasyprocta*, *Oligoryzomys*, entre otros. Asimismo, en Belice y la península de Yucatán se ha identificado el género *Ototylomys* como potencial reservorio de *L. mexicana* debido a la alta prevalencia de infección y asociación con el vector *L. flaviscutellata*. En el caso de *L. brasiliensis*, los roedores infectados descritos son de los géneros *Akodon*, *Mus*, *Nectomys*, *Necromys*, *Orzomys*, *Rattus* y *Sigmodon* (Ashford, 1996; Brandão-Filho *et al.*, 2003; de Freitas *et al.*, 2012; De Lima, De Guglielmo, Rodríguez, Convit, & Rodriguez, 2002; Kerr *et al.*, 2006; Oliveira, Pirmez, Pires, Brazil, & Pacheco, 2005; Rotureau, 2006).

Ahora, en el orden Carnivora se encuentran dos de los principales mamíferos domésticos, los perros y los gatos. En Sudamérica y otras regiones de Latinoamérica, los perros son el reservorio más relevantes de *L. infantum* (Dantas-Torres, 2009; Rivero Rodríguez, Rodríguez Jiménez, Pérez-Doria, & Bejarano Martínez, 2018). Además, otros caninos silvestres como el zorro *Cerdocyon thous* presentan una prevalencia de la enfermedad mayor al 50% según ensayos serológicos (Quinnell & Courtenay, 2009). En cuanto a los primates no humanos, estos no han sido estudiados ampliamente más que bajo condiciones experimentales. En el Nuevo Mundo se han descrito infecciones de *L. shawi* en monos capuchinos (*Cebus apella*) e infecciones por *L. (Vianna)* en monos búho (*Aotus azarai*) (Acardi, Rago, Liotta, Fernandez-Duque, & Salomón, 2013; Lainson *et al.*, 1989). En el caso de los murciélagos (Chiroptera), estos no se han implicado directamente como reservorios, pero sí se ha detectado la infección natural de hígado, bazo y lesiones cutáneas en especies *Molossus molossus* y *Glossophaga soricina* (Savani *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2013). Estudios más recientes en Brasil han confirmado dichas infecciones naturales a partir de pruebas moleculares, donde se han hallado tasas de 41.6%, 38.9% y 19.4% para *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. brasiliensis*, respectivamente (Gómez-Hernandez *et al.*, 2017). Además, el efecto la capacidad de dispersión de los quirópteros se evidenció en un estudio transversal realizado en México que buscó identificar murciélagos infectados con *L. mexicana*, puesto que hasta un 62% de las especies infectadas tienen una amplia distribución geográfica (Berzunza-cruz *et al.*, 2015).

## b. Guatemala

En el presente, el único estudio realizado en este país que buscó incriminar a un mamífero como reservorio se basó principalmente en ensayos serológicos moleculares dirigido a perros de la región endémica de Petén (P. R. Ryan *et al.*, 2003). Sin embargo, el alcance de dicho estudio se vio limitado a un animal sinantrópico, mientras que numerosos mamíferos silvestres y sinantrópicos han sido vinculados a infecciones por *Leishmania* en otros países (Roque & Jansen, 2014). Asimismo, la existencia de seropositividad no es evidencia de reservorios, puesto que no necesariamente sugiere la transmisión del

parásito hacia hospederos humanos. Desde hace más de una década, el protocolo de vigilancia epidemiológica establecido por MSPAS dirige a las autoridades de salud pública para el monitoreo de la incidencia de la enfermedad en perros, un reservorio previamente identificado. Asimismo, se ha brindado la educación comunitaria necesaria para que las personas eliminen otras fuentes de *Leishmania* silvestres (Chajón & Mazá, 2009). Por lo tanto, al identificar potenciales reservorios de *Leishmania* y los paisajes que mejor describen el ecosistema que alberga al parásito, dicha información podría utilizarse por el MSPAS para redirigir los esfuerzos de control de leishmaniasis en sitios endémicos.

Cuadro 4. Resumen epidemiológico de la leishmaniasis cutánea.

<b>Agente</b>	Parásito: Protozoa, Euglenozoa, Kinetoplastea, Flagelado: <i>Leishmania</i> sp.
<b>Reservorio</b>	Personas, damanes, roedores, marsupiales, perros, perezosos, osos hormigueros, armadillos, murciélagos
<b>Vector</b>	“Mosca de arena” ( <i>Phlebotomus</i> en el viejo mundo; <i>Lutzomyia</i> o <i>Psychodopygus</i> en el nuevo mundo)

(adaptado de Berger, 2019)

## 2. Incriminación de reservorios en la leishmaniasis

Anteriormente se mencionó que para incriminar a un reservorio se requiere demostrar que dicho hospedero se mantiene infectado por el parásito y puede llevarlo a participar en un ciclo de transmisión que involucre a humanos. Adicionalmente, en la literatura se han mencionado requerimientos adicionales generales y específicos para la leishmaniasis, tal como: a) el mantenimiento de parásitos en sangre y piel con la suficiente carga como para infectar a vectores, b) el mantenimiento de una prevalencia de infección mayor al 20% , c) un contacto intenso entre el hospedero y el flebótomo y d) la existencia de una infección a largo plazo con reducida patogenicidad (Chaves, Hernandez, Dobson, & Pascual, 2007; Marinkelle, 2010). Por consiguiente, a continuación se presentan diversas disciplinas que se han utilizado dichos principios para incriminar reservorios desde varias perspectivas.

### a. Serológica

Incluso si los criterios para incriminar un reservorio que se mencionaron anteriormente establecen la necesidad de revisar la existencia de parásitos vivos en el hospedero, en muchos casos la determinación directa no es factible. Por lo tanto, se utilizan métodos serológicos para demostrar la asociación entre parásito y potencial reservorio. Lamentablemente, a pesar de las ventajas logísticas, la información obtenida tiende a ser complicada de interpretar debido a la posibilidad de reactividad cruzada, la seroreversión, puntos de corte arbitrarios y el efecto de la infección sobre la inmunidad (Viana *et al.*, 2014). Además, un ensayo serológico únicamente demuestra la existencia de infección, mas no genera información respecto a la transmisibilidad del parásito, por lo que los resultados no necesariamente son relevantes en cuanto a la contribución del hospedero evaluado al mantenimiento del parásito en la naturaleza (Roque & Jansen, 2014). Por consiguiente, varios estudios que buscan incriminar reservorios de la leishmaniasis han acoplado análisis de detección directa – citometría de flujo, análisis histológico y

molecular – que también permiten estimar el potencial de transmisión a partir de la carga parasitaria con el diagnóstico serológico de infecciones (Cardoso *et al.*, 2015; Kent, Ramkalup, Mans, & Schallig, 2013; Silvestre *et al.*, 2008; B L A Verçosa *et al.*, 2011; Bárbara Laurice Araújo Verçosa, Melo, Puerto, Mendonça, & Vasconcelos, 2012). Por otra parte, un estudio inmunoquímico realizado por Nascimento *et al.* ha confirmado el potencial de estimar la carga parasitaria al medir la concentración de ciertas citoquinas pro-inflamatorias y la proteína reguladora de hierro (IRP2) en suero para la leishmaniasis visceral canina. Por consiguiente, cabe la posibilidad de validar un procedimiento basado en la cuantificación directa de interferón gamma, TNF- $\alpha$ , IL-10 y TRP2 que permita estimar la carga y, por tanto, la transmisibilidad del parásito (Nascimento *et al.*, 2013)

#### b. Molecular

La determinación molecular de la leishmaniasis en un potencial reservorio representa una demostración definitiva de la presencia del parásito y puede alcanzar incluso valores de especificidad y sensibilidad del 100% en algunos tejidos (Roque & Jansen, 2014). De igual manera, este tipo de análisis debe conjugarse con la investigación ecológica de la dinámica de transmisión para así diferenciar entre reservorios primarios y hospederos incidentales (Chaves *et al.*, 2007). Asimismo, bajo esta metodología, los tejidos más relevantes a evaluar son la sangre y la piel, puesto que son puntos de acceso al vector y, por tanto, al ciclo de transmisión de la enfermedad en la comunidad. Por consiguiente, ambos tejidos han sido utilizados para la incriminación preliminar de reservorios con ensayos para la amplificación y detección por PCR convencional de marcadores específicos como kDNA e ITS (Cardoso *et al.*, 2015; Elnaiem *et al.*, 2001). No obstante, estudios recientes han desarrollado ensayos basados en PCR cuantitativo con el interés de cuantificar la carga parasitaria y así aproximar el riesgo de transmisión. En efecto, se ha demostrado una relación entre dicha carga y diversas variables de interés como la duración y severidad de la infección y la tasa de transmisión hacia el vector (Andrade *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2016; Courtenay, Carson, Calvo-Bado, Garcez, & Quinnell, 2014; Doehl *et al.*, 2017).

#### c. Eco-filogenética

Debido a que el concepto de reservorios en un ciclo de transmisión supone interacciones de la leishmaniasis con múltiples hospederos, la comprensión de sinergismos y antagonismos que se dan a nivel individual y ecológico pueden predecir la evolución y diversidad de un patógeno. Es por ello que para incriminar a un reservorio pueden acoplarse herramientas ecológicas y moleculares en la forma de la eco-filogenética, una disciplina que amalgama las herramientas de la ecología de comunidades y la filogenética, incluyendo métodos modernos de secuenciación y bioinformática. Por lo tanto, tomando en cuenta que los brotes de patógenos desde un hospedero a otro no se dan de manera filogenéticamente aleatoria pueden deducirse estos patrones de manera retrospectiva (Fountain-Jones *et al.*, 2018). En efecto, la transición de hospederos por parte de un parásito puede ser un cambio que requiera cambios adaptativos. Es en este campo donde patógenos específicos como los virus tienden a dominar, puesto que tienden a tener mayores

tasas de mutación y una mayor plasticidad de hospedero (Hassell, Begon, Ward, & Fèvre, 2017). Por consiguiente, las principales maneras utilizadas para incriminar o investigar reservorios con evidencia eco-filogenética es la siguiente: a) co-filogenética de parásitos y hospederos, b) análisis de cobertura y especificidad de hospedero y d) Índices estandarizados de filodiversidad (Fountain-Jones *et al.*, 2018).

Los métodos filogenéticos han sido utilizados previamente para la caracterización de *L. infantum* de potenciales reservorios caninos en Brasil (Teixeira *et al.*, 2017). Asimismo, se han llevado a cabo estudios filogenéticos en gerbilinos (*Rhombomys opimus*), reservorios locales, que han confirmado el alto grado de filodiversidad de *Leishmania* en dicho hospedero (Hajjarian *et al.*, 2013; Parvizi *et al.*, 2008). No obstante, la metodología antes descrita no ha sido utilizada extensamente en comparación con métodos moleculares y serológicos.

## V. METODOLOGÍA

### A. Sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo a dos diferentes escalas, escala fina y escala gruesa, para el análisis filogenético y para el desarrollo de modelos de nicho ecológico, respectivamente: a nivel de Guatemala y a nivel de Centroamérica. Para la escala fina se delimitó a Guatemala como sitio de estudio y se desarrolló con base en muestras recolectadas en los departamentos de Izabal, Santa Rosa, Jutiapa, Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal y Quiché. En cambio, el desarrollo del modelo de nicho ecológico se llevó a cabo en el área delimitada por el istmo de Tehuantepec y el istmo panameño (-94.59°W, 78.68°W y 6.91°N, 21.82°N).

### B. Sujetos de estudio

En este estudio se utilizaron datos y muestras obtenidas de humanos y mamíferos, respectivamente, recolectados durante actividades de investigación y asistencia técnica realizadas por el CES-UVG. En el caso de las muestras de mamíferos, se utilizaron remanentes de sangre o tejido que se recolectaron en estudios previos del Programa de Arbovirus y otras Enfermedades Zoonóticas del CES-UVG. También se utilizó información epidemiológica y secuencias de ADN de datos generados por un estudio epidemiológico del CES-UVG, realizado con muestras de de los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal y Quiché (Ruiz, 2018).

### C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo, puesto que se basa en el cálculo numérico de divergencia molecular, así como la correlación entre datos geográficos y los valores de variables continuas bioclimáticas. El alcance del estudio es descriptivo y correlacional, puesto que busca hallar la relación entre la filodiversidad de *Leishmania* en humanos y hospederos mamíferos y, a la vez, se correlacionaran variables bioclimáticas con la distribución de vectores y hospederos, lo cual permite generar modelos predictivos.

Debido a que no hay manipulación de las variables experimentales y únicamente se describieron y modelaron patrones ecológicos y filogenéticos ya existentes, el diseño de esta investigación fue de tipo no experimental, de corte transversal.



## D. Tipo y tamaño de muestra

Puesto que este estudio se llevó a cabo a dos diferentes escalas para el análisis filogenético y para el desarrollo de modelos de nicho ecológico, respectivamente, se incorporaron dos diferentes tamaños de muestra. En ambos casos, la selección de la muestra fue por conveniencia. Para el análisis filogenético realizado a nivel nacional se utilizaron 309 muestras de tejido de mamíferos – recolectado en los años 2009, 2010, 2017 y 2018 – y 36 secuencias de casos positivos de LC en humanos de dicho centro – recolectados de manera no uniforme entre 1980 y 2017.

Para el modelo de nicho ecológico a escala de Centroamérica se utilizaron 251 ocurrencias geográficas para leishmaniasis cutánea en Centroamérica provenientes de una base de datos externa (Pigott, Golding, *et al.*, 2014). Asimismo, se incluyeron 121 casos positivos de LC en humanos y los 19 casos positivos que se determinaron para mamíferos en la etapa previa del estudio. El tamaño de muestra disponible para los casos en mamíferos se determinó con base en la cantidad de casos positivos para LC.

## E. Criterios de inclusión

En general, en este análisis únicamente se incluyeron muestras confirmadas como positivas para LC a partir de métodos diagnósticos basados en microscopía o análisis molecular del gen *hsp70*. En el caso del análisis eco-epidemiológico, únicamente se incluyeron muestras cuya localización de origen pueda determinarse al menos a nivel administrativo 1 (departamento o estado) o 2 (municipio).

## F. Variables

Cuadro 5. Variables del estudio.

Variable	Definición	Clasificación (Por naturaleza y escala de medición)	Unidades de medición
<b>Diagnóstico molecular de leishmaniasis</b>	Indica la presencia o ausencia de ADN de <i>Leishmania</i> en una muestra y, por tanto, es representativo de la existencia o no existencia de leishmaniasis en una muestra determinada. Se determina según la ausencia o presencia de bandas de ~593 pb separadas por gel de electroforesis.	Cualitativa, nominal	Puede asumir dos valores: “positivo” o “negativo”
<b>Secuencia de <i>hsp70</i></b>	Indica la secuencia de bases nitrogenadas en orden 5' -> 3' para el fragmento N del gen <i>hsp70</i> .	Cualitativa, nominal	Se define por una secuencia de aproximadamente 593 letras (A, C, T o G)
<b>Distancia filogenética</b>	Se refiere a la aproximación de distancia evolutiva entre dos unidades taxonómicas operativas a partir de la proporción de	Cuantitativa, continua	Adimensional

Variable	Definición	Clasificación (Por naturaleza y escala de medición)	Unidades de medición
	incongruencias entre dos secuencias alineadas y un modelo filogenético específico.		
<b>Distancia filogenética promedio</b>	Promedio aritmético de la distancia filogenética entre pares de individuos, incluyendo pares de la misma especies.	Cuantitativa, continua	Adimensional
<b>BIO1: Temperatura media anual</b>	Valor promedio anual de temperatura medida cada hora a 2 m sobre el nivel del mar en una localización geográfica específica a una resolución espacial de 10 minutos de arco.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO2: Rango diurno medio</b>	Se refiere al promedio de la diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO4: Estacionalidad de la temperatura</b>	Cantidad de variación en la temperatura en un año dado la desviación estándar mensual en la temperatura.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO8: Temperatura media del trimestre más húmedo</b>	Temperatura promedio en el trimestre anual con mayor índice de humedad.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO9: Temperatura promedio del trimestre más seco</b>	Temperatura promedio en el trimestre anual con menor índice de humedad.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO10: Temperatura promedio del trimestre más cálido</b>	Temperatura promedio en el trimestre anual con mayor índice de calidez.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO11: Temperatura promedio del trimestre menos cálido</b>	Temperatura promedio en el trimestre anual con menor índice de calidez.	Cuantitativa, continua	Grados Celsius
<b>BIO12: Humedad específica promedio anual.</b>	Se refiere a la medición absoluta de la humedad; es decir, la cantidad real de agua presente en la atmósfera. En contrario con la humedad relativa, no se ve afectado por cambios en la presión y la temperatura.	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire (adimensional)
<b>BIO15: Estacionalidad de la humedad específica</b>	Razón entre la desviación estándar de la humedad específica mensual y la humedad específica promedio mensual.	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire (adimensional)
<b>BIO16: Humedad específica del</b>	Humedad específica promedio del trimestre con mayor índice de	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire

Variable	Definición	Clasificación (Por naturaleza y escala de medición)	Unidades de medición
<b>trimestre más húmedo</b>	humedad.		(adimensional)
<b>BIO17: Humedad específica del trimestre más seco</b>	Humedad específica promedio del trimestre con menor índice de humedad.	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire (adimensional)
<b>BIO18: Humedad específica del trimestre más cálido</b>	Humedad específica promedio del trimestre con mayor índice de calidez.	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire (adimensional)
<b>BIO19: Humedad específica del trimestre menos cálido</b>	Humedad específica promedio del trimestre con menor índice de calidez.	Cuantitativa, continua	Kilogramos de agua por kilogramo de aire (adimensional)
<b>Geolocalización de muestra</b>	Coordenadas geográficas específicas de una muestra.	Cuantitativa, continua	Grados
<b>Riesgo de leishmaniasis cutánea</b>	Indica el grado de idoneidad climática de ciertas áreas geográficas para la presencia de leishmaniasis cutánea humana.	Cuantitativa, discreta	Índice de idoneidad climática (CSI en inglés)

## G. Hipótesis

### 1. Componente eco-epidemiológico:

En Centroamérica, la leishmaniasis cutánea está presente en condiciones climáticas estadísticamente consistentes, por lo que sus características ecológicas y distribución son predecibles.

### 2. Componente filogenético:

#### a. Hipótesis 1

No existe diferencia entre los géneros de mamíferos con infecciones por *Leishmania* sp. identificados en Guatemala y los reportados en América.

#### b. Hipótesis 2

Existe relación filogenética entre los parásitos de *Leishmania* spp. aislados de infecciones humanas e infecciones en mamíferos silvestres de Guatemala.

## H. Procedimiento

### 1. Consideraciones éticas

Las muestras utilizadas en este estudio fueron recolectadas por el Programa de Arbovirus y Zoonosis del CES-UVG y la información pertinente se recolectó en estudios previos bajo el aval del Comité de Ética, Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CEUCA) de la Universidad del Valle de Guatemala. En este estudio no se realizaron capturas o procesos de recolección de muestras adicionales. En el caso de las secuencias del parásito, las mismas fueron obtenidas de estudios previos realizados también en el CES-UVG aprobados por los comités de ética del CES-UVG y la Facultad de Ciencias y Humanidades. En esta investigación no se manejarán muestras humanas ni información ligada a las identidades de las personas de donde provienen las secuencias del parásito.

### 2. Análisis molecular de muestras de mamífero silvestre

#### a. Extracción de ADN

Se extrajo ADN del parásito a partir de muestras de sangre, hígado, bazo y piel de mamíferos. Para la extracción se usó el kit comercial DNA Extract All Reagents Kit (Biosystems 4402616) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 2 µl de sangre y se mezclaron con 20 µl de la “solución de lisis”. Luego, esta se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y, posteriormente, se agregaron 20 µl de la “solución estabilizante de ADN”. Por otra parte, en el caso de las muestras de hígado, bazo y piel se tomaron aproximadamente 1-2 mm<sup>3</sup> y la incubación se llevará a cabo a 95 °C durante 3 minutos. En todos los casos, el extracto se almacenó a -20 °C al final de la extracción.

#### b. PCR anidado para gen *hsp70*

Se llevó a cabo la amplificación del fragmento de *hsp70*. Debido a que es una amplificación anidada, tal como fue validado por Fraga *et al.* y Van der Auwera *et al.* (2012), primero se amplifica el fragmento G de 1422 pares de bases. Para la amplificación de dicho fragmento se utilizaron los cebadores HSP70-sen y HSP70-ant con 5 µl de plantilla ADN con concentraciones finales de 0.8 µM para cada cebador, “Solución Q” o Betaína a 1 M y Buffer Tonbo 1x. En la primera y segunda reacción se añadió 1U y 2U de Tonbo Classic ++<sup>TM</sup> Hot Start Taq Polymerase, respectivamente. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes:

Cuadro 6. Programa para la amplificación del fragmento PCR-G del gen *hsp70*.

<b>Etapas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	5 min	95	1
Desnaturalización	40 s	94	35
Hibridación	1 min	61	
Elongación	80 s	72	
Elongación final	8 min	72	1

(Montalvo *et al.*, 2010)

Luego, el producto de la primera amplificación (PCR-G) se usó como plantilla para amplificar el fragmento PCR-N de 593 pares de bases. Aparte de utilizar 2U en vez de 1U Tonbo Classic ++<sup>TM</sup> Hot Start Taq Polymerase, las condiciones para la preparación de la mezcla de reactivos y adición de plantilla fueron las mismas y la configuración para el termociclador se describe en el cuadro 7.

Cuadro 7: Programa para la amplificación del fragmento PCR-N del gen *hsp70*.

<b>Etapas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	5 min	95	1
Desnaturalización	40 s	94	35
Hibridación	1 min	61	
Elongación	1 min	72	
Elongación final	10 min	72	1

(Montalvo *et al.*, 2012)

### c. Electroforesis en gel

Los amplicones PCR-N de 593 pb obtenidos en la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% teñido con “SYBR Safe DNA Gel stain” (3 µl por cada 100 ml de gel). Se cargó 5 µl del producto PCR con 1 µl de tinte de carga 6x. La banda obtenida de las muestras se comparó con la banda del marcador de 500 bp (Sigma 100 bp) y con el control positivo incluido en la amplificación. Si se obtiene una banda claramente diferenciada que coincide en desplazamiento con el control positivo, se determina que la muestra es positiva para leishmaniasis.

### d. Purificación de productos

Para la purificación de productos se utilizó el kit comercial SpinPrep<sup>TM</sup> PCR Clean Up Kit de Novagen® (Merck 70976). Los amplicones purificados se almacenaron a -20 °C. hasta su secuenciación.

#### e. Secuenciación Sanger

Se realizó la secuenciación automática de los amplicones purificados (MacroGen<sup>®</sup>, Corea), tanto la hebra sentido como la antisentido. A partir de las secuencias sentido y contrasentido se generó una secuencia consenso usando la función “contig” del programa bioinformático UGENE (versión 1.32.0.0).

### H. Análisis de datos

#### 1. Generación de árbol filogenético y análisis de diversidad

Se utilizó el programa UGENE (versión 1.32.0.0) y MEGA (versión 1.01) (S. Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018; Tamura *et al.*, 2011) para generar secuencias consenso con la herramienta contig. Dicho proceso se verificó manualmente usando los electroferogramas de la secuenciación. Estas se subirán a la base de datos GenBank para acceso público. Se llevó a cabo el análisis de secuencias *hsp70* (fragmento N) de parásitos aislados de humanos y mamíferos utilizando el algoritmo de alineamiento múltiple CLUSTALW y métodos de inferencia filogenética de máxima verosimilitud con 500 pseudoréplicas (*Maximum Likelihood*) y *nearest neighbor joining* para las secuencias de mamíferos. Para el análisis de diversidad de secuencias se utilizó el programa DnaSP versión 6, con el cual se calculó la diversidad de nucleótidos y la diversidad de haplotipos (Rozas *et al.*, 2017).

#### 2. Análisis eco-epidemiológico

##### a. Generación de base de datos y mapa de casos

Primero, se construyó una base de datos con todos los casos de leishmaniasis cutánea disponibles en el país que se habían delimitado en la sección de tipo y tamaño de muestra. Aquí se incluyeron ocurrencias de parásitos en mamíferos de este estudio y las confirmadas por Ruiz (2018). Para cada una de las muestras se anotó la siguiente información en un cuadro descriptivo: a) departamento, b) municipalidad, c) localidad, d) longitud, e) latitud, f) fecha de toma de muestra, g) fuente, h) especie de hospedero (humanos o reservorios) y i) especie de parásito (en donde aplique cada categoría). Las coordenadas geográficas se determinaron usando los sitios de donde se obtuvieron las muestras en conjunto con sitios como *Google Earth*, *Falling Rain* y *IGAC* (Ferro *et al.*, 2015). Luego, estas base de datos se concatenaron con las ocurrencias reportadas en una investigación previa (Pigott, Golding, *et al.*, 2014).

##### b. Análisis espacio-temporal y predicción de casos

Se llevó a cabo un análisis de envoltura climática con MaxEnt basado en el paquete *kuenm* ejecutado en R versión 3.5.0 (Cobos, Peterson, Barve, & Osorio-Olvera, 2019). Brevemente, se descargaron y recopilaron valores de la base de datos MERRAclim (Vega *et al.*, 2018) y se incluyeron las variables más relevantes a los vectores de leishmaniasis cutánea del nuevo mundo (Ferro *et al.*, 2015) y otro conjunto

predictivo de utilidad (David A. Moo-Llanes, 2016). Se generaron mapas de riesgo para la leishmaniasis cutánea utilizando únicamente las ocurrencias del parásito en modalidad de caja negra.

## VI. RESULTADOS

### A. Componente filogenético

#### 1. Muestras de mamíferos sujetas a análisis molecular

Se analizaron 268 muestras de biopsia de piel provenientes de mamíferos recolectados entre febrero del año 2009 y febrero del año 2015. Entre las especies que formaron parte del análisis se incluye a *Artibeus jamaicensis*, *A. lituratus*, *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana*, *Dacypus novemcinctus*, *Heteromys desmarestianus*, *Heteromys* sp., *Oligoryzomys fluvescens*, *O. fulvia*, entre otros (ver Cuadro 8 y Anexo 1). También se utilizaron 41 muestras restantes de hígado y bazo recolectadas entre agosto y septiembre del 2017 donde 39 (95%) son de sangre mientras una es de bazo (2.4%) y una es de hígado (2.4%). En total se evaluaron 309 muestras.

#### 2. Diagnóstico molecular (PCR anidado *hsp70*)

Se detectó 19/309 casos positivos (6.1%) para el gen *hsp70* en las muestras evaluadas en mamíferos de las especies *Artibeus jamaicensis* (13.64%), *A. lituratus* (6.25%), *Didelphis marsupialis* (9.52%), *D. virginiana* (3.92%), *Oryzomys couesi* (33.33%), *Philander oposum* (7.69%), *Urocyon cinereoargenteus* (33.33%) y cuatro especímenes no identificados (14.81%), como se muestra en el Cuadro 8. Los resultados en tiempo y espacio se resumen en el Cuadro 9.

Cuadro 8. Prevalencia de leishmaniasis en análisis retrospectivo de tejido proveniente de mamíferos según el marcador molecular *hsp70*.

Especie	Positivos	Total	% positividad <sup>a</sup>
No identificada	4	27	14.81
<i>Artibeus jamaicensis</i>	3	22	13.64
<i>Artibeus lituratus</i>	1	16	6.25
<i>Artibeus watsoni</i>		3	0
<i>Carollia perspicillata</i>		8	0
<i>Centurio senex</i>		1	0
<i>Chiroderma villosum</i>		1	0
<i>Choeronycteris auritus</i>		1	0
<i>Desmodus rotundus</i>		7	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	4	42	9.52
<i>Didelphis virginiana</i>	2	51	3.92
<i>Glossophaga soricina</i>		2	0
<i>Heteromys desmarestianus</i>		1	0
<i>Heteromys</i> sp.		8	0



<b>Especie</b>	<b>Positivos</b>	<b>Total</b>	<b>% positividad<sup>a</sup></b>
<i>Leptoncycteris sp</i>		1	0
<i>Lonchorhina aurita</i>		1	0
<i>Mimon sp</i>		1	0
<i>Mus musculus</i>		14	0
<i>Neacomys sp.</i>		1	0
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>		4	0
<i>Oligoryzomys fulvia</i>		2	0
<i>Oligoryzomys sp.</i>		3	0
<i>Oryzomys couesi</i>	1	3	33.33
<i>Oryzomys sp.</i>		3	0
<i>Peromyscus gymnotis</i>		4	0
<i>Peromyscus sp.</i>		5	0
<i>Philander opossum</i>	3	39	7.69
<i>Pteronotus davyi</i>		1	0
<i>Pteronotus parnellii</i>		4	0
<i>Rattus rattus</i>		5	0
<i>Scotinomys sp.</i>		6	0
<i>Chaetodipus spinatus</i>		2	0
<i>Sturnira lilium</i>		5	0
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	1	3	33.33
<i>Zygodontomys sp.</i>		2	0
<i>Sigmodon hispidus</i>		10	0
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>309</b>	

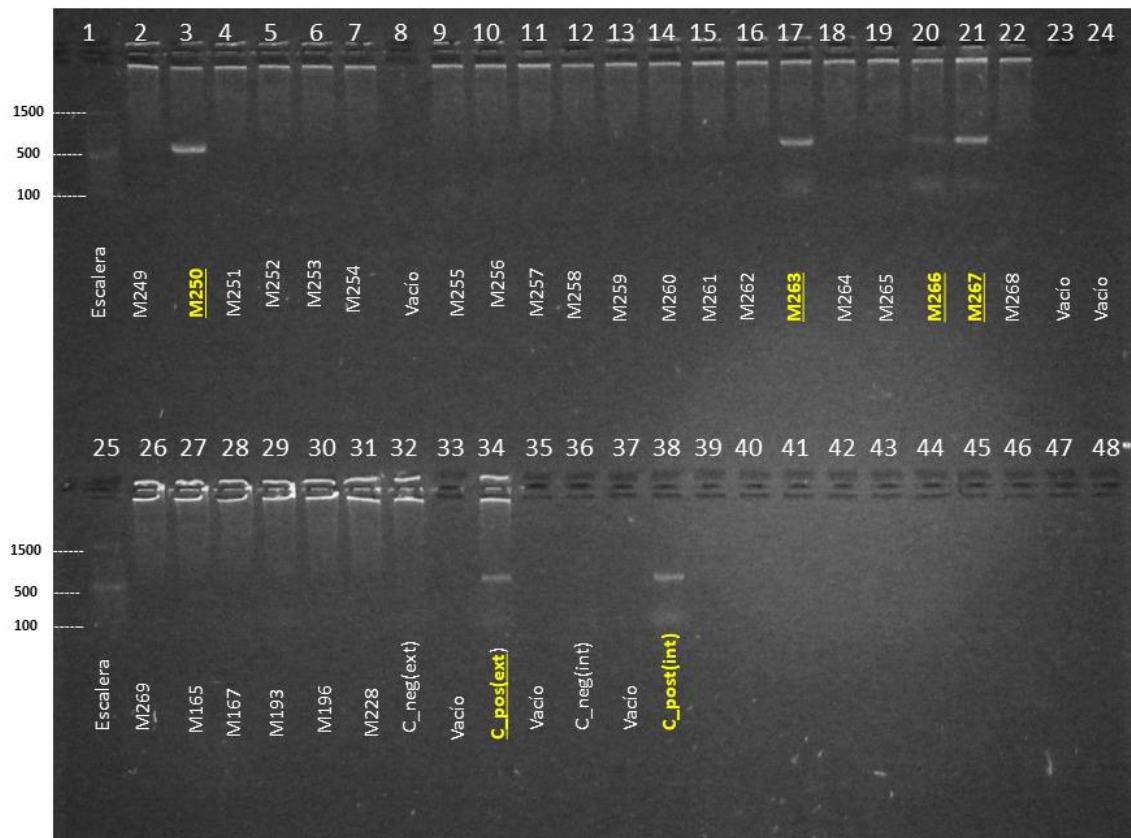
a Calculado respecto al total de la especie en cuestión.

Cuadro 9. Distribución en tiempo y espacio de las muestras de mamíferos con diagnóstico positivo para leishmaniasis.

<b>Departamento</b>	<b>Año</b>				<b>Total por departamento</b>
	2009	2010	2015	2017	
<b>Jutiapa</b>	1	3	0	0	3
<b>Petén</b>	0	0	4	1	5
<b>Izabal</b>	4	0	0	0	4
<b>Santa Rosa</b>	4	2	0	0	6
<b>Total por año</b>	9	5	4	1	<b>19</b>

A continuación se presenta un ejemplo del diagnóstico molecular que se llevó a cabo a partir del PCR anidado del gen *hsp70*. Se evalúan 42 muestras con dos escaleras de 100 bp y cuatro controles en gel de agarosa 1.5% (Figura 8).

Figura 8. Diagnóstico molecular (PCR anidado) de leishmaniasis para muestras de mamíferos basado en la amplificación del fragmento N del gen *hsp70* (593 bp).



Leyenda: Escalera= marcador molecular de 100 bp, C\_neg(ext)= control negativo de PCR anidado, C\_neg(int)= control negativo para segundo PCR, C\_post(ext)= control positivo (*L. braziliensis*) de PCR anidado, C\_post(int)= control positivo (*L. braziliensis*) para segundo PCR. Las muestras se representan con un código M# (ver Anexo 1) y aquellas que presentaron banda se están subrayadas.

Como puede verse en la Figura 8, se observan bandas ligeramente mayores a 500 pares de bases en cuatro de las 42 muestras representadas en esta figura, cuyo valor es similar al valor esperado de 593 bp. Los amplicones obtenidos para cada una de las 19 muestras positivas fueron purificados y enviados a secuenciar. Los resultados de la secuenciación y análisis bioinformático se describe en la siguiente sección.

### 3. Secuenciación e identificación de especie *Leishmania* sp.

A partir de las secuencias del fragmento N (*hsp70*) que se obtuvieron previamente se prepararon 13 (68% de las muestras positivas) secuencias consenso con el software UGENE. Se usó la herramienta incluida para desarrollo de “contigs” y se depuraron los resultados con la verificación manual de electroferogramas para corroborar que no hay una discordancia mayor al 1% entre secuencias sentido y antisentido y que la lectura ambas hebras es inteligible. Al final, se obtuvieron secuencias consenso de al menos 480 pares de bases (80.9% del valor esperado). Luego, dichas secuencias se utilizaron como base para identificar las especies de *Leishmania* sp. con el apoyo de la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados se presentan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados del análisis de identidad utilizando la herramienta BLASTn de NCBI para las secuencias de *hsp70* (fragmento N) amplificadas en las muestras.

<b>Id. Muestra</b>	<b>Especie de mamífero</b>	<b>Especie (homología)</b>	<b>Largo de secuencia (pares de bases)</b>	<b>Identidad (%)</b>
<b>M04-02</b>	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	491	99.80
<b>M04-04</b>	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>L. guyanensis/ panamensis</i>	490	100.00
<b>M05-03</b>	<i>Philander opossum</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	490	99.80
<b>M06-01</b>	<i>Oryzomys couesi</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	491	99.80
<b>M07-02</b>	<i>Philander opossum</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	491	99.80
<b>M07-08</b>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	490	99.80
<b>M07-010</b>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	495	99.80
<b>M11-01</b>	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	514	99.81
<b>M19-01</b>	<i>Philander opossum</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	491	99.80
<b>M20-10</b>	No identificado	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	490	100.00
<b>M20-13</b>	No identificado	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	482	99.79
<b>M21-02</b>	No identificado	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	494	99.80
<b>UT07SV-09</b>	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>L. naiffi/L. braziliensis</i>	480	99.58

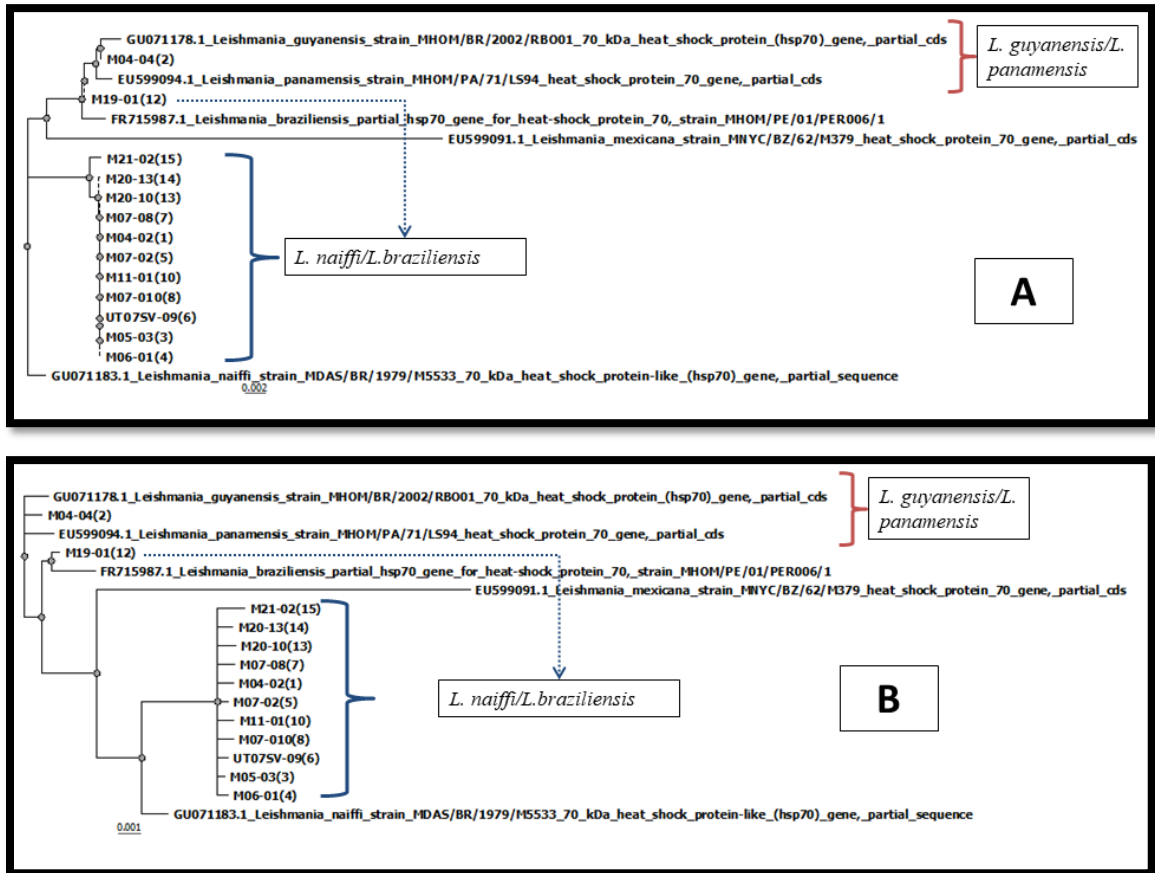
Como se presenta en el Cuadro 10, todos los casos menos 1 (93.3% de secuencias) corresponden a dos posibles especies: *L. naiffi/L. braziliensis*. Dichas aciertos se dan con un porcentaje de identidad de entre 99.58% y 99.80%. La única excepción es un caso de *L. guyanensis/ L.panamensis* obtenido con 100.00%

de identidad a partir de un aislado de tacuacín (*Didelphis virginiana*). Los resultados obtenidos en esta etapa se usarán como base en la selección de controles para el árbol filogenético y su interpretación.

#### 4. Análisis filogenético

Se generaron árboles filogenéticos a partir de trece secuencias consenso depuradas y cinco secuencias de referencia adicionales obtenidas de la base de datos de GenBank para las especies *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Tanto en el análisis bajo un modelo de unión o uno de inferencia Bayesiana se notan los mismos patrones. En congruencia con el análisis de homología que se llevó a cabo previamente con BLASTn, 13 de 15 secuencias (anteriormente clasificadas como *L.naiiffi/L. braziliensis*) se encuentran aglomeradas en principal cercanía de la referencia *L.naiiffi*. En efecto, dicho resultado se explica con base en el alineamiento (ver Anexo 2), donde se observa que dichas 13 secuencias comparten siete polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), de los cuales cuatro son idénticos a la referencia de *L. naiiffi*. Ahora, a pesar de que la muestra M19-01(12) se identificó como parte de la misma especie que las otras 13, esta solo comparte uno de los siete polimorfismos con el resto, lo cual sugiere una mayor homología con los genotipos de *L. panamensis/L. guyanensis*. De igual forma, únicamente la muestra M04-04(2) comparte todos los polimorfismos con la referencia de *L. guyanensis*.

Figura 9. Árbol filogenético de las 15 secuencias consenso obtenidas para hospederos mamíferos (ver cuadro 1) utilizando los modelos filogenéticos de (A) “Nearest Neighbor Joining” e (B) inferencia Bayesiana.



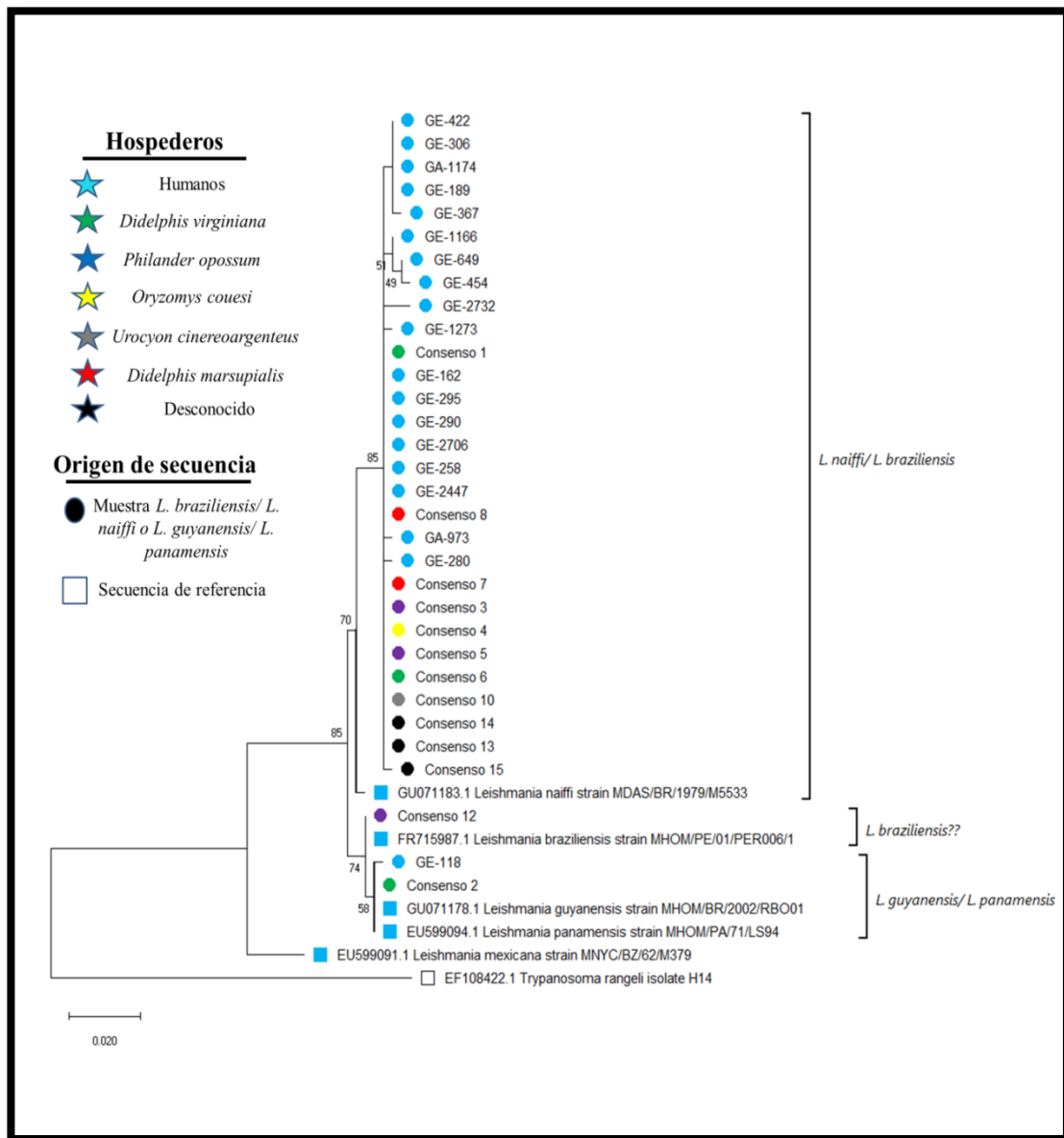
Para cada muestra se utilizan los identificadores y correlativos correspondientes (ver Anexo 1) y para secuencias de referencia se muestra el código de acceso a GenBank. El largo de las ramificaciones se muestra a escala.

Además de la relación filogenética, también se buscó comparar las trece secuencias ya mencionadas con 19 secuencias que se obtuvieron de muestras clínicas en un estudio previo (Ruiz, 2018). En este caso las secuencias de mamíferos se muestran con la codificación “Consenso #” (ver Anexo 1) y las muestras de humanos con la codificación “GE -# o GA-#” de la investigación de Ruiz (2018). En la Figura 10 se muestra el árbol filogenético más plausible bajo el algoritmo de máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”) que se infirió a partir de 500 réplicas (con “bootstrapping”). En primer lugar, puede notarse que no se da una segregación de secuencias según el hospedero, sino que se dan las principales ramificaciones a nivel de especie seguido de divergencias intraespecíficas. Por lo tanto, al igual que en la Figura 9, el árbol distingue a las secuencias en dos linajes correspondientes a los grupos *L. naiffi/ L. braziliensis* y *L. panamensis/ L. guyanensis* del subgénero *L. (Vianna)*. Asimismo, dicha estructura evolutiva se ve confirmada por el árbol filogenético construido con inferencia Bayesiana (ver Anexo 7). No obstante, incluso si las muestras de referencia para *L. naiffi* y *L. braziliensis* (GU071183.1 y FR715987.1, respectivamente) se agrupan con su respectivo linaje, estas divergen del resto de secuencias en más del 70% de las réplicas.

En el caso de las muestras provenientes de mamíferos, únicamente el consenso 12 (M19-01) diverge en más del 85% de las topologías respecto al patrón general relativamente conservado del linaje *L. naiffi*/*L. braziliensis*. Dicha ramificación concuerda con la estructura de la filogenia de ambos árboles en la figura 9 y probablemente se infiere a partir de la presencia de seis polimorfismos de sustitución en seis bases (71, 77, 98, 249, 263 y 272) y una inserción en la posición 485 (ver Anexo 4 y 8). Es más, en esta topología se muestra una ramificación entre el consenso 12 (M19-01) y la secuencia de referencia de *L. braziliensis* (FR715987.1), así sugiriendo una relación evolutiva más estrecha con dicha especie en vez de *L. naiffi*. En cambio, en el caso de las secuencias obtenidas de hospederos humanos existen solo tres cepas que divergen en entre 49-51% de las réplicas.

Por otro lado, en congruencia con lo anteriormente mencionado, el análisis de diversidad intraespecífica calculado por el programa DNAsp (*L. naiffi*/*L. braziliensis*) confirmó los patrones de variación observados a partir del árbol filogenético, puesto que para las cepas aisladas de humanos y de mamíferos los índices de diversidad de haplotipos fueron de  $0.9216 \pm 0.0026$  y  $0.6818 \pm 0.0104$ , respectivamente. Asimismo, los índices  $\pi$  de diversidad de nucleótidos fueron de  $5.37 \cdot 10^{-3}$  y  $3.48 \cdot 10^{-3}$  para aislados de humanos y mamíferos, respectivamente (ver Anexo 3). En efecto, las secuencias de hospederos humanos presentan un 150% de sitios polimórficos respecto a las secuencias aisladas de mamíferos (ver Anexo 9). En total existen 20 sitios únicos, y de estos, solamente 1 es compartido (ver Anexo 10). Además, siete sitios son exclusivos de secuencias aisladas de mamíferos. Por consiguiente, los resultados de este análisis confirman el hallazgo de que la diversidad de secuencias fue mayor para las cepas aisladas de humanos respecto a las de mamíferos.

Figura 10. Árbol filogenético más plausible de las 15 secuencias consenso obtenidas para hospederos mamíferos y 36 secuencias de hospederos humanos (Ruiz, 2018) (ver Cuadro 12) construido con el método “Maximum Likelihood” y clasificado por hospedero de origen.



Para cada muestra se utilizan los identificadores y correlativos (Ruiz, 2018) correspondientes (ver Anexo 1) y para secuencias de referencia se muestra el código de acceso a GenBank. La inferencia evolutiva utilizada para la construcción del árbol filogenético se llevó a cabo con el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución “General Time Reversible” con una distribución gamma discreta de cinco categorías. Este último modelo de sustitución se seleccionó debido a su buen ajuste y reducida complejidad que se determinó a partir del Criterio de Información de Akaike (AIC en inglés) calculado por MEGA para 24 distintos modelos (Anexo 8). A partir de un muestreo interno “bootstrap” de 500 árboles candidatos se seleccionó la topología más probable y, como referencia, se muestra el porcentaje de réplicas

internas que confirman las ramificaciones (solo se muestran valores mayores a 40%). El largo de las ramificaciones se muestra a escala en proporción a la cantidad de sustituciones por sitio. Se excluyen las posiciones con agujeros y se muestran secuencias referencia de GenBank para las especies *L. naiffi*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *Trypanosoma rangeli*. Las regiones administrativas se definen de la siguiente forma. Región Nororiental: Chiquimula, El Progreso, Izabal y Zacapa; región Suroriental: Jutiapa, Jalapa y Santa Rosa; región Petén: Petén; región Norte: Alta Verapaz y Baja Verapaz; región Noroccidental: Huehuetenango y Quiché.

## B. Componente eco-epidemiológico

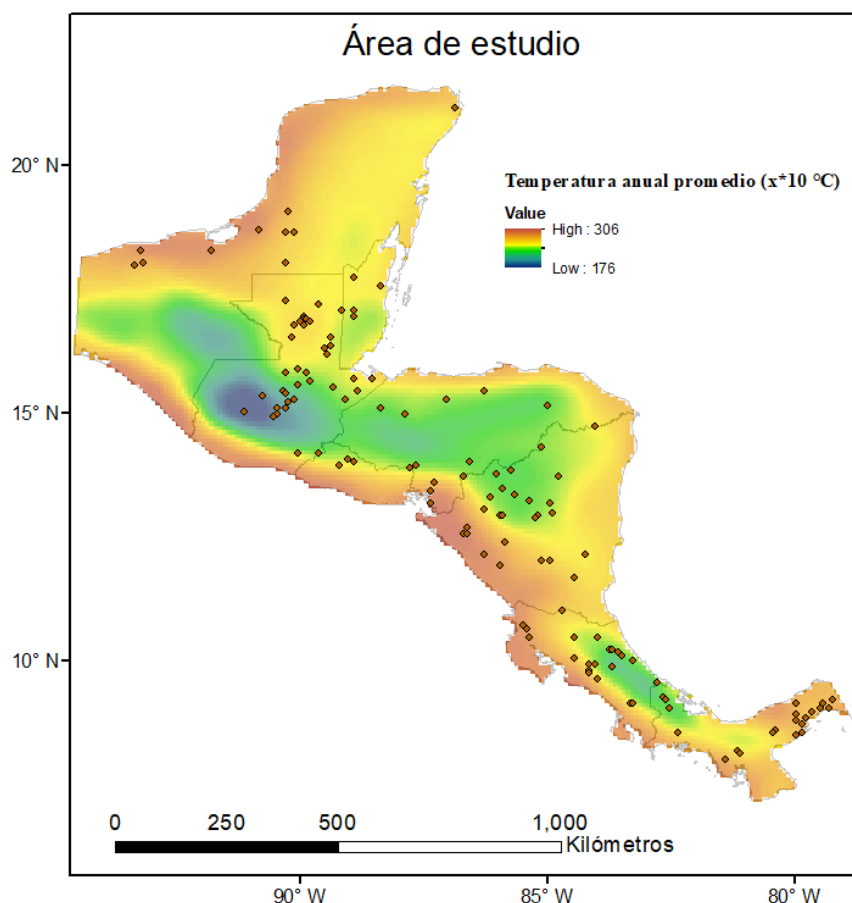
La ausencia de una mayor diversidad de coordenadas disponibles para mamíferos infectados con LC a lo largo del país (ver Anexos 1 y 11) impidió desarrollar modelos de nicho ecológico dirigidos a cada especie de reservorio individual. En cambio, dada la disponibilidad de datos geográficos para ocurrencias de leishmaniasis cutánea en humanos (Ruiz, 2018), se buscó investigar la biogeografía de esta enfermedad con base en la construcción de modelos de riesgo para el parásito en sí mismo. Por lo tanto, se emuló la modalidad de tipo “caja negra” que se ha empleado en diversos estudios donde se carece de información respecto al resto de actores en el ciclo de transmisión (Chavy *et al.*, 2019; Escobar & Craft, 2016; Pigott, Bhatt, *et al.*, 2014). Se combinaron las ocurrencias de parásitos en mamíferos de este estudio y las confirmadas por Ruiz (2018) en conjunto con las ocurrencias descritas en una base de datos global de leishmaniasis cutánea en el rango temporal de 1960 a 2012 (Pigott, Golding, *et al.*, 2014).

### 1. Área de estudio y preparación de variables climáticas

Tomando en consideración que la calibración de modelos de nicho ecológico tiende a mejorar cuando se delimita un área de estudio con base en factores relevantes a la capacidad de dispersión del organismo de estudio (Barve *et al.*, 2011; Merow, Smith, & Silander, 2013), la extensión establecida previamente se expandió para cubrir toda la región centroamericana. Por consiguiente, las barreras geográficas utilizadas se definen en los istmos de Tehuantepec y Panamá (Guevara & Sánchez-Cordero, 2018; Valderrama *et al.*, 2014) para las barreras occidental y oriental, respectivamente.



Figura 11. Área de estudio para la calibración de modelos de nicho ecológico.



En la Figura 11 se presenta el área de estudio que se utilizó en la calibración de modelos según el programa MaxEnt. Se muestran las divisiones administrativas sobrepuestas con la capa bioclimática 1 de Merraclim (estilo mapa de calor) recortada. Asimismo, se incluyen los puntos de las ocurrencias de leishmaniasis cutánea (LC) posterior al proceso de filtración aplicado, el cual involucraba: 1) eliminar duplicados con base en coordenadas, 2) verificar que no haya más de una ocurrencia por pixel. Esto resultó en un recorte secuencial de datos desde las 383 muestras originales a 134 ocurrencias.

Se designaron a dos conjuntos de variables predictivas, las cuales incluyen capas climáticas (Vega *et al.*, 2018) y topográficas (Danielson & Gesch, 2011), en concordancia con su relevancia biológica para la transmisión de la LC (Ferro *et al.*, 2015; C. González *et al.*, 2013; David A. Moo-Llanes, 2016). Las capas designadas se recortaron utilizando el área de estudio como máscara y se “remuestrearon” a una resolución de 5 minutos de arco (pixeles de aproximadamente 10 km x10 km) usando ArcMap 10.3. Por último, se llevó a cabo un análisis de componentes principales para ambos conjuntos de variables y se seleccionaron a los primeros nueve componentes, cuya variación acumulada sumaba 99.9%. Estos formaron el tercer y

último conjunto de variables predictivas a utilizar durante la calibración. Todos los conjuntos de muestran a continuación:

Cuadro 11. Conjuntos de variables predictivas climáticas y topográficas seleccionadas para la calibración del modelo.

Conjunto	Variables	Base de datos	Fuente (selección)
<b>Clima y topografía (1)</b>	BIO1, BIO2, BIO4, BIO8, BIO9, BIO10, BIO11, BIO12, BIO15, BIO16, BIO17, BIO18, BIO19	MERRA	(Ferro <i>et al.</i> , 2015; C. González <i>et al.</i> , 2013)
	Aspecto	USGS:GMTED2010	
	Pendiente		
	Elevación		
<b>Clima únicamente (2)</b>	BIO5, BIO7, BIO4, BIO13, BIO15, BIO1 BIO6, BIO14, BIO12	MERRA	(Moo-Llanes, 2016)
<b>PCA (3)</b>	PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8 y PC9	Set 1 y 2	N/A

## 2. Generación de base de datos

Para los subsiguientes análisis eco-epidemiológicos se incorporaron dos bases de datos a los casos ya descritos en el Cuadro 9 y la sección anterior (componente filogenético). Una de ellas proviene del estudio de Ruiz, 2018 e incluye casos de leishmaniasis cutánea (LC) diagnosticados por PCR anidado en CES-UVG. Asimismo, también se incluye la base de datos de Pigott *et al.* para casos en humanos filtrados para el área de estudio.

Cuadro 12. Distribución de datos de infecciones en humanos en Guatemala *Leishmania* spp recopilados por el CES-UVG.

Departamento	Décadas				Total por departamento
	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2017	
<b>Alta Verapaz</b>	4	5	1	15	25
<b>Baja Verapaz</b>	2	4	1	0	7
<b>Petén</b>	7	37	34	0	78
<b>Izabal</b>	2	3	4	1	10
<b>Quiché</b>	0	1	0	1	2
<b>Total por década</b>	15	50	40	17	122

(adaptado de Ruiz, 2018)

Cuadro 13. Distribución de casos para la base de datos global de leishmaniasis cutánea utilizada en el modelo de nicho ecológico.

País	Total por país
México	10
Guatemala	5
Belice	4
El Salvador	4
Honduras	11
Costa Rica	20
Nicaragua	27
Panamá	22
<b>Total por década</b>	<b>103</b>

(Pigott, Golding, *et al.*, 2014)

### 3. Calibración, evaluación y selección de modelos de nicho ecológico

Utilizando el paquete *kuenm* en R versión 3.5.0 (Cobos *et al.*, 2019) se generaron 270 modelos, de los cuales 117 son significativos y 4 fueron seleccionados con base en criterios de significancia (valor-p de ROC parcial), tasa de omisión, así como ajuste y complejidad (AICc) (ver anexo 19). Para la calibración se utilizaron todas las combinaciones de “features” o transformaciones de variables predictivas que incluyen a la transformación cuadrática (q) y cada uno se evalúa bajo los siguientes multiplicadores de regularización: 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5. Para la partición de datos de ocurrencias se utilizó el método de bloques (Muscarella *et al.*, 2014), el cual permitió la división sistemática y equitativa de todos los casos de LC en dos grupos: 1) datos para entrenamiento y 2) datos para evaluación. Dicha partición se muestra en el anexo 12. Los resultados de los modelos finales se muestran a continuación:

Cuadro 14. Selección final de modelos a partir de criterios de significancia, tasa de omisión y complejidad (AICc) usando *kuenm*.

Modelo	Reg <sup>a</sup>	Feat. <sup>b</sup>	Conjunto	Cociente AUC promedio	Valor-p (pROC)	Tasa de omisión (%)	AICc	ΔAICc	Cantidad de parámetros
<b>1</b>	1.5	q	3	1.050673	0 <sup>***</sup>	14.71	2421.548	0	8
<b>2</b>	0.1	q	3	1.049419	0 <sup>***</sup>	14.71	2423.023	1.475291	9
<b>3</b>	0.5	q	3	1.047224	0 <sup>***</sup>	14.71	2423.168	1.620078	9
<b>4</b>	1	q	3	1.049686	0 <sup>***</sup>	14.71	2423.473	1.925699	9

a= Multiplicador de regularización

b= “Features” o transformaciones de variables predictivas

Como se muestra en el Cuadro 14, los cuatro modelos seleccionados comparten dos características en común: 1) todos se calibraron con el conjunto 3 de variables predictivas (capas de componentes

principales) y 2) la clase de transformación de dichas variables es la misma (cuadrática). No obstante, cada modelo difiere en su respectivo multiplicador de regularización, por lo que dicha configuración repercute en la cantidad de parámetros incluidos y en la complejidad. Sin embargo, a pesar de que la metodología de selección originalmente se fundamentó en la significancia, tasa de omisión y complejidad de cada modelo en dicho orden de prioridad, ningún modelo cumplió con el criterio de omisión (5%). Por consiguiente, se escogieron los modelos que mostraron la mayor sensibilidad (omisión de 14.71%) y una baja complejidad y pérdida de información ( $AICc < 2$ ).

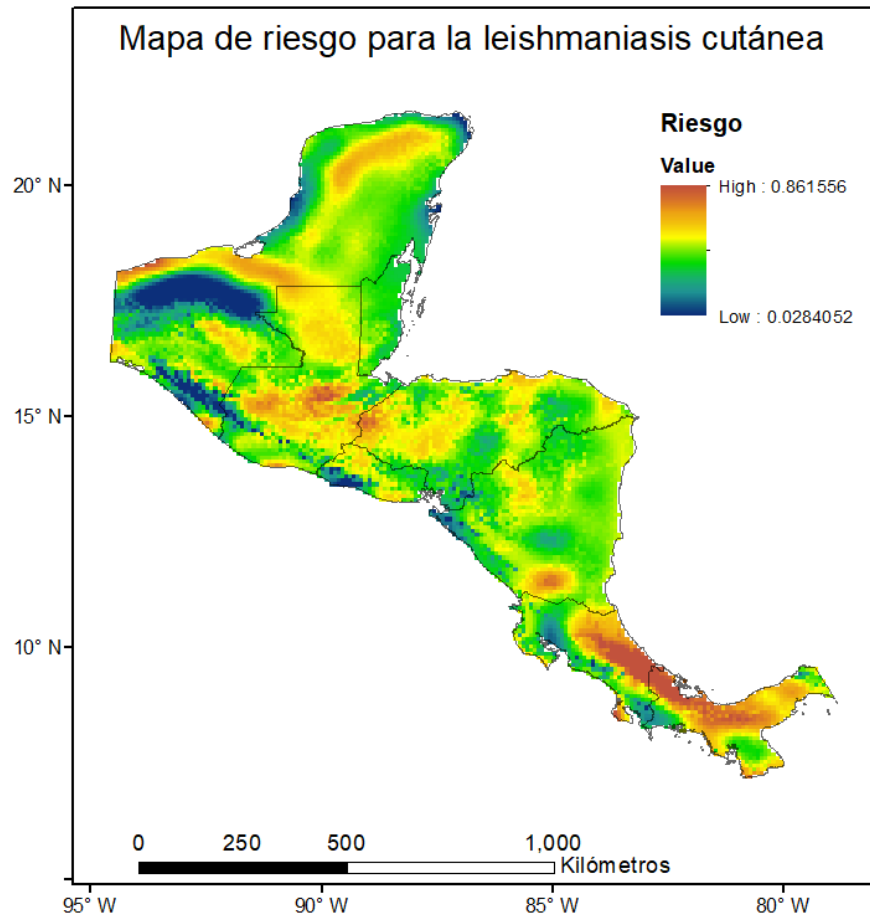
#### 4. Mapas de riesgo continuos y binarios

La configuración correspondiente al modelo de nicho ecológico que demostró un mejor rendimiento con base en los criterios de selección establecidos en la etapa de evaluación (modelo 1) se utilizó para generar una nueva calibración y un mapa de riesgo según en el 100% de las ocurrencias de LC en el área de estudio. Dicho modelo demostró un área bajo la curva (AUC) del ROC con un valor de 0.645 y un cociente promedio de AUC parcial – suponiendo una omisión del 5%, usando pseudoréplicas de un 50% y 500 iteraciones– con un valor de  $1.26 \pm 0.06$  y un valor-p menor de 0.001 respecto a una predicción aleatoria (ver Anexos 13 y 14). Asimismo, la contribución mayoritaria de las variables predictivas a la calibración del modelo se dio por parte de los componentes principales PC2 (34.3%), PC5 (28.7%) y PC3 (14.7%) y PC9 (14.4%) (ver Anexo 15). Por lo tanto, según en los factores de carga para cada componente principal se determinó que las variables climáticas que más explican la variación de ocurrencias en el espacio geográfico y climático son la temperatura promedio del trimestre más cálido (bio10), la estacionalidad de la humedad específica (bio15), la humedad específica del mes menos húmedo (bio14), el rango de temperatura anual (bio7) y la humedad específica promedio anual (bio12) (ver Anexo 16).

Por otro lado, a partir de las relaciones descritas entre las curvas de respuesta cuadráticas para los distintos componentes principales y los factores de carga se puede deducir la existencia de ciertos valores intermedios de las variables originales dan lugar a valores de riesgo máximo o mínimo. Por ejemplo, el riesgo tiende a maximizarse bajo condiciones “intermedias” de las variables bio14 (humedad específica del mes menos húmedo) y bio15 (estacionalidad de la humedad específica). En cambio, el riesgo tiende a minimizarse a valores intermedios de otras variables como bio4 (estacionalidad de la temperatura) y bio16 (humedad específica del trimestre más húmedo). Por lo tanto, con base en dichas curvas de respuesta se genera el mapa de riesgo (ver Figura 12) correspondiente al modelo de mejor rendimiento (modelo 1). Se muestra dicho riesgo en función de la idoneidad determinada por el modelo de nicho ecológico y la capa respectiva este se sobrepone con el mapa político de la región. Por lo tanto, dicho mapa presenta el riesgo en un rango logístico de 0 a 1 (índice de idoneidad de hábitat) representado como mapa de calor. A grandes rasgos, las áreas de mayor riesgo corresponden principalmente al 1) extremo Atlántico de Costa Rica y Panamá, así como 2) el suroccidente de Nicaragua (sobre el Lago de Nicaragua), 3) la frontera occidental de Honduras, 4) Petén y la franja transversal norte de Guatemala y 5) ciertas áreas de Yucatán, Campeche y

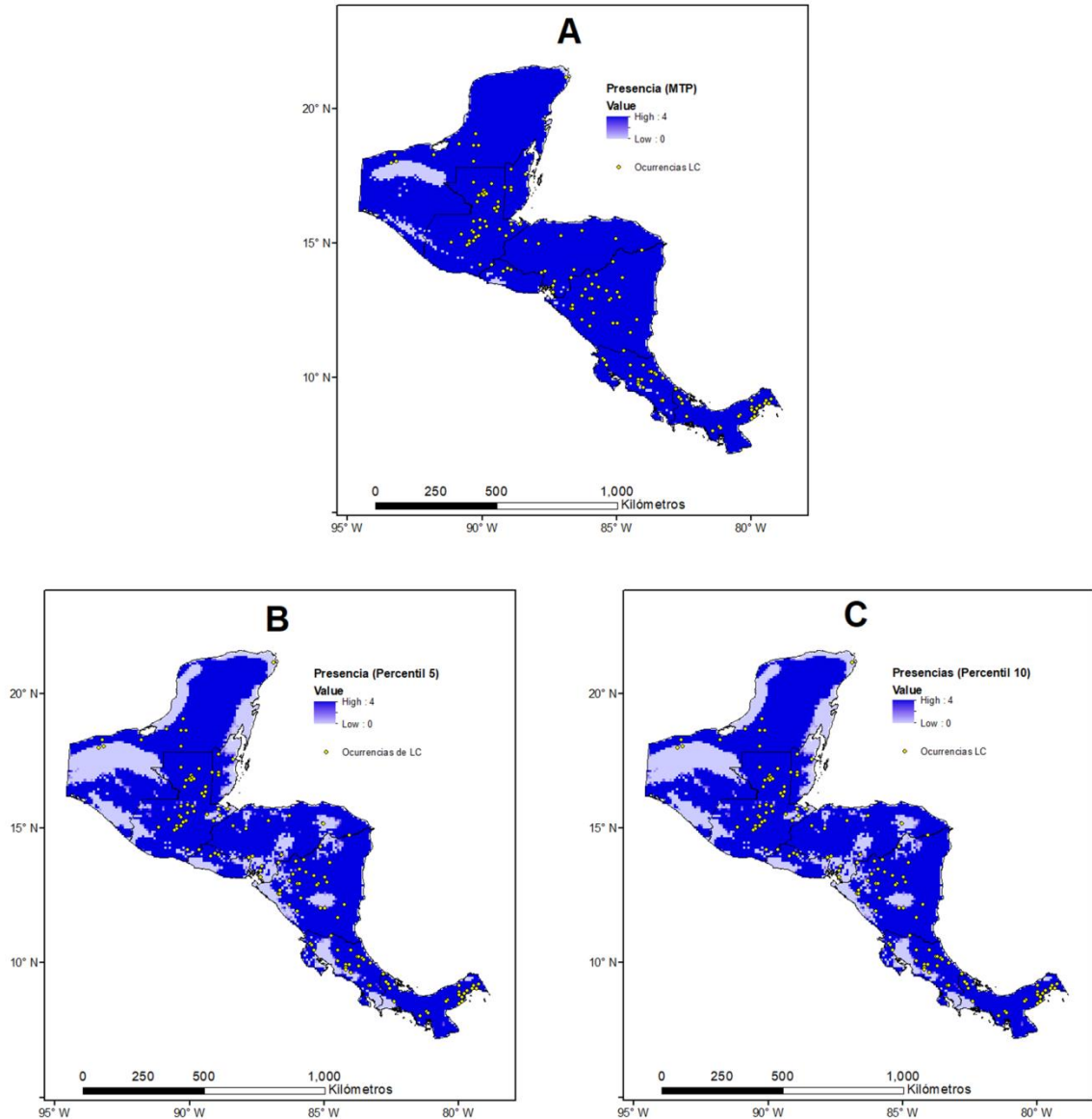
Chiapas (México). Asimismo, los patrones mencionados concuerdan con los mapas de riesgo generados para el resto de modelos (ver Anexo 17).

Figura 12. Riesgo pronosticado de leishmaniasis cutánea en el área de estudio con base en el modelo de nicho ecológico de mejor rendimiento.



Por último, el modelo de nicho ecológico logístico (ver Figura 12) se transforma en un modelo binario que permite discriminar entre sitios pronosticados de presencia y ausencia según en distintos umbrales preestablecidos (ver Anexo 18). Por consiguiente, los valores de cada uno de los cuatro modelos binarios (ver Cuadro 14) se suman para generar un mapa en escala de grises que indica las áreas pronosticadas de presencia en una escala de 0 a 4 según la cantidad de modelos que concuerdan. Por lo tanto, un valor de 4 indica un pronóstico de presencia por parte de los cuatros modelos; un valor de 0 indica un pronóstico de ausencia por parte de todos y un resultado intermedio indica un pronóstico mixto entre modelos. Asimismo, también se muestran todos los puntos de ocurrencias que se utilizaron para la calibración y evaluación de los modelos.

Figura 13. Mapas de riesgo en modalidad presencia/ausencia (binarios) utilizando los umbrales logísticos preestablecidos por MaxEnt A) Presencia Mínima de los puntos del entrenamiento (MTP en inglés), B) Presencia de entrenamiento percentil 5 y C) Presencia de entrenamiento percentil 10.



Como se muestra en la Figura 13, el umbral logístico de Presencia Mínima de los puntos del entrenamiento (MTP en inglés) resulta en un pronóstico que establece la presencia de leishmaniasis cutánea en más de 95% del área total del área de estudio. Por lo tanto, solo excluye ciertas regiones en el sur de Guatemala, así como parte de los estados de Soconusco, Chiapas y Tabasco adyacentes al istmo de Tehuantepec. En cambio, a partir de los umbrales de “Presencia de entrenamiento percentil 5” y percentil 10 el área pronosticada de ausencia aumenta y llega a incluir a partes los estados mexicanos de Yucatán,

Campeche y Quintana Roo, así como al suroccidente guatemalteco, la costa salvadoreña y ciertas regiones delimitadas en el occidente hondureño y la costa pacífica nicaragüense y costarricense. Bajo estos umbrales que toleran mayores porcentajes de omisión, el área pronosticada como positiva se reduce a porcentajes menores de 90% y 80% con los umbrales de percentil 5 y 10, respectivamente. De igual forma, puede notarse que las regiones donde se pronostican ausencias coinciden con las áreas de bajo riesgo que se muestran (colores fríos) en la Figura 12.

## VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue identificar las características ecológicas de la leishmaniasis cutánea en Guatemala. Por lo tanto, se buscaba identificar el porcentaje de positividad de *Leishmania* spp. para mamíferos silvestres, evaluar la filogenia de parásitos aislados de mamíferos silvestres y humanos, y usar el modelamiento de nicho ecológico para caracterizar la biogeografía de la enfermedad. En presente estudio se confirmaron 19 casos positivos (6.1%) de 309 utilizando la amplificación del gen *hsp70* como marcador molecular de *Leishmania* sp. De estos casos, siete especies de mamíferos fueron vinculadas y las siguientes fueron las más frecuentes: *Oryzomys couesi* (33.33%), *Urocyon cinereoargenteus* (33.33%) y *Artibeus jamaicensis* (13.64%). Además, de las siete especies identificadas, tres no se habían confirmado previamente como hospederos del parásito en Centroamérica (Da Costa *et al.*, 2015; Roque & Jansen, 2014; Rosypal *et al.*, 2013; Rosypal, Tidwell, & Lindsay, 2007; Rosypal *et al.*, 2010; Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002; Zamora-Ledesma *et al.*, 2016). Asimismo, la reconstrucción filogenética de estas 12 secuencias en conjunto con las 35 generadas en un estudio epidemiológico previo las distingue en dos linajes correspondientes a los grupos *L. naiffi*/*L. braziliensis* y *L. panamensis*/*L. guyanensis* del subgénero *L. (Vianna)* de manera congruente con la filogenia establecida del parásito y las limitaciones resolutivas del fragmento N (Fraga, Montalvo, De Doncker, Dujardin, & Van der Auwera, 2010b; Gert van der Auwera & Dujardina, 2015), pero no se observan divergencias plausibles a nivel de hospedero. Sin embargo, se observó una reducida diversidad de secuencias en parásitos provenientes de mamíferos en comparación con los aislados provenientes de humanos, lo cual no es congruente con lo que se ha observado en distintos reservorios de enfermedades (Fountain-Jones *et al.*, 2018). Por lo tanto, la evidencia es parcialmente consistente con la hipótesis de la participación de dichos mamíferos en el ciclo de transmisión. Por lo tanto, se discuten dichos aspectos en el contexto de la literatura disponible respecto al tema, las limitaciones del estudio y recomendaciones para futuras investigaciones.

Bajo la hipótesis de que una especie de mamífero en particular actúa como reservorio de LC pueden plantearse varias predicciones filogenéticas. Por ejemplo, se esperaría una mayor historia evolutiva entre el verdadero reservorio y el parásito respecto a los parásitos que infectan humanos (hospedero incidental), lo cual se reflejaría en la homología y diversidad genética del parásito (Fountain-Jones *et al.*, 2018; Hajjarian *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2014). Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, uno de los principales hallazgos de este estudio fue la estrecha relación filogenética entre especies de *Leishmania* spp. que infectan a mamíferos silvestres y aquellos que infectan a personas. Dicho grado de homología se ha observado previamente en estudios en los que se ha comparado las secuencias de *hsp70* aisladas de parásitos que han infectado humanos con aquellas secuencias aisladas de potenciales reservorios, animales domésticos reservorios y animales expuestos a un posible evento de antropozoonosis. Por lo tanto, incluso si no se pudiera afirmar que las especies de mamíferos, cuya infección por *Leishmania* sp. fue confirmada en este estudio, son un reservorio de la leishmaniasis cutánea, sí sería plausible sospechar que dicha



relación estrecha podría deberse a la existencia de flujo génico entre los aislados de humanos y mamíferos (Chen *et al.*, 2019; Rivero Rodríguez *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2013). No obstante, debe tomarse en cuenta que los estudios mencionados se llevaron a cabo amplificando secuencias de entre 738 y 1460 pb para el gen *hsp70*, mientras que en esta investigación se utilizó el fragmento N, el cual tiene una mayor sensibilidad para la detección de infecciones, pero carece de la suficiente variabilidad para permitir diferenciar a las especies *L. panemensis* y *L. guyanensis* (Montalvo *et al.*, 2017). En efecto, previamente se ha reportado una reducida variabilidad y utilidad del gen *hsp70* para resolver variantes intraespecíficas en comparación con otros marcadores de genotipificación y, además, dicho grado de conservación se ha atribuido a la presión selectiva contra mutaciones no sinónimas (Nemati *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2013). Es más, el gen *hsp70* pertenece a cuatro subfamilias de genes y ha evolucionado a raíz de duplicaciones, conversiones génicas, transposiciones, entre otros procesos, por lo que es susceptible a generar inferencias erradas debido a paralogías (Krenek, Schlegel, & Berendonk, 2013; Martin & Burg, 2002). Por lo tanto, para futuros estudios se sugiere utilizar un fragmento más amplio de *hsp70* como el fragmento G o secuenciar marcadores moleculares distintos como *citocromo c* el cual es de mayor utilidad para resolver variantes intraespecíficas debido a que no sufre recombinaciones y su polimorfismo es neutral al ser de origen mitocondrial (Lee *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2016). Por otra parte, también se sugiere llevar a cabo un análisis de estructuración genética para infrapoblaciones con el propósito de evaluar si la existencia de flujo génico entre las poblaciones correspondientes a aislados de humanos y mamíferos podría explicar la estrecha relación filogenética entre dichos grupos, tal como se ha llevado a cabo con otros parásitos (Agola *et al.*, 2009; Korsunenko *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011). Dicha metodología podría adaptarse a *Leishmania* utilizando el análisis de secuencias multi-locus (MLSA), como se ha realizado previamente (El Baidouri *et al.*, 2013).

Como se mencionó, la diversidad genética de la leishmaniasis puede ser un parámetro importante para identificar el rol, si este existiera, de los mamíferos infectados que se identificaron en el estudio y los ciclos de transmisión de la LC. Esto se debe a que dicha variación genética tiende a favorecer un patrón generalista en especies de parásitos, puesto que se requiere de distintos fenotipos de virulencia y fisiología para mantener la competencia en un amplio rango de hospederos (Fountain-Jones *et al.*, 2018; Woolhouse, Taylor, & Haydon, 2001). En congruencia con esto, estudios basados en MLEE, amplificación aleatoria (RAPD) y patrones de restricción (RFLP) han evidenciado que la presencia de una mayor diversidad de vectores y reservorios coincide con una mayor diversidad de genotipos para *Leishmania* spp. (Cupolillo *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002). Por lo tanto, si se consideran a los mamíferos como reservorios y a los humanos como hospederos incidentales, se esperaría ver una mayor diversidad de nucleótidos en las secuencias de *hsp70* correspondientes al primero. Contrario a lo esperado, se observó una reducida diversidad de secuencias – a nivel intraespecífico – en parásitos provenientes de mamíferos en comparación con los aislados provenientes de humanos. Ahora, incluso si este patrón no es consistente con un rol de reservorio y, en cambio, sugiere que los mamíferos mencionados se tratan de hospederos incidentales con reducida participación en el ciclo de transmisión, deben tomarse en cuenta las características de las

muestras que se están comparando. En primer lugar, la cantidad de mamíferos infectados para los cuales se lograron obtener secuencias fueron menores (n=12) en comparación con las secuencias obtenidas de muestras clínicas (n=19). Además, debe considerarse que estos mamíferos no se recolectaron para la identificación de los reservorios de leishmaniasis y algunos incluso son de áreas no endémicas para la enfermedad. Por lo tanto, existe un sesgo geográfico impuesto por el hecho de que las muestras de mamíferos se recolectaron en sitios de reducida extensión en únicamente cuatro departamentos, mientras las muestras de humanos provienen de una gran extensión de comunidades y municipios distribuidos en siete departamentos. Asimismo, las doce secuencias aisladas de mamíferos se obtuvieron de al menos cinco especies distintas de hospederos, por lo que la muestra es muy pequeña para ser representativa y puede influir considerablemente en la diversidad intraespecífica observada (Garamszegi & Møller, 2010). No obstante, este estudio es de tipo exploratorio, por lo que las limitaciones mencionadas pueden remediarse en el futuro. Por lo tanto, se sugiere que para futuros estudios se lleve a cabo un muestreo más sistemático y dirigido a hospederos mamíferos con hábitat peridomicilar y en sitios con transformación ecológica a causa de presencia humana, puesto que se esperaría una mayor abundancia de vectores y potenciales reservorios en dichos sectores (Ferro *et al.*, 2015).

Otro hallazgo pertinente que se observó en la topología filogenética propuesta para las secuencias analizadas fue una posible estructura filogeográfica, puesto que en el caso de los aislados correspondientes a *L. naiffi*/ *L. braziliensis*, se observó una divergencia con un alto porcentaje de sustento (70% de pseudorélicas) entre las cepas provenientes de muestras locales y la secuencia de referencia (GU071183.1) correspondiente a un aislado brasileño. Dichas observaciones son consistentes con estudios previos, donde se ha demostrado que el gen *hsp70* sí tiene la capacidad para diferenciar cepas del parásito con distintos orígenes geográficos – especialmente cuando se trata de cepas con alta variabilidad como *L. braziliensis* – desde nivel continental (Nuevo o Viejo Mundo) a nivel regional (Fraga, Montalvo, De Doncker, Dujardin, & Van der Auwera, 2010a; Ana M. Montalvo *et al.*, 2016). Por lo tanto, dicha agrupación podría sugerir un origen en común para los aislados guatemaltecos independientemente de su hospedero, pero se requeriría de comparaciones con cepas provenientes de otros países centroamericanos para corroborar dicha hipótesis. Por consiguiente, para dilucidar la historia evolutiva y filogeografía de la LC, en futuros estudios podrían analizarse genes con tasas de mutaciones predecibles (Hallmaier-Wacker *et al.*, 2017) y una mayor variabilidad que permitan construir redes de unión de medianas y análisis con filodinámica Bayesiana que permita caracterizar la transmisión y dispersión del patógeno en función del origen de los aislados. Dicho enfoque se ha llevado a cabo con parásitos del género *Leishmania* spp. y *Plasmodium* spp (Lee *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2004).

De las especies de mamíferos que fueron determinadas como positivas para LC, algunas no se había descrito previamente como potenciales reservorios de especies nativas de Guatemala o la región de Centroamérica. Este es el caso de *Didelphis virginiana*, *Artibeus jamaicensis* y *Urocyon cinereoargenteus*. En cuanto a *D. virginiana* este únicamente se había asociado a infecciones por Chagas, mientras A.

*jamaicensis* solo se ha asociado a *L. mexicana* y, en cuanto a *U. cinereoargenteus*, solo se ha diagnosticado la infección de forma indirecta usando anticuerpos en Norteamérica (Da Costa *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2005; Roque & Jansen, 2014; Rosypal *et al.*, 2013, 2007, 2010; Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002; Stephens *et al.*, 2016; Zamora-Ledesma *et al.*, 2016). En efecto, estas tres especies se habían pronosticado como potenciales reservorios de leishmaniasis a partir de la relación ecológica entre la distribución de estos mamíferos y los vectores del género *Lutzomyia* spp. (González-Salazar & Stephens, 2012; Stephens *et al.*, 2009). Esto implica que aún si la evidencia filogenética por sí sola es insuficiente para incriminar a estas especies como reservorios, la evidencia establecida por la literatura y la contribución de estudio en conjunto sugieren que sí es plausible que dichos mamíferos participen en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis cutánea en esta región. Por consiguiente, estos hallazgos tienen aplicabilidad en medidas de vigilancia y control dirigidas a dicha enfermedad.

Sin embargo, se necesita más investigación, puesto que no se conoce la relación que estos mamíferos puedan tener con poblaciones humanas en el país o si puedan actuar como intermediarios con especies sinantrópicas, por lo que dicha dinámica debe estudiarse más a fondo. Asimismo, no se conoce la capacidad de estas especies para interactuar con flebótomos y propiciar ciclos zoonóticos, selváticos o ambos. Además, ciertas especies que se han descrito previamente como potenciales reservorios no presentaron una infección por *Leishmania* sp., como aquellas del género *Heteromys* sp., *Peromyscus* sp. y la especie *Sigmodon hispidus* (Lara, Wynsberghe, Gonzalez, Farfan, & Narvaez, 1999; Reyes & Arrivillaga, 2009; Van Wynsberghe, Canto-Lara, Sosa-Bibiano, Rivero-Cárdenas, & Andrade-Narváez, 2009). Por ejemplo, en Guatemala se ha diagnosticado al menos un espécimen de *S. hispidus* con LC con base en una apreciación visual por profesionales veterinarios, mientras que no se alcanzó el mismo diagnóstico para *D. marsupialis* ni *U. cinereoargenteus* (Guzman-De la Cruz, 1994). No obstante, en dicho estudio no se realizó una confirmación parasitológica o molecular. En el caso de las demás especies, puede ser que no se haya logrado detectar la enfermedad debido a la reducida sensibilidad del método utilizado (falsos negativos). Por otra parte, debe tomarse en cuenta que el esfuerzo de muestreo utilizado en la recolección de estas muestras no estaba dirigido a potenciales mamíferos reservorios, por lo que probablemente refleja la abundancia de cada especie y la susceptibilidad al método de trapeo, dado que dichos taxones y otros que tampoco resultaron positivos para leishmaniasis representaban una menor proporción de la muestra. Asimismo, las prevalencias de leishmaniasis pueden variar drásticamente en ciertos mamíferos reservorios (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2017), por lo que no se sabe si los resultados representan variaciones reales entre Guatemala y otras regiones, o falsos negativos. Por lo tanto, sería recomendable corroborar las especies identificadas en este estudio como potenciales reservorios a partir de una investigación dirigida a vectores. Una forma de llevar esto a cabo sería con base en un estudio entomológico que busque aislar ADN genómico de la ingesta sanguínea de flebótomos y posteriormente identifique el hospedero de origen, como se ha realizado previamente (Baum *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2015; Sosa-Ochoa *et al.*, 2015).

Por otra parte, el perfil genotípico de las especies de *Leishmania* aisladas sí coincide con los patrones epidemiológicos que se han observado en humanos desde la década de 1980, puesto que los valores obtenidos de prevalencia para *L. braziliensis* y *L. guyanensis/panamensis* en este estudio (93.3% y 6.7%) son similares a los esperados (86.7% y 3.33%) (Ruiz, 2018) tomando en cuenta el valor reducido de n (15) para esta investigación. No obstante, a pesar de contener las proporciones adecuadas, a lo largo del desarrollo experimental se tuvieron dificultades para obtener bandas claras, lo cual podría deberse al método de extracción, puesto que no cuenta con pasos de lavado o hidrólisis proteica. Por lo tanto, previo a la amplificación, se recomienda cuantificar la concentración de ADN extraído, verificar con gel de integridad y de preferencia utilizar controles de amplificación, puesto que esta limitación pudo haber comprometido la exactitud de la prevalencia calculada. Además, otro hallazgo importante de este estudio que se refleja en el análisis filogenético es la sospecha de la presencia de especies *L. naiffi/L. braziliensis* con genotipos claramente distintos, puesto que algunas secuencias (M19-01) tenían mayor identidad con las referencias de *L. braziliensis* que con las de *L. naiffi*. Este fenómeno podría deberse a que el gen *hsp70* del parásito contiene un alelo distinto (B2) que lo identifica inequívocamente como *L. braziliensis* a pesar de la usual ambigüedad inherente a dicho marcador molecular, tal como se ha descrito en análisis RFLP (Montalvo *et al.*, 2016; Ruiz, 2018). Por lo tanto, se sugiere que, para futuros estudios, se corrobore la especie con la que se ha identificado a cada una de las muestras *L. naiffi/L. braziliensis* por RFLP usando el algoritmo enzimático *Bsa*II → *Rsa*I → *Bsp*I286I sugerido recientemente (Ruiz, 2018) y se corrobore el resultado con otro marcador molecular.

El estudio generó resultados que contribuyen significativamente al conocimiento de diversas dimensiones del campo epidemiológico de la LC y la información obtenida asiste a responder las siguientes incógnitas: (1) ¿Qué especies de mamíferos actúan como potenciales reservorios de la leishmaniasis cutánea en el país? (2) ¿Cómo se compara la taxonomía, la filogenia, y diversidad de la leishmaniasis entre hospederos mamíferos y humanos del país? No obstante, debe tomarse en cuenta que el alcance de este estudio fue exploratorio y se desarrolló en un país donde los reservorios de la leishmaniasis cutánea no se han investigado previamente (Roque & Jansen, 2014; P. R. Ryan *et al.*, 2003). En efecto, una de las limitaciones más importantes para este estudio en términos de sus repercusiones en la profundidad del análisis bioinformático que pudo realizarse fue la reducida prevalencia de LC en mamíferos (6.1%), la cual es considerablemente baja tomando en cuenta que se esperan valores promedio del 20% (Chaves *et al.*, 2007). Dicha limitación está vinculada con el enfoque exploratorio de este estudio, puesto que el esfuerzo de muestreo de los tejidos analizados de manera retrospectiva no iba dirigido a la leishmaniasis cutánea. Por consiguiente, esta investigación debería propiciar futuros estudios eco-epidemiológicos sobre la LC que amplíen el alcance de la investigación, principalmente a partir de esfuerzo de muestreo enfocado en LC que abarque los sitios con mayor probabilidad de presencia de mamíferos infectados con leishmaniasis y, a la vez, sea representativo para el país. Asimismo, se recomendaría incluir métodos que evalúen directamente el traslape espacio-temporal entre mamíferos y personas en riesgo o corroboren la viabilidad del parásito para su transmisión hacia el vector (Andrade *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2016).

A partir del desarrollo de los modelos de nicho ecológico utilizando una metodología basada en el paquete de *kuenm*, se lograron seleccionar cuatro modelos significativos para generar mapas de riesgo continuo y binario. Estos cuatro se calibraron usando los nueve componentes principales de 15 variables climáticas y dos topográficas que permitieron alcanzar un cociente promedio de AUC parcial de  $1.26 \pm 0.06$  y un porcentaje de omisión menor a 15% durante la validación cruzada de datos. Las variables climáticas que mayormente contribuyeron a los componentes principales más relevantes para explicar la variación del modelo involucran la temperatura promedio, el rango de temperatura, así como la estacionalidad y valor promedio de la humedad específica. Por consiguiente, los hallazgos más importantes que se alcanzaron en este estudio estriban en tres distintos resultados. Primero, la identificación de áreas de mayor riesgo para la presencia de LC en regiones que coinciden con la epidemiología y ecología conocida de la enfermedad. Segundo, la confirmación de que, a nivel las variables climáticas y topográficas no permiten alcanzar la suficiente especificidad en el modelo de nicho ecológico como para caracterizar la biogeografía de la LC a nivel nacional o de las regiones internas de cada país. Por último, se encontró que las variables climáticas que contribuyeron mayoritariamente a los componentes principales más explicativos involucran la temperatura promedio, el rango y promedio de temperatura, así como la estacionalidad y valor promedio de la humedad específica. Por lo tanto, a continuación se discuten las implicaciones de dichos hallazgos, los enfoques más adecuados para futuras investigaciones y las posibles aplicaciones en departamentos de salud pública de la región.

A grandes rasgos, el consenso entre los pronósticos de los cuatro modelos continuos generados es que las áreas de mayor riesgo corresponden principalmente al 1) extremo Atlántico de Costa Rica y Panamá, así como 2) el suroccidente de Nicaragua (adyacente al Lago de Nicaragua), 3) la frontera occidental de Honduras, 4) Petén y la franja transversal norte de Guatemala y 5) ciertas áreas de Yucatán, Campeche y Chiapas (México). Asimismo, suponiendo un error permisible del 5%, se pronosticó la presencia de LC en aproximadamente 90% del área de estudio en la región de Centroamérica. Dichas predicciones, a pesar de que son poco conservadoras, son congruentes con la distribución espacial de la enfermedad a nivel administrativo en la mayoría de la región centroamericana según datos del periodo entre 2001 y 2011, exceptuando a Guatemala (Maia-Elkhoury *et al.*, 2016). No obstante, datos de vigilancia más recientes para el país han generado sospecha sobre la presencia de LC en departamentos más hacia el sur, como Guatemala y Quetzaltenango, lo cual es congruente con las predicciones de los modelos en este estudio (Chávez, 2019).

Asimismo, los resultados también concuerdan con los pronósticos generados a partir de la misma base de datos de casos clínicos (David A. Moo-Llanes, 2016; Pigott, Bhatt, *et al.*, 2014; Purse *et al.*, 2017). Sin embargo, a diferencia de dichos estudios, esta investigación contribuye a una mejor comprensión del riesgo de LC en la región centroamericana, puesto que en este caso se delimita el área de estudio a una extensión menor con base en barreras geográficas de importancia biológica (Guevara & Sánchez-Cordero, 2018; Valderrama *et al.*, 2014), se optimizan los parámetros de calibración de los modelos para mejorar su

rendimiento y se incorporan ocurrencias del parásito en Guatemala obtenidas de este estudio y una investigación previa (Ruiz, 2018). Por consiguiente, en este estudio se logró obtener una omisión reducida para dicha región en comparación con Pigott y colaboradores, así como un pronóstico más detallado en comparación con el 100% de presencia pronosticado por Moo-Llanes para Centroamérica. Además, incluso si el pronóstico de Purse y colaboradores es más consistente con la distribución espacial de la LC, siempre demuestra un claro sesgo debido a la ausencia de ocurrencias en la región de Norte América y la alta abundancia de casos en Sudamérica, lo cual, a diferencia de esta investigación, resulta en una subestimación de la idoneidad climática en Guatemala y el sur de México.

Por otra parte, dichas áreas de mayor riesgo también coinciden con la distribución y nicho fundamental de actores importantes en el ciclo de transmisión, tal como ciertas especies de vectores del género *Lutzomyia* que pueden transmitir LC. Incluso si no se tienen datos para toda la región, se ha establecido la probable presencia de *Lu. olmeca*, *Lu. ovallesi*, *Lu. ylephiletor* y *Lu. panamensis* en la península de Yucatán y Petén. Asimismo se pronosticó la compatibilidad climática del extremo occidental de nuestra área de estudio (península de Yucatán, istmo de Tehuantepec y Guatemala) con el nicho de *Lu. cruciata* y *Lu. shannoni* (Ibáñez-Bernal *et al.*, 2011; D. A. Moo-Llanes *et al.*, 2019). Es más, las áreas de mayor riesgo se traslapan con el nicho pronosticado para reservorios roedores del género *Neotoma* sp. (C. González *et al.*, 2010). Sin embargo, incluso si algunos de estos estudios, como el de Ibañez y colaboradores, buscan comparar la ecología de los flebótomos con la incidencia de leishmaniasis a nivel administrativo, en ningún caso se busca modelar la idoneidad climática del parásito, como se llevó a cabo en este estudio. Por otra parte, en las tres investigaciones se limita el área de fondo a la región norteamericana, por lo que no se conoce cuál podría ser el nicho de las especies de vectores en el resto de Centroamérica, mientras que esta investigación se enfoca en toda la región. Por lo tanto, la consistencia entre las áreas de alto riesgo pronosticadas por el modelo con la distribución epidemiológica y ecológica de la enfermedad en el espacio geográfico sugiere que los mapas de riesgo generados podrían utilizarse para complementar deficiencias o sesgos en la vigilancia de la LC de la región (Escobar & Craft, 2016; Townsend Peterson, 2014). Además, puesto que la presencia de LC en humanos supone la presencia de vectores y reservorios (Marinkelle, 2010), los mapas de riesgo podrían usarse para guiar el estudio, como control de estos mismos o ambos.

A pesar de las potenciales aplicaciones de los mapas de riesgo, otro hallazgo importante en este estudio fue que la calibración usando variables climáticas y topográficas no permite alcanzar la suficiente exactitud en el modelo de nicho ecológico como para caracterizar la biogeografía de la LC a nivel de paisajes o regiones internas de cada país. Esto se refleja en el alto porcentaje de presencia (~90%) pronosticado para toda el área de estudio, incluso suponiendo un 5% de error. Ahora, dicho pronóstico es consistente con los que se han realizado previamente para esta región (David A. Moo-Llanes, 2016), exceptuando que en este caso se obtuvo un mayor grado de detalle para la región centroamericana y se utilizaron capas climáticas de sensores remotos y mediciones terrestres (Vega *et al.*, 2018). Por otro lado, este resultado es consistente con la ubicuidad de leishmaniasis en Centroamérica y los patrones observados en la generación de modelos

para especies de amplia distribución (generalistas) (Evangelista *et al.*, 2008). Por consiguiente, este resultado probablemente implica que, de manera congruente con investigaciones en otras regiones (Chavy *et al.*, 2019; Falcão de Oliveira *et al.*, 2018; Ferro *et al.*, 2015; Samy, Annajar, Dokhan, Boussaa, & Peterson, 2016), es necesario incluir variables que tomen en cuenta a la diversidad de mamíferos, la modificación de cobertura de tierra y otros factores antropogénicos para lograr hacer predicciones a escalas más finas. De igual manera, este estudio podrá actuar de base para propiciar la divulgación de información vinculada a la variación geográfica de dichas variables, lo cual facilitaría la generación de modelos más informativos para guiar políticas de salud pública a nivel nacional o distrital.

Por otra parte, el último de los hallazgos más importantes se dio a nivel de la relación entre la presencia de LC y el espacio climático. Como se ha realizado en otros estudios (Cruz-Cárdenas, López-Mata, Villaseñor, & Ortiz, 2014), los factores de carga para los componentes principales que más explican la variación en el modelo permitieron determinar las contribuciones de distintas variables climáticas originales. Por lo tanto, se determinó que el rango y promedio de temperatura, así como la estacionalidad y valor promedio de la humedad específica son las variables más relevantes para la idoneidad climática de la LC. En efecto, la relevancia de ciertos rangos de tolerancia para temperatura y humedad (o precipitación) se ha demostrado en estudios de escala gruesa que incluyen a Centroamérica o se desarrollaron en otras regiones para generar modelos de nicho sobre el parásito o ciertas especies del vector de la LC (Chavy *et al.*, 2019; Falcão de Oliveira *et al.*, 2018; Ferro *et al.*, 2015; David A. Moo-Llanes, 2016; Pigott, Bhatt, *et al.*, 2014). Asimismo, a escalas reducidas de tiempo y espacio se ha demostrado que ciertas etapas del ciclo de vida del flebótomo requieren de suelos con alta humedad relativa (Vivero *et al.*, 2015). Por lo tanto, los patrones en el espacio climático que se hallaron en este estudio son compatibles con la literatura. Ahora, a diferencia del resto de estudios, en esta investigación se desarrollaron los modelos utilizando componentes principales, lo cual impide hallar relaciones directas entre las curvas de respuesta con las variables originales. No obstante, como se mostró en la sección de resultados, dicha reducción de multicolinealidad permitió generar modelos con una menor omisión, lo cual mejora el rendimiento del modelo, así como la calidad de las predicciones que podrían generarse a partir de este (Cobos *et al.*, 2019). Asimismo, a diferencia de la distribución aleatoria usada en la mayoría de estudios, en esta investigación se empleó el método de bloques para la partición de datos en grupos de entrenamiento y prueba, lo cual reduce la autocorrelación y es preferible al extrapolar o transferir los modelos a distintas condiciones climáticas (Muscarella *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2017). Adicionalmente, en este estudio se utilizaron las capas climáticas de MERRAclim en vez de las capas de WorldClim que se han aplicado más habitualmente en investigaciones como la de Moo-Llanes. Esto representa una ventaja para la investigación, puesto que dichas capas se construyeron a partir de datos de sensores remotos y de estaciones terrestres (Vega *et al.*, 2018; Waltari, Schroeder, McDonald, Anderson, & Carnaval, 2014). El conocimiento generado por esta investigación respecto a la contribución de las distintas variables climáticas podría ser útil para modificar y mejorar el rendimiento de los modelos generados a partir de las variables originales. Esto permitiría que, según las curvas de respuesta, se infieran rangos y valores óptimos de temperatura y humedad específica.

Posteriormente, estos últimos datos podrían ser utilizados por departamentos de salud pública para predecir en qué regiones y en qué épocas del año hay un mayor riesgo de transmisión de LC y, por tanto, hay vectores y reservorios presentes. Además, conforme los modelos se optimicen al compensar por el sesgo, reducir el rango temporal, añadir variables vinculadas al paisaje y utilizar validaciones cruzadas robustas con datos epidemiológicos se logrará alcanzar una mayor exactitud y precisión en las predicciones. De esta manera los modelos llegarán a ser de mayor utilidad para autoridades de salud pública y se justificará la realización de proyecciones a escenarios climáticos futuros (Escobar & Craft, 2016; Morain & Budge, 2012; Muscarella *et al.*, 2014). Esta última aplicación sería de suma utilidad, dado que se ha comprobado que el cambio climático tiene el potencial de impactar significativamente en la biogeografía de la LC (González *et al.*, 2013, 2010; Purse *et al.*, 2017).

A pesar de las contribuciones de los modelos y mapas de riesgo generados al conocimiento sobre la biogeografía de la LC, existen varios factores de mejora y supuestos del modelo que deben delinarse para el beneficio de futuras investigaciones. En primer lugar debe mencionarse que, al usar una base de datos de ocurrencias que consiste en su mayoría en casos clínicos de la enfermedad (Pigott, Golding, *et al.*, 2014), el complejo sistema de transmisión de la leishmaniasis se está simplificando usando un enfoque de tipo caja negra (Escobar *et al.*, 2017; Peterson, 2007; Townsend Peterson, 2014). Ahora, incluso si este enfoque puede ser válido y útil cuando no se cuenta con la detección directa del parásito u ocurrencias de vectores o reservorios, esta metodología puede introducir sesgos debido a su dependencia en el esfuerzo de vigilancia epidemiológica (una forma de esfuerzo de muestreo), los métodos de diagnóstico empleados, la variación estacional en la incidencia de infecciones, la presencia de infecciones subclínicas y la distancia entre los centros de salud y el sitio de infección original (Escobar & Craft, 2016). Asimismo, la incorporación de casos de infecciones que se diagnosticaron de manera independiente y se limitan a solo uno de los países del área de estudio también introduce un sesgo que podría influir en la exactitud del modelo. Es más, el uso de datos provenientes de un amplio rango temporal, como en este caso (1960-2012) incrementa la incertidumbre asociada a cada presencia, principalmente debido a los cambios constantes en la cobertura y uso de tierra que influyen en el nicho de los vectores (Ferro *et al.*, 2015; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2011). Por lo tanto, bajo circunstancias ideales se debería determinar el nicho de vectores y, si es posible, hallar el traslape de este con el nicho de reservorios y con personas susceptibles, tal como se ha llevado a cabo en otros estudios (C. González *et al.*, 2010; Samy *et al.*, 2016). Esto se debe a que al incorporar a dichos componentes del sistema de transmisión se puede llegar a conocer con mayor certeza respecto a dónde ocurre la transmisión (debido a vectores) y dónde se mantiene la LC (debido a reservorios) (Chaves *et al.*, 2007).

Sin embargo, en este caso, la compilación de ocurrencias se llevó a cabo considerando la ausencia de datos para vectores y/o reservorios que abarcaran toda la región Centroamericana. Además, se buscó enriquecer la base de datos de Pigott y colaboradores con ocurrencias que se determinaron usando pruebas diagnósticas moleculares de alta sensibilidad y especificidad (Montalvo *et al.*, 2010; Ana M. Montalvo *et*



*al.*, 2016; Gert Van Der Auwera *et al.*, 2014). Asimismo, se procuró eliminar datos duplicados y reducir las ocurrencias a un valor por pixel para reducir la autocorrelación. De igual manera, para futuras investigaciones se recomienda, en primer lugar, buscar compensar por el sesgo de diversas formas: 1) ajustando el área de estudio para tomar en cuenta otras barreras biogeográficas y la capacidad de movimiento de las especies involucradas, 2) validando los modelos con datos epidemiológicos independientes, 3) eliminando pseudoréplicas y datos atípicos en el espacio climático con un algoritmo que corrige este sesgo (ej. NicheA), 4) submuestreando, o 5) dividiendo la lista de ocurrencias en conglomerados según el esfuerzo de muestreo (Escobar & Craft, 2016; Escobar *et al.*, 2017; Fourcade, Engler, Rödder, & Secondi, 2014; Merow *et al.*, 2013). Por otra parte, también pueden emplearse métodos más estrictos para la filtración de datos, tal como la exclusión de sitios urbanos del área de estudio y la corrección de datos georreferenciados erróneamente con base en dicha zona de exclusión (Chavy *et al.*, 2019).

Por otro lado, otro aspecto que es necesario para mejorar el detalle y la aplicabilidad de los modelos en departamentos de salud pública es la escala y variabilidad. Como se había discutido previamente, las variables bioclimáticas y topográficas utilizadas para la calibración no fueron suficientes para explicar variaciones en la presencia de LC a nivel de paisajes o regiones internas de cada país. En parte esto podría deberse a la exclusión de variables vinculadas al paisaje y actividades antropogénicas, tal como la cobertura y el uso de suelo, los índices de vegetación, la huella ecológica humana, la urbanización, entre otras variables predictivas que se han usado en distintos estudios (Chavy *et al.*, 2019; Pigott, Bhatt, *et al.*, 2014). Sin embargo, una modificación que podría mejorar considerablemente la calidad de los pronósticos realizados por el modelo sería la inclusión de datos provenientes de sensores remotos. En efecto, dichas variables conllevan un mayor detalle, exactitud y menor autocorrelación simplemente porque se generan a partir de mediciones satelitales y locales de alta resolución (Garni *et al.*, 2014; Townsend Peterson, 2014). Sin embargo, en este estudio se decidió mantener una escala de menor resolución, principalmente porque varias de las ocurrencias conllevan una alta incertidumbre al haberse obtenido de coordenadas a escala de divisiones administrativas, por lo que el uso de variables predictivas a una escala fina no necesariamente sería informativo (Pigott, Golding, *et al.*, 2014). Asimismo, la limitada cobertura espacio-temporal de la mayoría de estas capas, a excepción de algunas como “WorldGrids” (Hengl, Reuter, & J, 2013) impide que estas puedan generalizarse al amplio rango temporal de las ocurrencias y en toda el área de estudio, especialmente cuando se trata de variables vinculadas a factores antropogénicos. Además, el uso de variables de alta resolución posiblemente habría limitado la viabilidad de llevar a cabo la calibración y evaluación de los 270 modelos que se generaron en esta investigación, puesto que incrementarían considerablemente el tiempo de corrida.

Otro de los aspectos novedosos de la metodología de este estudio fue la evaluación de una alta diversidad de modelos (270) con distintas configuraciones y conjuntos de variables predictivas para la selección de las más adecuadas para los datos. Este proceso se llevó a cabo utilizando el paquete *kuenm*

para R (3.5.0), el cual recientemente se ha descrito en la literatura como una herramienta diseñada para facilitar la calibración y evaluación de modelos usando una amplia gama de configuraciones de MaxEnt (Cobos *et al.*, 2019). Asimismo, este paquete se ha logrado emplear con éxito en investigaciones vinculadas a la biogeografía de artrópodos como garrapatas *Haemaphysalis longicornis*, *Amblyomma americanum* y otras especies (R. K. Raghavan *et al.*, 2019; Ram K Raghavan, Peterson, Cobos, Ganta, & Foley, 2019). Dicho paquete se utilizó para calibrar y evaluar hasta 1479 modelos para distintas bases de datos de ocurrencias. En efecto, en el caso de esta investigación se utilizó dicho paquete para seleccionar a las variables reducidas en componentes principales como el mejor conjunto de predictores. Asimismo, se simplificaron los modelos para limitarse a transformaciones cuadráticas y cuatro multiplicadores de regularización. Por lo tanto, el paquete *kuenm* permitió una mejorada optimización de los modelos.

En conclusión, el desarrollo de modelos de nicho ecológico para la LC contribuyen a la biogeografía de esta enfermedad en términos de tres distintos aspectos: la identificación de áreas de mayor riesgo, la confirmación de que las variables bioclimáticas y topográficas no son suficientes para pronosticar detalles a nivel de paisajes o regiones internas de cada país y, la determinación de que el rango y promedio de temperatura, así como la estacionalidad y valor promedio de la humedad específica son las variables más relevantes para la idoneidad climática de la LC en la región centroamericana. Por consiguiente, los pasos a seguir en futuras investigaciones serían los siguientes: 1) optimizar el modelo compensando el sesgo presente en las ocurrencias, agregando más variables predictivas y comparando el modelo con bases de datos independientes, 2) seleccionar las variables que más contribuyen al modelo utilizando los resultados de MaxEnt y la retroalimentación de *kuenm* para que puedan determinarse rangos óptimos y de tolerancia para las variables más importantes que influyen en el riesgo de LC, y 3) obtener modelos de nicho ecológico para las especies de vectores y reservorios más importantes de la región centroamericana y calcular el traslape de nichos con la presencia de personas susceptibles para identificar cuántas personas en riesgo existen en esta región y dónde se encuentran.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la infección de mamíferos pertenecientes a las especies *Artibeus jamaicensis* (13.64%), *A. lituratus* (6.25%), *Didelphis marsupialis* (9.52%), *D. virginiana* (3.92%), *Oryzomys couesi* (33.33%), *Philander oposum* (7.69%) y *Urocyon cinereoargenteus* (33.33%) con parásitos causantes de leishmaniasis cutánea (*Leishmania naiffi*/ *L. braziliensis* y *L. guyanensis/panamensis*) y con una prevalencia de 6.1%.
2. Según la topología filogenética de máxima verosimilitud construida para secuencias *hsp70*, se determinó la ausencia de divergencias significativas entre las variantes de *Leishmania* spp. que infectan a personas y mamíferos silvestres, lo cual sugiere una estrecha relación de linajes consistente con la participación de estos últimos en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis cutánea. No obstante, se observó una reducida diversidad de secuencias *hsp70* – a nivel intraespecífico– en parásitos provenientes de mamíferos en comparación con los aislados provenientes de humanos, lo cual no es congruente con un rol de reservorio.
3. Se seleccionaron cuatro modelos de nicho ecológico para la leishmaniasis cutánea con sus respectivos mapas de riesgo y se determinó una zona habitable pronosticada de 90% para la enfermedad (suponiendo 5% de omisión). Además, se determinó que el rango y promedio de temperatura, así como la estacionalidad y valor promedio de la humedad específica son las variables más relevantes para la idoneidad climática de esta enfermedad.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere enfocar el esfuerzo de muestreo a hospederos mamíferos con hábitat peridomicilar y en sitios con transformación ecológica a causa de la presencia o actividad humana, puesto que se esperaría una mayor abundancia de vectores y potenciales reservorios en dichos sectores, y acoplar dichas actividades con un estudio entomológico para determinar la ingesta alimenticia e infectividad de dichos hospederos.
2. Para futuros estudios se sugiere utilizar un fragmento más amplio de *hsp70* como el fragmento G o secuenciar marcadores moleculares distintos como citocromo c, el cual es de mayor utilidad para resolver variantes intraespecíficas debido a que, al ser de origen mitocondrial, no sufre recombinaciones y sus mutaciones tienden a ser homogéneas. Asimismo, se sugiere llevar a cabo un análisis de estructuración genética para infrapoblaciones correspondientes a aislados de humanos y mamíferos para determinar el grado de flujo génico entre ambos grupos.
3. Para profundizar en los resultados ya generados y así llegar a concluir respecto a la presencia de reservorios en el país, se recomendaría incluir métodos que evalúen la dispersión del parásito en tiempo y espacio, como podría darse con un enfoque filodinámico, o corroboren la viabilidad del parásito para su transmisión hacia el vector.
4. Para futuras investigaciones que involucren modelos de nicho ecológico de la leishmaniasis cutánea en Centroamérica, se sugiere optimizar el modelo compensando el sesgo presente en las ocurrencias, agregando más variables predictivas y comparando el modelo con bases de datos independientes. Además, se debe determinar rangos óptimos y de tolerancia para las variables más importantes que influyen en el riesgo de esta enfermedad y obtener modelos de nicho ecológico para las especies de vectores y reservorios más importantes de la región centroamericana para así identificar el nicho y las zonas habitables de las especies que conforman el sistema de transmisión.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Acardi, S. A., Rago, M. V., Liotta, D. J., Fernandez-Duque, E., & Salomón, O. D. (2013). Leishmania (Viannia) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Veterinary Parasitology*, *193*(1–3), 256–259. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.12.012>
- Agola, L. E., Steinauer, M. L., Mburu, D. N., Mungai, B. N., Mwangi, I. N., Magoma, G. N., ... Mkoji, G. M. (2009). Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers. *Acta Tropica*, *111*(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.04.012>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, *11*(4), 1–6. <https://doi.org/10.21767/1791-809x.1000519>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... WHO Leishmaniasis Control Team, the W. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, *7*(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amro, A., Al-Dwibe, H., Gashout, A., Moskalenko, O., Galafin, M., Hamarsheh, O., ... Kuhls, K. (2017). Spatiotemporal and molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Libya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005873>
- Andrade, M. S., Courtenay, O., Maria, M. E., Carvalho, F. G., Carvalho, A. W. S., Soares, F., ... Brandão-Filho, S. P. (2015). Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of Leishmania (Viannia) braziliensis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004137>
- Araujo Carreira, J. C., Figueiredo Mafra Magalhes, M. de A., & da Silv, A. V. M. (2014). The Geospatial Approach on Eco-Epidemiological Studies of Leishmaniasis. In *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57210>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., ... Magill, A. (2017). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Arora, S., Kapoor, G., & Sehgal, S. (1998). Heterogeneity in heat shock protein genes in Leishmania isolates. *Immunology and Cell Biology*, *76*(2), 186–189. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00731.x>
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, *14*(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)

- Barve, N., Barve, V., Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, A., Maher, S. P., Townsend Peterson, A., ... Villalobos, F. (2011). The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecological Modelling*, 222, 1810–1819. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.02.011>
- Baum, M., de Castro, E. A., Pinto, M. C., Goulart, T. M., Baura, W., Klisiowicz, D. do R., & Vieira da Costa-Ribeiro, M. C. (2015). Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica*, 143, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006>
- Bennis, I., De Brouwere, V., Belrhiti, Z., Sahibi, H., & Boelaert, M. (2018). Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: A scoping review. *BMC Public Health*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5260-9>
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1435–1439. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>
- Berger, S. (2019). *Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Global Status*. Gideon Informatics, Inc.
- Berzunza-cruz, M., Rodríguez-moreno, Á., Gutiérrez-granados, G., González-salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-mihart, M., ... Sánchez-cordero, V. (2015). Leishmania (L.) mexicana Infected Bats in Mexico : Novel Potential Reservoirs, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438>
- Beumer, R. J., Christenisen, H. A., & Herrer, A. (1973). RESERVOIR HOSTS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS AMONG PANAMANIAN FOREST MAMMALS. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22(5), 585–591. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1973.22.585>
- Bhunja, Gouri S., Kesari, S., Jeyaram, A., Kumar, V., & Das, P. (2010). Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: a study based on remote sensing and geographical information system. *Geospatial Health*, 4(2), 155. <https://doi.org/10.4081/gh.2010.197>
- Bhunja, Gouri Sankar, Kesari, S., Chatterjee, N., Kumar, V., & Das, P. (2013). The Burden of Visceral Leishmaniasis in India: Challenges in Using Remote Sensing and GIS to Understand and Control. *ISRN Infectious Diseases*, 2013, 1–14. <https://doi.org/10.5402/2013/675846>
- Boité, M. C., Mauricio, I. L., Miles, M. A., & Cupolillo, E. (2012). New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of Leishmania (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1888. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001888>
- Borja, L. S., Sousa, O. M. F. de, Solcà, M. da S., Bastos, L. A., Bordoni, M., Magalhães, J. T., ... Veras, P. S. T. (2016). Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by Leishmania infantum is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Veterinary Parasitology*, 229, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.004>
- Brandão-Filho, S. P., Brito, M. E., Carvalho, F. G., Ishikaw, E. A., Cupolillo, E., Floeter-Winter, L., & Shaw, J. J. (2003). Wild and synanthropic hosts of Leishmania (Viannia) braziliensis in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 291–296. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90146-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90146-5)

- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Cardoso, R. M., De Araújo, N. N. S. L., Romero, G. A. S., Souza, T. T. C. M., Dietrich, A. G., Mendes, J. D., ... Gurgel-Gonçalves, R. (2015). Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0780-y>
- CDC. (2018). Parasites - Leishmaniasis. Retrieved from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>
- Chajón, H. S., & Mazá, K. B. (2009). *CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICA DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS EN EL DEPARTAMENTO DE PETÉN*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., Benie, G. B., Michael, E., & Ben Salah, A. (2018). Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: Impact of climate change. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3019-x>
- Chaves, L. F., Hernandez, M. J., Dobson, A. P., & Pascual, M. (2007). Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 23(7), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.05.003>
- Chávez, E. (2019). *Leishmaniasis cutánea Guatemala*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guatemala.
- Chavy, A., Ferreira Dales Nava, A., Luz, S. L. B., Ramírez, J. D., Herrera, G., Vasconcelos dos Santos, T., ... de Thoisy, B. (2019). Ecological niche modelling for predicting the risk of cutaneous leishmaniasis in the Neotropical moist forest biome. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(8), e0007629. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007629>
- Chen, H., Li, J., Zhang, J., Guo, X., Liu, J., He, J., ... Chen, J. (2019). Multi-locus characterization and phylogenetic inference of *Leishmania* spp. in snakes from Northwest China. *PLOS ONE*, 14(4), e0210681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210681>
- Chowdhury, R., Kumar, V., Mondal, D., Das, M. L., Das, P., Dash, A. P., & Kroeger, A. (2016). Implication of vector characteristics of *Phlebotomus argentipes* in the kala-azar elimination programme in the Indian sub-continent. *Pathogens and Global Health*, 110(3), 87–96. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1180775>
- Cobos, M. E., Peterson, A. T., Barve, N., & Osorio-Olvera, L. (2019). kuenm: an R package for detailed development of ecological niche models using Maxent. *PeerJ*, 7, e6281. <https://doi.org/10.7717/peerj.6281>
- Copeland, H. W., Arana, B. A., & Navin, T. R. (1990). Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43(3), 257–259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2221220>
- Courtenay, O., Carson, C., Calvo-Bado, L., Garcez, L. M., & Quinnell, R. J. (2014). Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs.

*PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00630>

- Croan, D. G., Morrison, D. A., & Ellis, J. T. (2002). Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession numbers: POLA/RPOIILS (AF009134/AF0091. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89(2), 149–159. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00111-4)
- Cruz-Cárdenas, G., López-Mata, L., Villaseñor, J. L., & Ortiz, E. (2014). Potential species distribution modeling and the use of principal component analysis as predictor variables. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1), 189–199. <https://doi.org/10.7550/rmb.36723>
- Cupolillo, E., Brahim, L. R., Toaldo, C. B., de Oliveira-Neto, M. P., de Brito, M. E. F., Falqueto, A., ... Grimaldi, G. (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3126–3132. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3126-3132.2003>
- Cupolillo, E., Momen, H., & Grimaldi, G. (1998). Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 663–668. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000500018>
- Da Costa, A. P., Costa, F. B., Soares, H. S., Ramirez, D. G., De Carvalho Mesquita, E. T. K., Gennari, S. M., & Marcili, A. (2015). *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* *chagasi* Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(11), 656–666. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1771>
- Danielson, J. J., & Gesch, D. . (2011). *Global Multi-resolution Terrain Elevation Data 2010 (GMTED2010)* (Vol. U.S. Geo-). Retrieved from [http://eros.usgs.gov/#/Find\\_Data/Products\\_and\\_Data\\_Available/GMTED2010](http://eros.usgs.gov/#/Find_Data/Products_and_Data_Available/GMTED2010)
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
- de Freitas, T. P. T., D'Andrea, P. S., de Paula, D. A. J., Nakazato, L., Dutra, V., Bonvicino, C. R., ... Sousa, V. R. F. (2012). Natural Infection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in *Mus musculus* Captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 81–83. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0268>
- De Lima, H., De Guglielmo, Z., Rodríguez, A., Convit, J., & Rodríguez, N. (2002). Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) and Black Rats (*Rattus rattus*) as Possible Reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(2), 169–174. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000200004>
- de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- Dedet, J. P., Gay, F., & Chatenay, G. (1989). Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), 613–615. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90374-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90374-X)



- Disney, R. H. L. (1968). Observations on a Zoonosis: Leishmaniasis in British Honduras. *The Journal of Applied Ecology*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.2307/2401273>
- Doehl, J. S. P., Bright, Z., Dey, S., Davies, H., Magson, J., Brown, N., ... Kaye, P. M. (2017). Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. *Nature Communications*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00103-8>
- El Baidouri, F., Diancourt, L., Berry, V., Chevenet, F., Pralong, F., Marty, P., & Ravel, C. (2013). Genetic Structure and Evolution of the Leishmania Genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002255>
- Elnaiem, D. A., Connor, S. J., Thomson, M. C., Hassan, M. M., Hassan, H. K., Aboud, M. A., & Ashford, R. W. (1998). Environmental determinants of the distribution of Phlebotomus orientalis in Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(8), 877–887. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10396348>
- Elnaiem, D. A., Hassan, M. M., Maingon, R., Nureldin, G. H., Mekawi, A. M., Miles, M., & Ward, R. D. (2001). The egyptian mongoose, Herpestes ichneumon, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology*, 122(5), 531–536. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007594>
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00067-12>
- Escobar, L. E., & Craft, M. E. (2016). Advances and limitations of disease biogeography using ecological niche modeling. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01174>
- Escobar, L. E., Qiao, H., Lee, C., & Phelps, N. B. D. (2017). Novel Methods in Disease Biogeography: A Case Study with Heterosporosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(July). <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00105>
- Evangelista, P. H., Kumar, S., Stohlgren, T. J., Jarnevich, C. S., Crall, A. W., Norman, J. B., & Barnett, D. T. (2008). Modelling invasion for a habitat generalist and a specialist plant species. *Diversity and Distributions*, 14(5), 808–817. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00486.x>
- Falcão de Oliveira, E., Galati, E. A. B., Oliveira, A. G. de, Rangel, E. F., & Carvalho, B. M. de. (2018). Ecological niche modelling and predicted geographic distribution of Lutzomyia cruzi, vector of Leishmania infantum in South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006684>
- Ferro, C., López, M., Fuya, P., Lugo, L., Cordovez, J. M., & González, C. (2015). Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLoS ONE*, 10(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139391>
- Fischer, D., Thomas, S. M., & Beierkuhnlein, C. (2011). Modelling climatic suitability and dispersal for disease vectors: The example of a phlebotomine sandfly in Europe. *Procedia Environmental Sciences*, 7, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.07.029>
- Fountain-Jones, N. M., Pearse, W. D., Escobar, L. E., Alba-Casals, A., Carver, S., Davies, T. J., ... Craft,

- M. E. (2018). Towards an eco-phylogenetic framework for infectious disease ecology. *Biological Reviews*, 93(2), 950–970. <https://doi.org/10.1111/brv.12380>
- Fourcade, Y., Engler, J. O., Rödder, D., & Secondi, J. (2014). Mapping species distributions with MAXENT using a geographically biased sample of presence data: A performance assessment of methods for correcting sampling bias. *PLoS ONE*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097122>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C. C., & Van der Auwera, G. (2010a). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010b). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Gálvez, R., Descalzo, M. A., Guerrero, I., Miró, G., & Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the Madrid Region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 799–806. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0109>
- Garamszegi, L. Z., & Møller, A. P. (2010). Effects of sample size and intraspecific variation in phylogenetic comparative studies: A meta-analytic review. *Biological Reviews*, 85(4), 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00126.x>
- Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., ... Dujardin, J.-C. (2004). Culture-independent species typing of neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>
- Garni, R., Tran, A., Guis, H., Baldet, T., Benallal, K., Boubidi, S., & Harrat, Z. (2014). Remote sensing, land cover changes, and vector-borne diseases: Use of high spatial resolution satellite imagery to map the risk of occurrence of cutaneous leishmaniasis in Ghardaïa, Algeria. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.036>
- Gebremichael, D. (2018). Zoonotic impact and epidemiological changes of leishmaniasis in Ethiopia. *Open Veterinary Journal*, 8(4), 2226–4485. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.13>
- Gentile, B., Le Pont, F., Pajot, F. X., & Besnard, R. (1981). Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as a reservoir host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 612–613. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90223-6)
- Georgiadou, S. P., Makaritsis, K. P., & Dalekos, G. N. (2015). Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*, 3(2), 43–50. <https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0002>
- Gómez-Hernandez, C., BENTO, E. C., REZENDE-OLIVEIRA, K., NASCENTES, G. A. N., BARBOSA, C. G., BATISTA, L. R., ... RAMIREZ, L. E. (2017). Leishmania infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology*, 144(14), 1980–1986. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001500>

- González-Salazar, C., & Stephens, C. R. (2012). Constructing ecological networks: A tool to infer risk of transmission and dispersal of leishmaniasis. *Zoonoses and Public Health*, 59(SUPPL.2), 179–193. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01479.x>
- González, C., Paz, A., & Ferro, C. (2013). Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species under climate change scenarios in Colombia. *Acta Tropica*, 129(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.014>
- González, C., Wang, O., Strutz, S. E., González-Salazar, C., Sánchez-Cordero, V., & Sarkar, S. (2010). Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1), e585. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000585>
- González, K., Calzada, J. E., Saldaña, A., Rigg, C. A., Alvarado, G., Rodríguez-Herrera, B., ... Baldi, M. (2015). Survey of Wild Mammal Hosts of Cutaneous Leishmaniasis Parasites in Panamá and Costa Rica. *Tropical Medicine and Health*, 43(1), 75–78. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-30>
- Grimaldi, G., Momen, H., Naiff, R. D., McMahon-Pratt, D., & Barrett, T. V. (1991). Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(6), 645–661. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645>
- Guevara, L., & Sánchez-Cordero, S. (2018). Patterns of morphological and ecological similarities of small-eared shrews (Soricidae, Cryptotis) in tropical montane cloud forests from Mesoamerica Geography of emerging zoonotic diseases of human health importance in Mexico View project Biogeografía.. *Systematics and Biodiversity*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2017.1470582>
- Guzman-De la Cruz, M. T. (1994). *Reservorios animales de leishmaniasis tegumentaria*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hajjaran, H., Mohebbali, M., Abaei, M. R., Oshaghi, M. A., Zarei, Z., Charehdar, S., ... Teimouri, A. (2013). Natural infection and phylogenetic classification of *Leishmania* spp. infecting *Rhombomys opimus*, a primary reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in northeast Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(9), 550–557. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt060>
- Hallmaier-Wacker, L. K., Munster, V. J., & Knauf, S. (2017). Disease reservoirs: From conceptual frameworks to applicable criteria. *Emerging Microbes and Infections*, 6(9), 1–5. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.65>
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., & Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
- Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H., & Laurenson, M. K. (2002). Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), 1468–1473. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010317>
- Hengl, T., Reuter, H. I., & J, M. D. J. (2013). WorldGrids . org : a repository of global soil covariates.
- Herricks, J. R., Hotez, P. J., Wanga, V., Coffeng, L. E., Haagsma, J. A., Basanez, M.-G., ... Murray, C. J.

- L. (2017). The Global Burden of Disease Study 2013 : What does it mean for the NTDs ? PLOS Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(8), 1–21. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pntd.0005424>
- Hijjawi, N., Kanani, K. A., Rasheed, M., Atoum, M., Abdel-Dayem, M., & Irhimeh, M. R. (2016). Molecular Diagnosis and Identification of Leishmania Species in Jordan from Saved Dry Samples . *BioMed Research International*, *2016*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/6871739>
- Ibáñez-Bernal, S., Becker-Fausser, I., González, C., Martínez-Meyer, E., Sánchez-Cordero, V., Rebollar-Téllez, E. A., & Peterson, A. T. (2011). Current Knowledge of Leishmania Vectors in Mexico: How Geographic Distributions of Species Relate to Transmission Areas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *85*(5), 839–846. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0452>
- Ishikawa, E. A. Y., Silveira, F. T., Magalhães, A. L. P., Guerra, R. B., Melo, M. N., Gomes, R., ... Shaw, J. J. (2002). Genetic variation in populations of Leishmania species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*, S111–S121. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90061-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90061-1)
- Johnson, E. E., Escobar, L. E., & Zambrana-Torrel, C. (2019). An Ecological Framework for Modeling the Geography of Disease Transmission. *Trends in Ecology and Evolution*, *34*(7), 655–668. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.03.004>
- Kaabi, B., & Ahmed, S. B. (2013). Assessing the effect of zooprophyllaxis on zoonotic cutaneous leishmaniasis transmission : A system dynamics approach. *BioSystems*, *114*(3), 253–260. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2013.10.003>
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., ... Heymann, D. L. (2012). Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *The Lancet*, *380*(9857), 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Kent, A., Ramkalup, P., Mans, D., & Schallig, H. (2013). Is the dog a possible reservoir for cutaneous leishmaniasis in suriname? *Journal of Tropical Medicine*, *2013*, 3–7. <https://doi.org/10.1155/2013/324140>
- Kerr, S. F., Emmons, L. H., Melby, P. C., Liu, C., Perez, L. E., Villegas, M., & Miranda, R. (2006). Leishmania amazonensis infections in Oryzomys acritus and Oryzomys nitidus from Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(6), 1069–1073. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172367>
- Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *65*(October), 37–42. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>
- Koch, L. K., Kochmann, J., Klimpel, S., & Cunze, S. (2017). Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13822-1>
- Korsunen, A., Chrisanova, G., Lopatkin, A., Beer, S. A., Voronin, M., Ryskov, A. P., & Semyenova, S. K. (2012). Genetic differentiation of cercariae infrapopulations of the avian schistosome Trichobilharzia szidati based on RAPD markers and mitochondrial cox1 gene. *Parasitology Research*, *110*(2), 833–841. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2562-6>

- Krenek, S., Schlegel, M., & Berendonk, T. U. (2013). Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the Hsp70 gene family. *BMC Evolutionary Biology*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-49>
- Kreutzer, R. D., Tesh, R. B., Corredor, A., Groggl, M., Morales, A., Guzman, H., ... Rowton, E. D. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* Sp. N (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a New Parasite Infecting Humans, Animals, and Phlebotomine Sand Flies in Colombia and Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *44*(6), 662–675. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.662>
- Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, *3*(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lainson, R., Braga, R. R., De Souza, A. A. A., Pôvoa, M. M., Ishikawa, E. A. Y., & Silveira, F. T. (1989). *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *64*(3), 200–207. <https://doi.org/10.1051/parasite/1989643200>
- Lainson, R., & Shaw, J. J. (1989). *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *64*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1051/parasite/19896413>
- Lainson, R., Shaw, J. J., Ward, R. D., Ready, P. D., & Naiff, R. D. (1979). Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(2), 239–242. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90225-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90225-6)
- Lara, S. B. C., Wynsberghe, N. R. V, Gonzalez, A. V, Farfan, F. F. O., & Narvaez, F. J. A. (1999). Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*(3), 305–309.
- Lee, K. S., Divis, P. C. S., Zakaria, S. K., Matusop, A., Julin, R. A., Conway, D. J., ... Singh, B. (2011). *Plasmodium knowlesi*: Reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathogens*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002015>
- Lindquist, S. (1986). The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry*, *55*(1), 1151–1191. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>
- Maia-Elkhoury, A. N. S., E. Yadón, Z., Idali Saboyá Díaz, M., de Fátima de Araújo Lucena, F., Gerardo Castellanos, L., & J. Sanchez-Vazquez, M. (2016). Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(11), 2001–2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005086>
- Maia-Elkhoury, A. N. S., Oshiro, S. Y., Nicholls, S., Buzanovsky, L. P., Sánchez, M. J., & Rivera, A. M. (2018). Informe Epidemiológico de las Americas- LEISHMANIASIS. *PAHO/WHO*, 7.
- Marinkelle, C. J. (2010). The control of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, *58*(6),

807–818. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>

- Martin, A. P., & Burg, T. M. (2002). Perils of paralogy: Using HSP70 genes for inferring organismal phylogenies. *Systematic Biology*, *51*(4), 570–587. <https://doi.org/10.1080/10635150290069995>
- Mendizábal-Cabrera R, de Leon O, Arana B, Duran E, Ramay B, Mendez L, *et al.* (2015). Challenges for controlling cutaneous leishmaniasis in remote areas of Guatemala, Central America., (October).
- Merow, C., Smith, M. J., & Silander, J. A. (2013). A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: What it does, and why inputs and settings matter. *Ecography*, *36*(10), 1058–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2013.07872.x>
- Miranda, C., Massa, J. L., & Marques, C. C. A. (1996). Análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, *30*(5), 433–437. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000500005>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *31*(7), 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, *137*(8), 1159–1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Montalvo, Ana M., Fraga, J., Montano, I., Monzote, L., Van der Auwera, G., Marín, M., & Muskus, C. (2016). Identificación molecular de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. procedentes de Colombia con base en el gen hsp70. *Biomédica*, *36*, 37–44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688>
- Montalvo, Ana M., Fraga, J., Tirado, D., Blandón, G., Alba, A., Van der Auwera, G., ... Muskus, C. (2017). Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitology Research*, *116*(7), 1843–1848. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5454-6>
- Montalvo, C. A. M., Fraga, J., & Monzote, C. L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina*, *64*(2), 108–131.
- Moo-Llanes, D. A., Pech-May, A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Rebollar-Téllez, E. A., & Ramsey, J. M. (2019). Inferring distributional shifts of epidemiologically important North and Central American sandflies from Pleistocene to future scenarios. *Medical and Veterinary Entomology*, *33*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1111/mve.12326>
- Moo-Llanes, D., Ibarra-Cerdeña, C. N., Rebollar-Téllez, E. A., Ibáñez-Bernal, S., González, C., & Ramsey, J. M. (2013). Current and Future Niche of North and Central American Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Climate Change Scenarios. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002421>
- Moo-Llanes, David A. (2016). Nicho ecológico actual y futuro de la Leishmaniasis (Kinetoplastida:

- Trypanosomatidae) en la región Neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1237–1245. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.20150>
- Moo Llanes, D. A. (2016). Nicho ecológico actual y futuro de la Leishmaniasis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en la región Neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1237–1245. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.20150>
- Morain, S. A., & Budge, A. M. (2012). *Environmental Tracking for Public Health Surveillance*. CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com.gt/books?id=D9DKBQAAQBAJ>
- Muscarella, R., Galante, P. J., Soley-Guardia, M., Boria, R. A., Kass, J. M., Uriarte, M., & Anderson, R. P. (2014). ENMeval: An R package for conducting spatially independent evaluations and estimating optimal model complexity for Maxent ecological niche models. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(11), 1198–1205. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12261>
- Naiff, R. D., Freitas, R. A., Naiff, M. F., Arias, J. R., Barret, T. V., Momen, H., ... Grimaldi Júnior, G. (1991). Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(3), 317–321. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000300006>
- Nascimento, P. R. P. do, Martins, D. R. A., Monteiro, G. R. G., Queiroz, P. V., Freire-Neto, F. P., Queiroz, J. W., ... Jeronimo, S. M. B. (2013). Association of Pro-Inflammatory Cytokines and Iron Regulatory Protein 2 (IRP2) with *Leishmania* Burden in Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073873>
- Nemati, S., Fazaeli, A., Hajjaran, H., Khamesipour, A., Anbaran, M. F., Bozorgomid, A., & Zarei, F. (2017). Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of the Iranian *Leishmania* Parasites Based on HSP70 Gene PCR-RFLP and Sequence Analysis. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(4), 367–374. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.4.367>
- Nieto, P., Malone, J. B., & Bavia, M. E. (2006). Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis. *Geospatial Health*, 1(1), 115. <https://doi.org/10.4081/gh.2006.286>
- Oghumu, S., Natarajan, G., & Satoskar, A. R. (2015). Pathogenesis of Leishmaniasis in Humans. In *Human Emerging and Re-emerging Infections* (Vol. I, pp. 337–348). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch18>
- Okwor, I., & Uzonna, J. (2016). Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), 489–493. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>
- Oliveira, F. S., Pirmez, C., Pires, M. Q., Brazil, R. P., & Pacheco, R. S. (2005). PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 129(3–4), 219–227. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2005.01.005>
- PAHO/WHO. (2017). *Plan of Action To Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas*. <https://doi.org/10.5584/jiomics.v4i1.156>
- Palatnik-de-sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health : The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis, 1–10.

- Parvizi, P., Moradi, G., Akbari, G., Farahmand, M., Ready, P. D., Piazak, N., ... Amirkhani, A. (2008). PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitology Research*, *103*(6), 1273–1278. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1124-z>
- Peterson, A. T. (2007). Ecological niche modelling and understanding the geography of disease transmission. *Veterinaria Italiana*, *43*(3), 393–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20422515>
- Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., ... Hay, S. I. (2014). Global distribution maps of the leishmaniasis. *ELife*, *3*, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.02851>
- Pigott, D. M., Golding, N., Messina, J. P., Battle, K. E., Duda, K. A., Balard, Y., ... Hay, S. I. (2014). Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960-2012. *Scientific Data*, *1*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.36>
- Purse, B. V., Masante, D., Golding, N., Pigott, D., Day, J. C., Ibañez-Bernal, S., ... Jones, L. (2017). How will climate change pathways and mitigation options alter incidence of vector-borne diseases? A framework for leishmaniasis in South and Meso-America. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183583>
- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., & Requena, J. M. (1997). Analysis of Post-transcriptional Regulation Operating on Transcription Products of the Tandemly Linked *Leishmania infantum* hsp70 Genes. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(7), 4493–4499. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.7.4493>
- Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, *136*(14), 1915. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Raghavan, R. K., Barker, S. C., Cobos, M. E., Barker, D., Teo, E. J. M., Foley, D. H., ... Peterson, A. T. (2019). Potential Spatial Distribution of the Newly Introduced Long-horned Tick, *Haemaphysalis longicornis* in North America. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37205-2>
- Raghavan, Ram K, Peterson, A. T., Cobos, M. E., Ganta, R., & Foley, D. (2019). Current and Future Distribution of the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) in North America. *PloS One*, *14*(1), e0209082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209082>
- Rahinatu, L., Madaki, M. A., Lawan, S. U., Muaz, A. S., & Momo, M. (2018). *Neglected Tropical Diseases*. Geneva: World Health Organization.
- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
- Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(1), 21–25. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
- Reyes, A., & Arrivillaga, J. (2009). Mammalia fauna associated to foci of neotropical leishmaniasis: Situation in Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, *49*(1), 35–52.
- Rivero Rodríguez, M. E., Rodríguez Jiménez, J. L., Pérez-Doria, A. J., & Bejarano Martínez, E. E. (2018).



- Aislamiento de *Leishmania infantum* a partir de *Canis familiaris* en área urbana del Caribe colombiano. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(3), 923. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i3.13708>
- Roberts, D. R., Bahn, V., Ciuti, S., Boyce, M. S., Elith, J., Guillera-Arroita, G., ... Dormann, C. F. (2017). Cross-validation strategies for data with temporal, spatial, hierarchical, or phylogenetic structure. *Ecography*, 40(8), 913–929. <https://doi.org/10.1111/ecog.02881>
- Rodríguez-Rojas, J. J., Rodríguez-Moreno, Á., Berzunza-Cruz, M., Gutiérrez-Granados, G., Becker, I., Sánchez-Cordero, V., ... Rebollar-Téllez, E. A. (2017). Ecology of phlebotomine sandflies and putative reservoir hosts of leishmaniasis in a border area in Northeastern Mexico: Implications for the risk of transmission of *Leishmania mexicana* in Mexico and the USA. *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017034>
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- Rossi, E., Rinaldi, L., Musella, V., Veneziano, V., Carbone, S., Gradoni, L., ... Maroli, M. (2007). Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospatial Health*, 1(2), 191. <https://doi.org/10.4081/gh.2007.267>
- Rosypal, A. C., Alexander, A., Byrd, D., Weaver, M., Stewart, R., Gerhold, R., ... Dubey, J. P. (2013). Survey of Antibodies To *Leishmania* Spp. in Wild Canids From Pennsylvania and Tennessee. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(4), 1131–1133. <https://doi.org/10.1638/2013-0151r.1>
- Rosypal, A. C., Tidwell, R. R., & Lindsay, D. S. (2007). Prevalence of Antibodies to *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in Wild Canids From South Carolina. *Journal of Parasitology*, 93(4), 955–957. <https://doi.org/10.1645/ge-1057r.1>
- Rosypal, A. C., Tripp, S., Lewis, S., Francis, J., Stoskopf, M. K., Larsen, R. S., & Lindsay, D. S. (2010). Survey of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in Gray and Red Fox Populations From North Carolina and Virginia. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1230–1231. <https://doi.org/10.1645/ge-2600.1>
- Rotureau, B. (2006). Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 81–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407350>
- Rowton, E., de Mata, M., Rizzo, N., Navin, T., & Porter, C. (1991). Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parassitologia*, 33 Suppl(March 1919), 501–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1841251>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-García, A. (2017). DnaSP6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 3299–3302.
- Ruiz-Piña, H. A., & Cruz-Reyes, A. (2002). The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), 613–620. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500003>

- Ruiz, C. (2018). *Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método PCR-RFLP/hsp70*. Universidad del Valle de Guatemala.
- Ryan, J. R., Mbui, J., Rashid, J. R., Wasunna, M. K., Kirigi, G., Magiri, C., ... Chan, A. S. T. (2006). Spatial clustering and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in two endemic villages, Baringo District, Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(2), 308–317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474089>
- Ryan, P. R., Arana, B. A., Ryan, J. R., Wirtz, R. A., Wortmann, G. W., & Rizzo, N. R. (2003). The domestic dog, a potential reservoir for Leishmania in the Peten region of Guatemala. *Veterinary Parasitology*, 115(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00158-4)
- Salahi-Moghaddam, A., Mohebbali, M., Moshfae, A., Habibi, M., & Zarei, Z. (2010). Ecological study and risk mapping of visceral leishmaniasis in an endemic area of Iran based on a geographical information systems approach. *Geospatial Health*, 5(1), 71. <https://doi.org/10.4081/gh.2010.188>
- Sales, K. G. da S., Costa, P. L., de Moraes, R. C. S., Otranto, D., Brandão-Filho, S. P., Cavalcanti, M. de P., & Dantas-Torres, F. (2015). Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites & Vectors*, 8(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3>
- Samy, A. M., Annajar, B. B., Dokhan, M. R., Boussaa, S., & Peterson, A. T. (2016). Coarse-resolution Ecology of Etiological Agent, Vector, and Reservoirs of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Libya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004381>
- Satoskar, A., & Durvasula, R. (2013). *Pathogenesis of leishmaniasis: New developments in research*. (A. Satoskar & R. Durvasula, Eds.), *Pathogenesis of Leishmaniasis: New Developments in Research*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9108-8>
- Satow, M. M., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Rocha, M. C., Oyafuso, L. K., Soler, R. C., Cotrim, P. C., & Lindoso, J. A. L. (2013). APPLICABILITY OF kDNA-PCR FOR ROUTINE DIAGNOSIS OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN A TERTIARY REFERENCE HOSPITAL. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(6), 393–399. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000600004>
- Savani, E. S. M. M., de Almeida, M. F., de Oliveira Camargo, M. C. G., D'Auria, S. R. N., Silva, M. M. S., de Oliveira, M. L., & Sacramento, D. (2010). Detection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Leishmania) infantumchagasi in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology*, 168(1–2), 5–10. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.10.019>
- Schönian, G., Cupolillo, E., & Mauricio, I. (2013). Molecular Evolution and Phylogeny of Leishmania. In *Drug Resistance in Leishmania Parasites* (pp. 15–44). Vienna: Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_2)
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Shapiro, J. T., da Costa Lima Junior, M. S., Dorval, M. E. C., de Oliveira França, A., Cepa Matos, M. de F., & Bordignon, M. O. (2013). First record of Leishmania braziliensis presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Tropica*, 128(1), 171–174. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2013.07.004>

- Silvestre, R., Santarém, N., Cunha, J., Cardoso, L., Nieto, J., Carrillo, E., ... Cordeiro-da-Silva, A. (2008). Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Veterinary Parasitology*, *158*(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.001>
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-singh, J., & Thomas, A. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*, *363*, 1017–1024.
- Sokolow, S. H., Nova, N., Pepin, K. M., Peel, A. J., Pulliam, J. R. C., Manlove, K., ... De Leo, G. A. (2019). Ecological interventions to prevent and manage zoonotic pathogen spillover. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *374*(1782), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0342>
- Sosa-Ochoa, W., Morales Cortedano, X., Argüello, S., Zuniga, C., Henríquez, J., Mejía, R., ... Quan, D. (2015). Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*, (February), 115–128. <https://doi.org/10.5377/rct.v0i14.1799>
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., ... Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(9), 1266–1272. <https://doi.org/10.1086/383321>
- Stark, Craig, G. (2018). Leishmaniasis. Retrieved from <https://emedicine.medscape.com/article/220298-overview>
- Stephens, C. R., González-Salazar, C., Sánchez-Cordero, V., Becker, I., Rebollar-Tellez, E., Rodríguez-Moreno, Á., ... Ramírez Martínez, M. M. (2016). Can You Judge a Disease Host by the Company It Keeps? Predicting Disease Hosts and Their Relative Importance: A Case Study for Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005004>
- Stephens, C. R., Heau, J. G., González, C., Ibarra-Cerdeña, C. N., Sánchez-Cordero, V., & González-Salazar, C. (2009). Using biotic interaction networks for prediction in biodiversity and emerging diseases. *PLoS ONE*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005725>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, *7*(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Teixeira, D. G., Monteiro, G. R. G., Martins, D. R. A., Fernandes, M. Z., Macedo-Silva, V., Ansaldi, M., ... Jeronimo, S. M. B. (2017). Comparative analyses of whole genome sequences of Leishmania infantum isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. *International Journal for Parasitology*, *47*(10–11), 655–665. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.04.004>
- Torres-guerrero, E., Quintanilla-cedillo, M. R., Ruiz-esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis : a review. *F1000 Research*, *6*(750), 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

- Townsend Peterson, A. (2014). *Mapping Disease Transmission Risk: Enriching Models Using Biogeography and Ecology*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. Retrieved from <http://www.ghbook.ir/index.php?name=های ر سانه و ف ر هنگ>  
 ویدئو&option=com\_dbook&task=readonline&book\_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4  
 &Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Tuon, F. F., Amato Neto, V., & Sabbaga Amato, V. (2008). *Leishmania* : origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(2), 158–166.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x>
- ul Bari, A. (2006). Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 16, 156–162.
- Valderrama, A., Tavares, M. G., Dilermando, J., & Filho, A. (2014). *Phylogeography of the Lutzomyia gomezi (Diptera: Phlebotominae) on the Panama Isthmus*.
- Van der Auwera, G, Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., ... Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for Leishmania species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveillanc e : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 18(30), 20543. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543>
- Van der Auwera, Gert, Bart, A., Chicharro, C., Cortes, S., Davidsson, L., Di Muccio, T., ... Chiodini, P. L. (2016). Comparison of Leishmania typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Eurosurveillance*, 21(49), 30418. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>
- van der Auwera, Gert, & Dujardina, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van Der Auwera, Gert, Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schoñian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for leishmania species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>
- Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., Sosa-Bibiano, E. I., Rivero-Cárdenas, N. A., & Andrade-Narváez, F. J. (2009). Comparison of small mammal prevalence of Leishmania (Leishmania) mexicana in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(2), 87–94. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000200006>
- Vega, G. C., Pertierra, L. R., & Olalla-Tárraga, M. Á. (2018). Erratum: MERRAclim, a high-resolution global dataset of remotely sensed bioclimatic variables for ecological modelling. *Scientific Data*, 5, 180070. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.70>
- Verçosa, B L A, Borges, A. C. J., Mendes, F. J. M., Costa, M. L. S., Pereira, N. B., Melo, M. N., ... Vasconcelos, A. C. (2011). Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic Leishmania (Leishmania) chagasi infected dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(3), 308–317.  
<https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000300011>
- Verçosa, Bárbara Laurice Araújo, Melo, M. N., Puerto, H. L. Del, Mendonça, I. L., & Vasconcelos, A. C.

- (2012). Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of Leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. *Veterinary Parasitology*, 189(2–4), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.035>
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115–158. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05018-11>
- Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P. C., Lloyd-Smith, J. O., & Haydon, D. T. (2014). Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(5), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.03.002>
- Vivero, R. J., Torres-Gutierrez, C., Bejarano, E. E., Peña, H. C., Estrada, L. G., Florez, F., ... Muskus, C. E. (2015). Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of Leishmania transmission in Colombia. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0711-y>
- Waltari, E., Schroeder, R., McDonald, K., Anderson, R. P., & Carnaval, A. (2014). Bioclimatic variables derived from remote sensing: Assessment and application for species distribution modelling. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(10), 1033–1042. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12264>
- Wijerathna, T., Gunathilaka, N., Gunawardana, K., & Rodrigo, W. (2017). Potential Challenges of Controlling Leishmaniasis in Sri Lanka at a Disease Outbreak. *BioMed Research International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/6931497>
- Woolhouse, M. E. J., Taylor, L. H., & Haydon, D. T. (2001). Population Biology of Multihost Pathogens. *Science*, 292(5519), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1059026>
- Zamora-Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Villagrán-Herrera, M. E., Sánchez-Moreno, M., Concha-Valdez, F. G., Jones, R. W., ... Camacho-Macías, B. (2016). Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 5, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.08.005>
- Zeledón, R., McPherson, B., & Ponce, C. (1977). Isolation of Leishmania Braziliensis from a Wild Rodent in Costa Rica \*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(5), 1044–1045. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.1044>
- Zhang, C. Y., Lu, X. J., Du, X. Q., Jian, J., Shu, L., & Ma, Y. (2013). Phylogenetic and Evolutionary Analysis of Chinese Leishmania Isolates Based on Multilocus Sequence Typing. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063124>

## XI. ANEXOS

ANEXO 1: Potenciales reservorios que dieron una amplificación positiva para el gen *hsp70*.

<b>Id. Lab</b>	<b>Id. Muestra</b>	<b>Id. Consenso</b>	<b>Especie</b>	<b>Departamento</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Fecha</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Seguridad</b>
M18	M04-02	1	<i>Didelphis virginiana</i>	Izabal	15.7615	-88.53523	3/18/2009	BIOPSIA	Sí
M19	M04-04	2	<i>D. virginiana</i>	Izabal	15.7615	-88.53523	3/18/2009	BIOPSIA	Sí
M24	M05-03	3	<i>Philander opossum</i>	Izabal	15.7615	-88.53523	3/19/2009	BIOPSIA	Sí
M26	M06-01	4	<i>Oryzomys couesi</i>	Izabal	15.7615	-88.53523	3/20/2009	BIOPSIA	Sí
M29	M07-02	5	<i>P. opossum</i>	Santa Rosa (SR)	-	-	4/23/2009	BIOPSIA	Sí
M35	M07-08	7	<i>D. marsupialis</i>	SR	-	-	4/23/2009	BIOPSIA	Sí
M37	M07-010	8	<i>D. marsupialis</i>	SR	-	-	4/23/2009	BIOPSIA	Sí
M40	M08-03	9	<i>D. marsupialis</i>	SR	-	-	4/24/2009	BIOPSIA	Sí
M46	M11-01	10	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	Jutiapa	-	-	5/14/2009	BIOPSIA	Sí
M79	M18-05	11	No identificado	SR	-	-	1/14/2010	BIOPSIA	Sí
M81	M19-01	12	<i>P. opossum</i>	SR	-	-	1/15/2010	BIOPSIA	Sí
M98	M20-10	13	SPA	Jutiapa	14.20225	-90.01909	2/24/2010	BIOPSIA	Sí
M101	M20-13	14	SPA	Jutiapa	14.20225	-90.01909	2/24/2010	BIOPSIA	Sí
M103	M21-02	15	SPA	Jutiapa	14.20225	-90.01909	2/25/2010	BIOPSIA	Sí
M250	LG-018/BB-43-018	N/A	<i>Artibeus lituratus</i>	Petén	14.20225	-90.01909	1/20/2015	BIOPSIA	No
M263	LG-031/BB-44-008	N/A	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Petén	17.24715	-90.29171	1/28/2015	BIOPSIA	No
M266	LG-034/BB-44-011	N/A	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Petén	17.24715	-90.29171	1/31/2015	BIOPSIA	No

<b>Id. Lab</b>	<b>Id. Muestra</b>	<b>Id. Consenso</b>	<b>Especie</b>	<b>Departamento</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Fecha</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Secuencia</b>
M267	LG-035/BB-44-012	N/A	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Petén	17.24715	90.29171	2/1/2015	BIOPSIA	No
B-09	UT07SV-09	6	<i>Didelphis virginiana</i>	Petén	-	-	9/13/2017	Sangre	Sí

ANEXO 2

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

Visualización gráfica generada por: <http://sourceforge.net/projects/boxshade/>

```

                Consenso 1          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 10         1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 12         1 -
ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 13         1 -
ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 14         1 -
ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 15         1 -----
GCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 2          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 3          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 4          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 5          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 6          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 7          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                Consenso 8          1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                EF108422.1 Tryp      1
GACGGCGGCCGATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                EU599091.1 Leis      1
GACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                EU599094.1 Leis      1
GACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                FR715987.1 Leis      1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GA-1174              1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GA-973                1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GE-1166              1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GE-118                1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GE-1273              1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT
                GE-162                1
```



AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-189	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-2447	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-258	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-2706	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-2732	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-280	1
AACAGCGGCGGCCATCTCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-290	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-295	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-306	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-367	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-422	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-454	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GE-649	1
AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
	GU071178.1 Leis	1
AACAGCGTGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT		
GU071183.1 Leis	1	-----
		GACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT

Consenso 1	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 10	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 12	60
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 13	60
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 14	60
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 15	54
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 2	61
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 3	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 4	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 5	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 6	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 7	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
Consenso 8	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
EF108422.1 Tryp	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGACGTCACCCTGCTGACGATCGACGGCGG	
EU599091.1 Leis	61
GCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGG	
EU599094.1 Leis	61
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
FR715987.1 Leis	61
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GA-1174	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GA-973	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-1166	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-118	61
GTTTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-1273	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-162	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-189	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GE-2447	61
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	

	GE-258	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-2706	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-2732	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-280	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-290	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-295	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-306	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-367	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-422	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-454	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GE-649	61
	GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
	GU071178.1 Leis	61
	GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG	
GU071183.1_Leis	33	GCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCT-
		CTGACGATCGACGGCGG

Consenso 1	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 10	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 12	120
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 13	120
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 14	120
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 15	114
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 2	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 3	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 4	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 5	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 6	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 7	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
Consenso 8	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
EF108422.1 Tryp	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
EU599091.1 Leis	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
EU599094.1 Leis	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
FR715987.1 Leis	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GA-1174	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GA-973	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-1166	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-118	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-1273	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-162	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-189	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-2447	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	

GE-258	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-2706	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-2732	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACCGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-280	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-290	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-295	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-306	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-367	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-422	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-454	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GE-649	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GU071178.1 Leis	121
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	
GU071183.1 Leis	92
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA	

Consenso 1	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 10	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 12	180
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 13	180
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 14	180
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 15	174
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 2	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 3	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 4	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 5	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 6	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 7	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
Consenso 8	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
EF108422.1 Tryp	181
CCGCCTCGTGGCGCACTTCACGCAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
EU599091.1 Leis	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
EU599094.1 Leis	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
FR715987.1 Leis	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GA-1174	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GA-973	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-1166	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-118	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-1273	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-162	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-189	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-2447	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	

GE-258	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-2706	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-2732	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGGACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-280	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-290	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-295	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-306	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-367	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-422	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-454	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GE-649	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GU071178.1 Leis	181
CCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	
GU071183.1 Leis	152
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC	

Consenso 1	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 10	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 12	240
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 13	240
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 14	240
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 15	234
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 2	241
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 3	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 4	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 5	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 6	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 7	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
Consenso 8	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
EF108422.1 Tryp	241
GACGAGCCACCGCGCGCTCGCCGCCTCCGCACCGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
EU599091.1 Leis	241
GTCGAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGTACGCT	
EU599094.1 Leis	241
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
FR715987.1 Leis	241
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GA-1174	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GA-973	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-1166	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-118	241
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-1273	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-162	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-189	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-2447	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	



GE-258	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-2706	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-2732	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-280	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-290	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-295	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-306	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-367	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-422	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-454	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GE-649	241
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GU071178.1 Leis	241
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	
GU071183.1 Leis	212
GTCGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT	

Consenso 1	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 10	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 12	300
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 13	300
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 14	300
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 15	294
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 2	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 3	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 4	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 5	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 6	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 7	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
Consenso 8	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
EF108422.1 Tryp	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
EU599091.1 Leis	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATTAACGTTGACTTCCA	
EU599094.1 Leis	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
FR715987.1 Leis	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GA-1174	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GA-973	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-1166	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-118	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-1273	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-162	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-189	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	
GE-2447	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA	

GE-258	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-2706	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-2732	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCTGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-280	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-290	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-295	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GE-306	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA	
GE-367	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA	
GE-422	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA	
GE-454	301
GTCGTCCGCGACGCACGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA	
GE-649	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA	
GU071178.1 Leis	301
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	
GU071183.1 Leis	272
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA	

Consenso 1	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 10	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 12	360
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 13	360
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 14	360
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 15	354
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 2	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 3	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 4	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 5	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 6	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 7	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
Consenso 8	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
EF108422.1 Tryp	361
GTCGACCATCACCCGTGCCCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
EU599091.1 Leis	361
GGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
EU599094.1 Leis	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
FR715987.1 Leis	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GA-1174	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GA-973	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-1166	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-118	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-1273	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-162	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-189	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-2447	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	

GE-258	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-2706	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-2732	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-280	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-290	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-295	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-306	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-367	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-422	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-454	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GE-649	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GU071178.1 Leis	361
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	
GU071183.1 Leis	332
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT	

Consenso 1	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 10	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 12	420
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 13	420
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 14	420
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 15	414
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 2	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 3	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 4	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 5	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 6	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 7	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
Consenso 8	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
EF108422.1 Tryp	421
GCAGCCGGTGGAGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
EU599091.1 Leis	421
TCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
EU599094.1 Leis	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
FR715987.1 Leis	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GA-1174	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GA-973	421
GCAACCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-1166	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-118	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-1273	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-162	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-189	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	
GE-2447	421
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT	

GE-258

421 GCAGCCGGTGGAGC

-----

GE-2706 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-2732 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-280 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-290 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-295 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-306 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-367 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-422 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-454 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GE-649 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GU071178.1 Leis 421

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GU071183.1 Leis 392

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

Consenso_1	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_10	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_12	480	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_13	480	GGT-----
Consenso_14	480	GGTGCTGGTGGGCGG
Consenso_15	474	GGTGCTG-----
Consenso_2	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_3	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_4	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_5	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_6	481	GGTGCTGGTGG-----
Consenso_7	481	GGTGCTGGTGGGCGG
Consenso_8	481	GGTGCTGGTGG-----
EF108422.1_Tryp	481	GGTGCTCGTTG-----
EU599091.1_Leis	481	GGTGCTGGTGGG---
EU599094.1_Leis	481	GGTGCTGGTGG-----
FR715987.1_Leis	481	GGTGCTGGTGG-----
GA-1174	481	GGTGC-----
GA-973	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-1166	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-118	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-1273	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-162	481	GGTGC-----
GE-189	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-2447	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-258		-----
GE-2706	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-2732		-----
GE-280	481	GGTGC-----
GE-290	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-295	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-306	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-367	481	GGTGCTGGT-----
GE-422	481	GGTGC-----
GE-454	481	GGTGCTGGTGG-----
GE-649	481	GGTGCTGGTGG-----
GU071178.1_Leis	481	GGTGCTGGTGG-----
GU071183.1_Leis	452	GGTGCTGGTGG-----



ANEXO 3: Análisis de diversidad genética para secuencias de *L. naiiffi*/ *L. braziliensis* y *L. guyanensis*/ *L. panamensis* de hospederos humanos y mamíferos generado con el programa DnaSP (6.12.03).

Secuencias		n	S	Hap	Hd±sd		π
Especies de parásito	Hospedero						
<i>L. naiiffi</i> / <i>L. braziliensis</i>	Humano	18	12	12	0.921569	0.002602	0.005374
<i>L. naiiffi</i> / <i>L. braziliensis</i>	Mamífero	12	8	4	0.681818	0.01039	0.003484

n=número de secuencias, S=sitios polimórficos, Hap= Número de haplotipos, Hd±sd= diversidad de haplotipos, π=diversidad de nucleótidos

ANEXO 4. Lista de secuencias utilizadas para generar árboles filogenéticos (cada consenso corresponde a una muestra de acuerdo a los códigos en la tabla del Anexo 1).

#Consenso\_14

-ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGGGCGG

#Consenso\_13

-ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGT-----

#Consenso\_12

-ACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT

GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_10

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_15

-----GCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTG-----

#Consenso\_2

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_6

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_5

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA

CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_4

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_3

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_7

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGGGCGG

#Consenso\_8

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GU071178.1\_Leishmania\_guyanensis\_strain\_MHOM/BR/2002/RBO01\_70\_kDa\_heat\_shock\_protein\_(hsp70)\_gene\_partial\_cds

AACAGCGTCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTG----

#FR715987.1\_Leishmania\_braziliensis\_partial\_hsp70\_gene\_for\_heat-

shock\_protein\_70\_strain\_MHOM/PE/01/PER006/1

AACAGCGGCGCCATCGCATACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTG----

#EU599094.1\_Leishmania\_panamensis\_strain\_MHOM/PA/71/LS94\_heat\_shock\_protein\_70\_gene\_partial\_cds

GACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTG----

#GU071183.1\_Leishmania\_naiffi\_strain\_MDAS/BR/1979/M5533\_70\_kDa\_heat\_shock\_protein-like\_(hsp70)\_gene\_partial\_sequence

-----GACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCT-CTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTTCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTG----

#EU599091.1\_Leishmania\_mexicana\_strain\_MNYC/BZ/62/M379\_heat\_shock\_protein\_70\_gene\_partial\_c  
ds

GACGGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGCGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTCGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGC  
GTCGAGCCACCGCTCGCTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCCAAGCGTACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGATAACGTTGACTTCCA  
GGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACGAT  
TCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCAAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG---

Secuencias de la tesis de Ruiz (2018).

#GA-973

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAACCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-189\_

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-1166\_

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-118\_

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT

GTTTCATCTTCGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-162

AACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGGCGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGC-----

#GA-1174

AACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGC-----

#GE-422\_

AACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGC-----

#GE-649\_

AACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT

GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-295

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-306

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCACACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-367

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCACACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGT-----

#GE-290

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-2706

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG

CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTG---

#GE-280

AACAGCGGCGGCCATCTCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGC-----

#GE-258

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGC-----  
-----

#GE-2732

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACGCGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGGACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGTGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
-----

#GE-1273

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCACCACAAT



GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-454

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCACGAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#GE-2447

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#Consenso\_1

AACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAA  
CCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTC  
GACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCT  
GTCGTCCGCGACGCAGGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTTCGACTTCCA  
GGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAT  
GCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGT  
GGTGCTGGTGG----

#EF108422.1\_Trypanosoma\_rangeli\_isolate\_H14\_70\_kDa\_heat\_shock\_protein\_(hsp70)\_gene\_complete\_c  
ds

GACGGCCCGCCATTGCGTACGGGCTGGACAAGGTGGAGGAAGGCAGGGAGCGCCACGT  
GCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGACGTCACCCTGCTGACGATCGACGGCGG  
CATCTTTGAGGTGAAGGGCGACGAACGGCGACACGCACCTGGGCGGCGAGGACTTCGACAA  
CCGCCTCGTGGCGCACTTCACGACGAGTTCAAGCGGAAGAACCAGGGGCAAGGACATGAC  
GACGAGCCAGCGGGCGCTCCGCCGCTCCGCACCGCGTGCGAGCGCGCAAGCGGACGCT  
GTCGTCCGCGGCGCAGGGCGACGATTGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTGGACTTCCA  
GTCGACCATACCCGCTGCCGCTTCGAGGAGCTCTGCGGCGACCTTTCGCGGCACGCT  
GCAGCCGGTGGAGCGTGCTGCAGGACGCCAAGATGGACAAGCGCGCCGTGCACGACGT  
GGTGCTCGTTG----

Anexo 5 Controles positivos de *Leishmania* spp. utilizados para las pruebas moleculares

**Concentración de los controles de Leishmania**

(Obtenidas de cultivos de parásitos de *Leishmania* proporcionados por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas,

CIDEIM – Cali, Colombia – (Agosto 2017)

<b>Especie</b>		<b>ng/ul</b>
<i>L. mexicana</i>	Bel21	38,43
<i>L. panamensis</i>	LS94	136,44
<i>L. guyanensis</i>	M4147	65,08
<i>L. braziliensis</i>	M2903	71,91

Anexo 6: Principales sitios polimórficos de las secuencias de *hsp70* obtenidas a partir de aislados provenientes de hospederos mamíferos.

<b>Id. Secuenciación</b>	<b>Id. Muestra</b>	<b>DEL-8 y 9</b>	<b>INS-14</b>	<b>Sust-16</b>	<b>DEL-17</b>	<b>Sust-71</b>	<b>Sust-77</b>	<b>Sust-98</b>	<b>Sust-208</b>	<b>Sust-249</b>	<b>Sust-263</b>	<b>Sust-272</b>	<b>INS-485</b>
<b>1</b>	M04-02	N	Y	A	Y	G	T	C	G	A	A	T	N
<b>2</b>	M04-04	N	N	C	N	C	C	T	C	T	G	C	Y
<b>3</b>	M05-03	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>4</b>	M06-01	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>5</b>	M07-02	N	Y	A	Y	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>7</b>	M07-08	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>8</b>	M07-010	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>9</b>	M08-03												
<b>10</b>	M11-01	N	Y	A	Y	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>11</b>	M18-05												
<b>12</b>	M19-01	N	N	C	N	C	C	C	G	T	G	C	Y
<b>13</b>	M20-10	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>14</b>	M20-13	N	N	C	N	G	T	T	G	A	A	T	N
<b>15</b>	M21-02	Y	N	C	N	G	T	T	C	A	A	T	N
<b>6</b>	UT07S V-09	N	Y	A	Y	G	T	T	G	A	A	T	N

Del: Delección, Ins: Inserción, Sust: Sustitución

Anexo 7: Árbol filogenético basado en inferencia Bayesiana construido para las secuencias de *hsp70* obtenidas de aislados de *Leishmania* sp. que provienen de 36 muestras humanas y 12 de mamíferos.



Anexo 8: Evaluación de 24 distintos modelos (se muestran los primeros 10 según AICc) de sustitución de nucleótidos para el método de reconstrucción de árboles filogenéticos “Maximum Likelihood” con base en el Criterio Bayesiano de Información (BIC), el Criterio de Información de Akaike corregido (AICc) y la probabilidad máxima (lnL) para las 55 secuencias de nucleótidos para *hsp70* provenientes de *Leishmania* spp. correspondiente a referencias, hospederos humanos y hospederos mamíferos.

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Gamma	R
<b>GTR+G</b>	82	2720.955787	2095.244249	-965.177	n/a	0.368672157
<b>GTR+G+I</b>	83	2730.62179	2097.290527	-965.190	0.215107519	0.6220351
<b>T92+G</b>	76	2679.240291	2099.252643	-973.244	n/a	0.37606402
<b>GTR+I</b>	79	2702.368378	2099.517597	-970.346	n/a	0.351214996
<b>TN93+G</b>	77	2687.763248	2100.154292	-972.685	0.608464965	200
<b>T92+G+I</b>	76	2680.191117	2100.20347	-973.720	0.412345679	n/a
<b>HKY+G</b>	79	2703.502637	2100.651857	-970.913	0.412345679	n/a
<b>T92+I</b>	80	2711.155277	2100.68398	-969.919	7.53626E-06	0.351485936
<b>TN93+G+I</b>	82	2727.050618	2101.33908	-968.225	0.412345679	n/a

Abreviaciones(inglés): GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor./div>, R: transversion/transition bias, Se excluyen agujeros en las secuencias.

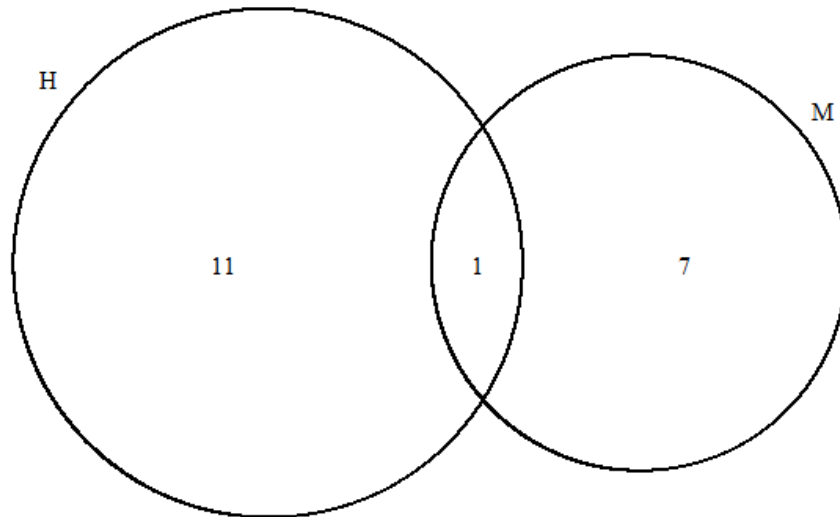
Anexo 9: Sitios polimórficos que definen la variación intraspecífica del gen *hsp70* de *Leishmania* sp. según su respectiva especie y hospedero para las 54 secuencias de nucleótidos obtenido de aislados a partir de muestras humanas (Ruiz, 2018) y muestras de mamíferos.

Especie de <i>Leishmania</i> sp.	Clase de hospedero	Sitios polimórficos (# sitios/nucleótidos totales)	Posiciones de sitios polimórficos <sup>a</sup>
<i>Leishmania naiffi/braziliensis</i>	Humano	12/512	20, 86, 159, 228, 323, 343, 410, 424, 434, 16, 326, 360
	Mamífero	8/512	16, 71, 77, 98, 208, 249, 263 y 272
<i>Leishmania guyanensis/panamensis</i>	Humano	NA <sup>b</sup>	NA <sup>c</sup>
	Mamífero	NA <sup>b</sup>	NA <sup>c</sup>

**a**= Definida con base en alineamiento de secuencias (ver Anexo 4).

**b**= Únicamente hay una secuencia asignada a este grupo.

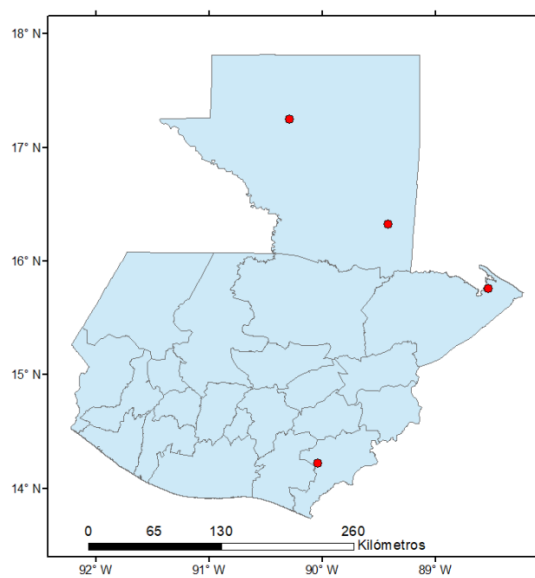
Anexo 10: Diagrama de Venn para la cantidad de posiciones de sitios polimórficos en común para distintos conjuntos (ver Anexo 9) de 54 secuencias *hsp70* obtenidas de aislados a partir de muestras humanas (Ruiz, 2018) y muestras de mamíferos.



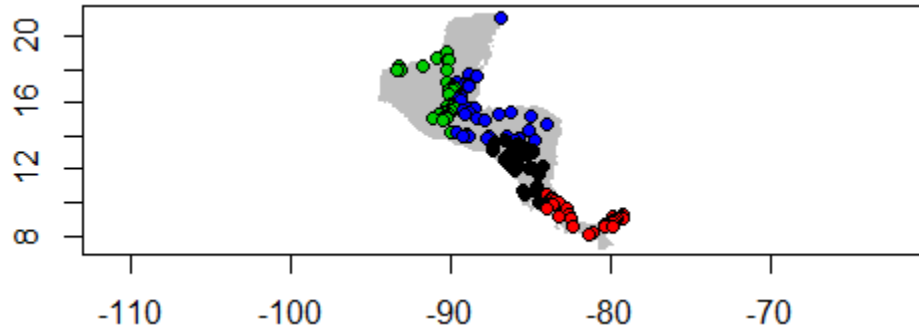
**H**= *Leishmania naiffi/braziliensis* en hospedero humano

**M**= *Leishmania naiffi/braziliensis* en hospedero mamífero

Anexo 11: Coordenadas geográficas para las ocurrencias de mamíferos infectados con parásitos *Leishmania* sp. para Guatemala según análisis moleculares descritos previamente.



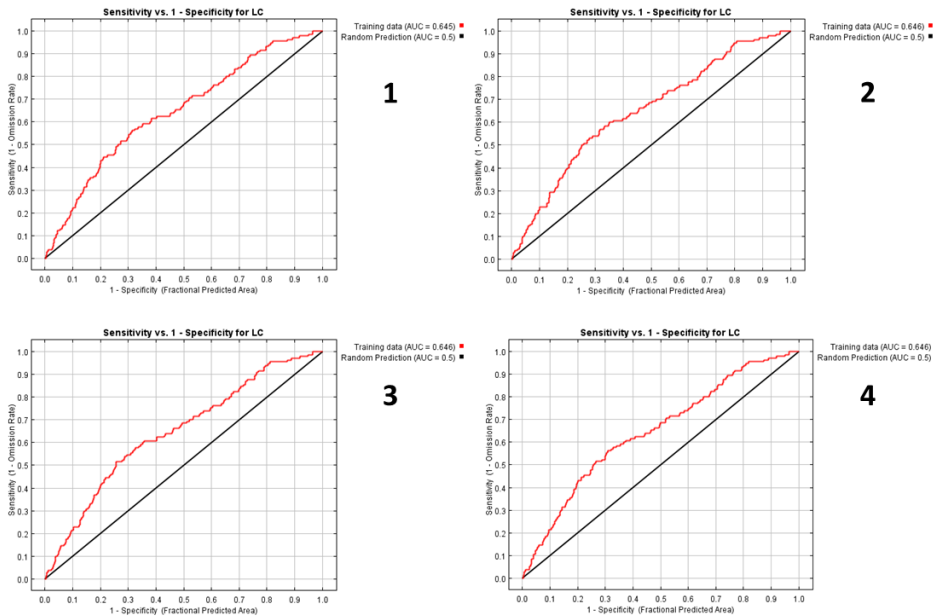
Anexo 12: Partición de ocurrencias de leishmaniasis cutánea para Centroamérica usando el método de bloques.



Bloque 1 -> Negro; Bloque 2: Rojo; Bloque 3: Verde; Bloque 4: Azul

Nota: Los bloques 2 y 4 se seleccionaron como entrenamiento, mientras los 1 y 3 se utilizaron para evaluar a los modelos.

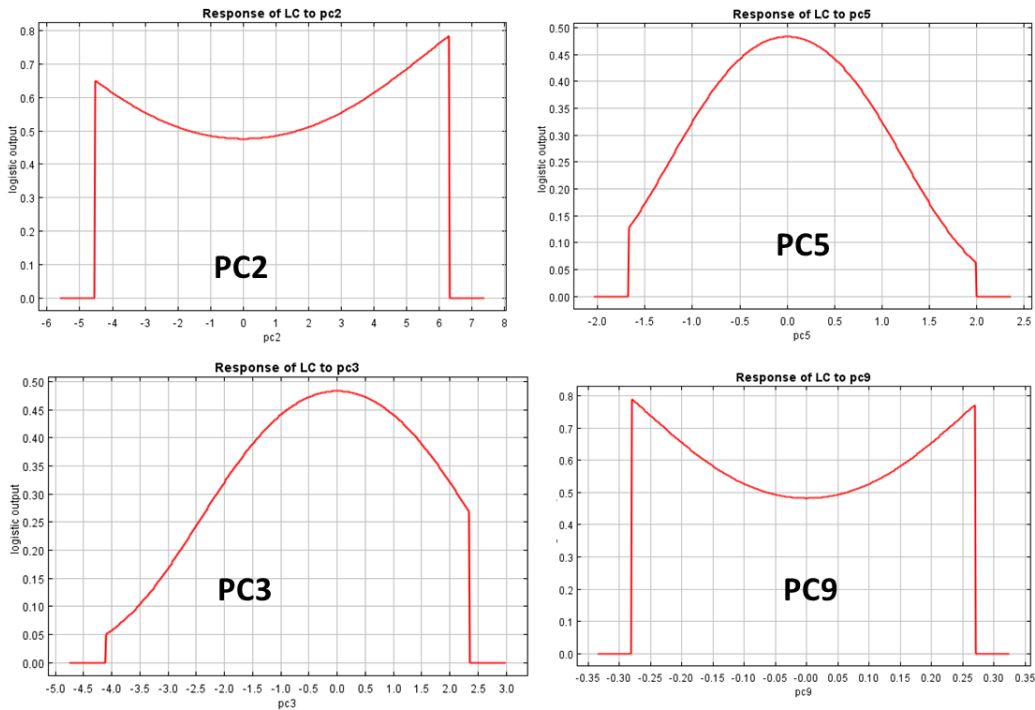
Anexo 13: Curvas Operador-Receptor (ROC) para los cuatro modelos de nicho ecológico para leishmaniasis cutánea en la región Centroamericana finales seleccionados.



Anexo 14: Resultados de análisis AUC ROC parcial para modelos de nicho ecológico para leishmaniasis cutánea en la región Centroamericana finales utilizando *nichetoolbox* (<http://shiny.conabio.gob.mx:3838/nichetoolb2/>) con 500 iteraciones y un muestreo del 50% de las ocurrencias.

Modelo	pAUC promedio (E=0.05)	Cociente pAUC promedio	Valor-p
1	0.629	1.26 ±0.06	<0.001
2	0.633	1.27 ±0.06	<0.001
3	0.628	1.26 ±0.06	<0.001
4	0.628	1.26 ±0.06	<0.001

Anexo 15: Contribución de los distintos componentes principales al modelo de nicho ecológico para leishmaniasis cutánea en la región Centroamericana (modelo 1) y curvas de respuesta para los cuatro componentes principales de mayor contribución.





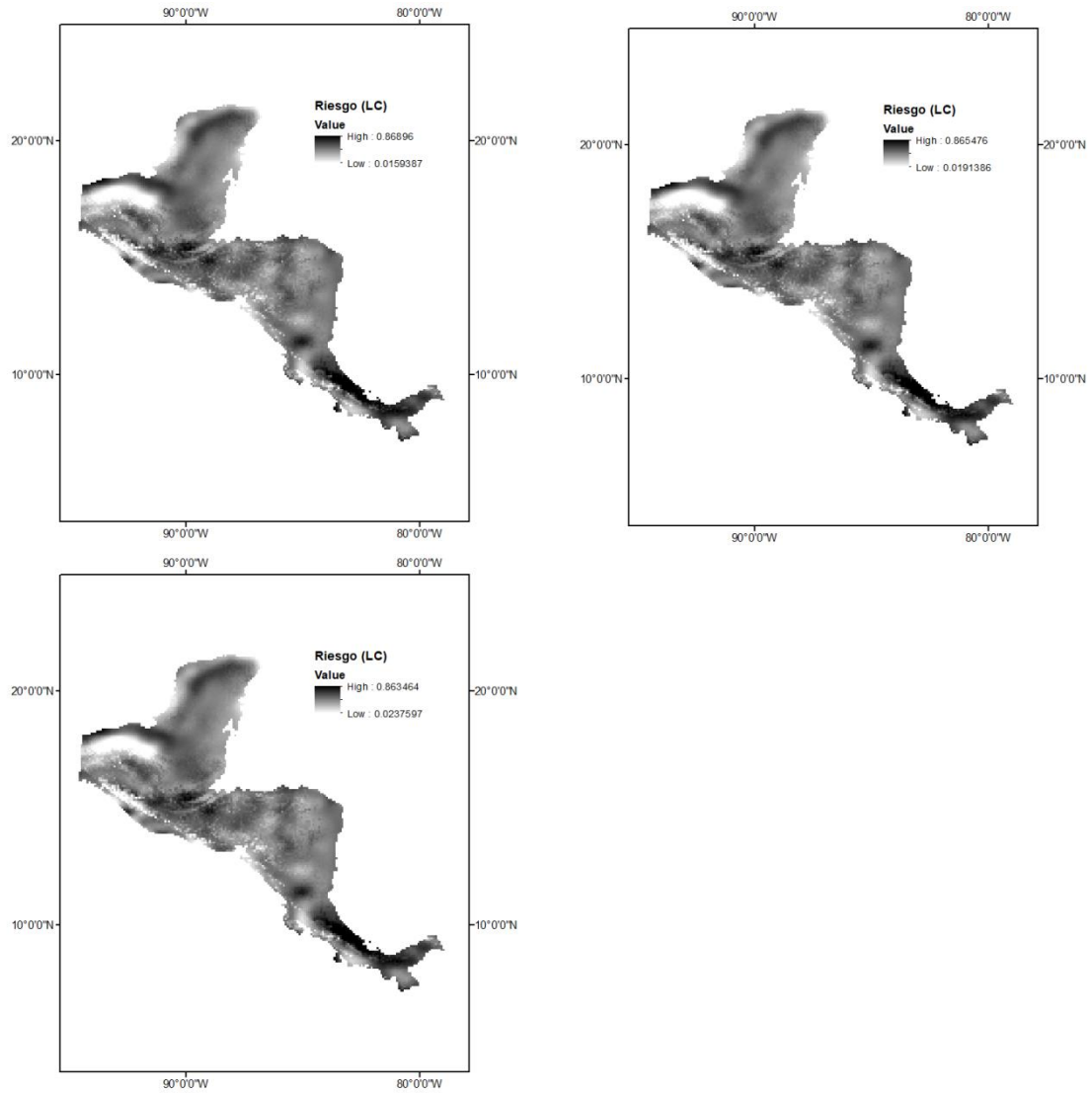
Variable predictiva	Contribución
PC2	34.3
PC5	28.7
PC3	14.7
PC9	14.4
PC8	3.5
PC7	2.6
PC1	1.6
PC6	.2
PC4	0

Anexo 16: Factores de carga para los cuatro componentes principales de mayor contribución a la calibración del modelo nicho ecológico número 1 final.

Variable original	PC2	PC5	PC3	PC9
bio1	-0.19998	-0.05942	-0.34102	-0.19752
bio10	-0.39039	-0.53082	0.164076	0.026991
bio11	-0.13737	-0.15311	0.250005	0.217895
bio12	0.238842	0.371911	0.098404	-0.05256
bio13	-0.25705	0.220666	-0.15839	0.437129
bio14	-0.37488	0.317278	0.190521	0.111468
bio15	-0.38051	0.323147	-0.25435	0.105395
bio16	0.081278	-0.05601	-0.28608	0.541935
bio17	-0.34728	0.284613	0.033286	-0.3422
bio2	-0.28079	0.087023	-0.28776	-0.11343
bio4	-0.07593	-0.11444	-0.40789	-0.21804
bio5	0.078971	0.129781	0.151838	-0.39965
bio6	-0.15361	-0.1657	0.241114	0.136814
bio7	0.250758	0.359166	0.090518	0.212003
elev	0.1787	-0.04552	-0.31025	-0.02811
slope	0.209361	-0.13776	-0.37517	0.004396

Variables originales con mayor contribución relativa resaltadas.

Anexo 17: Mapas de riesgo de leishmaniasis cutánea continuos para los modelos de nicho ecológico 2, 3 y 4 en la región de Centroamérica (de izquierda a derecha).



Anexo 18: Umbrales logísticos para los cuatro modelos de nicho ecológico para la región de Centroamérica seleccionados.

Modelo	Presencia Mínima de los puntos del entrenamiento	Presencia de entrenamiento percentil 5	Presencia de entrenamiento percentil 10
1	0.216	0.381	0.397
2	0.196	0.374	0.379
3	0.202	0.376	0.388
4	0.209	0.379	0.393

Anexo 19: Modelos de nicho ecológico para *Leishmania* spp. calibrados según su tasa de omisión y valor de AICc.

