



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de fin de Carrera titulado:

Diseño de primers dirigidos a regiones del gen CYT - B para el estudio e identificación de *Leishmania* spp.

Realizado por:

GÓMEZ DE LA ROSA MATHÍAS ANDRÉS

Director del proyecto:

PHD. JOSE RUBEN RAMIREZ IGLESIAS

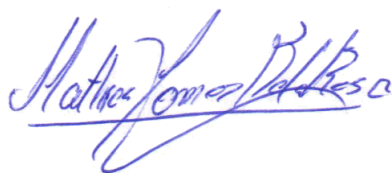
Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

QUITO, 9 DE JULIO del 2025

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **GÓMEZ DE LA ROSA MATHÍAS ANDRÉS** ecuatoriano/a, con Cédula de ciudadanía N° **1725946337**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento. A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, reading "Mathias Gomez de la Rosa". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

GÓMEZ DE LA ROSA MATHÍAS ANDRÉS

C.I.: 1725946337

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

LOS PROFESORES INFORMANTES:

Juan Carlos Navarro Castro

Andrés Herrera Yela

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.

Juan Carlos Navarro

Andrés Herrera

QUITO, 9 DE JULIO del 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

A handwritten signature in blue ink, reading "Mathías Andrés Gómez de la Rosa". The signature is written in a cursive style and is underlined.

GÓMEZ DE LA ROSA MATHÍAS ANDRÉS

C.I.: 1725946337

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi mismo, el no haberme rendido ante las circunstancias. A pesar de los problemas que atravesé durante la realización de mi tesis , siempre me mantuve firme en terminar este proyecto

Segundo, quiero agradecer a mi familia, en especial a mi padre, que siempre estaba detrás mío, motivándome a terminar este proyecto de investigación. Ahora me percató que siempre fue él quien siempre veló por mi y sobretodo por que acabara mi carrera universitaria.

Tercero, a mi madre, quien me apoyó desde el día uno hasta el final de mi carrera. Dandome los recursos y herramientas necesarias para ser un excelente ser humano y estudiante

Cuarto, deseo agradecer a cada uno de mis amigos que estuvieron a mi lado mientras realizaba mi proyecto de tesis, escribir cada uno de los nombres no abarcaría en este agradecimiento pero a cada uno de ellos agradezco un montón

Quinto, quiero agradecer a la música de mis artistas favoritos como Alvaro Díaz, Mora y Nskq que me motivaron en mis momentos más fuertes.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo en especial a mi mamá, papá y hermana ya que son los pilares fundamentales de mi vida

Resumen

La leishmaniasis, causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por flebótomos, se manifiesta con formas cutánea, mucocutánea y visceral, con alta morbilidad y mortalidad en áreas endémicas. La detección molecular precisa de especies de *Leishmania* resulta compleja debido a la gran diversidad genética y a la inespecificidad de cebadores convencionales, especialmente en regiones con múltiples hospedadores reservorios y alta endemicidad como Ecuador. Por ello el objetivo de este trabajo fue diseñar primers dirigidos a la región del gen citocromo b (CYT-B) de *Leishmania* spp. mediante herramientas bioinformáticas. Se obtuvieron 35 secuencias de CYT-B de 10 especies de *Leishmania* (*L. equatorensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. infantum*) desde GenBank, filtradas por longitud (500–1100 pb), adecuadas para secuenciación Sanger. Las secuencias se alinearon con Clustal Omega usando parámetros predeterminados. Se identificaron regiones conservadas y espacios con variabilidad, cubiertos mediante el uso de bases degeneradas. Mediante revisión manual de alineamientos, se propusieron regiones de unión y se calcularon parámetros fisicoquímicos usando el servidor OligoCalc. De las 35 secuencias, la mayoría (82%) se agruparon como Neotrópico, 11% como Viejo Mundo y el resto dentro de “*Leishmania*” según origen geográfico, reflejando concordancia con estudios previos en Ecuador. Se obtuvieron dos sets principales: F1 (20 pb, 36 degenerancias) con R1 (19 pb, 55 degenerancias), y F2 (23 pb, 36 degenerancias) con R2 (20 pb, 40 degenerancias). Los rangos de T_m estimados fueron aproximadamente 33–54 °C. Los T_m bajos podrían comprometer la especificidad y eficiencia de amplificación, incrementando riesgo de amplificadores inespecíficos o baja eficiencia

de secuenciación. La inclusión de elevados números de degenerancias amplía cobertura de especies, pero disminuye especificidad y puede inducir sesgos cuantitativos. Los cebadores diseñados mediante alineamiento de 35 secuencias de CYT-B permiten la detección amplia de *Leishmania* spp. en Ecuador, pero presentan valores de Tm y alta degeneración que pueden reducir especificidad y eficiencia. Se recomienda validar in vitro la funcionalidad de estos cebadores y considerar ampliaciones de alineamiento con más especies para optimizar futuros sets. Asimismo, explorar marcadores complementarios con menor degeneración puede mejorar precisión en estudios de diagnóstico molecular.

Palabras clave: *Leishmania*, Primers , Citocromo B, PCR.

Abstract

Leishmaniasis, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sandflies, manifests in cutaneous, mucocutaneous, and visceral forms, with high morbidity and mortality in endemic areas. Accurate molecular detection of *Leishmania* species is complex due to the high genetic diversity and the non-specificity of conventional primers, especially in regions with multiple reservoir hosts and high endemicity such as Ecuador. Therefore, the objective of this work was to design primers targeting the cytochrome b (CYT-B) gene region of *Leishmania* spp. using bioinformatics tools. Thirty-five CYT-B sequences from 10 *Leishmania* species (*L. equatorensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, and *L. infantum*) were obtained from GenBank and filtered by length (500–1100 bp) suitable for Sanger sequencing. Sequences were aligned with Clustal Omega using default parameters. Conserved regions and gaps in variability were identified and filled by using degenerate bases. By manual review of alignments, junctional regions were proposed, and physicochemical parameters were calculated using the OligoCalc server. Of the 35 sequences, the majority (82%) were grouped as Neotropical, 11% as Old World, and the remainder within “*Leishmania*” according to geographic origin, reflecting concordance with previous studies in Ecuador. Two main sets were obtained: F1 (20 bp, 36 degeneracies) with R1 (19 bp, 55 degeneracies), and F2 (23 bp, 36 degeneracies) with R2 (20 bp, 40 degeneracies). The estimated T_m ranges were approximately 33–54 °C. Low T_m could compromise amplification specificity and efficiency, increasing the risk of nonspecific amplifications or low sequencing efficiency. The inclusion of high numbers of degeneracies expands species coverage, but decreases specificity and can induce quantitative bias. Primers designed by alignment of 35 CYT-B sequences allow broad detection of *Leishmania* spp. in Ecuador, but their T_m values and high degeneracy can reduce

specificity and efficiency. It is recommended to validate the functionality of these primers in vitro and consider alignment extensions with more species to optimize future sets. Likewise, exploring complementary markers with less degeneration can improve the accuracy of molecular diagnostic studies.

Keywords: *Leishmania* , primers, cytochrome B, PCR.

Introducción

Leishmania spp. es un conjunto de parásitos protozoarios, causantes de la Leishmaniasis, enfermedad transmitida por la hembra flebotomía o “mosca de la arena”. En la mayoría de los casos, la Leishmaniasis se presenta como una infección asintomática, pero en otros, los pacientes pueden desarrollar síntomas, entre los que destacan tres tipos de lesiones: cutáneas, viscerales y mucocutáneas. Esta enfermedad afecta tanto a humanos como a animales, provocando altas tasas de mortalidad (Farshchi et al., 2023; Peixoto et al., 2024; Durán-Galea et al., 2024; Pala et al., 2024).

Los síntomas dependen del tipo de Leishmaniasis. La Leishmaniasis visceral muestra daños en órganos y tejidos hematopoyéticos (bazo, médula ósea, ganglios linfáticos e hígado). La Leishmaniasis cutánea llega a producir úlceras en distintas zonas del cuerpo, lo que resulta en inflamaciones secundarias acompañada de agentes microbianos. La Leishmaniasis mucocutánea se presenta meses o años después de haber cicatrizado y afecta al tracto nasal y su mucosa. También se producen costras serohemáticas, rinorrea mucosanguinolenta, deformando la punta de la nariz (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

En general se pueden observar úlceras cutáneas auto rehabilitadoras, mal funcionamiento del sistema inmune y mutilaciones mucocutáneas. Este patógeno tiene la capacidad de ocultarse en los neutrófilos y macrófagos, lo cual permite evadir la respuesta inmune del hospedador, generando que las enzimas encargadas de su eliminación no las puedan destruir. En consecuencia, se suprimen las funciones de los macrófagos, debilitando el sistema inmune e induciendo apoptosis celular. Estos mecanismos de evasión vienen a partir de la interacción agente-patógeno para la supervivencia del mismo parásito y se dan gracias a citocinas no protectoras relacionadas con Th2, IL-4, IL-10, IL-13 Y TGF- β . Una vez detectada la enfermedad, puede mantenerse dentro del cuerpo,

aunque haya existido tratamiento médico y es gracias a la inmunosupresión que vive el paciente (Mehri et al., 2020; Silva et al., 2021; Valigurová & Rohoušová, 2023; Durán-Galea et al., 2024; Avendaño-Rangel et al., 2024).

La *Leishmania* spp. se puede identificar durante sus tres fases morfológicas, a través de los vectores que transportan al patógeno. La mosca de la arena es el vector principal y lo traslada a vertebrados como perros y gatos, que acaban transmitiendo a los humanos. Sus tres fases son:

- 1) *Promastigote procíclico*: se da cuando el parásito se está desarrollando dentro del vector como el flebótomo (Mule et al., 2024).
- 2) *Promastigote metacíclico*: consiste en la etapa de transmisión del parásito hacia el huésped (Mule et al., 2024).
- 3) *Amastigote*: A través de una forma intracelular se da una transición morfológica, las cuales se ajustan a la fagocitosis de los macrófagos (Mule et al., 2024).

Anteriormente, la forma de detectar las especies de *Leishmania* spp. se basaba en el uso de características extrínsecas, como la geografía, características clínicas o biológicas. En la actualidad, para detectar la presencia de *Leishmania* spp. se requiere el uso de PCR y qPCR. Estas herramientas son indispensables al momento de analizar una muestra biológica debido a su especificidad y esto se debe gracias a los marcadores moleculares como el gen citocromo-B (CYT - B) que pertenece a uno de los 3 sectores que conforman el ADN mitocondrial. El gen CYT-B es conocido por codificar una proteína que pertenece al complejo del sistema de fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria, además de ser un gen muy usado en la identificación de especies y con un índice alto de evolución (Chena et al., 2013; Farag et al., 2020; Ibrahim et al., 2023; Kumar et al., 2024; Huang et al., 2024; Abdullah et al., 2024; Serem et al., 2024; Da Silva et al., 2024).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró un listado de enfermedades tropicales desatendidas (ETD) donde se incluye la Leishmaniasis y sus variantes. A nivel mundial, esta enfermedad ha provocado más de 1,5 millones de casos al año y actualmente no existe ninguna vacuna en el mercado para la Leishmaniasis, por lo cual se debe considerar a la *Leishmania* spp. como una amenaza a la salud humana y global (Gerasimov et al., 2023; De Oliveira et al., 2023; Kobialka et al., 2024; Gritti et al., 2023; Rezaei et al., 2024).

Por ejemplo, en Europa la *Leishmania infantum* fue hallada en felinos, lo cual induce úlceras que lastimaban al animal en cuestión. Para detectar este parásito, se realizaron PCR en muestras de sangre con EDTA. También se pudieron hallar distintas especies de *Leishmania* spp. en el continente sudamericano. En Brasil se ha podido evidenciar estudios en gatos y perros domésticos por ser hospedadores reservorios crípticos de *Leishmania* spp. El proceso de identificación consistió en una prueba de anticuerpos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para análisis serológicos. También se han detectado un estimado de 100 000 casos de Leishmaniasis visceral en territorio brasileño, gracias a los índices altos de pobreza, desnutrición y la mala higiene de las personas (Tarannum et al., 2023; Hartmann et al., 2023; Schäfer et al., 2023; De Freitas et al., 2024).

La enfermedad tiene la potencialidad de ser mortal. Esto provocó que en Brasil 250 pacientes fallecieran a causa de la Leishmaniasis, debido a que a inicio de los años 2000, se empezó a propagar la enfermedad en pueblos pequeños y zonas rurales a través de la transmisión zoonótica, lo cual provocó que la propagación se extendiera a zonas urbanas como ciudades grandes con el paso del tiempo, aumentando el número, de casos por los sectores norte, centro-oeste y el sur-este del país (Chicharro et al., 2023; Gonçalves et al., 2023).

Dentro del territorio ecuatoriano algunas especies de *Leishmania* spp. fueron descubiertas, desencadenando la enfermedad dentro de la población. Estas fueron halladas en la región amazónica, la cordillera de los Andes y sobre todo en ciudades de Costa-Sierra como Pedro Vicente Maldonado, San Miguel de los Bancos y Puerto Quito. Estas zonas presentan un índice alto de endemidad del protozooario y gracias a la afluencia de la gente, sirvieron como focos activos para la propagación de la enfermedad. También la provincia de Manabí fue declarada como zona de transmisión y de alto índice epidemiológico, tanto que en el 2014 se detectaron 21.305 casos de Leishmaniasis (Hashiguchi et al., 2020; Duque et al., 2020)

Al existir una gran variedad de especies de *Leishmania* spp. a nivel mundial y en el país, la detección de este tipo de parásito se complica al no existir primers con un elevado nivel de especificidad para el género estudiado, por lo cual las investigaciones se complican al punto de no poder identificar este patógeno con precisión mediante el uso de técnicas moleculares o el uso de métodos convencionales (Liang et al., 2023; Usman et al., 2023).

Dentro del Ecuador las investigaciones de *Leishmania* spp. se han visto afectadas por la inespecificidad de primers en muestras extraídas de la costa-sierra, por lo cual desarrollar primers con secuencias específicas de *Leishmania* spp. con la ayuda del gen citocromo B (CYT - B) facilita la identificación de las especies en cuestión y permitiría obtener la información filogenética del parásito, permitiendo el diagnóstico temprano de la enfermedad y tratamiento específico contra esta misma (Duque et al., 2020; Ibrahim et al., 2023; Abdullah et al., 2024). Por eso el objetivo de este trabajo de investigación fue diseñar primers dirigidos a regiones de CYT - B de *Leishmania* spp. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

Materiales y métodos

1) Búsqueda y recuperación de secuencias:

Para la obtención de las secuencias de *Leishmania* spp. se usó la herramienta de la National Library of Medicine (NCBI) de GenBank (*GenBank Overview*, 2024). Se buscaron secuencias en formato FASTA de las distintas especies de *Leishmania* que han sido reportadas previamente en el país. Cada secuencia de *Leishmania* spp. extraída de la base de datos del NCBI fue clasificada en una tabla según la especie y región a la cual pertenece. Se buscaron secuencias que cumplieran ciertos requisitos con el fin de obtener primers específicos a la región de citocromo B (CYT-B) de *Leishmania* spp. Los requisitos necesarios para ser incorporar las secuencias a los análisis fueron:

- a) La secuencia debe estar relacionada con el gen citocromo B (CYT-B) del tipo de especie de *Leishmania*.
- b) Tamaño de la secuencia mayor a 500 pares de bases y menor a 1100 pares de bases con el fin de poder realizar secuenciación vía Sanger.

2) Alineamiento y selección de regiones potenciales para primers:

Las secuencias clasificadas, fueron colocadas en la aplicación de Clustal Omega (Embl-Ebi, 2024), un programa bioinformático con la capacidad de realizar alineamientos múltiples de secuencias de diferentes organismos. Se seleccionaron 10 especies de *Leishmania* spp. que se han detectado dentro del territorio ecuatoriano: *L. equatorensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. infantum*. Usando las opciones predeterminadas de la página bioinformática y la opción del ADN, se cargaron las secuencias de las 10 especies de *Leishmania* spp., para realizar el alineamiento general (ver anexo 2). Una vez se obtuvieron los resultados, se diseñaron los posibles primers mediante una

revisión manual, a través de la búsqueda de pequeños segmentos nucleotídicos que cumplan las siguientes características:

- 18 a 25 pares de bases para facilitar la especificidad del proceso de unión (Benchling, 2024).
- Temperaturas de hibridación (T_m) entre los 50 °C y 60 °C con un rango máximo de diferencia entre oligos de 5 °C (Benchling, 2024).
- Los porcentajes de GC% deben rondar entre el 40% al 60% para impulsar la unión del primer (Staff & Staff, 2019)
- Evitar, en lo posible, la formación de estructuras secundarias como los bucles o hairpins (Staff & Staff, 2019).

3) Diseño de primers degenerados

Para el diseño de primers se procedió a identificar los posibles segmentos conservados para la unión de oligos, desde las distintas zonas del alineamiento múltiple. Las potenciales regiones asociadas a los sets de primers diseñados fueron analizadas en un editor de texto plano y se determinó la necesidad de usar la nomenclatura de bases degeneradas, para sustituir posiciones de nucleótidos variables. Las bases asociadas a nucleótidos degenerados fueron ubicadas dependiendo la zona y según el nucleótido requerido, tomando en cuenta las normas IUPAC y presentados en formato de tabla, con su código y descripción (Tabla 1) (Gimenez, 2015; Wei et al., 2003).

Tabla 1: Nomenclatura IUPAC de las bases degeneradas usadas dentro del alineamiento de la *Leishmania* spp. con su código y la descripción de cada una

Código	Descripción
M	A C
R	A G
W	A T
S	C G
Y	C T
K	G T
V	A C G
H	A C T
D	A G T
B	C G T
N	A C G T

Posteriormente, se usó la herramienta informática “OligoCalc: Oligonucleotide properties calculator”

(<https://www.biosyn.com/gizmo/tools/oligo/oligonucleotide%20properties%20calculator.htm>)(C

ao, 2025) como analizador de los sets de primers, con el fin de examinar los rangos de temperaturas de melting de los distintos juegos de primers obtenidos a través del alineamiento en Clustal Omega.

El uso de la herramienta OligoCalc: Oligonucleotide properties calculator permite realizar el cálculo de la temperatura de fusión, que dictamina la temperatura a la cual se exponen los primers y se hayan fusionado al 50% con el fin de formar el duplex (González et al., 2023).

Resultados

Se filtraron los resultados de la recuperación de las secuencias de *Leishmania* spp. y se obtuvieron un total de 3 grupos donde se clasificaron en: Neotrópico, Viejo mundo y *Leishmania*. Dentro de estos 3 grupos, se dividieron y ordenaron las 35 secuencias extraídas de NCBI y GenBank dentro de las 10 especies distintas de *Leishmania* spp. En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos de las 35 secuencias del gen CYT - B de las especies de *Leishmania* spp.

Tabla 2: Grupos de secuencias CYT - B de *Leishmania* spp. recuperadas de la base de datos GenBank y su número de copias respectivo.

Grupo	Especie	Número de secuencias recuperadas
Leishmania	<i>L. equatoriensis</i>	2
Neotrópico	<i>L. amazonensis</i>	4
Neotrópico	<i>L. mexicana</i>	4
Neotrópico	<i>L. tarentolae</i>	2
Neotrópico	<i>L. braziliensis</i>	4
Neotrópico	<i>L. guyanensis</i>	4
Neotrópico	<i>L. naiffi</i>	2
Neotrópico	<i>L. panamensis</i>	5
Neotrópico	<i>L. peruviana</i>	4
Viejo Mundo	<i>L. infantum</i>	4
	TOTAL	35

Los resultados del alineamiento en la herramienta bioinformática Clustal Omega se pueden observar en las figuras 1-4, en las cuales se presentan algunos espacios en blanco o ausencia de bases conservadas entre las 35 secuencias. Esto es denotado por la ausencia de asteriscos en la parte inferior del alineamiento, y en las cuales se usaron bases degeneradas. Como resultado general, se obtuvieron 2 sets, 2 primers forward y 2 primers reverse. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del alineamiento.

```

Leish. Tarentolae LC089020.1 GTATGAGCTGAGGATTTATAATATATATATTTATAGTAGTTATAGGTTTTATTGGTTAT 314
Leish. Tarentolae LC092878.1 GTATGAGCTGAGGATTTATAATATATATATTTATAGTAGTTATAGGTTTTATTGGTTAT 311
Leish. Naiffi MW117332.1 GTTTGAGTTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Naiffi AB433279.1 GTTTGAGTTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Panamensis MW117425.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT 286
Leish. Panamensis MW117424.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT 286
Leish. Panamensis MW117423.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT 286
Leish. Panamensis MW117422.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT 286
Leish. Panamensis MW117421.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Guyanensis OQ608599.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 198
Leish. Guyanensis OQ608600.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 240
Leish. Guyanensis OQ608601.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 258
Leish. Guyanensis OQ608598.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 228
Leish. Peruviana LC593674.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Braziliensis AB095966.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 358
Leish. Peruviana LC593673.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Peruviana LC593675.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Braziliensis AB434682.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 358
Leish. Peruviana AB433282.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 286
Leish. Braziliensis AB095967.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 358
Leish. Braziliensis OQ608578.1 GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 189
Leish. Equatorensis AB434687.1 GTTTGAGTAGTAGGTTTATAATATATATATTTATTGTTATTATAGGTTTTATTGGTTAT 360
Leish. Equatorensis AB434686.1 GTTTGAGTAGTAGGTTTATAATATATATATTTATTGTTATTATAGGTTTTATTGGTTAT 360
Leish. Infantum MW387249.1 GTATGGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTATAATAGGTTTTATTGGTTAT 243
Leish. Infantum EF579913.1 GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 277
Leish. Infantum LC089019.1 GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 279
Leish. Infantum KX443560.1 GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT 252
Leish. Mexicana KU680833.1 GTATGGTGGTAGGTTTTGTGATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATCGGCTAT 306
Leish. Mexicana EF579915.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTAT 277
Leish. Mexicana EU499922.1 -----GGTTTTGTTATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTAT 48
Leish. Amazonensis MF344895.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT 264
Leish. Amazonensis MF344894.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT 264
Leish. Mexicana HQ908258.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT 358
Leish. Amazonensis MF344893.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT 264
Leish. Amazonensis MF344892.1 GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT 264
** *** * ** ***** ** * ** ***** ** ***

```

TWATHGGTTTTATYGGYTAT

Figura 1: Alineamiento en Clustal Omega de las secuencias de la *Leishmania* spp. para el diseño del primer forward 1. Imagen representativa de los alineamientos generados. En color verde se resalta la región elegida para el potencial diseño de primer degenerado.

Para el diseño del 1er primer forward se examinó de manera manual una secuencia, con un total de 20 pares de bases, 36 degenerancias y un total de 4 puntos de sustitución. El primer diseñado se constituyó por las bases 5'TWATHGGTTTTATYGGYTAT3'

```

Leish. Tarentolae LC089020.1 GTTTTTCATGAAGAGTCGTGAGTAATTGTTGACACATTGAAAACATCTGATAAAAATTTTA 734
Leish. Tarentolae LC092878.1 GTTTTTCATGAAGAGTCGTGAGTAATTGTTGACACATTGAAAACATCTGATAAAAATTTTA 731
Leish. Naiffi MW117332.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Naiffi AB433279.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Panamensis MW117425.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Panamensis MW117424.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Panamensis MW117423.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Panamensis MW117422.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Panamensis MW117421.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Guyanensis OQ608599.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 618
Leish. Guyanensis OQ608600.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTYTGATAAAAATTTTA 660
Leish. Guyanensis OQ608601.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 678
Leish. Guyanensis OQ608598.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 648
Leish. Peruviana LC593674.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGGACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Braziliensis AB095966.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 778
Leish. Peruviana LC593673.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Peruviana LC593675.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Braziliensis AB434682.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 778
Leish. Peruviana AB433282.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 706
Leish. Braziliensis AB095967.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 778
Leish. Braziliensis OQ608578.1 GTTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCTGATAAAAATTTTA 609
Leish. Equatorensis AB434687.1 GTATTTTCATGAAGAATCTTGAGTTATAGTAGATACTTTAAA AACATCAGATAAAAATTTG 780
Leish. Equatorensis AB434686.1 GTATTTTCATGAAGAATCTTGAGTTATAGTAGATACTTTAAA AACATCAGATAAAAATTTG 780
Leish. Infantum MW387249.1 GTATTTTCATGAAGAGTCATGGGTAATAGTTGATACATTA AAAA CATCTGATAAAGATTCTC 663
Leish. Infantum EF579913.1 GTATTTTCATGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTA AAAA CATCTGATAAAGATTCTC 697
Leish. Infantum LC089019.1 GTATTTTCATGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTA AAAA CATCTGATAAAGATTCTC 699
Leish. Infantum KX443560.1 GTATTTTCATGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTA AAAA CATCTGATAAAGATTCTC 672
Leish. Mexicana KU680833.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGAGTTATAGTTGATACATTA AAAA CATCTGATAAAAATTTCTG 726
Leish. Mexicana EF579915.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA CCTCTGATAAAAATTTCTG 697
Leish. Mexicana EU499922.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA CCTCTGATAAAAATTTCTG 468
Leish. Amazonensis MF344895.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA GACATCTGATAAAAATTTTG 684
Leish. Amazonensis MF344894.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA GACATCTGATAAAAATTTTG 684
Leish. Mexicana HQ908258.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA CATCTGATAAAAATTTTG 778
Leish. Amazonensis MF344893.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA CATCTGATAAAAATTTTG 684
Leish. Amazonensis MF344892.1 GTTTTTCATGAAGAGTCCTGGGTTATTGTGGATACATTA AAAA CATCTGATAAAAATTTTG 684
** ***** ** ** ** **

```

TAWTGRGTDCTRAGRAGTA

Figura 2: Alineamiento en Clustal Omega de las secuencias de la *Leishmania* spp. para el diseño del primer reverse 1. Imagen representativa de los alineamientos generados. En color naranja se resalta la región elegida para el potencial diseño de primer degenerado.

Para el diseño del 1er primer reverse se observó y analizó de manera manual una secuencia de 19 pares de bases, 55 degenerancias en su composición y 5 puntos de sustituciones. La secuencia final fue 5'TAWTGRGTDCTRAGRAGTA3'.

```

Leish. Tarentolae LC089020.1 GTGTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGGTTGACTGTTTTAGTAATATTTAGCA 374
Leish. Tarentolae LC092878.1 GTGTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGGTTGACTGTTTTAGTAATATTTAGCA 371
Leish. Naiffi MW117332.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Naiffi AB433279.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Panamensis MW117425.1 GACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Panamensis MW117424.1 GACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Panamensis MW117423.1 GACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Panamensis MW117422.1 GACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Panamensis MW117421.1 GACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Guyanensis OQ608599.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 258
Leish. Guyanensis OQ608600.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 300
Leish. Guyanensis OQ608601.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 318
Leish. Guyanensis OQ608598.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 288
Leish. Peruviana LC593674.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Braziliensis AB095966.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 418
Leish. Peruviana LC593673.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Peruviana LC593675.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Braziliensis AB434682.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 418
Leish. Peruviana AB433282.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 346
Leish. Braziliensis AB095967.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 418
Leish. Braziliensis OQ608578.1 GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCT 249
Leish. Equatorensis AB434687.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCATATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 420
Leish. Equatorensis AB434686.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCATATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 42
Leish. Infantum. MW387249.1 GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGGGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTAGCA 303
Leish. Infantum. EF579913.1 GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTAGCA 337
Leish. Infantum. LC089019.1 GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTAGCA 339
Leish. Infantum. KX443560.1 GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTAGCA 312
Leish. Mexicana KU680833.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGGGGTTAAACAGTGTTCAGTAACATTTAGCA 366
Leish. Mexicana EF579915.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 337
Leish. Mexicana EU499922.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 108
Leish. Amazonensis MF344895.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 324
Leish. Amazonensis MF344894.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 324
Leish. Mexicana HQ908258.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 418
Leish. Amazonensis MF344893.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 324
Leish. Amazonensis MF344892.1 GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTAGCA 324
** * * * * *

```

CCRTGTACRATGATSTCDTATTG

Figura 3: Alineamiento en Clustal Omega de las secuencias de la *Leishmania* spp. para el primer forward 2. Imagen representativa de los alineamientos generados. En color verde se resalta la región elegida para el potencial diseño de primer degenerado

Para el diseño del 2do primer forward se examinó de manera manual un segmento de la secuencia y se halló un primer de 23 pares de bases, 36 degenerancias y 4 puntos de sustitución.

El primer es: 5'**CCRTGTACRATGATSTCDTATTG** 3'

Leish.	Tarentolae	LC089020.1	TTTTTAGCTTTTTAATATTATTTTATGTAGTATACTTTATATTCATAAAATTGATATTTT	674
Leish.	Tarentolae	LC092878.1	TTTTTAGCTTTTTAATATTATTTTATGTAGTATACTTTATATTCATAAAATTGATATTTT	671
Leish.	Naiffi	MW117332.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Naiffi	AB433279.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Panamensis	MW117425.1	TTTTTAGCGTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Panamensis	MW117424.1	TTTTTAGCGTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Panamensis	MW117423.1	TTTTTAGCGTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Panamensis	MW117422.1	TTTTTAGCGTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Panamensis	MW117421.1	TTTTTAGCGTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Guyanensis	OQ608599.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	558
Leish.	Guyanensis	OQ608600.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	600
Leish.	Guyanensis	OQ608601.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	618
Leish.	Guyanensis	OQ608598.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	588
Leish.	Peruviana	LC593674.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Braziliensis	AB095966.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	718
Leish.	Peruviana	LC593673.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Peruviana	LC593675.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Braziliensis	AB434682.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	718
Leish.	Peruviana	AB433282.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	646
Leish.	Braziliensis	AB095967.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	718
Leish.	Braziliensis	OQ608578.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAAATTGATATTTT	549
Leish.	Equatorensis	AB434687.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTGTTATGTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	720
Leish.	Equatorensis	AB434686.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTGTGTTATGTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	720
Leish.	Infantum	MW387249.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGGTATTTT	603
Leish.	Infantum	EF579913.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	637
Leish.	Infantum	LC089019.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	639
Leish.	Infantum	KX443560.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	612
Leish.	Mexicana	KU680833.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	666
Leish.	Mexicana	EF579915.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	637
Leish.	Mexicana	EU499922.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTATAAATTGATATTTT	408
Leish.	Amazonensis	MF344895.1	TTTTTAGGATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTCATTAATTGATATTTT	624
Leish.	Amazonensis	MF344894.1	TTTTTAGGATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTCATTAATTGATATTTT	624
Leish.	Mexicana	HQ908258.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTCATTAATTGATATTTT	718
Leish.	Amazonensis	MF344893.1	TTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTCATTAATTGATATTTT	624
Leish.	Amazonensis	MF344892.1	TTTTTAGGATTTTTAATATTATTTTATGTAATATATTTTATTTTCATTAATTGATATTTT	624

TGTDTTTTRTTWTADTTTTT

Figura 4: Alineamiento en Clustal Omega de las secuencias de la *Leishmania* spp. para el primer reverse 2. Imagen representativa de los alineamientos generados. En color naranja se resalta la región elegida para el potencial diseño de primer degenerado.

Para el diseño del 2do primer reverse, se marcó un pequeño segmento de la alineación y se halló un primer de 20 pares de bases, 40 degenerancias y 4 puntos de sustitución. El primer es; 5'TGTDTTTTRTTWTADTTTTT3'

Finalmente, se obtuvieron 2 sets de primers forward y reverse, con la posibilidad de combinarse entre sí para obtener en total 4 juegos distintos. Esto es posible debido a sus propiedades fisicoquímicas similares, las cuales se pueden observar en la tabla 3 como: los rangos de temperaturas de melting, el tamaño aproximado del amplicón, el número de degenerancias de cada uno de los primers, el porcentaje guanina-citosina y sobre todo la formación de hairpins. Cada uno de estos parámetros fisicoquímicos permite conocer a detalle cómo funciona cada primer al momento de realizar una amplificación del segmento del gen CYT - B de *Leishmania* spp.

Tabla 3: Sets de primers diseñados del alineamiento de las secuencias de *Leishmania*.

SET	PRIMERS (5'-->3')	Tm rango	Tamaño aproximado del amplicón	# degenerancias	%GC	Hairpins
F1 Y R1	FORWARD: TWATHGGTTTTATYGGY TAT	37,38 a 44,9 °C	500 pb	36	26,7	2
	REVERSE: TAWTGRGTDCTRAGRAG TA	33,49 a 45,6 °C				
F2 Y R2	FORWARD: CCRTGTACRATGATSTCD TATTG	47,48 a 53,4 °C	300 pb	36	40,6	6
	REVERSE: TGTDTTTTRTTWTADTTT TT	33,65 a 36,4 °C				
F1 Y R2	FORWARD: TWATHGGTTTTATYGGY TAT	37,38 a 44,9 °C	350 pb	36	26,7	2
	REVERSE: TGTDTTTTRTTWTADTTT TT	33,65 a 36,4 °C				
F2 Y R1	FORWARD: CCRTGTACRATGATSTCD TATTG	47,48 a 53,4 °C	400 pb	36	40,6	6

	REVERSE:				
	TAWTGRGTDCTRAGRAG	33,49 a			
	TA	45,6 °C	55	36	1

Discusión de Resultados

Se obtuvieron 35 secuencias del gen citocromo b (CYT - B) de 10 distintas especies de *Leishmania* spp. a través de la búsqueda y descarga desde la base de datos de GenBank, de las cuales cada especie posee entre un rango de 2 a 5 copias de secuencias del gen CYT - B, lo cual permitió clasificar las especies en tres grupos: *Leishmania*, Neotrópico y Viejo mundo a través de su denominación de origen geográfico o ubicación, donde fueron descubiertas por primera vez, como el continente Americano para el grupo “Neotrópico” y “*Leishmania*” y Europa/Asía para el “Viejo mundo” con el fin de establecer una relación en base a su origen. Según la investigación científica de (Asato et al., 2008) el autor establece que la identificación y clasificación de especies de *Leishmania* spp. a través del uso del gen citocromo b (CYT - B) permite constituir una base firme y poder relacionar cada especie o subespecie de *Leishmania* spp. para su estudio y posterior análisis filogeográfico a través de la examinación de semejanzas o diferencias entre cada especie o subespecie. Por lo cual, comparando la clasificación de especies de *Leishmania* spp. con el trabajo del autor, la clasificación de especies permite conocer de manera exacta y efectiva el tipo de parásito que se está tratando, a través de sus nexos entre especies parasitarias.

Según el autor (Hernández Aguirre, 2023), en su estudio determinó que, de un total de 96 secuencias, el 50% de las especies de su estudio de *Leishmania* spp. en el Ecuador pertenecían a la clasificación de “Neotrópico”, con lo cual existe una similitud en este estudio de que existe un mayor porcentaje de especies pertenecientes a esta clasificación, de las cuales se pudieron clasificar un total de 29 secuencias de 35 en total, representando un 82% de la clasificación “Neotrópico”, determinando que en territorio ecuatoriano abundan especies de *Leishmania* spp. pertenecientes a la clasificación “Neotrópico” y se sugiere que este tipo de especies se expanden con mayor facilidad e infectan a la población exitosamente. Adicionalmente el autor (Hernandez Aguirre, 2023) observó que el 30% de especies y sus secuencias pertenecen a la clasificación de “Viejo Mundo”, al igual que este estudio, se clasificó solamente 4 secuencias pertenecientes a este grupo, de la especie *L. infantum*, siendo solamente el 11% de las secuencias totales, teniendo en cuenta que, entre este estudio y el estudio del autor, abundan menos especies de *Leishmania* spp. de la clasificación “Viejo Mundo” en territorio ecuatoriano.

Los resultados del alineamiento de las 10 especies de *Leishmania* mostraron que, a lo largo de los segmentos de bases, existen degenerancias en distintos espacios del alineamiento, por lo cual esto dificulta tener un alineamiento 100% limpio al momento de identificar y seleccionar los primers, por lo cual se usaron bases degeneradas con el fin representar esta variabilidad. Al momento de generar primers, el número de degenerancias se encontraba en un rango de 36 a 55 y esto afecta a los resultados finales. Con base en los estudios realizados por (Muñoz Salazar, 2015), el autor en su trabajo de investigación mostró cómo hacer un alineamiento más sencillo y sobre todo con menos posibilidades de tener un error al momento de secuenciar. A partir de las muestras de 3 pacientes con posibles indicios de Leishmaniasis, el autor obtuvo las secuencias finales a partir de la extracción de una muestra de sangre y de las lesiones cutáneas de los pacientes, luego

se envió a amplificar las muestras extraídas y por último se obtuvieron los productos amplificados que codifican el gen CYT - B y unió cada uno de los productos obtenidos de la amplificación dando como resultado final las secuencias usadas para el alineamiento de *Leishmania* spp. En este caso pudo obtener un resultado más limpio, pudiendo identificar hasta en un 99% de efectividad, el tipo de *Leishmania* spp. que se hallaba dentro del paciente. A comparación de este estudio el cual el uso de las bases degeneradas se vuelve esencial para poder obtener un alineamiento sin regiones vacías. Por lo cuál, el uso de estas mismas dentro de un alineamiento suele ser una opción arriesgada al momento de realizar primers con un número elevado de secuencias, pero permite ser una herramienta al momento de identificar las especies de *Leishmania* spp. a partir del gen CYT - B si se está usando un número elevado de copias del parásito.

Por otro lado, en el estudio realizado por (Perez Mejía, 2017), el autor detectó de manera eficiente dos especies de *Leishmania*: *Leishmania* sp. y *Leishmania mexicana* a través del uso de primers ITS1 (espaciador transcripcional interno ribosomal 1) con nombres L5.8S al primer forward y LITSR al primer reverse, a través de la exploración en flebótomos hembra que habían tenido ingesta sanguínea en el momento de la extracción, a comparación de este estudio que usó el gen CYT - B para la identificación de *Leishmania* spp. usando primers con bases degeneradas. El autor enfatizó el uso de estos primers para la identificación del parásito en localidades como Progreso y Calceta, debido a que el uso de los mismos tuvo una efectividad considerable (44,4% en Progreso y un 57% en Calceta) al momento de identificar *Leishmania*, se puede considerar el uso de estos primers como una opción alterna de identificación de especies sin usar bases degeneradas dentro del alineamiento, por lo cual se evitará errores y sobre todo se podrá ser más exactos al momento de secuenciar las muestras de *Leishmania* spp de la paciente.

Se obtuvieron 2 sets de primers forwards y reverse a partir del alineamiento y se observó que los rangos de temperaturas de T_m rondan entre los 35 a 50 °C aproximadamente, siendo un valor bajo. Según el autor (Naqib et al., 2019,) el diseño de estos primers provocaría que se unieran de manera errónea o inespecífica ya que estos valores se encargan de la apertura de las hebras de ADN, lo cual puede resultar en la generación de productos secundarios no deseados. Al igual que la eficiencia se vería reducida en cierta medida, lo cual generaría que los productos finales no se secuencien de manera correcta y se desnaturalizan ante la exposición de temperaturas semejantes.

El parámetro de %GC es considerablemente bajo, rondando entre un 25% a 40%, a excepción del primer reverse 2, siendo 10%. Según el autor (Siswanto et al., 2022), tener datos muy bajos en este trabajo investigativo produciría que la estabilidad de los primers se vea comprometida, afectando la unión entre la cadena molde y el primer, adicionalmente tener un bajo número de guaninas y citosinas produciría un posible desanclaje durante la PCR.

El parámetro del # de degenerancias dentro de los primers ronda entre los 35 y 55, siendo un valor por debajo del límite. Según el autor (Gaby & Buckley, 2017) en este trabajo investigativo el tener un número de degenerancias puede abarcar un mayor número de especies para su identificación, también se pierde la propiedad de la especificidad y se puede acortar la eficiencia, también se puede generar un sesgo en el momento de la identificación, llegando a tener a tener futuros errores en el momento de la cuantificación.

Por último, se mostró la posible formación de estructuras secundarias como Hairpins, aproximadamente entre 1 a 6 estructuras secundarias. Según la información dada por el autor (Fan et al., 2018), tener hairpins en este trabajo investigativo complica el diseño de primers como tal, debido a que tener estas estructuras puede inhibir el proceso de secuenciación, evitando que exista una correcta eficiencia debido a la competitividad entre los hairpins y el primer a la secuencia

diana. Determinando que este los parámetros anteriormente mencionados no cumplen en cierta medida los requisitos necesarios para una correcta secuenciación.

En el trabajo investigativo de (Fonseca Carrera, 2019), el autor realizó pruebas de detección y diferenciación molecular para subgéneros de *Leishmania*, en este caso se hizo uso del marcador molecular “nagA”, a comparación de este estudio que se lo realizó con el gen CYT - B. En el estudio de (Fonseca Carrera, 2019), el autor obtuvo resultados positivos gracias al uso de los primers: INAGA-F537 (Forward) e INAGA-R836 (Reverse). Se mostraron los parámetros fisicoquímicos, como la temperatura de denaturación que rondaba entre los 56 °C y 57°C, una longitud de 19 a 20 pb por primer, un amplicón de aproximadamente 300 pb y la posible formación de estructuras secundarias como: homodímeros y heterodímeros. Comparando los resultados de este estudio con los del autor (Fonseca Carrera, 2019), existe una gran diferencia entre cada parámetro fisicoquímico. Se puede explicar que al realizar un alineamiento con varias secuencias de especies de *Leishmania* produjo que los primers no posean los parámetros fisicoquímicos deseados al momento de que estos sean sometidos a un proceso de secuenciación, dando como resultado un producto no 100% exacto, gracias al uso de bases degeneradas como método para rellenar las regiones en blanco. A comparación del estudio de (Fonseca Carrera, 2019) donde el autor, a través del uso del primer INAGA-F537: 3' CGTCATGACCATCTCGCCM 5' en su estructura solamente tenía en una base degenerada (M), por lo cuál, el producto final de la secuenciación sería más limpio y sobretodo con menos errores, facilitando la identificación de las especies de *Leishmania* spp. Siendo una alternativa que se puede aplicar en este trabajo investigativo gracias al uso del marcador molecular “nagA”.

Comparando los productos obtenidos en este trabajo investigativo con los del autor (Fonseca Carrera, 2019), los primers usados por el autor son menos probables de que tengan errores

por parámetros físico-químicos al momento de secuenciar gracias a que no poseen en su estructura varias bases degeneradas, a comparación de los primers diseñados en este estudio investigativo que si los poseen. Sin embargo, el diseño de primers de este estudio investigativo permite la identificación de varias especies de *Leishmania* spp. que se encuentran en el país gracias al uso del gen CYT - B como marcador molecular, a comparación de los primers usados por el autor (Fonseca Carrera, 2019 que permiten sólo identificar subgéneros específicos de *Leishmania* spp, gracias al marcador molecular “nagA” lo cual limita la investigación e identificación de estas especies.

Finalmente, desde la perspectiva del método empleado para el diseño de primers, dichos protocolo de abordaje *in silico* han sido implementado en otros trabajos con la finalidad de mejorar la detección e identificación de tripanosomátidos en el territorio ecuatoriano, como es el caso de diseño de primers dirigidos a segmentos alternativos y altamente informativos como la Fosfofructoquinasa y el gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (Mariño Suarez, 2023; Vélez Requenez, 2023). Estos procedimientos permiten abrir nuevas líneas de trabajo con la finalidad de optimizar marcadores moleculares, sondas y primers, cuyos diseños pueden mejorar gracias al constante enriquecimiento de secuencias nucleotídicas de agentes infecciosos, a nivel de fragmentos o genomas completos presentes en bases de datos de acceso abierto como GenBank y TrypDB. De igual manera, la necesidad de la actualización y mejoramientos de recursos para el diagnóstico molecular se hace evidente al considerar a Ecuador, y a sus regiones de costa y Amazonía, como ecosistemas con nichos ecológicos ideales para la proliferación de enfermedades causadas por otros hemoparásitos kinetoplastidos como *Trypanosoma* spp., entre los que destacan *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi* (De La Cadena Flores, 2021; Avila Carabajo, 2022; Maldonado et al., 2024; Guayaquil et al., 2025), lo cual resalta el requerimiento de continuar investigaciones sobre enfermedades desatendidas en el país.

Conclusiones

Tomando en cuenta que los cebadores finales para este estudio se obtuvieron a partir de un alineamiento de 35 secuencias de 10 especies distintas del parásito los resultados del diseño de primers Forward y Reverse resultantes de este estudio no son 100% confiables ya que pueden existir errores al momento de secuenciar como la desnaturalización, formación de estructuras secundarias o amplificar regiones no deseadas. Por otro lado, al haber alineado una gran cantidad de secuencias provenientes de distintas especies de *Leishmania* spp. los primers obtenidos en este estudio permiten identificar una gran variedad de este parásito en el territorio ecuatoriano, sin necesidad de contar con un primer para cada especie.

Después de la extracción, alineamiento y análisis de los primers en cuestión, se determinó que estos mismos cumplen los parámetros físico-químicos para una secuenciación mediante PCR. Los valores obtenidos son bastante positivos teniendo en cuenta que para el diseño de estos primers degenerados se usaron bases degeneradas como una alternativa para la formación de estos sets, en comparación de los valores que se podría obtener de un set de cebadores sin estas mismas bases. Lo anteriormente mencionado influye o se desvía en menor medida de los parámetros físicoquímicos básicos convencionales, tales como los rangos de temperatura, los %GC, la posible formación de estructuras secundarias como hairpins y sobre todo el rango del amplicón esperado. Esto se debe a que en este estudio, la muestra que se usó se compone de una gran variedad genética de *Leishmania* spp, lo cual provoca que se reduzca la especificidad de los primers, pero al contrario, resaltando una característica benéfica como la amplificación del rango de identificación de varias especies de *Leishmania* spp.

Se sugiere que para futuros estudios, se realicen pruebas *in vitro* para la detección de *Leishmania* spp. con los primers de esta investigación para corroborar la efectividad de estos mismos al momento de secuenciar futuras muestras, adicionalmente, para próximos trabajos se recomienda ampliar el número de especies del parásito para formar un alineamiento más grande y con ello, formar sets de primers con un mayor rango de detección y poder detectar una mayor cantidad de especies.

Lista de referencias

1. Abdullah, A., Putri, A. M. A., & Nurilmala, M. (2024). Specific Primer Design for Detection of gene Cyt b for Shark Species *Prionace glauca* and gene COI for *Carcharhinus* spp. Using Real-Time PCR Method. *Bio Web of Conferences/BIO Web of Conferences*, 92, 01008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20249201008>
2. Aguirre, F. R. (2022). Diseño de Primers para PCR. Obtenido de Diseño de Primers para PCR: <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/>
3. Andrea, G. H. P., Inés, U. S. S., & Andrés, L. R. (n.d.). Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200020
4. Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., Mimori, T., Gomez, E. A., Hashiguchi, Y., & Uezato, H. (2008). Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121(4), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.013>
5. Avendaño-Rangel, F., Agra-Duarte, G., Borba, P. B., Moitinho, V., Ávila, L., Silva, L., Viana, S. M., Sharma, R., Gannavaram, S., Nakhasi, H. L., & De Oliveira, C. I. (2024). Immunization with centrin-Deficient *Leishmania braziliensis* Does Not Protect against Homologous Challenge. *Vaccines*, 12(3), 310. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030310>
6. Avila Carabajo, M. A. (2022). DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR [Tesis de post-grado, UISEK].

<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4752/1/Avila%20Carabajo%20Mari%20Alexandra.pdf>

7. Benchling. (2024). Primer Designing. Obtenido de Benchling: https://assets.ctfassets.net/kzeezny59h5p/7poDAXRjbbGZxgfSdYUICK/233a8a01295e9fbf74281b658944df42/Benchling_eBook__Primer_Design.pdf
8. Cao, W. K. Q. (2024). OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator. <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html#helpbasic>
9. Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., & Russomando, G. (n.d.). Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282013000100007
10. Chicharro, C., Nieto, J., Migueláñez, S., García, E. B., Ortega, S., Peña, A., Rubio, J. M., & Flores-Chávez, M. (2023). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis in Spain: Development and Validation of Ready-To-Use Gel-Form Nested and Real-Time PCRs To Detect *Leishmania* spp. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03354-22>
11. Da Silva, A. R., Herrera, H. M., De Oliveira, C. E., Torres, J. M., Ferreira, A. M. R., Da Silva Leite, J., Menezes, R. C., Martinez, É. V., De Oliveira, G. M. D. S., Santos, F. M., & De Andrade, G. B. (2024). The relationships among *Leishmania infantum* and phyllostomid bats assessed by histopathological and molecular assays. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 23, 100904. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.100904>

12. De Freitas, B. R., Da Rosa, G., Roman, I. J., Gressler, L. T., Cargnelutti, J. F., Vogel, F. S. F., & Cunha, R. C. (2024). Molecular detection of DNA from *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* spp. in wild boar (*Sus scrofa*) tissues. *Veterinary Parasitology. Regional Studies and Reports*, 47, 100970. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100970>
13. De La Cadena Flores, E. J. (2021). Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador [Tesis de post-grado, UISEK]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4473/1/De%20la%20Cadena%20Flores%2c%20Esteban%20Javier>
14. De Oliveira, Á. S., Aredes-Riguetti, L. M., Pereira, B. a. S., Alves, C. R., & Souza-Silva, F. (2023). Degron Pathways and Leishmaniasis: Debating Potential Roles of *Leishmania* spp. Proteases Activity on Guiding Hosts Immune Response and Their Relevance to the Development of Vaccines. *Vaccines*, 11(6), 1015. <https://doi.org/10.3390/vaccines11061015>
15. Duque, P. L., Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Ron, L., Benítez, W., & Navarro, J. C. (2020). Spatial-Temporal Analysis of *Lutzomyia trapidoi* and *Lutzomyia reburra* (Diptera: Phlebotominae), in Rural Tourist Locations, Biosphere Reserve and Leishmaniasis Endemic Area, Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 57(6), 1905–1912. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa102>
16. Durán-Galea, Á., Cristobal-Verdejo, J. I., Barrera-Chacón, R., Macías-García, B., González-Solís, M., Nicolás-Barceló, P., García-Ibáñez, A., Ruiz-Tapia, P., & Duque, J. (2024). Clinical importance of neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and systemic immune-inflammation index in dogs with leishmaniasis. *Comparative*

Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 102148.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102148>

17. EMBL-EBI. (2024). Clustal Omega < EMBL-EBI.

<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>

18. Fan, H., Wang, J., Komiyama, M., & Liang, X. (2018). Effects of secondary structures of DNA templates on the quantification of qPCR. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(11), 2867–2874. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1498804>

19. Farshchi, F., Lopes, G. D., De Castro Côrtes, L. M., Alves, C. R., & Souza-Silva, F. (2023). Recent advances in surface plasmon resonance as a powerful approach for studying *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Talanta Open*, 8, 100266. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100266>

20. Fonseca Carrera, D. A. (2019). Identificación y diferenciación molecular por la técnica de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) múltiple de los subgéneros de *Leishmania* (*Viannia* y *Leishmania*) en el Ecuador [Tesis de pregrado, UDLA]. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/11044/1/UDLA-EC-TIB-2019-22.pdf>

21. Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2017). The use of degenerate primers in QPCR analysis of functional genes can cause dramatic quantification bias as revealed by investigation of NIFH primer performance. *Microbial Ecology*, 74(3), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>

22. GenBank Overview. (2024). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

23. Gerasimov, E. S., Novozhilova, T. S., Zimmer, S. L., & Yurchenko, V. (2023). Kinetoplast Genome of *Leishmania* spp. Is under Strong Purifying Selection. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(8), 384. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080384>

24. Giménez, C. (2015). Diseño de cebadores degenerados para la caracterización de genes en Musa.
25. González, C., González, A., & Gómez, S. (2023). PCR multiplex: práctica y aplicaciones clínicas. *Revista Bioanálisis*.
<https://www.revistabioanalisis.com/images/Rev%20133n/Nota%203.pdf>
26. Gonçalves, G. H., De Campos, M. P., Tirado, T. C., Negrão, D. D., Da Silva, G. M. P., Poleto, A. P. C. M., Hartin, T. P., Silva, J. B. A., De Melo Santos De Castilhos, M., & Figueiredo, F. B. (2023). A case of canine visceral leishmaniasis of unknown origin in Curitiba (state of Paraná, Brazil) treated successfully with miltefosine. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária/Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 32(2).
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612023026>
27. Gritti, T., Carra, E., Van Der Auwera, G., Solana, J. C., Gaspari, V., Trincone, S., Ortalli, M., Rabitti, A., Reggiani, A., Rugna, G., Varani, S., & Network, S. N. S. (2023). Molecular Typing of *Leishmania* spp. Causing Tegumentary Leishmaniasis in Northeastern Italy, 2014–2020. *Pathogens*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010019>
28. Guayaquil, G., Chávez, C., Enríquez, S., Arrivillaga-Henríquez, J., Vaca, F., Eleizalde, M. C., Mendoza, M., Pedelini, L., Martínez-Fresneda, M., Uzcanga, G. L., Benítez-Ortiz, W., Navarro, J., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2025). First report of *Trypanosoma evansi* A-type from the Ecuadorian Amazon: phylogenetic and structural analyses of the VSG RoTat1.2 fragment. *Acta Tropica*, 107719. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107719>
29. Hartmann, G., Roman, I. J., Lorenzetti, D. M., Herbichi, A. P., Mazaro, R. D., Santos, M. F., Tonin, A. A., Vogel, F. S. F., & Figuera, R. A. (2023). Anti-*Leishmania* spp. antibody

- detection in domestic cats from a visceral leishmaniasis transmission area. *Parasitology Research*, 122(11), 2631–2639. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07961-w>
30. Hashiguchi, Y., Gómez, E. A., Velez, L. N., Villegas, N. V., Kubo, M., Mimori, T., Hashiguchi, K., & Kato, H. (2020). Anthropophilic phlebotomine sand fly *Lutzomyia* species and search for the natural *Leishmania* infections in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Tropica*, 203, 105287. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105287>
31. Hernandez Aguirre, L. S. (2023). Filogenética molecular para la identificación de *Leishmania* spp, mediante el análisis de secuencias de Citocromo b (Cytb) del ADN mitocondrial. [Pregrado, UISEK]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/5143/1/Hern%C3%A1ndez%20Aguirre%20Luis%20Santiago.pdf>
32. Huang, X., Jiang, Y., & Yang, T. F. (2024). Genetic variation and phylogeographic patterns of *Harpadon nehereus* in China offshore inferred from mitochondrial cytochrome b (Cyt b) sequences: with implications for its fishery management. *Marine Biodiversity*, 54(2). <https://doi.org/10.1007/s12526-024-01411-1>
33. Ibrahim, A., Baliarti, E., Budisatria, I. G. S., Artama, W. T., Widayanti, R., Maharani, D., Tavares, L., & Margawati, E. T. (2023). Genetic diversity and relationship among Indonesian local sheep breeds on Java Island based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00491-z>
34. Kobialka, R. M., Ceruti, A., Roy, M., Roy, S., Chowdhury, R., Ghosh, P., Hossain, F., Weidmann, M., Graf, E., Alvarez, J. B., Moreno, J., Truyen, U., Mondal, D., Chatterjee,

- M., & Wahed, A. a. E. (2024). Portable smartphone-based molecular test for rapid detection of *Leishmania* spp. *Infection*. <https://doi.org/10.1007/s15010-024-02179-z>
35. Kumar, A., Negi, N. S., Yadav, N., Badola, R., Hussain, S. A., & Gupta, S. (2024). Genetic diversity, spatial connectivity, and population structure of Asian silurid catfish *Wallago attu* (Bloch and Schneider, 1801) in the Ganga River System: insights from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Biology Reports*, *51*(1). <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09323-w>
36. Liang, Q., Liang, X., Hong, D., Fang, Y., Tang, L., Mu, J., Tan, X., & Chen, F. (2023). Case report: Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of visceral leishmaniasis and its treatment evaluation. *Frontiers in Medicine*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1044043>
37. Lin, Q., Jin, S., Zong, Y., Yu, H., Zhu, Z., Liu, G., Kou, L., Wang, Y., Qiu, J., Li, J., & Gao, C. (2021). High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nature Biotechnology*, *39*, 923 - 927. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00868-w>
38. Maldonado, C., Cáceres, A., Burgos, A., Hinojosa, D., Enríquez, S., Celi-Erazo, M., Vaca, F., Ron, L., Rodríguez-Hidalgo, R., Benítez-Ortiz, W., Martínez-Fresneda, M., Eleizalde, M. C., Mendoza, M., Navarro, J. C., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2024). Seroprevalence of trypanosomosis and associated risk factors in cattle from coast and amazonian provinces of Ecuador. *Veterinary Research Communications*, *48*(3), 1891–1898. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10333-z>
39. Mariño Suarez, K. J. (2023). DISEÑO Y VALIDACIÓN in silico DE PRIMERS DIRIGIDOS CONTRA LAS REGIONES 18s Y PFK PARA EL ESTUDIO METAGENÓMICO DE *Trypanosoma* spp [Tesis de post-grado, UISEK].

[https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/5139/1/Mari%
a1rez%20Karen%20Johanna%20.pdf](https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/5139/1/Mari%c3%b1o%20Su%c3%a1rez%20Karen%20Johanna%20.pdf)

40. Mehri, P., Pashazadeh-Panahi, P., Hasanzadeh, M., & Razmi, N. (2020). An innovative genosensor for the monitoring of *Leishmania* spp sequence using binding of pDNA to cDNA based on Cit-AgNPs. *Heliyon*, 6(8), e04638. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04638>
41. Muñoz Salazar, E. B. (2015). Identificación de especies de *Leishmania* a partir de muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis [Tesis de pregrado, UDLA]. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4569/1/UDLA-EC-TIB-2015-07.pdf>
42. Mule, S. N., Saad, J. S., Sauter, I. P., Rosa-Fernandes, L., De Oliveira, G. S., Quina, D., Tano, F. T., Brandt-Almeida, D., Padrón, G., Stolf, B. S., Larsen, M. R., Cortéz, M., & Palmisano, G. (2024). The protein map of the protozoan parasite *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* during growth phase transition and temperature stress. *Journal of Proteomics*, 295, 105088. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2024.105088>
43. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Washington, D.C: OPS; 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275327340>
44. Pala, S., Martínez-Sáez, L., Llobat, L., & Marín-García, P. J. (2024). Prevalence and factors associated with *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* infections in apparently healthy horses in Eastern Spain. *Research in Veterinary Science/Research in Veterinary Science*, 171, 105236. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105236>

45. Peixoto, J. F., Gonçalves-Oliveira, L. F., Souza-Silva, F., De Castro Côrtes, L. M., Finkelstein, L. C., Dias-Lopes, G., De Carvalho Patricio, B. F., Lima, C. G. S., Rocha, H. V. A., De Carvalho Da Silva, F., Ferreira, V. F., Pereira, B. a. S., & Alves, C. R. (2024). Efficacy of the treatment using a microemulsion loaded with epoxy- α -lapachone in combination with meglumine antimoniate against murine infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 24, 100525. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100525>
46. Rezaei, Z., Tahmasebi, A., & Pourabbas, B. (2024). Using meta-analysis and machine learning to investigate the transcriptional response of immune cells to *Leishmania* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(1), e0011892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011892>
47. Schäfer, I., Schmidt, A. J., Grässer, F. A., Schieszler, A., Aupperle-Lellbach, H., Loesenbeck, G., Gentil, M., Müller, E., & Naucke, T. J. (2023). Feline leishmaniosis with focus on ocular manifestation: a case report. *Parasites & Vectors*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05741-0>
48. Serem, E. K., Mburu, D., Abdullahi, O., & Bargul, J. L. (2024). A scoping review on tsetse fly blood meal sources and its assay methods since 1956 to 2022. *Parasites & Vectors*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06114-3>
49. Silva, M. V. T., Santos, J. C. D., De Figueiredo, A. M. B., Teufel, L. U., Pereira, J. X., De Matos, G. G., Pinto, S. A., Netea, M. G., Gomes, R. S., Joosten, L. a. B., & Ribeiro-Dias, F. (2021). The role of IL-32 in Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced trained immunity in infections caused by different *Leishmania* spp. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105088. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105088>

50. Siswanto, T., Sianipar, N. F., Hendric Spits Warnars, H. L., & Prabowo, H. (2022). Algorithm model determination of DNA primer design for the success PCR process. *IJETAE*, 12(07), https://doi.org/10.46338/ijetae0722_12.
51. Staff, B. B., & Staff, B. B. (2019, September 25). PCR primer design tips. *Behind the Bench*. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
52. Tarannum, A., Rodríguez-Almonacid, C. C., Salazar-Bravo, J., & Karamysheva, Z. N. (2023). Molecular mechanisms of persistence in protozoan parasites. *Microorganisms*, 11(9), 2248. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092248>
53. Usman, M., Natala, A. J., Jatau, I. D., Ogo, N. I., Jeelani, G., Goto, Y., Nozaki, T., McKerrow, J. H., & Balogun, E. (2023). Molecular identification of phlebotomine sand flies and the harbored *Leishmania* spp. in Sokoto State, Nigeria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1219629>
54. Valigurová, A. B., & Rohoušová, I. (2023). Unrevealing the mystery of latent leishmaniasis: What cells can host *Leishmania*? *Pathogens*, 12(2), 246. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020246>
55. Vélez Requenez, M. (2023). Diseño y validación in silico de primers dirigidos contra GAPDH e ITS para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp. mediante secuenciación de lecturas largas [Tesis de maestría, UISEK]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/5140/1/V%c3%a9lez%20Requenez%20Miguel%20%c3%81ngel%20.pdf>
56. Wei, X., Kuhn, D., & Narasimhan, G. (2003). Degenerate primer design via clustering. <https://www.semanticscholar.org/paper/Degenerate-primer-design-via-clustering-Wei-Kuhn/6d623ee0b9068ac2847226d6f811261aa07bb54a#citing-papers>

Anexos

Anexo 1: Alineamiento total de las especies de *Leishmania* spp. mediante el uso de la herramienta bioinformática Clustal Omega

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

LC089020.1 -----TCACTATAGGTGTA 14
LC092878.1 -----CATTAGGTGTA 11
MW117332.1 ----- 0
AB433279.1 ----- 0
MW117425.1 ----- 0
MW117424.1 ----- 0
MW117423.1 ----- 0
MW117422.1 ----- 0
MW117421.1 ----- 0
OQ608599.1 ----- 0
OQ608600.1 ----- 0
OQ608601.1 ----- 0
OQ608598.1 ----- 0
LC593674.1 ----- 0
AB095966.1 --AAGCGGAGAGAAAAGAAAAGGCTTAACTTCAGGTTGTTTATTGCGAATTTATGGTGTA 58
LC593673.1 ----- 0
LC593675.1 ----- 0
AB434682.1 --AAGCGGAGAGAAAAGAAAAGGCTTAACTTCAGGTTGTTTATTGCGAATTTATGGTGTA 58
AB433282.1 ----- 0
AB095967.1 --AAGCGGAGAGAAAAGAAAAGGCTTAACTTCAGGTTGTTTATTGCGAATTTATGGTGTA 58
OQ608578.1 ----- 0
AB434687.1 AAGCGGAGAGGAAAGAAAAGGCTTTTAACTTCAGGTTGTTTATTAAGAGTATATGGTGTA 60
AB434686.1 AAGCGGAGAGGAAAGAAAAGGCTTTTAACTTCAGGTTGTTTATTAAGAGTATATGGTGTA 60
MW387249.1 ----- 0
EF579913.1 ----- 0
LC089019.1 ----- 0
KX443560.1 ----- 0
KU680833.1 -----GGTGTA 6
EF579915.1 ----- 0
EU499922.1 ----- 0
MF344895.1 ----- 0
MF344894.1 ----- 0
HQ908258.1 AAGCG--GAGAGGAAAGAAAAGGCTTAACTTCAGGTTGTTTATTACGAGTTTATGGTGTA 58
MF344893.1 ----- 0
MF344892.1 ----- 0

LC089020.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATTATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 74
LC092878.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATTATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 71
MW117332.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 46
AB433279.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 46
MW117425.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 46
MW117424.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 46
MW117423.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGCTTAGCATGA 46

```

MW117422.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 MW117421.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 OQ608599.1 ----- 0
 OQ608600.1 ----- 0
 OQ608601.1 -----GGTGTGTTGTTAGCATGA 18
 OQ608598.1 ----- 0
 LC593674.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATGTGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 AB095966.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 118
 LC593673.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 LC593675.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 AB434682.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 118
 AB433282.1 -----TTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 46
 AB095967.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 118
 OQ608578.1 ----- 0
 AB434687.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 120
 AB434686.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATAATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGA 120
 MW387249.1 -----TGG 3
 EF579913.1 -----TTGTATGCAGATAATATGTGGTGTGTGTTTAGCGTGG 37
 LC089019.1 -----ATTTGTATGCAGATAATATGTGGTGTGTGTTTAGCGTGG 39
 KX443560.1 -----TTGTTAGCGTGG 12
 KU680833.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATTATTTGTGGTGTATGTTTAGCATGA 66
 EF579915.1 -----TTGTATGCAAATTATTTGTGGTGTATGTTTGGCATGA 37
 EU499922.1 ----- 0
 MF344895.1 -----ATTTGTGGTGTGTGTTTAGCATGA 24
 MF344894.1 -----ATTTGTGGTGTGTGTTTAGCATGA 24
 HQ908258.1 GGTTTTAGTTAGGTTTTTTTATTTGTATGCAAATTATTTGTGGTGTGTGTTTAGCATGA 118
 MF344893.1 -----ATTTGTGGTGTGTGTTTAGCATGA 24
 MF344892.1 -----ATTTGTGGTGTGTGTTTAGCATGA 24

 LC089020.1 TTATTTTTAGTTGCTTTATTTGTACAAATTGATATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT 134
 LC092878.1 TTATTTTTAGTTGCTTTATTTGTACAAATTGATATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT 131
 MW117332.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 AB433279.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 MW117425.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 MW117424.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 MW117423.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 MW117422.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 MW117421.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 106
 OQ608599.1 -----TTTATTTTATGAGATTTT 18
 OQ608600.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 60
 OQ608601.1 CTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 78
 OQ608598.1 -----TGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTATGAGATTTT 48
 LC593674.1 TTATTCCTTACTTGGTTTATTTGTACTAATTGATGTTTTGTTTTATTTTTGTGAGATTTT 106
 AB095966.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 178
 LC593673.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 106
 LC593675.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 106
 AB434682.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 178
 AB433282.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 106
 AB095967.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATTTGTACTAATTGATATTTTGTGTTTATTTTTGTGAGATTTT 178
 OQ608578.1 -----TGAGATTTT 9
 AB434687.1 CTCTTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAACTGATATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT 180
 AB434686.1 CTCTTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAACTGATATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT 180
 MW387249.1 TTATTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAATTGGTATTTTGTGTTTATTTTTCTGGGATTTT 63

EF579913.1	TTATTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTC	97
LC089019.1	TTATTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTC	99
KX443560.1	TTATTTTTAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTC	72
KU680833.1	TTATTTTTAGTTGTTTTATATGTACTAATTGATATTATGTATTTGTTTATTGTAGATTTC	126
EF579915.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAACTGGTATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTT	97
EU499922.1	----- 0	
MF344895.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT	84
MF344894.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT	84
HQ908258.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT	178
MF344893.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT	84
MF344892.1	CTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTTGTATTATTTTTATGAGATTTT	84
LC089020.1	GATTTAGGATTTGTGATACGTAGTACACATATATGTTTTACATCTTTATTATTTTTCTT	194
LC092878.1	GATTTAGGATTTGTGATACGTAGTACACATATATGTTTTACATCTTTATTATTTTTCTT	191
MW117332.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTCTT	166
AB433279.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTCTT	166
MW117425.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
MW117424.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
MW117423.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
MW117422.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
MW117421.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
OQ608599.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	78
OQ608600.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	120
OQ608601.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	138
OQ608598.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	108
LC593674.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
AB095966.1	GATTTAGGTTTTGTTATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	238
LC593673.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
LC593675.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
AB434682.1	GATTTAGGTTTTGTTATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	238
AB433282.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	166
AB095967.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	238
OQ608578.1	GATTTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTACTATTTTTCTT	69
AB434687.1	GATTTAGGATTTGTTGTACGCAGTACACATATATGTTTTACATCATTATTATTTTTTTA	240
AB434686.1	GATTTAGGATTTGTTGTACGCAGTACACATATATGTTTTACATCATTATTATTTTTTTA	240
MW387249.1	GACTTAGGTTTTGTAATACGTAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTCCTT	123
EF579913.1	GACTTAGGTTTTGTAATACGTAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTCCTT	157
LC089019.1	GACTTAGGTTTTGTAATACGTAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTCCTT	159
KX443560.1	GACTTAGGTTTTGTAATACGTAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTCCTT	132
KU680833.1	GATTTGGGATTTGTAATACGAAGCACACATATTTGTTTTACATCGTTGTTATTTTTCTT	186
EF579915.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTTCTT	157
EU499922.1	----- 0	
MF344895.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTCCTT	144
MF344894.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTCCTT	144
HQ908258.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTCCTT	238
MF344893.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTCCTT	144
MF344892.1	GATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTTACTTCTTTATTATTTTCCTT	144
LC089020.1	CTTTATGTGCACATTTTTAAATGCATAGTATTGATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	254
LC092878.1	CTTTATGTGCACATTTTTAAATGCATAGTATTGATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	251
MW117332.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
AB433279.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
MW117425.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226

MW117424.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
MW117423.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
MW117422.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
MW117421.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
OQ608599.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	138
OQ608600.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	180
OQ608601.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	198
OQ608598.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	168
LC593674.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
AB095966.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAAAGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	298
LC593673.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
LC593675.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
AB434682.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	298
AB433282.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	226
AB095967.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	298
OQ608578.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTTA	129
AB434687.1	TTATATGTCATATATTTAAGTCTATTGTTTTAATTATATTATTTGATAGTCATATTTTA	300
AB434686.1	TTATATGTCATATATTTAAGTCTATTGTTTTAATTATATTATTTGATAGTCATATTTTA	300
MW387249.1	CTTTATGTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATATTGTTTGATACACATATTTTA	183
EF579913.1	CTTTATGTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATATTGTTTGATACACATATTTTA	217
LC089019.1	CTTTATGTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATATTGTTTGATACACATATTTTA	219
KX443560.1	CTTTATGTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATATTGTTTGATACACATATTTTA	192
KU680833.1	CTTTATGTTTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGATACACATATTTTA	246
EF579915.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTGTTAATAATTTTGTGTTGATACTCATATTTTA	217
EU499922.1	----- 0	
MF344895.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGACACTCATATTTTA	204
MF344894.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGACACTCATATTTTA	204
HQ908258.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGACACTCATATTTTA	298
MF344893.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGACACTCATATTTTA	204
MF344892.1	TTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAATTTTATTTGACACTCATATTTTA	204
LC089020.1	GTATGAGCTGTAGGATTTATAATATATATATTTTATAGTAGTTATAGGTTTTATTGGTTAT	314
LC092878.1	GTATGAGCTGTAGGATTTATAATATATATATTTTATAGTAGTTATAGGTTTTATTGGTTAT	311
MW117332.1	GTTTGAGTTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
AB433279.1	GTTTGAGTTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
MW117425.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT	286
MW117424.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT	286
MW117423.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT	286
MW117422.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGCTAT	286
MW117421.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
OQ608599.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	198
OQ608600.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	240
OQ608601.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	258
OQ608598.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	228
LC593674.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
AB095966.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	358
LC593673.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
LC593675.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
AB434682.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	358
AB433282.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	286
AB095967.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	358
OQ608578.1	GTTTGAATTATAGGTTTTATTATTTATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	189
AB434687.1	GTTTGAGTAGTAGGTTTTATAATATATATATTTTATTGTTATTATAGGTTTTATTGGTTAT	360

AB434686.1	GTTTGAGTAGTAGGGTTTATAATATATATATTTATTGTTATTATAGGTTTTATTGGTTAT	360
MW387249.1	GTATGGGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTATTAATAGGTTTTATTGGTTAT	243
EF579913.1	GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	277
LC089019.1	GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	279
KX443560.1	GTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTAT	252
KU680833.1	GTATGGGTGGTAGGTTTTGTGATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATCGGCTAT	306
EF579915.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTAT	277
EU499922.1	-----GGTTTTGTTATATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTAT	48
MF344895.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT	264
MF344894.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT	264
HQ908258.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT	358
MF344893.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT	264
MF344892.1	GTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTTTATAGTTATAAATTGGTTTTATTGGTTAT	264

LC089020.1	GTGTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGGTTGACTGTTTTTAGTAATATTTTTAGCA	374
LC092878.1	GTGTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGGTTGACTGTTTTTAGTAATATTTTTAGCA	371
MW117332.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
AB433279.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
MW117425.1	GTACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
MW117424.1	GTACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
MW117423.1	GTACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
MW117422.1	GTACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
MW117421.1	GTACTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
OQ608599.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTCTAGCT	258
OQ608600.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTCTAGCT	300
OQ608601.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTCTAGCT	318
OQ608598.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTCTAGCT	288
LC593674.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
AB095966.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	418
LC593673.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
LC593675.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
AB434682.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	418
AB433282.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	346
AB095967.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	418
OQ608578.1	GTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTTTTAGCT	249
AB434687.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCATATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	420
AB434686.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCATATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	420
MW387249.1	GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGGGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	303
EF579913.1	GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	337
LC089019.1	GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	339
KX443560.1	GTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	312
KU680833.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCGTATTGGGGTTAACAGTGTTTCAGTAACATTTTTAGCA	366
EF579915.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	337
EU499922.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	108
MF344895.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	324
MF344894.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	324
HQ908258.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	418
MF344893.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	324
MF344892.1	GTTTTACCATGTACAATGATGTCCTATTGAGGTTAACTGTATTTAGTAATATTTTTAGCA	324
	** * *****	
LC089020.1	ACTGTGCCAGTGATCGGTACCTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATTAAT	434
LC092878.1	ACTGTGCCAGTGATCGGTACCTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATTAAT	431
MW117332.1	ACTGTACCAGTTATTGGTGTGGTTATGTTATTGGATTTGAGGAAGTGAATATATAAAT	406

AB433279.1 ACTGTACCAGTTATTGGTGTGGCTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 MW117425.1 ACTGTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 MW117424.1 ACTGTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 MW117423.1 ACTGTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 MW117422.1 ACTGTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 MW117421.1 ACTGTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 OQ608599.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 318
 OQ608600.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 360
 OQ608601.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 378
 OQ608598.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 348
 LC593674.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 AB095966.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 478
 LC593673.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 LC593675.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 AB434682.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 478
 AB433282.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 406
 AB095967.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 478
 OQ608578.1 ACTGTGCCAGTTATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAAAT 309
 AB434687.1 ACAGTCCCAGTAATTGGTACTTGATTATGTTATTGAATATGAGGTAGTGAGTACATTAAT 480
 AB434686.1 ACAGTCCCAGTAATTGGTACTTGATTATGTTATTGAATATGAGGTAGTGAGTACATTAAT 480
 MW387249.1 ACAGTCCCAGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGGATTTGGGGTAGTGAATATATTAAT 363
 EF579913.1 ACCGTCCCAGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAAT 397
 LC089019.1 ACCGTCCCAGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAAT 399
 KX443560.1 ACCGTCCCAGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAAT 372
 KU680833.1 ACTGTCCCAGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAGTATATTAAT 426
 EF579915.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 397
 EU499922.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 168
 MF344895.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 384
 MF344894.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 384
 HQ908258.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 478
 MF344893.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 384
 MF344892.1 ACAGTACCTGTTATAGGCACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAAT 384
 *** **
 LC089020.1 GACTTCACTTTACTTAAATTACACGTTTTACACGTTTTATTACCTTTTGTATTAATATTA 494
 LC092878.1 GACTTCACTTTACTTAAATTACACGTTTTACACGTTTTATTACCTTTTGTATTAATATTA 491
 MW117332.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 AB433279.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 MW117425.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 MW117424.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 MW117423.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 MW117422.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 MW117421.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 OQ608599.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 378
 OQ608600.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 420
 OQ608601.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 438
 OQ608598.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 408
 LC593674.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTGTATTAATA 466
 AB095966.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 538
 LC593673.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 LC593675.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 AB434682.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 538
 AB433282.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 466
 AB095967.1 GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA 538

OQ608578.1	GATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATTAATA	369
AB434687.1	GATTTTACTTTATTAAAATTACATGTTTTACATGTGTTATTACCATTTGTTTTAATATTA	540
AB434686.1	GATTTTACTTTATTAAAATTACATGTTTTACATGTGTTATTACCATTTGTTTTAATATTA	540
MW387249.1	GATTTTACATTATTAATAATTACATGTATTACATGTTTTATTACCATTCGTATTAATACTT	423
EF579913.1	GATTTTACATTATTAATAATTACATGTATTACATGTTTTATTACCATTCGTATTAATACTT	457
LC089019.1	GATTTTACATTATTAATAATTACATGTATTACATGTTTTATTACCATTCGTATTAATACTT	459
KX443560.1	GATTTTACATTATTAATAATTACATGTATTACATGTTTTATTACCATTCGTATTAATACTT	432
KU680833.1	GATTTTACATTGTTAAAATTACATGTGTTGCATGTGCTATTACCTTTTGTATTAATACTT	486
EF579915.1	GATTTTACACTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTACCTTTTGTATTAATATTA	457
EU499922.1	GATTTTACACTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTACCTTTTGTATTAATATTA	228
MF344895.1	GATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCCTTTTGTATTAATATTA	444
MF344894.1	GATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCCTTTTGTATTAATATTA	444
HQ908258.1	GATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCCTTTTGTATTAATATTA	538
MF344893.1	GATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCCTTTTGTATTAATATTA	444
MF344892.1	GATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCCTTTTGTATTAATATTA	444
	*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **	
LC089020.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTACTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	554
LC092878.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTACTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	551
MW117332.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
AB433279.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
MW117425.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
MW117424.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
MW117423.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
MW117422.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
MW117421.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
OQ608599.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	438
OQ608600.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	480
OQ608601.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	498
OQ608598.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	468
LC593674.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTGTGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
AB095966.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	598
LC593673.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
LC593675.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
AB434682.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	598
AB433282.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	526
AB095967.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	598
OQ608578.1	ATAATTTTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	429
AB434687.1	GTAATTATTATGCATTTATTTTGCTTGCATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	600
AB434686.1	GTAATTATTATGCATTTATTTTGCTTGCATTATTTTATGAGTTCTGATGGTTTTTGAT	600
MW387249.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTTTTTATGAGTTCAGATGGGTTTTTGAT	483
EF579913.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGGTTTTTGAT	517
LC089019.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGGTTTTTGAT	519
KX443560.1	GTAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGGTTTTTGAT	492
KU680833.1	GTAATATTTATGCATTTGTTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	546
EF579915.1	GTGATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	517
EU499922.1	GTGATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	288
MF344895.1	GTTATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	504
MF344894.1	GTTATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	504
HQ908258.1	GTTATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	598
MF344893.1	GTTATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	504
MF344892.1	GTTATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTTGAT	504
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **	
LC089020.1	AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGCTTTTGCATGTGATTTTATTTAAGAGATATG	614

LC092878.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGCTTTTGCATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 611
 MW117332.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 AB433279.1 AGATTTGCATTTTACTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 MW117425.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 MW117424.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 MW117423.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 MW117422.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 MW117421.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 OQ608599.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGACTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 498
 OQ608600.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGACTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 540
 OQ608601.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGACTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 558
 OQ608598.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGACTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 528
 LC593674.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 AB095966.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 658
 LC593673.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 LC593675.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 AB434682.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 658
 AB433282.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 586
 AB095967.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 658
 OQ608578.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAGCGGCTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATG 489
 AB434687.1 CGTTTTGCATTTTATTGTGAGCGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATCTAAGAGATATG 660
 AB434686.1 CGTTTTGCATTTTATTGTGAGCGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATCTAAGAGATATG 660
 MW387249.1 AGATTCGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTACGAGATATG 543
 EF579913.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTACGAGATATG 577
 LC089019.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTACGAGATATG 579
 KX443560.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTACGAGATATG 552
 KU680833.1 CGATTTGCATTTTATTGCGAACGTTTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTACGAGATATG 606
 EF579915.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 577
 EU499922.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 348
 MF344895.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 564
 MF344894.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 564
 HQ908258.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 658
 MF344893.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 564
 MF344892.1 AGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATG 564
 *** ***** ** *

LC089020.1 TTTTTCAGCTTTTAAATATTATTTTATGTAGTATACTTTATATTCATAAATTGATATTTT 674
 LC092878.1 TTTTTCAGCTTTTAAATATTATTTTATGTAGTATACTTTATATTCATAAATTGATATTTT 671
 MW117332.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 AB433279.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 MW117425.1 TTTTTCAGCGTTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 MW117424.1 TTTTTCAGCGTTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 MW117423.1 TTTTTCAGCGTTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 MW117422.1 TTTTTCAGCGTTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 MW117421.1 TTTTTCAGCGTTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 OQ608599.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 558
 OQ608600.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 600
 OQ608601.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 618
 OQ608598.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 588
 LC593674.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 AB095966.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 718
 LC593673.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 LC593675.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 646
 AB434682.1 TTTTTCAGCATTTTAAATATTATTTTTGTAGTGTATTTTATATTTATAAATTGATATTTT 718

** ***** ** ** ** **

LC089020.1 CCAGAGTGATTTTTCTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTCCCTGATAAAATTTACT 794
 LC092878.1 CCAGAGTGATTTTTCTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTCCCTGATAAAATTTACT 791
 MW117332.1 CCTGAATGATTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 AB433279.1 CCTGAATGATTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 MW117425.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 MW117424.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 MW117423.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 MW117422.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 MW117421.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 OQ608599.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGCTTTTTAAAAGCAGTACC----- 665
 OQ608600.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGCTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 720
 OQ608601.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGCTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 738
 OQ608598.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGCTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT- 707
 LC593674.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 AB095966.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 838
 LC593673.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 LC593675.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 AB434682.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 838
 AB433282.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 766
 AB095967.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAATTTACT 838
 OQ608578.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTT----- 632
 AB434687.1 CCAGAATGATTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTGCCTGATAAAGTTTACT 840
 AB434686.1 CCAGAATGATTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTGCCTGATAAAGTTTACT 840
 MW387249.1 CCAGAATGGTTTTTTTTATTCCTATTTGGTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAAGTTTACT 723
 EF579913.1 CCAGAATGATTTTTTTTATTCCTATTTGGTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAAGTTTACT 757
 LC089019.1 CCAGAATGATTTTTTTTATTCCTATTTGGTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAAGTTTACT 759
 KX443560.1 CCAGAATGATTTTTTTTATTCCTATTTGG----- 701
 KU680833.1 CCAGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGCTTTTTAAAAGCAGTACCAGATAAAATTTACT 786
 EF579915.1 CCAGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGCTTTTTAAAAGCAGTACCAGATAAAATTTACT 757
 EU499922.1 CCAGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGCTTTTTAAAAGC----- 509
 MF344895.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTAC----- 730
 MF344894.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTAC----- 730
 HQ908258.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGCTTTTTAAAAGCAGTACCAGATAAAATTTACT 838
 MF344893.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTAC----- 730
 MF344892.1 CCTGAATGGTTTTTTTTATTTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTAC----- 730

** ** ** ***** ** ** **

LC089020.1 GGTT----- 798
 LC092878.1 GGTTTACTATTAATGGTAATACTATTATTTTCATTATTTTTATTTATATTAATTAATGCATA 851
 MW117332.1 GGTTTATTATTAATGGTTATATTGTTATTTTCATTGTTCTTATTT----- 811
 AB433279.1 GGTTTATTATTAATGGTTATATTGTTATTTTCATTGTTCTTATTTATATTA----- 817
 MW117425.1 GGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTGTTTTTATTT----- 811
 MW117424.1 GGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTGTTTTTATTT----- 811
 MW117423.1 GGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTGTTTTTATTT----- 811
 MW117422.1 GGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTGTTTTTATTT----- 811
 MW117421.1 GGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTGTTTTTATTT----- 811
 OQ608599.1 ----- 665
 OQ608600.1 GGTTTATT----- 728
 OQ608601.1 GGTTTATTATTAATGGTTATAT----- 760
 OQ608598.1 ----- 707
 LC593674.1 GGTTTATTATTAATGGTTACATTATTATTTTCATTGTTTTTATTTATATTA----- 817
 AB095966.1 GGTTTATTATTAATGGTTATATTATTATTTTCATTGTTTTTATTTATATTAATTAATGTATA 898
 LC593673.1 GGTTTATTATTAATGGTTACATTATTATTTTCATTGTTTTTATTTATATTA----- 817

LC593675.1	GGTTTATTATTAATGGTTACATTATTATTTTCATTGTTTTATTATATTA-----	817
AB434682.1	GGTTTATTATTAATGGTTATATTATTATTTTCATTGTTTTATTATATTAATAATTGTATA	898
AB433282.1	GGTTTATTATTAATGGTTATATTATTATTTTCATTGGTTTTATTATATTA-----	817
AB095967.1	GGTTTATTATTAATGGTTATATTATTATTTTCATTGTTTTATTATATTAATAATTGTATA	898
OQ608578.1	-----	632
AB434687.1	GGATTATTATTGATGGTAATTTTATTATTTTCATTATTTTTATTATTTTAAATTGTATT	900
AB434686.1	GGATTATTATTGATGGTAATTTTATTATTTTCATTATTTTTATTATTTTAAATTGTATT	900
MW387249.1	GGTTTATTATTAATGGTTATTTTATTATTTTCGTTATTTTTGTTTATATTAATAATTGTATA	783
EF579913.1	GGTTTATTATTAATGGTTATTTTATTATTTTCGTTATTTTTGTTTATATTAATAATGCATA	817
LC089019.1	GGTTTATTATTAATGGTTATTTTATTATTTTCGTTATTTTTGTTTATATTAATAATGCATA	819
KX443560.1	-----	701
KU680833.1	GGTTTACTATTAATGGTTATTTTATTGTTTTCTTTATTTTTGTTTATATTAATAATTGTATA	846
EF579915.1	GGTTTACTATTAATGGTTATTTTATTGTTTTCTTTATTTTTGTTTATATTAATAATTGTATA	817
EU499922.1	-----	509
MF344895.1	-----	730
MF344894.1	-----	730
HQ908258.1	GGTTTATTGTTAATGGTTATTTTATTGTTTTCTTTATTTTTGTTTATATTAATAATTGTATA	898
MF344893.1	-----	730
MF344892.1	-----	730
LC089020.1	-----	798
LC092878.1	TTATGATTGTTTATTGTAGCGT-----	874
MW117332.1	-----	811
AB433279.1	-----	817
MW117425.1	-----	811
MW117424.1	-----	811
MW117423.1	-----	811
MW117422.1	-----	811
MW117421.1	-----	811
OQ608599.1	-----	665
OQ608600.1	-----	728
OQ608601.1	-----	760
OQ608598.1	-----	707
LC593674.1	-----	817
AB095966.1	TTATGATTTGTTTATTGTGCAAGTTCGTTATTATGATTTACTTATTCATTAATTTTATTT	958
LC593673.1	-----	817
LC593675.1	-----	817
AB434682.1	TTATGATTTGTTTATTGTGCAAGTTCGTTATTATGATTTACTTATTCATTAATTTTATTT	958
AB433282.1	-----	817
AB095967.1	TTATGATTTGTTTATTGTGCAAGTTCGTTATTATGATTTACTTATTCATTAATTTTATTT	958
OQ608578.1	-----	632
AB434687.1	TTATGATTTGTTTATTGTAGAAGTTCGTTATTATGATTTACATATTCATTAATACTTTTT	960
AB434686.1	TTATGATTTGTTTATTGTAGAAGTTCGTTATTATGATTTACATATTCATTAATACTTTTT	960
MW387249.1	TTATGGTTTGTATTATTGTAG-----	803
EF579913.1	TTATGATTTGTTTATTGTAGAAGTTCATTGTTGTGATTTACTTACTCATTAATTT-----	872
LC089019.1	TTATGATTTGTTTATTGTAGCGTCGTGA-----	847
KX443560.1	-----	701
KU680833.1	TTATGATTTGTATATTGTAG-----	866
EF579915.1	TTATGATTTGTATATTGTAGAAGTTCATTATTATGATTTACATATTCATTTATTT-----	872
EU499922.1	-----	509
MF344895.1	-----	730
MF344894.1	-----	730
HQ908258.1	TTATGATTTGTATATTGTAGAAGTTCATTATTATGATTCACATATTCATTTATTTTATTT	958

MF344893.1	-----	730	
MF344892.1	-----	730	
LC089020.1	-----	798	
LC092878.1	-----	874	
MW117332.1	-----	811	
AB433279.1	-----	817	
MW117425.1	-----	811	
MW117424.1	-----	811	
MW117423.1	-----	811	
MW117422.1	-----	811	
MW117421.1	-----	811	
OQ608599.1	-----	665	
OQ608600.1	-----	728	
OQ608601.1	-----	760	
OQ608598.1	-----	707	
LC593674.1	-----	817	
AB095966.1	TATAGTATATTTATGAGTGGCTTTTTAGCTTTATACGTTATATTAGCTTATCCTATTTGA		1018
LC593673.1	-----	817	
LC593675.1	-----	817	
AB434682.1	TATAGTATATTTATGAGTGGCTTTTTAGCTTTATACGTTATATTAGCTTATCCTATTTGA		1018
AB433282.1	-----	817	
AB095967.1	TATAGTATATTTATGAGTGGCTTTTTAGCTTTATACGTTATATTAGCTTATCCTATTTGA		1018
OQ608578.1	-----	632	
AB434687.1	TATAGTATCTTTATGAGTGGTTTTTTAGCTTTATATGTAATTTTAGCATATCCTATTTGA		1020
AB434686.1	TATAGTATCTTTATGAGTGGTTTTTTAGCTTTATATGTAATTTTAGCATATCCTATTTGA		1020
MW387249.1	-----	803	
EF579913.1	-----	872	
LC089019.1	-----	847	
KX443560.1	-----	701	
KU680833.1	-----	866	
EF579915.1	-----	872	
EU499922.1	-----	509	
MF344895.1	-----	730	
MF344894.1	-----	730	
HQ908258.1	TATAGTATATTTATGAGTGGTTTTTTAGCTTTGTATGTTATATTAGCATATCCTATATGA		1018
MF344893.1	-----	730	
MF344892.1	-----	730	
LC089020.1	-----	798	
LC092878.1	-----	874	
MW117332.1	-----	811	
AB433279.1	-----	817	
MW117425.1	-----	811	
MW117424.1	-----	811	
MW117423.1	-----	811	
MW117422.1	-----	811	
MW117421.1	-----	811	
OQ608599.1	-----	665	
OQ608600.1	-----	728	
OQ608601.1	-----	760	
OQ608598.1	-----	707	
LC593674.1	-----	817	

AB095966.1	ATGGAGTTACAATTTTGAGTATTAATTTTATTTATGTTAATAGTATGTAGATTAGATTAG	1078
LC593673.1	-----	817
LC593675.1	-----	817
AB434682.1	ATGGAGTTACAATTTTGAGTATTAATTTTATTTATGTTAATAGTATGTAGATTAGATTAG	1078
AB433282.1	-----	817
AB095967.1	ATGGAGTTACAATTTTGAGTATTAATTTTATTTATGTTAATAGTATGTAGATTAGATTAG	1078
OQ608578.1	-----	632
AB434687.1	ATGGAGTTGCAATTTTGAGTTTTATTGTTATTTATGTTAGTTGTGTGTAGATTAGATTAA	1080
AB434686.1	ATGGAGTTGCAATTTTGAGTTTTATTGTTATTTATGTTAGTTGTGTGTAGATTAGATTAA	1080
MW387249.1	-----	803
EF579913.1	-----	872
LC089019.1	-----	847
KX443560.1	-----	701
KU680833.1	-----	866
EF579915.1	-----	872
EU499922.1	-----	509
MF344895.1	-----	730
MF344894.1	-----	730
HQ908258.1	ATGGAATTACAATTTTGGGTTTTACTTTTATTTATGTTAGTTGTATGTAGATTAGATTAA	1078
MF344893.1	-----	730
MF344892.1	-----	730