



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM FLORIANÓPOLIS:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *Leishmania*
infantum ISOLADAS DE CASOS LOCAIS E PESQUISA
VETORIAL**

Tatiana Catecati

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Biotecnologia e Biociências
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia
Hermes Stoco
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de
Pinho

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Catecati, Tatiana
LEISHMANIOSE VISCERAL EM FLORIANÓPOLIS:
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *Leishmania*
infantum ISOLADAS DE CASOS LOCAIS E PESQUISA
VETORIAL / Tatiana Catecati ; orientadora, Patrícia
Hermes Stoco, coorientador, Luiz Carlos de Pinho,
2018.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

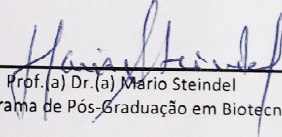
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Diagnóstico.
3. Flebotomíneos. 4. MLSA. I. Hermes Stoco, Patrícia.
II. Pinho, Luiz Carlos de. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

"Leishmaniose visceral em Florianópolis/SC: caracterização molecular das cepas de *Leishmania infantum* isoladas de casos locais e pesquisa vetorial"

Por

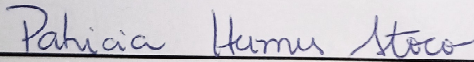
Tatiana Catecati

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (11/PPGBTC/2018) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.


Prof. (a) Dr. (a) Mário Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

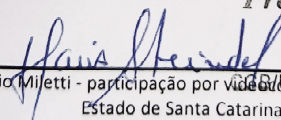
Banca examinadora:

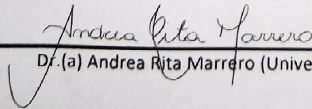


Dr. (a) Patricia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)

Prof. Dr. Mário Steindel

Coordenador do PPG
Biotecnologia e Biociências


Dr. (a) Luiz Claudio Mijetti - participação por vídeoconferência (UFSC - Florianópolis, 21/05/2015/GR
Estado de Santa Catarina)



Dr. (a) Andrea Rita Marreiro (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho, por ser totalmente fora da minha zona de conforto, foi, como no dito popular, “um passo maior do que a perna”, e só pode ser completado graças ao apoio e auxílio de diversas pessoas. Não fosse por vocês, não sei se teria conseguido finalizar este passo da minha vida.

À UFSC, ao Programa de Pós Graduação e Biotecnologia e Biociências e ao Laboratório de Protozoologia, pela infraestrutura que possibilitou a pesquisa;

À FAPESC pela bolsa de mestrado;

Um agradecimento muito especial à minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Patrícia Hermes Stoco! Muito obrigada pelo apoio, pela atenção, pelos ensinamentos e por toda a paciência. O mérito deste trabalho também é seu. Faltam palavras para o tanto que deveria agradecer. Eu nunca teria conseguido sozinha;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luiz Carlos de Pinho, agradeço pela confiança e por permitir que agregássemos uma parte importante e interessante ao trabalho. Graças a você e aos seus alunos, Renan e Lara, pudemos estudar os flebotomíneos da região;

Aos professores do laboratório Dr. Mário Steindel, Dr. Edmundo C. Grisard e Dr. Glauber Wagner: obrigada. Aprendi muito nestes três anos com todos vocês;

Aos meus colegas da Protozoologia: Dra. Milene, Abadio, Adriana, Carime, Vanessa, Caibe, Laryssa, Luíza, Natália, Thaís, Carol e Bruno (gente, se esqueci de alguém, me desculpem!), vocês foram parte da família pra mim nesses anos!;

Aos “colegas de corredor” do LVA, Laurita, Naira, Vanessa, mas em especial à minha amiga de tantos anos, a futura Dr^ª Clarissa Feltrin, pelos almoços, cafés e conversas a respeito dos sucessos, das falhas e ideias de como resolver os problemas;

O maior de todos os agradecimentos é à minha família, que foi meu suporte e minha força, meus pais Roberto e Gisela, meu irmão Tiago, minha cunhada Aline e meu namorado, Andreas (a propósito, quem mais sofreu com esse trabalho). Não seria nada sem vocês!

À todos os citados e aos que contribuíram também de forma indireta: Obrigada!

“Uma árvore que cai na floresta emite algum som se não há alguém para ouvir?”

Terry Pratchett

RESUMO

Leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas. Três formas clínicas distintas são descritas para as leishmanioses: cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave, de elevada mortalidade se não tratada, que possui a espécie *Leishmania infantum* como agente etiológico nas Américas. O vetor canônico de LV é *Lutzomyia longipalpis* e o cão doméstico é considerado o principal reservatório. Embora mais de 96% dos casos de LV nas Américas ocorram no Brasil, a região Sul era considerada uma área livre de LV até 2008. Atualmente, a LV canina (LVC) está se espalhando rapidamente em todos os estados do Sul, havendo um conseqüente aumento no número de casos humanos com alta taxa de letalidade. Santa Catarina foi o último estado do país a diagnosticar casos de LV humana (LVH), sendo que o município de Florianópolis possui uma prevalência de 3,4% de LVC. Porém, o principal vetor, *Lu. longipalpis*, não é encontrado nessa região. Sendo SC uma das áreas endêmicas mais recentes de transmissão de LV no Brasil o objetivo deste trabalho foi estudar a introdução de *L. infantum* em Florianópolis a partir da análise da variabilidade genética de cepas locais e pesquisar as possíveis espécies de vetores nesta região. Dos casos positivos registrados no município entre 2010 e 2016, foram obtidas amostras de 58 cães e dois casos humanos. A confirmação da espécie *L. infantum* nessas amostras ocorreu via PCR dos marcadores kDNA e ITS-1. Além disso, foi possível isolar as cepas de 43 dessas amostras. Para tentar identificar a variabilidade genética dos isolados foi realizada a padronização de um painel de marcadores para análise de sequências multilocus (MLSA) de *L. infantum*. Após amplificação e sequenciamento de 10 desses marcadores de algumas cepas isoladas e a comparação com as sequências de cepas de outros estados do país não foi observado nenhum polimorfismo, indicando baixa variabilidade. Visto que em Florianópolis não há o vetor clássico de LV foram coletados mais de 1.000 flebotomíneos em um dos bairros de Florianópolis (Pantanal) com um grande número de cães diagnosticados com LV. A população de flebotomíneos foi maior nos meses mais quentes do ano e a espécie mais prevalente foi *Pintomyia fischeri*. Dos indivíduos coletados 365 tiveram o DNA extraído e 31 apresentaram PCR positivo para *Leishmania* spp., sendo estes das espécies *Pi. fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia neivai*. Os resultados sugerem que estas espécies podem participar no

ciclo de transmissão dessa parasitose, sendo necessários estudos de comprovação da competência vetorial. Os dados apontam o rápido espalhamento da doença no município de Florianópolis, sendo que os resultados dos estudos sobre LV nesta região fornecem subsídios para medidas de controle dessa parasitose.

Palavras chave: Diagnóstico; Flebotomíneos; MLSA.

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), that are transmitted by bite of infected female phlebotomine. Three major clinical forms of leishmaniasis are found: visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (ML). Visceral leishmaniasis is the most severe clinical form of the disease, caused by *Leishmania infantum* in Americas. The canonical vector is *Lutzomyia longipalpis* and the domestic dog is considered the main reservoir. More than 96% of the human cases of VL (HVL) in the Americas occur in Brazil. However, southern Brazil was a VL-free area up to 2008. Nowadays, canine VL (CVL) is spreading rapidly in all southern States, where the number of human cases is increasing, and showing high lethality rates. Santa Catarina is the last state on the country to diagnose autochthonous HVL cases, and nowadays a serological survey in dogs from Florianópolis (SC) revealed a CVL prevalence of 3.4%. As the most recent established endemic area of VL transmission in Brazil, the goal of the present proposal was to study the introduction of *L. infantum* in Florianópolis, thought the genetic variability comparisons of local strains and determine the parasite vector(s). From positive cases registered in Florianópolis between 2010-2016, samples from 58 CVL cases and 2 HVL cases were obtained. All samples were diagnosed with *L. infantum*, confirmed by PCR (kDNA and ITS-1) and sequencing. Also, 43 *L. Infantum* strains from VL cases have been isolated. The genetic variability of the strains was performed using the multilocus sequence analysis (MLSA). PCR amplification and sequencing were performed for 10 loci using four local strains. These sequences were compared with sequences from other Brazilian states, however no polymorphic site was found, suggesting low variability. Since Florianópolis is an area without *Lu. Longipalpis*, the capture of phlebotomine sand-flies was initiated, and more than 1,000 individuals were collected in a locality of Florianópolis with CVL cases. The predominant specie was *Pintomyia fischeri* and the phlebotomine population had a marked reduction during the winter (June-September). DNA was extracted for 365 female phlebotomines and 31 revealed positive PCR amplification for *Leishmania* spp., including specimens from *Pi. fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia neivai*. The results suggest the possible participation of these three phlebotomine species in the parasite transmission, being necessary the study of their vectorial competence. Our data pointed out to the rapid spreading of VL in Florianópolis, and

studies about LV in this region can improve the control strategies for this disease.

Keywords: Diagnosis; Sandfly; MLSA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:**Exemplos de manifestações clínicas das leishmanioses. Forma cutânea (esquerda), mucocutânea (centro) e visceral (direita). Fontes: VELOZO et al., 2006; WHO, 2018.....18
- Figura 2:** Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).....19
- Figura 3:** Flebotomíneo fêmea durante repasto sanguíneo. Fonte: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>.....20
- Figura 4:** Número de casos de LV por ano nos países americanos, de 2001 a 2015. Fonte: PAHO, 2017.....22
- Figura 5:** Mapa do município de Florianópolis, SC destacando-se os locais das coletas de flebotomíneos realizadas para o presente estudo.....30
- Figura 6:** Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do kDNA de *Leishmania* sp. de amostras caninas e humanas com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral de Florianópolis, SC. Gel de poli-acrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com HaeIII); CN: Controle negativo; La: *L. amazonensis*; Lb: *L. braziliensis*; Li: *L. infantum*; 1: isolado de caso humano; 2: isolado de caso canino; 3: extração de DNA de tecido – pele; 4: extração de DNA de tecido – linfonodo39
- Figura 7:** Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do marcador ITS-1 de *Leishmania* sp. de amostras caninas e humanas com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral de Florianópolis, SC. Gel de poli-acrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com HaeIII); CN: Controle negativo; La: *L. amazonensis*; Lb: *L. braziliensis*; Li: *L. infantum*; 1: isolado de caso humano; 2: isolado de caso canino; 3: extração de DNA de tecido – pele; 4: extração de DNA de tecido – linfonodo.....40
- Figura 8:** Alinhamento representativo das sequências obtidas de ITS-1 das amostras caninas e humanas diagnosticadas com leishmaniose visceral em Florianópolis, SC. As sequências dos controles *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* foram alinhadas com todas as sequências obtidas, sendo aqui demonstrado apenas duas sequências obtidas a partir de amostras caninas (Cão 1 e 2) e uma humana. Os asteriscos representam nucleotídeos idênticos na mesma posição.....41
- Figura 9:** Produtos de amplificação por PCR dos 12 marcadores de MLSA de *Leishmania infantum*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. HMW: Padrão de tamanho molecular HMW (fago lambda digerido

com <i>Pst</i> I); CN: Controle negativo; C1-C2 DNA de cepas de <i>L. infantum</i> a 10 ng e 50 ng.....	42
Figura 10: Produtos de amplificação por PCR dos 12 marcadores de MLSA de <i>Leishmania infantum</i> de quatro cepas de <i>L. infantum</i> isoladas em Florianópolis, SC. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. CN: Controle negativo; 1-4 DNA das cepas (1) LVC FL 0007; (2) LVC FL 0050; (3) LVC FL 0057 e (4) LVH FL 0001.....	42
Figura 11: Distribuição do número de flebotomíneos fêmeas coletados na localidade do bairro Pantanal, Florianópolis SC, ao longo do período de 1 ano (abril de 2016 a março de 2017).....	43
Figura 12: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do kDNA de <i>Leishmania</i> sp. e gene da cacofonia a partir dos <i>pools</i> de flebotomíneos fêmeas coletados no bairro do Pantanal, Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com <i>Hae</i> III); CN: Controle negativo; Li+Fleb: DNA de <i>L. infantum</i> e DNA de flebotomíneo macho; 1 a 10: grupos contendo mistura de DNA de 10 flebotomíneos fêmeas. O produto de 220 pb corresponde ao gene da cacofonia utilizado como controle da qualidade do DNA extraído de flebotomíneos.....	44
Figura 13: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do ITS-1 de <i>Leishmania</i> sp. a partir das amostras individuais de flebotomíneos fêmeas coletados no bairro do Pantanal, Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com <i>Hae</i> III); CN: Controle negativo; Li: <i>L. infantum</i> ; 1-9: flebotomíneos fêmeas.....	45
Figura 14: Mapas de distribuição e de número acumulado dos casos de LVC em Florianópolis. A: 2010; B: 2010-2011; C: 2010-2012; D: 2010-2013; E: 2010-2014; F: 2010-2015; G: 2010-2016; H: 2010-2017.....	46
Figura 15: Mapas de distribuição dos casos de LVC em Florianópolis cujo material está disponível no laboratório de Protozoologia.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição detalhada das amostras de origem canina e humana de casos autóctones de Florianópolis, SC utilizadas no presente estudo.....	25
Quadro 2: Pannel de iniciadores utilizados para amplificação dos 12 marcadores MLSA de <i>L. infantum</i>	35
Quadro 3: Descrição das cepas de <i>Leishmania infantum</i> de diferentes localidades utilizadas no presente estudo.....	37
Quadro 4: Características gerais dos dados dos genomas das quatro cepas de <i>L. infantum</i> de Florianópolis obtidos por Illumina HiSeq.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Micro litro
CCZ	Centro de controle de zoonoses de Florianópolis
CLIOC	Coleção de leishmania do Instituto Oswaldo Cruz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP [®]	Plataforma de Duplo Percurso (<i>Dual Path Platform</i>)
ITS-1	Espaçador interno transcrito 1, do inglês <i>Internal transcribed spacer 1</i>
kDNA	DNA de cinetoplasto
L	Litro
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
min	Minuto
MLSA	Análise de sequências multilocus, do inglês <i>Multilocus sequence analysis</i>
MLMT	Análise de multilocus de microssatélites
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
Proto	Laboratório de Protozoologia da UFSC
s	Segundos
SBF	Soro bovino fetal
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	Organização mundial da saúde, do inglês <i>World health organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	25
3.1.1. Amostras de origem canina e humana	25
3.1.2. Coletas de Flebotomíneos.....	29
3.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DE <i>LEISHMANIA</i> SP.	30
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	31
3.3.1. Amostras de tecidos de origem canina e humana e isolados de <i>Leishmania</i> sp.	31
3.3.2. Amostras de Flebotomíneos	31
3.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	32
3.5. DETERMINAÇÃO ESPECÍFICA DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>LEISHMANIA</i> SP.....	33
3.6. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	34
3.7. CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>L. INFANTUM</i> A PARTIR DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS MULTILOCUS (MLSA).....	34
3.8. ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS DE MLSA DAS CEPAS DE <i>L. INFANTUM</i>	36
3.9. MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS.....	38
4. RESULTADOS.....	38
4.1. ISOLAMENTO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS AMOSTRAS CANINAS E HUMANAS	38
4.2. VARIABILIDADE GENÉTICA DAS CEPAS DE <i>L. INFANTUM</i>	40
4.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE FLEBOTOMÍNEOS.....	43
4.4. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LVC E LVH NA REGIÃO INSULAR DE FLORIANÓPOLIS AO LONGO DOS ANOS	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. RESUMO DOS RESULTADOS.....	56
7. CONCLUSÃO	57
8. PERSPECTIVAS	57

9.	REFERÊNCIAS.....	58
10.	APÊNDICE.....	75

1. Introdução

As leishmanioses são doenças complexas causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). São transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) infectadas. Essa parasitose está presente em mais de 90 países nas regiões tropicais, subtropicais e no sul da Europa, exceto na Austrália, e ocorre com mais frequência em países tropicais subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (ALVAR et al., 2012; ANTINORI et al., 2012, MURRAY et al., 2005).

As leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2018 a estimativa é de ocorrência de 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes pela doença.

As leishmanioses são classificadas em três distintas formas clínicas (Figura 1): cutânea (LC), caracterizada pela presença de uma ou mais lesões nodulares ou em forma de pápula eritematosa na pele, usualmente no local da picada do flebotomíneo; 2) mucocutânea (LMC), a qual manifesta, além dos sintomas citados anteriormente, lesões desfigurativas em regiões de mucosas, principalmente oronasal; e 3) visceral (LV), a forma mais grave que acomete os órgãos linfóides, podendo levar o paciente a óbito em 90% dos casos não tratados (DESJEUX, 2001; GOTO, LINDOSO, 2010).

Sabe-se que a ocorrência das formas clínicas está ligada diretamente a dois fatores: a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e o estado imunológico do hospedeiro. Mais de 20 espécies do parasito são descritas como causadoras de LC. No entanto, em um contexto mais específico *Leishmania braziliensis* está associada tanto a LC quanto a LMC, enquanto que *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* estão correlacionados à LV (VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015). Num contexto geográfico, *L. infantum* é a espécie responsável pelos casos de LV nas Américas e Europa, enquanto *L. donovani* é encontrada nos demais países da Ásia e África. Em relação ao estado imunológico, pacientes imunologicamente debilitados, como por exemplo, indivíduos HIV positivos, tendem a ter progressão acelerada da doença (BRASIL, 2018). Nesses pacientes a espécie *Leishmania amazonensis* pode causar a forma cutânea disseminada com várias lesões não ulcerativas dispersas pelo corpo. A *L. amazonensis* também tem sido descrita em alguns casos de leishmaniose visceral (LAINSON, SHAW, 1979; ALEIXO et al., 2006).

Figura 1:Exemplos de manifestações clínicas das leishmanioses.Forma cutânea (esquerda), mucocutânea (centro) e visceral (direita).

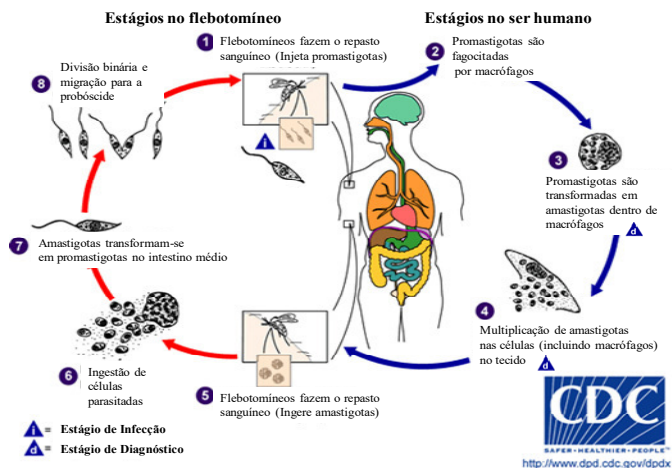


Fontes: VELOZO et al., 2006; WHO, 2018.

O gênero *Leishmania* caracteriza-se por incluir organismos unicelulares flagelados que tem uma única mitocôndria com uma região rica em DNA mitocondrial, denominada cinetoplasto ou kDNA. Esses parasitos possuem um ciclo digenético bem descrito tanto nos hospedeiros mamíferos quanto nos flebotomíneos (Figura 2). Nos mamíferos, o ciclo de vida do parasito é intracelular, e ocorre no interior do vacúolo fagocítico de células do sistema fagocítico mononuclear, nas quais o parasito em sua forma amastigota se multiplica por divisão binária. No hospedeiro invertebrado, as formas amastigotas ingeridas após repasto sanguíneo são conduzidas ao intestino médio, onde se diferenciam em formas promastigotas, multiplicam-se por divisão binária e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas infectantes para o hospedeiro mamífero (PIMENTA; SECUNDINO; BLANCO, 2003).

Durante a picada as fêmeas de flebotomíneos infectadas utilizam as partes bucais para macerar a pele e levar à exposição de sangue no local. O mecanismo de transmissão ocorre devido ao bloqueio do proventrículo e esôfago do vetor pela grande quantidade de parasitos, que durante o repasto sanguíneo acaba por regurgitar as promastigotas no mamífero sadio, o que leva à infecção deste (SHERLOCK, 2003).

Figura 2: Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

Os flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira ou birigui (BRASIL, 2018). São insetos de clima quente e temperado, com cerca de 3 mm de comprimento, cobertos de cerdas no corpo e nas asas (Figura 3), sendo hematófagas apenas as fêmeas (FIOCRUZ, 1997). Cerca de 30 das 500 espécies de flebotomíneos descritas são comprovadamente vetores do parasito (WHO, 2018). As fêmeas possuem hábito crepuscular e noturno, alimentando-se em hospedeiros mamíferos principalmente no ambiente extradomiciliar (GAGLIO et al., 2014; POCHÉ et al., 2017). Em relação à especificidade da relação parasito-vetor, várias espécies de flebotomíneos são descritas como transmissoras de espécies causadoras de LC. Na transmissão de LV nas Américas uma única espécie de flebotomíneo altamente adaptada ao ambiente urbano e periurbano é considerada o vetor canônico, *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005). Durante as duas últimas décadas alguns trabalhos têm apresentado evidências sugerindo que outras espécies de flebotomíneos possam atuar como vetores de *L. infantum*, incluindo *Lutzomyia cruzi* (DE OLIVEIRA 2017), *Lutzomyia evansi* (BEJARANO et al., 2001), *Pintomyia fischeri* (GALVIS-OVALLOS et al., 2017), *Migonemyia migonei* (GUIMARAES et al., 2016) e *Nyssomyia neivai* (DIAS et al., 2013). No entanto, o estudo da capacidade vetorial é crucial no

estabelecimento de espécies, visto que o fato de os insetos estarem infectados com o parasito não significa que sejam capazes de transmiti-lo para o hospedeiro (DANTAS-TORRES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2016; MORICONI et al., 2017). Neste sentido, poucos são os estudos que realizam essa comprovação vetorial. No caso de *L. infantum*, além de *Lu. longipalpis*, somente a espécie *Lu. cruzi* possui comprovada capacidade de transmissão (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 3: Flebotomíneo fêmea durante repasto sanguíneo.



Fonte: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>

As leishmanioses são classificadas como zoonoses (HUBÁLEK, 2003; MESLIN, 1997). Mais de 70 espécies de mamíferos são descritas como reservatórios naturais destes parasitos (CDC, 2018; WHO, 2018). Os hospedeiros compreendem desde mamíferos silvestres, como raposas e marsupiais, animais de estimação, como o gato e o cão, e o ser humano (LAINSON, 2010; MAIA; CAMPINO, 2011). Devido à sua proximidade com os seres humanos, os animais domésticos têm papel importante como reservatórios em regiões endêmicas para doenças zoonóticas (ASHFORD, 1996).

1.1. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral, popularmente conhecida como kalazar é a forma clínica mais severa. Apesar de uma grande porcentagem dos indivíduos infectados serem assintomáticos por longos períodos a doença pode ser fatal se não tratada. É uma doença sistêmica que compromete os órgãos linfóides, caracterizada em seres humanos por

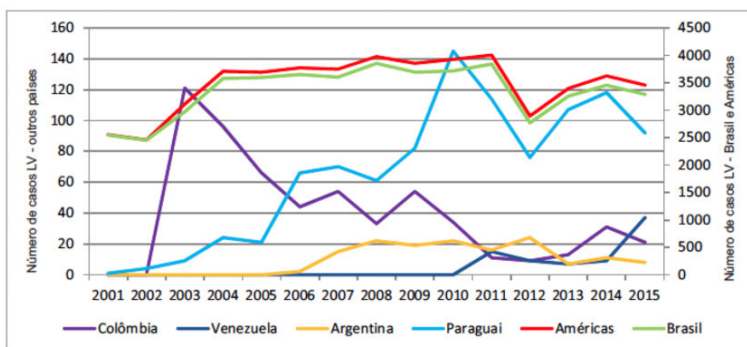
febre, perda de peso, aumento do volume de fígado e baço (hepatoesplenomegalia), diminuição da quantidade das células sanguíneas (pancitopenia) e aumento dos níveis de proteína gama sérica (hipergamaglobulinemia) (CDC, 2018; DESJEUX, 2001). Além disso, o comprometimento do sistema fagocítico mononuclear deixa o hospedeiro susceptível a infecções secundárias que agravam o estado de saúde do paciente (CHAPPUIS et al., 2007; CLEM et al., 2010)

Diferentemente do que ocorre na Ásia e África, onde a LV é uma antroponose e o ser humano é o único mamífero presente no ciclo de transmissão, nas Américas diversas espécies de mamíferos podem se infectar com *L. infantum*. Dentre essas, os canídeos possuem um papel fundamental como reservatórios de LV por apresentarem células infectadas no tecido subcutâneo, além dos órgãos linfóides. Devido a estas características e pela proximidade com o ser humano, o cão doméstico torna-se uma peça chave na transmissão da LV, fazendo o elo entre o flebotômico e o ser humano (ZEMANOVÁ et al., 2007a). A LV canina (LVC) inclui sintomas semelhantes aos que ocorrem em humanos, como febre, hepatoesplenomegalia e perda de peso, somados à alopecia, conjuntivite purulenta e crescimento exagerado das unhas. A maioria dos cães permanece assintomática por longos períodos de tempo, e podem, mesmo sem sintomas aparentes, serem responsáveis pela disseminação da doença (ASLAN et al., 2016; BANETH et al., 2008; DANTAS-TORRES, 2007; DANTAS-TORRES et al., 2012). Desta forma, a alta taxa de infecção em cães na presença do vetor competente precede a transmissão do parasito para seres humanos (LAINSON; RANGEL, 2005).

O número estimado de novos casos de LV no mundo é de 50 mil a 90 mil por ano, sendo que mais de 90% destes ocorrem em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2018). Nas Américas, a LV humana (LVH) está presente em 12 países, sendo que o Brasil contabiliza 96% dos casos (Figura 4). De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO), o Brasil possui aproximadamente 3.500 casos anuais de LVH, com uma incidência de 4,09 casos/100.000 habitantes. As regiões brasileiras mais afetadas são o Nordeste e o Sudeste (SANTIS et al., 2011; WERNECK, 2010; WHO, 2010). No entanto, há uma clara expansão geográfica da doença no cone sul da América Latina, incluindo Argentina, Paraguai, Uruguai e os estados brasileiros da região Sul. O fato mais relevante nessa região é o aumento no número de casos fatais de LVH, atingindo o maior número de mortes/ ano e taxas de mortalidade já observadas (PAHO, 2017).

Até 2008 a região Sul do Brasil não havia relatado casos de LV autóctones, sendo registrados apenas casos importados da doença. Os primeiros registros nesta região apareceram no município de São Borja, no Rio Grande do Sul. Inicialmente um inquérito sorológico em cães na região apontou uma soroprevalência de 20,8% (5,430 cães) (DEBONI et al., 2011; TARTAROTTI, et al., 2011). Além disso, a presença do vetor clássico, *Lu. longipalpis* foi confirmada em sete municípios da região oeste do estado (DOS SANTOS et al., 1998; SOUZA et al., 2009). No ano subsequente, três casos autóctones de LVH foram relatados, resultando em uma morte (DEBONI et al., 2011). Desde então, a expansão da LVH no RS resultou em casos diagnosticados nos municípios de Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Porto Alegre e Santa Cruz do Sul (CEVS, 2014).

Figura 4: Número de casos de LV por ano nos países americanos, de 2001 a 2015.



Fonte: PAHO, 2017.

No Paraná a transmissão autóctone de LVC foi primeiramente identificada na região de fronteira com Argentina e Paraguai, onde a presença de *Lu. longipalpis* foi confirmada (PINA TRENCH et al., 2016; SANTOS et al., 2012). Em 2013, a prevalência estimada de LVC foi de 14.6% em Foz do Iguazú, 28% em Puerto Iguazu (Argentina) e 8% no município de Ciudad del Este (Paraguai). Os casos autóctones de LVH passaram a ser registrados a partir de 2015 em Foz do Iguazú (oito casos) (PINA TRENCH et al., 2016), resultando em quatro mortes.

Até 2010, o estado de Santa Catarina era considerado livre de LV, sendo confirmados os primeiros casos de transmissão autóctone de LVC em um surto na localidade do Canto dos Araçás na região da

Lagoa da Conceição, município de Florianópolis (FIGUEIREDO et al, 2012; STEINDEL et al, 2013). Diferentemente do PR e RS, não foi encontrado o vetor clássico *Lu. longipalpis* em Florianópolis, sugerindo que outra(s) espécie(s) de flebotomíneo(s) atue como transmissor de *L. infantum* nesta localidade (DIAS et al., 2013). O inquérito entomológico realizado na época do surto revelou 12 espécies de flebotomíneos, sendo que exemplares de *Pi. fischeri*, *Mg. Migonei* e *Ny. Neivai* foram positivos para presença de DNA de *Leishmania* sp.. Em 2017, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Florianópolis realizou um inquérito sorológico em cães de 36 bairros da cidade e detectou 339 animais soropositivos (~3,4%), indicando o espalhamento da doença por toda a ilha. Seguindo o padrão clássico da LV, em agosto de 2017 o primeiro caso autóctone de LVH foi registrado em Florianópolis, seguido de um segundo caso uma semana depois e um terceiro caso em dezembro do mesmo ano. Além de Florianópolis, 48 casos autóctones de LVC foram confirmados na região oeste do estado, nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso próximos a fronteira com a Argentina (MAZIERO et al., 2014).

A LV é uma das mais complexas doenças transmitidas por vetores e apresenta uma rápida expansão geográfica no Brasil nas últimas décadas. Os fatores ecológicos, epidemiológicos e clínicos são variáveis entre as áreas de transmissão, e acredita-se que as características genéticas mantenham esta relação variável (BANULS et al., 2009). Diversos fatores como desmatamento, mudanças climáticas e a migração humana, somados a outras questões como diagnóstico tardio da LV, falta de conhecimento sobre os reservatórios e vetores envolvidos na transmissão nos distintos biomas brasileiros constituem problemas para o controle e vigilância da LV (ROMERO; BOELAERT, 2010).

A introdução da LV no sul do Brasil é um evento multifatorial que ocorreu quase simultaneamente e se espalhou muito rápido para diferentes áreas, indicando uma adaptação do parasito e do vetor as condições locais. Essa rápida dispersão é esperada em áreas onde *Lu. longipalpis* está presente como no RS e PR (SOUZA et al. 2009, SANTOS et al., 2011). Porém, a transmissão ativa de LV em Florianópolis está ocorrendo na ausência do vetor canônico. Apesar de *L. infantum* ter sido detectada em *Ny. neivai* por PCR em Florianópolis (DIAS et al., 2013), não existem evidências da sua competência vetorial. Desta forma, é urgente o levantamento atualizado em áreas de transmissão ativa de todas as espécies de flebotomíneos com

possibilidade de transmissão para que seja avaliada a capacidade vetorial a fim de determinar o verdadeiro vetor de LV em SC.

Além da característica peculiar de transmissão de LV, o estado de SC está localizado na fronteira sul de distribuição de LV no Brasil, sendo o último a detectar casos humanos no país. Desta forma, devido ao rápido aumento no número de casos de LV, mesmo sem a presença do vetor clássico, faz-se necessário o estudo relacionado à LV no município, visando não só a identificação das prováveis espécies de flebotomíneos associadas à propagação da doença, mas também a identificação e caracterização das cepas de *L. infantum* isoladas de casos locais, com o objetivo de identificar um possível padrão de transmissão para o delineamento futuro de políticas de controle dos insetos, com o intuito de reduzir a progressão da parasitose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar molecularmente as cepas de *Leishmania infantum* de casos de leishmaniose visceral em Florianópolis e pesquisar o vetor responsável pela disseminação da doença na região.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o diagnóstico molecular de leishmaniose visceral (LV) de amostras caninas e humanas;
- Padronizar marcadores de MLSA para análise de variabilidade genética *L. infantum*;
- Comparar a variabilidade genética dos isolados de *L. infantum* de Florianópolis com cepas representativas de diferentes estados brasileiros;
- Identificar os possíveis vetores da LV em Florianópolis;
- Elaborar um mapa de risco para direcionamento de ações preventivas à disseminação da doença.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção das amostras

3.1.1. Amostras de origem canina e humana

As amostras de tecidos de 58 cães foram enviadas ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo CCZ/ Florianópolis no período de maio de 2010 a fevereiro de 2016. Essas amostras são referentes a cães diagnosticados com LV pelo CCZ e Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) utilizando a combinação dos testes imunocromatográfico DPP (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Após a confirmação do diagnóstico, o procedimento de eutanásia dos cães foi realizado pelos veterinários responsáveis do CCZ, sendo os mesmos responsáveis pela coleta de amostras de sangue, baço, fígado, pele e linfonodo de cada animal. Fragmentos de cada órgão foram dispostos em três tubos contendo: 1) formol 10%; 2) etanol 70% e 3) meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado e 1% de estreptomicina e penicilina (10.000U/ml).

As amostras referentes aos dois primeiros casos de LVH do município de Florianópolis foram coletadas, respectivamente, no Hospital Universitário Ernani de São Thiago (HU) e no Hospital Nereu Ramos (HNR) e enviadas ao Laboratório de Protozoologia para a confirmação do diagnóstico, sendo constituídas de sangue total obtido com e sem anticoagulante e aspirado de medula óssea. Os detalhes de cada amostra canina e humana estão apontados no quadro 1.

Quadro1: Descrição detalhada das amostras de origem canina e humana de casos autóctones de Florianópolis, SC utilizadas no presente estudo.

Identificação da Amostra	Hosp.	Localidade	Data de coleta	Isolado	Depósito CLIOC
LVC FL 0001	C	Lagoa da Conceição	17/10/2014	S	Enviado – Sem número
LVC FL 0002	C	Lagoa da Conceição	02/09/2014	S	
LVC FL	C	Canto dos	27/08/2010	S	Enviado –

0003			Araçás			Sem número
LVC 0004	FL	C	Não Informado	23/07/2014	S	Enviado – Sem número
LVC 0005	FL	C	Canto da Lagoa	11/06/2014	N	
LVC 0006	FL	C	Abraão	10/10/2014	N	
LVC 0007	FL	C	Costa da Lagoa	17/07/2014	S	IOCL3717 MCAN/BR/2014/Bob
LVC 0008	FL	C	Itaguaçu	13/01/2016	S	Enviado – Sem número
LVC 0009	FL	C	Lagoa da Conceição	23/04/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0010	FL	C	Rio Tavares	13/01/2015	S	Enviado – Sem número
LVC FL 0011		C	Canto dos Araçás	14/12/2010	S	Enviado – Sem número
LVC 0012	FL	C	Não Informado	23/07/2014	S	Enviado – Sem número
LVC 0013	FL	C	Canto da Lagoa	02/12/2014	N	
LVC 0014	FL	C	Canto dos Araçás	14/05/2010	S	IOCL3721 MCAN/BR/2010/Chocolate
LVC 0015	FL	C	Lagoa da Conceição	24/05/2014	S	IOCL3730 MCAN/BR/2014/Dora
LVC 0016	FL	C	Lagoa da Conceição	02/05/2014	S	IOCL3720 MCAN/BR/2014/Faisca
LVC 0017	FL	C	Jurerê	19/08/2014	S	
LVC 0018	FL	C	Canto da Lagoa	29/01/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0019	FL	C	Canto dos Araçás	02/03/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0020	FL	C	Canto dos Araçás	14/05/2010	S	IOCL3716 MCAN/BR/2010/Iris
LVC 0021	FL	C	Canto da Lagoa	02/12/2014	N	
LVC 0022	FL	C	Córrego Grande	06/05/2015	S	Enviado – Sem número

LVC 0023	FL	C	Itacorubi	03/08/2015	S	IOCL3727 MCAN/BR/2015/Kiara2
LVC 0024	FL	C	Córrego Grande	06/05/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0025	FL	C	Canto dos Araçás	06/05/2010	S	IOCL3722 MCAN/BR/2010/Loba
LVC 0026	FL	C	Lagoa da Conceição	13/10/2014	N	
LVC 0027	FL	C	Canto da Lagoa	04/11/2014	N	
LVC 0028	FL	C	Lagoa da Conceição	08/05/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0029	FL	C	Canto dos Araçás	21/09/2010	N	
LVC 0030	FL	C	Rio Tavares	14/01/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0031	FL	C	Canto da Lagoa	09/06/2014	N	
LVC 0032	FL	C	Lagoa da Conceição	28/04/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0033	FL	C	Saco Grande	19/08/2014	N	
LVC 0034	FL	C	Itaguaçu	13/01/2016	S	Enviado – Sem número
LVC 0035	FL	C	Campeche	29/09/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0036	FL	C	Canto dos Araçás	08/08/2014	S	IOCL3723 MCAN/BR/2014/Ninna
LVC 0037	FL	C	Praia Mole	06/03/2015	S	IOCL3719 MCAN/BR/2015/Paco
LVC 0038	FL	C	Saco Grande	30/09/2015	N	
LVC 0039	FL	C	Saco Grande	21/03/2014	N	
LVC 0040	FL	C	Itacorubi	08/04/2014	S	IOCL3726 MCAN/BR/2014/Pingo2
LVC 0041	FL	C	Canto da Lagoa	11/06/2014	N	
LVC	FL	C	Praia Mole	07/10/2014	N	

0042						
LVC 0043	FL	C	Itacorubi	19/03/2014	N	
LVC 0044	FL	C	Lagoa da Conceição	14/05/2010	S	Enviado – Sem número
LVC 0045	FL	C	Saco Grande	22/01/2016	S	IOCL3729 MCAN/BR/2016/Preto
LVC 0046	FL	C	Costa da Lagoa	19/11/2015	S	
LVC 0047	FL	C	Não informado	30/09/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0048	FL	C	Campeche	04/02/2016	S	IOCL3723 MCAN/BR/2016/Simba
LVC 0049	FL	C	Lagoa da Conceição	14/05/2010	S	Enviado – Sem número
LVC 0050	FL	C	José Mendes	21/09/2015	S	IOCL3718 MCAN/BR/2015/Snoopy
LVC 0051	FL	C	Lagoa da Conceição	14/10/2014	N	
LVC 0052	FL	C	Agronômica	04/02/2016	S	Enviado – Sem número
LVC 0053	FL	C	Canto da Lagoa	15/10/2014	N	
LVC 0054	FL	C	Córrego Grande	28/04/2015	S	Enviado – Sem número
LVC 0055	FL	C	Lagoa da Conceição	17/10/2014	S	
LVC 0056	FL	C	Rio Tavares	14/01/2015	S	IOCL3725 MCAN/BR/2015/Twisty
LVC 0057	FL	C	Lagoa da Conceição	22/11/2010	S	IOCL3731 MCAN/BR/2010/Zeus
LVC 0058	FL	C	Rio Tavares	13/01/2015	S	
LVH 0001	FL	H	Saco do Limões	10/08/2017	S	IOCL3728 MHOM/BR/2017/PC
LVH 0002	FL	H	Pantanal	30/08/2017	N	

C- *Canis familiaris*; H- *Homo sapiens*; S- sim; N- não

As amostras sanguíneas humanas e caninas coletadas com EDTA foram processadas para a separação da nuvem leucocitária a partir de centrifugação, utilizando o reagente Histopaque® (Sigma-Aldrich). Os fragmentos de tecidos fixados em etanol 70% foram utilizados no preparo de lâminas coradas com Giemsa para confirmação do diagnóstico via microscopia óptica e também para extração de DNA. Os tubos contendo fragmentos de tecidos em meio de cultura foram mantidos em estufa a 27°C e avaliados a cada dois dias para identificar a presença de parasitos, visando o isolamento dos mesmos. As amostras de medula óssea foram fracionadas para a preparação de esfregaços, extração de DNA e adição de meio de cultura.

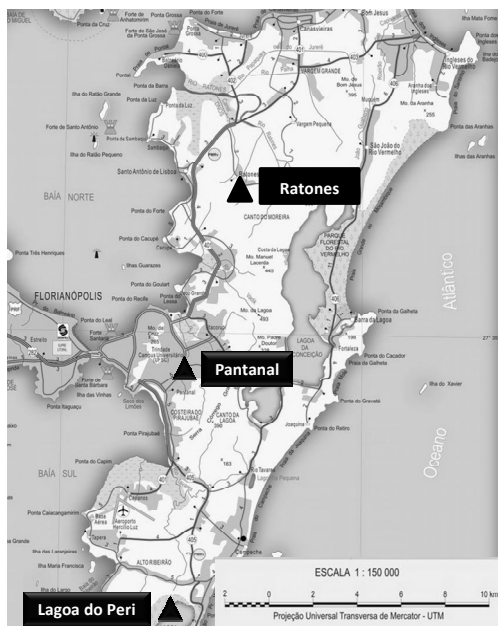
3.1.2. Coletas de Flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados e identificados com o auxílio do Laboratório de Diversidade de Insetos Aquáticos (LABDIA) da UFSC em três localidades do município: Lagoa do Peri, Ratonés e Pantanal (Figura 5). As localidades foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: 1) sem relato de casos de LV (Lagoa do Peri e Ratonés) e 2) com a presença de casos caninos positivos (Pantanal). Para a captura dos insetos fez-se uso de armadilhas luminosas tipo CDC, sendo 12 armadilhas por coleta dispostas em diversos pontos do local selecionado. Todas as armadilhas ficaram a pelo menos 0,5 m de altura em relação ao solo e foram colocadas nos locais selecionados ao fim da tarde, cerca de 18h independentemente do horário de verão, sendo recolhidas no início da manhã do dia seguinte. A periodicidade das coletas foi mensal no bairro do Pantanal (abril 2016 a março 2017), e única nos demais locais. No bairro Pantanal todas as coletas foram realizadas na mesma localidade, em terreno particular com autorização do proprietário, local onde nas proximidades foram registrados vários casos de LVC, sendo dois deles na própria propriedade.

A seleção dos flebotomíneos frente aos demais insetos foi feita com uso de microscópio estereoscópico. Os machos de cada coleta foram armazenados juntos em microtubos cônicos de 1,5 ml contendo etanol 70% para posterior extração de DNA e uso como controle de técnica. As fêmeas foram armazenadas individualmente, também em microtubos cônicos de 1,5 ml contendo etanol 70%, e receberam cada uma um código para identificação. A cabeça e o terço posterior do abdômen, referente aos três últimos segmentos do mesmo, foram removidos para o preparo das lâminas, visando a identificação das

espécies. A identificação dos insetos foi feita utilizando-se a chave proposta por Galati (2003), tendo o auxílio dos alunos de graduação em Ciências Biológicas Renan da Silva e Lara Maglia Szinwelski, bem como do Prof. Dr. Andrey José de Andrade da Universidade Federal do Paraná. Após a remoção das asas, o restante de cada indivíduo foi armazenado em microtubo cônico de 1,5 ml contendo etanol 70% para prosseguir à extração de DNA.

Figura 5: Mapa do município de Florianópolis, SC destacando-se os locais das coletas de flebotomíneos realizadas para o presente estudo.



3.2. Isolamento e cultivo de *Leishmania* sp.

As amostras coletadas e transferidas para os tubos contendo meio Schneider, as quais compreendiam fragmentos de pele, baço, fígado e aspirado de medula óssea, cada um em um tubo, foram mantidas em estufa a 27°C e avaliadas quanto à presença de parasitos a cada dois dias. Amostras que apresentaram contaminação bacteriana ou fúngica foram descartadas. Quando parasitos foram visualizados no sobrenadante das culturas a partir de microscopia óptica, estas foram

consideradas culturas positivas para *Leishmania* sp.. Aliquotas dessas culturas foram transferidas para novos tubos contendo meio Schneider suplementado com 5% de SBF e antibióticos, sendo parte dos parasitos centrifugados e utilizados para extração de DNA, e parte congelados em alíquotas dispostas em criotubos em nitrogênio líquido (N₂). As culturas dos parasitos isolados também foram enviadas para depósito na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, (CLIOC). Todas as cepas depositadas nessa coleção foram confirmadas em nível de espécie com *L. infantum* pelo método de eletroforese de enzimas.

3.3. Extração de DNA

3.3.1. Amostras de tecidos de origem canina e humana e isolados de *Leishmania* sp.

Os parasitos isolados dos indivíduos diagnosticados com LV e amostras de tecidos (preferencialmente fragmentos de linfonodo ou aspirado de medula óssea) de casos onde não foi possível realizar o isolamento com sucesso foram processados com a adição de 500 µl de solução de lise A (10 mM Tris HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS) e 100 µg de proteinase K. Após adição da solução, as amostras foram maceradas, com o auxílio de pistilo cônico quando necessário, e mantidas a 42°C até a completa lise do material. A extração de ácidos nucleicos foi realizada pelo método de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), sendo adicionado 10 mg/ml de RNase A ao final do processo. A avaliação de quantidade e qualidade do DNA resultante ocorreu respectivamente via espectrofotometria, utilizando o aparelho BioPhotometer® (Eppendorf), e a partir de eletroforese gel de agarose a 0,8%. O gel foi colocado em uma solução de brometo de etídeo (0,5mg/ml) para permitir a visualização dos fragmentos sob iluminação ultravioleta no transiluminador MacroVue UV-20 (Hoefler Pharmacia Biotech). A fotodocumentação do material ocorreu com auxílio do programa Doc-ItLS.

3.3.2. Amostras de Flebotomíneos

Em cada tubo contendo uma única fêmea foi adicionado 500 µl de solução de lise B (100 mM Tris HCl pH 9,0, 80 mM NaCl, 60 mM

EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 160 mM sacarose) e 100 µg de proteinase K. As amostras foram então maceradas com auxílio de pistilos cônicos e o DNA extraído pelo método de Collins (COLLINS et al., 1987). A avaliação de quantidade e qualidade do material resultante foi realizada conforme descrito no item 3.3.1.

Após a extração foram formados grupos contendo DNA de cerca de 10 indivíduos. Uma alíquota de DNA de cada fêmea do grupo foi adicionada em um novo microtubo. Água ultrapura foi adicionada de forma a diluir o DNA do *pool* para a concentração final de 50 ng/µl, quantidade ideal para amplificação em PCR de acordo com testes prévios.

3.4. Diagnóstico molecular

As amostras de DNA extraídas foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA, cujo tamanho do fragmento amplificado é de cerca de 120 pb (VOLPINI et al., 2004). A amplificação deste fragmento permite a identificação em nível de gênero (*Leishmania* sp.). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 10 µl utilizando 10 ng de DNA; 0,2 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); 10 pmol de cada iniciador 150 5'- GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA -3' e 152 5'- (G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C -3' e 1U de GoTaq® DNA polimerase (Promega) em tampão específico. O DNA foi desnaturado a 94°C por 10 min e amplificado com 5 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30 s, 72°C por 20 s, e um último ciclo a 72°C por 5 min para extensão final. Foram utilizados como controles positivos da técnica os DNAs extraídos de culturas de cepas padrões de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904) e *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). Como controles negativos foram utilizadas reações sem a presença de DNA e/ou contendo DNA extraído de tecidos caninos e humanos sabidamente negativos para *Leishmania* sp.

No diagnóstico molecular de flebotomíneos infectados com *Leishmania* sp. a pesquisa da presença de kDNA do parasito foi feita da mesma forma que nas amostras anteriores, exceto que, devido ao grande número de amostras, foram primeiramente utilizados *pools* de DNA de dez indivíduos fêmeas, visando facilitar o *screening* das amostras. No

entanto, visando não apenas a amplificação do kDNA de *Leishmania* sp., foi utilizada uma PCR multiplex para que também ocorresse a amplificação do gene da cacofonia (CAC) (220 pb) de flebotomíneos para assegurar a qualidade do material genético extraído dos insetos. Cada reação de PCR foi realizada conforme descrito anteriormente, apenas com a adição 10 pmol dos iniciadores PhS1 5'-GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG-3' e PhS2 5'-CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC-3' (PEIXOTO et al., 2001). Como controles positivos foram utilizados DNAs de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e de flebotomíneos machos. Pools de flebotomíneos fêmeas positivos passaram por uma segunda reação de PCR, sendo esta efetuada seguindo o mesmo protocolo, mas utilizando o DNA das fêmeas de forma individual.

Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídeo e fotodocumentados.

3.5. Determinação específica das amostras positivas para *Leishmania* sp.

As amostras de DNA extraídas foram também submetidas à PCR para a amplificação da região espaçadora interna transcrita 1 (ITS-1) de *Leishmania*, visando a identificação a nível de espécie. A reação foi preparada para um volume final de 10 µl utilizando: 10 ng de DNA; 10 pmol de cada iniciador LITSR 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3' e L5.8S 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3'; 0,2µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); e 1U de GoTaq® DNA polimerase em tampão apropriado (Promega). O DNA foi desnaturado a 95°C por 10 min e amplificado com 34 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 45 s, e 72°C por 7 min para extensão final, sendo este protocolo adaptado de El Tai et al (2000). Como controles positivos da técnica foram utilizados o DNA de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904) e *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo, sendo o tamanho esperado do fragmento amplificado de ~320 pb.

3.6. Sequenciamento e análise das sequências

Os fragmentos amplificados para o marcador ITS-1 foram purificados por precipitação do DNA, adicionando-se 100 µl de isopropanol 70% com posterior centrifugação a 14.000 X g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol gelado a 70%, a partir de centrifugação a 14.000 X g por cinco min. Após descarte do sobrenadante e evaporação do álcool residual foi adicionado 18 µl de água ultrapura ao precipitado. Os produtos purificados foram quantificados por espectrofotometria no equipamento Picodrop Microliter Uv/Vis Spectrophotometer. A reação de sequenciamento foi preparada utilizando 50 ng de cada produto e o Kit Big Dye 3.1 (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Após precipitação para a retirada de iniciadores e nucleotídeos não incorporados, a leitura das sequências foi realizada no sequenciador 3500 Genetic Analyser[®] (Thermo Fisher Scientific), existente no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC. Sequências consenso foram obtidas e avaliadas quanto a sua qualidade com o uso do programa phredPhrap (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>). As sequências com qualidade de Phred > 20 foram alinhadas utilizando o software Clustal Omega, disponível online no site <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

3.7. Caracterização das cepas de *L. infantum* a partir da técnica de Análise de sequências multilocus (MLSA)

Para avaliar a variabilidade genética das cepas de *L. infantum* relacionadas aos casos de LV, e visando correlacionar os resultados obtidos com cepas de outros estados, utilizou-se um painel de 12 marcadores já testados para avaliar variabilidade genética em outras espécies de *Leishmania* (MAURICIO et al., 2006; ZEMANOVÁ et al., 2007b). Este painel inclui os genes: 5' A2rel (A2P); Manose fosfato isomerase (MPI); Alanina aminotransferase (ALAT); Ácido graxo/esfingolípido δ -4 denaturase (FAD); Serina/treonina proteinoquinase (STK); Enzima ativadora de ubiquitina (UBE1); Fator de splicing 3B subunidade 1 (SF3B1); Isocitrato desidrogenase (ICD); Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); Aspartato aminotransferase (ASAT); Serina protease tipo rombóide (RSP); e Manosil transferase (MTF). As reações foram preparadas para um volume final de 20 µl

contendo 10 - 50 ng de DNA; 20 pmol de cada iniciador (senso e antissenso) (exceto para MTF para o qual foi utilizado 5 pmol); 0,2µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); e 2U de GoTaq® DNA polimerase em tampão apropriado (Promega). As sequências dos iniciadores e as condições térmicas de amplificação para cada marcador estão apresentadas no quadro 2.

Quadro 2: Pannel de iniciadores utilizados para amplificação dos 12 marcadores MLSA de *L. infantum*.

Marcador	Sequência dos iniciadores	Tamanho fragmento amplificado	Condições de amplificação
A2P	F 5' ATGCTCCACGCCATGTTAAG3'	600 pb	95°C por 10 min 30 ciclos: 94°C por 1 min
	R 5' ACGACAGCGTCCACGAAAG3'		
MPI	F 5' ATGCTCTGAGCTCGTAAAGCT3'	1266 pb	55°C por 1 min 72°C por 90 s
	R 5' CTACCTGTGCTCAAGTC3'		
ALAT	F 5' ATTAACAAGCTCGACCACGG3'	658 pb	Extensão final 72°C por 5 min
	R 5' TCATCAACTGCCGTTTACA3'		
FAD	F 5' AGACACAGAGTGGGAAGTGG3'	500 pb	95°C por 10 min 30 ciclos: 94°C por 1 min 58°C por 1 min 72°C por 90 s Extensão final 72°C por 5 min
	R 5' GTGATGCTCAGCGTGGTAAG3'		
STK	F 5' CGGCCTTTTTGAAAGAGAGA3'	576 pb	
	R 5' CAGAAAACGAAAAGCGCAAG3'		
UBE1	F 5' TCTTGAGCGCAATCATGAAC3'	483 pb	
	R 5' TCACGTAAGTCTCCAACCTG3'		
SF3B1	F 5' GTCATCGCCAAGAAAATTCG3'	450 pb	
	R 5' ATTCTTAGCCAGCAGCTCCA3'		
ICD	F 5' ATGTTCCGCCATGTTTCGGC3'	1308 pb	
	R 5' TTACGCGCTCATCGCCTT3'		
G6PDH	F 5' ATGTCGGAAGAGCAGTCT3'	1689 pb	
	R 5' TCACAGCTTGTTCGACGGAA3'		
ASAT	F 5' GATTTCGAGGGCATGAAGAA3'	568 pb	
	R 5' CAATCTGTTGATGACGTGC3'		
RSP	F 5' CGAGGAAGAGGATCATGACG3'	500 pb	95°C por 10 min 30 ciclos: 94°C por 1 min 60°C por 1 min 72°C por 90 s
	R 5' CATGAGCAGCAGCACTAGCA3'		

			Extensão final 72°C por 5 min
MTF	F 5'ATCTTCATGCCCTCCTCGTA3'	500 pb	95°C por 10 min seguido por
	R 5'TCGAGCTTCAAGTGGGAGGA3'		30 ciclos: 94°C por 1 min 62°C por 1 min 72°C por 90 s Extensão final 72°C por 5 min

Os produtos de PCR obtidos do painel de MLSA foram avaliados quanto à presença de banda única a partir de eletroforese em gel de agarose a 1%. Posteriormente, os produtos foram purificados por precipitação do DNA utilizando isopropanol 70% conforme descrito no item 3.6. Os produtos purificados foram quantificados por espectrofotometria no equipamento Picodrop Microliter Uv/Vis Spectrophotometer e encaminhados para sequenciamento no equipamento Abi3130 na empresa Myleus Biotecnologia.

3.8. Análise comparativa das sequências de MLSA das cepas de *L. infantum*

Além das sequências obtidas a partir de amplificação por PCR, as sequências dos 12 marcadores de MLSA da cepa JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877) isolada na Espanha foram obtidas do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) e utilizadas como referências para obtenção das sequências de outras cepas. As sequências dos marcadores foram obtidas para 12 cepas de *L. infantum* de outros estados brasileiros (Quadro 3) a partir de dados genômicos gerados por Illumina e disponibilizados pela Dra. Elisa Cupolillo do Instituto Oswaldo Cruz. Primeiramente, as sequências foram avaliadas quando a sua qualidade a partir do programa FastQC, e aquelas com baixa qualidade ($Q\text{-score} < 30$) foram removidas utilizando o programa Trimmomatic. De posse de sequências com boa qualidade, os *reads* foram mapeados nas sequências referência dos marcadores: A2P, ALAT, ASAT, FAD, G6PDH, ICD, MPI, MTF, RSP, SF3B1, STK e UBE1, utilizando o programa bowtie2. O alinhamento SAM gerado foi convertido para formato BAM, e a cobertura de reads que geraram cada alinhamento foi avaliada utilizando o mpileup (SAMTools). As variantes no alinhamento foram avaliadas utilizando o programa

bcftools. Em seguida, foram obtidas as seqüências consenso geradas pelo agrupamento dos *reads* utilizando o programa seqtk. Nucleotídeos pontuais com qualidade $Q\text{-score} < 30$ foram substituídos por “N”. Todos esses procedimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Glauber Wagner (MIP/CCB/UFSC).

Esse mesmo procedimento foi realizado para quatro cepas isoladas de amostras de Florianópolis (Loba, Nick, Luma e PC) as quais tiveram seu genoma sequenciado após extração do DNA com o KitDNeasy Blood & Tissue (Qiagen). As seqüências destas cepas foram geradas no equipamento HiSeq (Illumina) a partir de bibliotecas *paired-end* no National Genomics Infrastructure (NGI) do Karolinska Institutet (Sweden) (Quadro 4).

As seqüências de cada marcador para todas as cepas foram alinhadas utilizando o software Clustal Omega.

Quadro 3: Descrição das cepas de *Leishmania infantum* de diferentes localidades utilizadas no presente estudo.

Cepa	Hospedeiro	Origem
2666_C_MS	<i>Canis familiaris</i>	Mato Grosso do Sul
3135_C_MT	<i>Canis familiaris</i>	Mato Grosso
2919_C_DF	<i>Canis familiaris</i>	Distrito Federal
3177_C_RN	<i>Canis familiaris</i>	Rio Grande do Norte
3186_C_RN	<i>Canis familiaris</i>	Rio Grande do Norte
3196_C_RS	<i>Canis familiaris</i>	Rio Grande do Sul
3256_C_SP	<i>Canis familiaris</i>	São Paulo
3257_C_SP	<i>Canis familiaris</i>	São Paulo
3379_C_MG	<i>Canis familiaris</i>	Minas Gerais
3381_C_MG	<i>Canis familiaris</i>	Minas Gerais
2972_H_PI	<i>Homo sapiens</i>	Piauí
2788_H_ES	<i>Homo sapiens</i>	Espírito Santo
MCAN/ES/98/LLM-877	<i>Canis familiaris</i>	Madrid, Espanha

Quadro 4: Características gerais dos dados dos genomas das quatro cepas de *L. infantum* de Florianópolis obtidos por Illumina HiSeq.

Cepa	Hospedeiro	Total Reads	Reads qualidade >= 30 (%)
LVC FL 0025	<i>Canis familiaris</i>	34277744	29781814 (86)
LVC FL 0028	<i>Canis familiaris</i>	30967162	27025889 (87)
LVC FL 0034	<i>Canis familiaris</i>	73200564	41577166 (87)
LVH FL 0001	<i>Homo sapiens</i>	39985906	35267204 (88)

3.9. Mapas de distribuição dos casos

Os mapas relacionados aos casos de LVC em Florianópolis foram produzidos com base nos dados publicados no site do CCZ do município do período de 2010 a 2017, os quais foram compilados em tabela única. Foram selecionados apenas os dados que relacionavam o número de casos a cada localidade, excluindo-se os que apresentavam a quantidade de casos referentes a diferentes bairros de forma conjunta. Optou-se por utilizar apenas os dados que relacionavam casos/bairro para evitar inacurácia da representação gráfica. O mapa referente aos casos humanos foi produzido conforme dados fornecidos pelos hospitais nos quais os pacientes foram tratados.

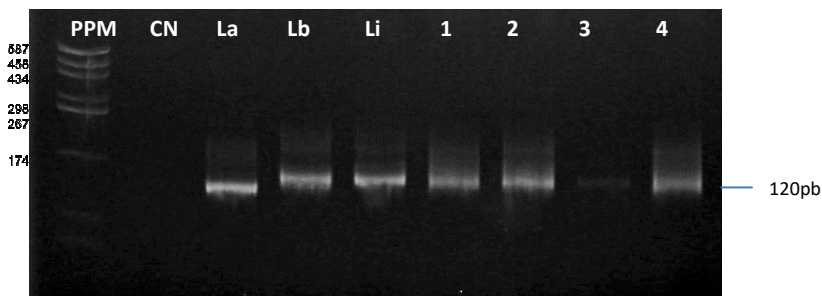
4. Resultados

4.1. Isolamento e diagnóstico molecular das amostras caninas e humanas

Das 60 amostras enviadas ao Laboratório de Protozoologia pelas instituições responsáveis, sendo 58 caninas e 2 humanas, em 43 foi possível realizar o isolamento da *Leishmania* em cultura, o que corresponde a 72% do total de amostras utilizadas no estudo.

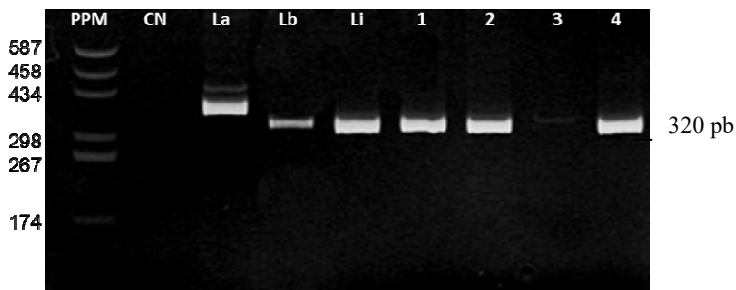
Todas as amostras provenientes dos cães e humanos, incluindo as com isolamento realizado e com DNA extraído a partir de tecido, apresentaram amplificação da região de kDNA de *Leishmania* sp. (Figura 6).

Figura 6: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do kDNA de *Leishmania* sp. de amostras caninas e humanas com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral de Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com HaeIII); CN: Controle negativo; La: *L. amazonensis*; Lb: *L. braziliensis*; Li: *L. infantum*; 1: isolado de caso humano; 2: isolado de caso canino; 3: extração de DNA de tecido – pele; 4: extração de DNA de tecido - linfonodo.



Para a confirmação da espécie de *Leishmania* todas as amostras foram submetidas à amplificação do marcador ITS-1, sendo que 100% das amostras humanas e 79% das amostras caninas apresentaram a amplificação de uma banda condizente com o tamanho esperado teórico (Figura 7). Dentre as doze amostras negativas para ITS-1, nove são referentes a amostras com DNA extraído diretamente a partir de tecido. Para essas amostras o DNA foi novamente extraído, tanto do mesmo tecido extraído originalmente quanto de outros, visando reduzir a quantidade de contaminantes de reação. No entanto, o resultado permaneceu negativo para todas as amostras.

Figura 7: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do marcador ITS-1 de *Leishmania* sp. de amostras caninas e humanas com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral de Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com HaeIII); CN: Controle negativo; La: *L. amazonensis*; Lb: *L. braziliensis*; Li: *L. infantum*; 1: isolado de caso humano; 2: isolado de caso canino; 3: extração de DNA de tecido – pele; 4: extração de DNA de tecido - linfonodo.



Após sequenciamento dos produtos de PCR de ITS-1 e comparação das seqüências com as das cepas utilizadas como controle, identificou-se 100 % de identidade de todas as amostras com a seqüência referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) (Figura 8). No entanto, apesar da variabilidade na seqüência de ITS-1 permitir a diferenciação entre as espécies de *Leishmania* sp., não foi possível verificar nenhuma variabilidade intraespecífica nas seqüências de ITS-1 das amostras de *L. infantum* de Florianópolis.

4.2. Variabilidade genética das cepas de *L. infantum*

Inicialmente, duas cepas isoladas de amostras caninas foram escolhidas para a padronização da amplificação do painel de MLSA para *L. infantum*. Todos os marcadores foram amplificados nos tamanhos esperados nas duas amostras (Figura 9). Não foi observada diferença entre as duas cepas e entre as concentrações de DNA testadas. Algumas bandas inespecíficas puderam ser observadas para os marcadores SF3B1, ICD e STK. Para esses marcadores as quantidades de iniciadores e temperaturas de ligação dos iniciadores foram ajustadas resultando em amplificação específica. A partir dessa padronização todos os marcadores foram amplificados com sucesso em quatro cepas (Figura 10). Dentre essas cepas foram incluídas três isoladas a partir de amostras caninas de diferentes localidades e uma de origem humana.

Figura 8: Alinhamento representativo das sequências obtidas de ITS-1 das amostras caninas e humanas diagnosticadas com leishmaniose visceral em Florianópolis, SC. As sequências dos controles *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* foram alinhadas com todas as sequências obtidas, sendo aqui demonstrado apenas duas sequências obtidas a partir de amostras caninas (Cão 1 e 2) e uma humana. Os asteriscos representam nucleotídeos idênticos na mesma posição.

```

          10      20      30      40      50      60
L. braziliensis  TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAA--ACATACAA--CTCGGGGAGGCT
L. amazonensis TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAAACATATACAAAACCTCTCGGGGAGACC
L. infantum    TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAAACATATACAAA--CTCGGGGAGACC
Cão1           TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAAACATATACAAA--CTCGGGGAGACC
Cão2           TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAAACATATACAAA--CTCGGGGAGACC
Humano         TTCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAAACATATACAAA--CTCGGGGAGACC
*****
          70      80      90      100     110     120
L. braziliensis  TGTGT-TTTCTA-GCAAGCCTTTCCCACAGATACGCAATACACTATATATATATATATAT
L. amazonensis TATTT-TTTCGATAGGCGCCTTTCCCACACATACACAGCAAGT-----TTGTACTC
L. infantum    TATGTATATATATGTAGGCCTTTCCCAC--ATACACAGCAAGT-----TTGTACTC
Cão1           TATGTATATATATGTAGGCCTTTCCCAC--ATACACAGCAAGT-----TTGTACTC
Cão2           TATGTATATATATGTAGGCCTTTCCCAC--ATACACAGCAAGT-----TTGTACTC
Humano         TATGTATATATATGTAGGCCTTTCCCAC--ATACACAGCAAGT-----TTGTACTC
* * * * *
          130     140     150     160     170     180
L. braziliensis  ATAGACACAACATACAGT---AGAAAAAGGCCGATCGACGT--TAACATAT---CGC
L. amazonensis AAAAAACACATTTGCAGTAAACA AAAAATGGCCGATCGACGTTATACGCCACAACCGCT
L. infantum    AAA-----ATTTGCAGTA---AAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCAC---CGC
Cão1           AAA-----ATTTGCAGTA---AAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCAC---CGC
Cão2           AAA-----ATTTGCAGTA---AAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCAC---CGC
Humano         AAA-----ATTTGCAGTA---AAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCAC---CGC
* * * * *
          190     200     210     220     230     240
L. braziliensis  GTATACAAC-----AAAAAGTTCGTTC-----TAACGGC--TTT---TTTT
L. amazonensis ATATACAAAAGCAGAGAAAAATGCCCGTT-----CAATACGGCGTTTCCGTTTT
L. infantum    CTATACAAAAGC---AAAAATGTCGGTTTATACAAAATAATACGGCG--TTTCGGTTTT
Cão1           CTATACAAAAGC---AAAAATGTCGGTTTATACAAAATAATACGGCG--TTTCGGTTTT
Cão2           CTATACAAAAGC---AAAAATGTCGGTTTATACAAAATAATACGGCG--TTTCGGTTTT
Humano         CTATACAAAAGC---AAAAATGTCGGTTTATACAAAATAATACGGCG--TTTCGGTTTT
*****
          250     260     270     280     290     300
L. braziliensis  TGGCG-----GCGTGCCTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
L. amazonensis TGGGCGGGGGGGTGCCTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
L. infantum    TGGCG--GGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
Cão1           TGGCG--GGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
Cão2           TGGCG--GGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
Humano         TGGCG--GGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACT
* * *
          310     320     330     340     350
L. braziliensis  GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
L. amazonensis GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
L. infantum    GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
Cão1           GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
Cão2           GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
Humano         GGCTTCCTATTTCGTTGARGAACGCGTAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
*****

```

Figura 9: Produtos de amplificação por PCR dos 12 marcadores de MLSA de *Leishmania infantum*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. HMW: Padrão de tamanho molecular HMW (fago lambda digerido com *Pst*I); CN: Controle negativo; C1-C2: DNA de cepas de *L. infantum* 10 ng e 50 ng.

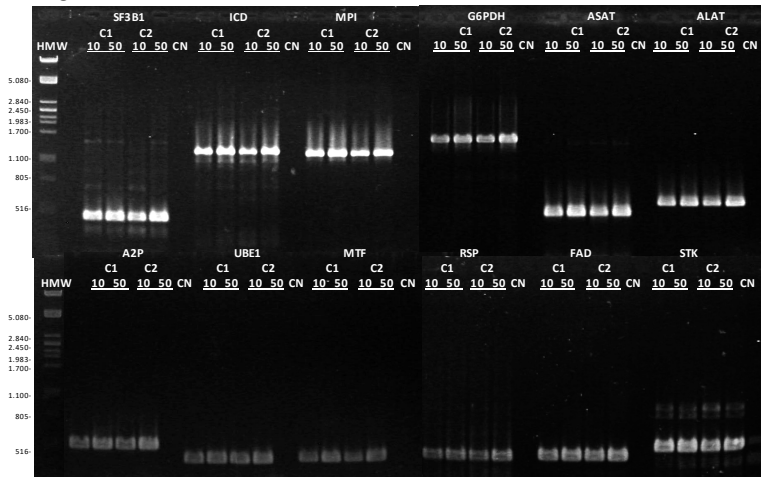
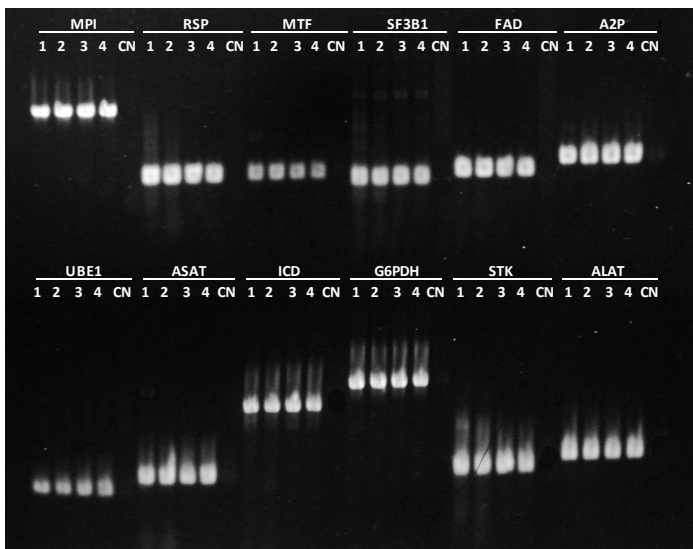


Figura 10: Produtos de amplificação por PCR dos 12 marcadores de MLSA de *Leishmania infantum* de quatro cepas de *L. infantum* isoladas em Florianópolis, SC. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. CN: Controle negativo; 1-4 DNA das cepas (1) LVC FL 0007; (2) LVC FL 0050; (3) LVC FL 0057 e (4) LVH FL 0001.

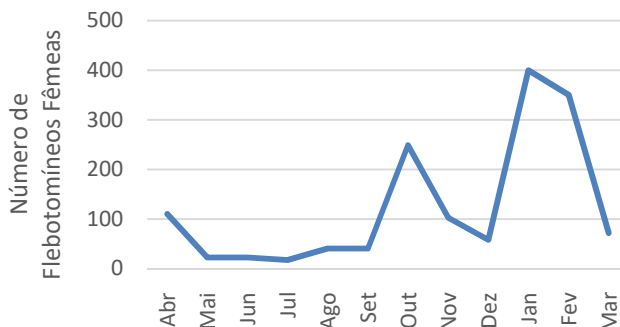


Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento utilizando apenas o iniciador senso de cada marcador. As sequências dos marcadores ICD e FAD foram de baixa qualidade para todas as amostras e estes marcadores foram desconsiderados nas análises comparativas subsequentes. Os alinhamentos foram gerados para os demais marcadores e nenhuma diferença foi encontrada entre as cepas para nenhum dos marcadores analisados (Apêndice).

4.3. Dados epidemiológicos e diagnóstico molecular das amostras de flebotomíneos

Das 15 coletas de insetos, uma ocorreu na localidade de Ratoles com zero (0) insetos coletados devido ao mau tempo; uma ocorreu na Lagoa do Peri, e rendeu 12 flebotomíneos, os quais foram utilizados inteiros para o preparo de lâminas; e 13 coletas ocorreram no bairro Pantanal, totalizando 1.192 flebotomíneos fêmeas (Figura 11). Nessa localidade observa-se que as coletas contendo o maior número de indivíduos concentraram-se nos meses mais quentes, do início da primavera ao final do verão, com queda significativa na obtenção de indivíduos no período de outono e inverno.

Figura 11: Distribuição do número de flebotomíneos fêmeas coletados na localidade do bairro Pantanal, Florianópolis SC, ao longo do período de 1 ano (abril de 2016 a março de 2017).



Das mais de mil fêmeas, 425 foram identificadas e correspondem as seguintes espécies: *Pi. fischeri*, *Ny. neivai*, *Mg. migonei*, *Evandromyia (Barrettomyia) petropolitana*, *Brumptomyia* spp. e *Psathyromyia* série lanei. Essas as espécies foram coletadas no Pantanal,

já na Lagoa do Peri foram observadas apenas as três primeiras espécies descritas. A espécie mais frequente foi *Pi. fisheri* que correspondeu a 58,52% das fêmeas identificadas.

Devido à grande quantidade de indivíduos e a proposta do trabalho de utilizar extrações individuais, apenas uma parte dos insetos coletados teve o seu DNA extraído, totalizando 365 insetos. Após a extração individual, 37 grupos contendo cerca de dez indivíduos foram criados, cada qual com a mistura de DNAs de cada indivíduo previamente extraído. Dos 37 grupos, 18 foram positivos na PCR (kDNA) confirmatória para a presença de *Leishmania* sp. (Figura 12). O DNA de cada indivíduo pertencente a cada grupo positivo foi também submetido a PCR para verificar quantos e quais indivíduos de cada grupo eram positivos para *Leishmania* sp. Identificou-se um total de 31 flebotomíneos fêmeas positivas para *Leishmania* sp., sendo correspondente a 8,5% dos insetos avaliados. Indivíduos das espécies *Pi. fisheri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai* foram identificados como positivos para *Leishmania* sp.

Os positivos seguiram então para amplificação do marcador ITS-1 (Figura 13), visando à identificação da espécie de *Leishmania* por sequenciamento. Houve amplificação da região de ITS-1 em todos os indivíduos com kDNA positivo, no entanto o sequenciamento ainda não foi realizado.

Figura 12: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR duplexdo kDNA de *Leishmania* sp. e gene da cacofonia a partir dos pools de flebotomíneos fêmeas coletados no bairro do Pantanal, Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com *Hae*III); CN: Controle negativo; Li+Fleb: DNA de *L. infantum* e DNA de flebotomíneo macho; 1 a 10: grupos contendo mistura de DNA de 10 flebotomíneos fêmeas. O produto de 220 pb corresponde ao gene da cacofonia utilizado como controle da qualidade do DNA extraído de flebotomíneos.

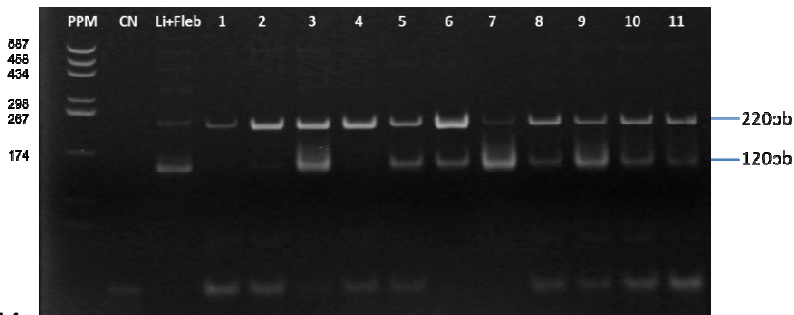
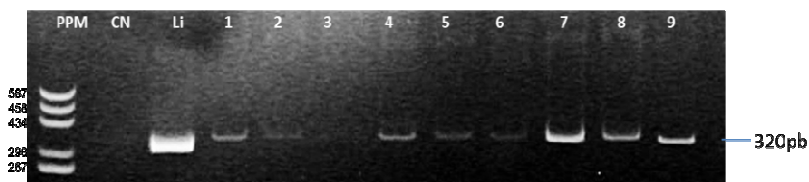


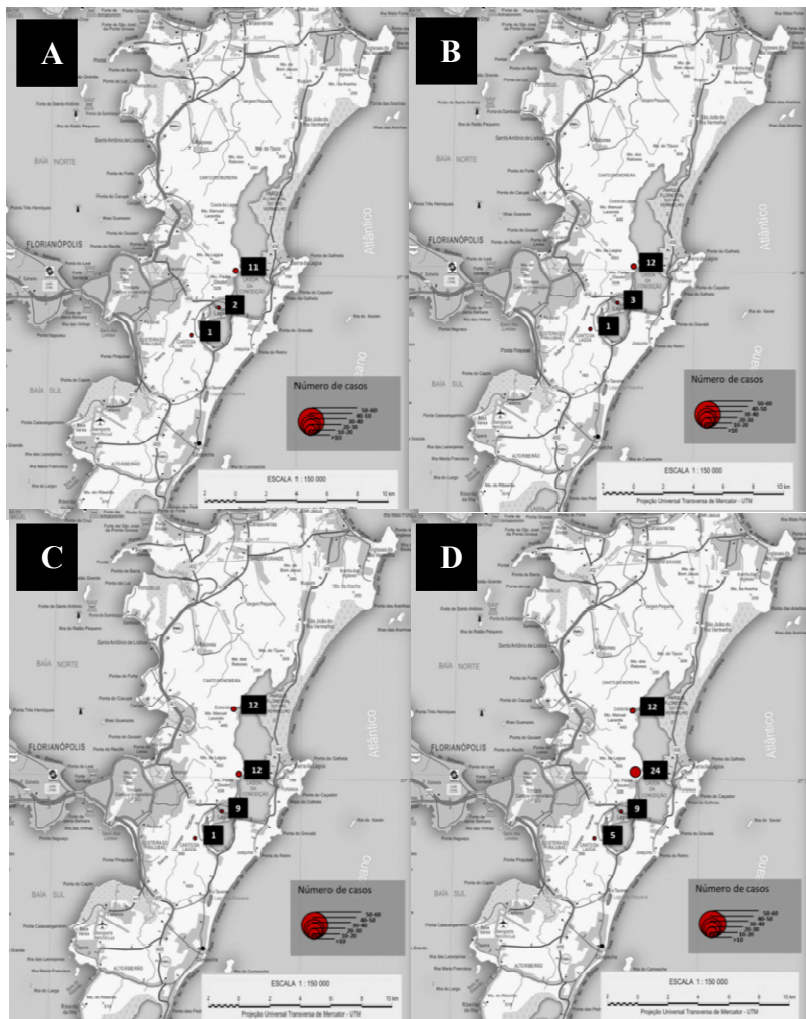
Figura 13: Imagem representativa dos produtos de amplificação por PCR do ITS-1 de *Leishmania* sp. utilizando as amostras individuais de flebotomíneos fêmeas coletados no bairro do Pantanal, Florianópolis, SC. Gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo. PPM: Padrão de peso molecular (pUC18 digerido com *Hae*III); CN: Controle negativo; Li: *L. infantum*; 1-9: flebotomíneos fêmeas de grupo previamente identificado como positivo para o parasito pesquisado.



4.4. Distribuição dos casos de LVC na região de Florianópolis ao longo dos anos

A partir dos dados obtidos relativos aos casos de LVC, procedeu-se ao preparo de mapas para verificar a expansão da LV em Florianópolis a partir de 2010, a qual é possível observar na figura 14. Os casos referentes aos indivíduos cujos materiais foram enviados para o Laboratório de Protozoologia estão dispostos na figura 15.

Figura 14: Mapas de distribuição e de número acumulado dos casos de LVC em Florianópolis. A: 2010; B: 2010-2011; C: 2010-2012; D: 2010-2013; E: 2010-2014; F: 2010-2015; G: 2010-2016; H: 2010-2017.



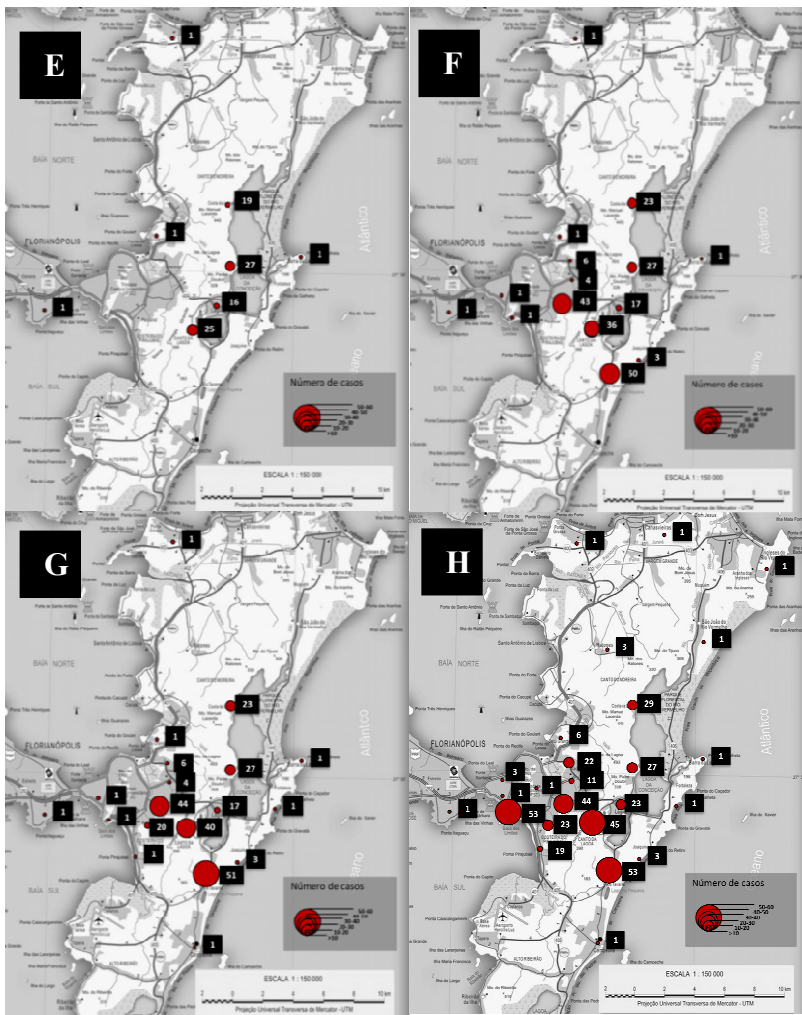


Figura 15: Mapas de distribuição dos casos de LVC em Florianópolis cujo material está disponível no laboratório de Protozoologia.



5. Discussão

A LV era considerada no Brasil como uma doença silvestre ou rural até a década de 1980, assumindo nos dias atuais também uma característica urbana e periurbana. Dentre os fatores desencadeantes do processo de urbanização da LV, ressaltam-se o intenso êxodo rural que contribui para formação de grandes adensamentos populacionais nas periferias das cidades e as ações antrópicas no ambiente que levam a desestabilização dos ecótopos naturais de transmissão, favorecendo a aproximação de vetores e reservatórios (LAINSON; RANGEL, 2005; BRASIL, 2006). Entretanto, o conhecimento sobre as causas desta intensa transmissão em ambientes urbanos ainda é insuficiente, o que dificulta o desenvolvimento de novas estratégias de controle, capazes de produzir impacto epidemiológico sobre a ocorrência dessa doença, impedindo a expansão de focos antigos e a emergência de novos focos para outros centros urbanos (DESJEUX, 2001; 2004).

Até 2008, a LV era considerada um problema, sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. No entanto atualmente não há mais estados no país sem registros de casos autóctones de LV. Essa disseminação espacial e aumento de incidência da LV no Brasil veio

somada à alta mortalidade em algumas regiões que não vivenciavam a doença, como é o caso do sul do Brasil (PAHO, 2017).

A expansão desordenada das cidades, assim como mudanças climáticas, também pode estar relacionada ao aparecimento da doença em regiões onde não ocorriam anteriormente, como Florianópolis e Porto Alegre. Pelas características dessas cidades em possuir regiões de fragmentos de mata, acredita-se que o vetor da LV seja de hábito silvestre e que está se adaptando à zona urbana à medida que as cidades avançam para a mata. Além disso, a ocupação dessas cidades levando ao desmatamento e a avanço da construção de habitações em região de borda de mata, levam a consequente redução dos animais silvestres que normalmente fazem parte da alimentação do vetor, e facilitam o contato das fêmeas de flebotomíneos com animais domésticos e com o próprio homem (BANETH et al, 2008; MONTEIRO et al, 2005; REITHINGER; DAVIES, 2002). Além disso, uma das proteções que a região sul tinha contra a expansão do inseto vetor era o inverno rigoroso, fator que não é mais tão bem definido pelas alterações climáticas percebidas nos últimos anos (MENDONÇA, 2006). Outro fator relevante no contexto da doença é o fluxo migratório urbano que favorece a dispersão geográfica da doença, pois as pessoas transportam seus cães de áreas endêmicas para outras áreas, muitas vezes sem saber que o animal está infectado.

Nesse sentido, um fator que contribui para a disseminação da doença é o fato dos hospedeiros poderem permanecer assintomáticos durante longos períodos de tempo (ASLAN et al., 2016). Além disso, o diagnóstico clínico de LV é bastante complexo, pois diversas características são compartilhadas com outras doenças de etiologias distintas (KOHANTEB; ARDEHALI, 2005; ALVES et al., 2012). Esse fato também é um problema quando se trata de utilização de métodos sorológicos no diagnóstico, que precisam ser específicos e sensíveis, normalmente utilizando-se um método de triagem e um confirmatório.

O diagnóstico molecular das cepas de *Leishmania sp.* é utilizado como uma medida confirmatória ao diagnóstico sorológico de leishmaniose. Várias técnicas moleculares podem ser utilizadas para essa finalidade, incluindo principalmente a PCR para distintos marcadores como kDNA, ITS-1, SSUrRNA e HSP70, bem como outras técnicas como MLSA, MLMT e MLEE (TAVARES et al., 2003). OPCR direcionado para o kDNA é bastante utilizado para identificação a nível de gênero, sendo os demais marcadores e técnicas utilizados para a identificação a nível de espécie (LASKAY et al., 1995). No presente

trabalho, as amostras caninas e humanas utilizadas já possuíam diagnóstico sorológico para leishmaniose, no entanto os resultados das PCRs de ITS-1 e kDNA permitiram não só confirmar o diagnóstico prévio em 100% das amostras (kDNA +), mas também assegurar que *L. infantum* era a espécie responsável pelos casos de LCV e LVH de Florianópolis. O marcador ITS-1 foi amplificado por PCR em mais de 80% das amostras, sendo a maioria dos resultados negativos referentes a extrações de DNA provenientes de tecido e não de culturas isoladas do parasito. Os resultados encontrados em nosso estudo utilizando tecidos foram semelhantes aos encontrados em PCR do mesmo tipo de amostra por LOPES (2014).

Outro resultado importante foi que em 81% das amostras foi possível isolar o parasito. O isolamento em meio de cultura é considerado padrão ouro no diagnóstico, pois além de confirmar o diagnóstico clínico, preserva o parasito isolado para utilização em outros estudos, facilitando a identificação de espécies de *Leishmania* por métodos moleculares e permitindo as análises de variabilidade genética (IHALAMULLA et al., 2005; VEGA-LÓPEZ, 2003).

Embora pareça desnecessário confirmar que *L. infantum* seja a espécie causadora de LV, a confirmação dessa espécie em Florianópolis é fundamental uma vez que se trata de uma região com características únicas de transmissão, sobretudo pela ausência do principal vetor desta espécie do parasito. Além disso, a espécie *L. amazonensis*, conhecida por causar leishmaniose cutânea e cutâneo disseminada, já foi isolada de humanos e cachorros com forma clínica visceral (LAINSON, SHAW, 1979; ALEIXO et al., 2006).

Apesar dos polimorfismos em ITS-1 permitirem a diferenciação específica dentro do gênero *Leishmania*, não foram encontradas diferenças entre as sequências das cepas de Florianópolis, não sendo esse um marcador de variabilidade genética.

Diversas ferramentas moleculares têm sido utilizadas na caracterização da variabilidade genética no gênero *Leishmania*, incluindo: análise do polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) (TOLEDO et al., 2002), análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) da região do ITS (CUPOLILLO et al., 2003) e kDNA (LAURENT et al., 2007); MLSA[25]; e MLMT(JAMJOOM et al., 2002; OCHSENREITHER et al., 2006; MONTOYA et al., 2007). No entanto, ainda são poucos os estudos que endereçam a estrutura populacional de *L. infantum* (FERREIRA et al., 2010, SEGATO 2012; BATISTA et al., 2012). Esses

estudos têm demonstrado que a variabilidade de *L. infantum* no Brasil é baixa, permitindo somente o agrupamento restrito de populações. Um dos estudos mais abrangentes neste sentido utilizou a técnica de MLST com 14 *loci* de microssatélites para analisar a variabilidade de mais de 150 cepas de *L. infantum* isoladas de humanos e cães de diferentes estados brasileiros e do Paraguai. Os resultados indicam uma baixa diversidade genética com perfil predominantemente clonal. Somente três populações foram identificadas, sendo uma mais dispersa e outras duas com predominância de cepas dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, respectivamente. Para essas duas populações houve uma forte associação com a presença de um vetor secundário de LV, *Lu. cruzi* (FERREIRA et al., 2012). Outros trabalhos demonstraram que quanto mais próximos geograficamente os isolados a diversidade genética fica ainda menor (SEGATTO et al, 2012; BATISTA et al, 2012).

Para *L. infantum* as análises de variabilidade, utilizando microssatélites, frequentemente apresentaram baixo número de polimorfismos (FERREIRA et al., 2012; RIBOLLA et al., 2016). Por esse motivo alguns trabalhos recentes têm aplicado a análise de PCR-RFLP do kDNA por possuir alto poder de resolução quando aplicado em estudos populacionais de cepas com proximidade genética ou geográfica (BOTILDE et al., 2006; NASEREDDIN et al., 2009; RIBOLLA et al., 2016). O uso de PCR-RFLP do kDNA permitiu analisar variabilidade entre cepas de *L. infantum* e agrupar populações em estudo feitos com cepas de diferentes biomas do estado da Bahia (CARVALHO et al., 2017), e cepas isoladas de cães em Campo Grande, Teresina e Bauru (RIBOLLA et al., 2016).

Apesar de permitir análise de diversidade genética, o uso de apenas um marcador altamente variável (kDNA) pode não necessariamente permitir agrupamentos genéticos que remetam a uma história evolutiva. Neste sentido, a técnica de MLSA permite avaliar comparativamente sequências de múltiplos *locus*, tendendo a ser mais informativa. Essa metodologia já foi utilizada com sucesso para comparar a variabilidade genética de entre espécies de *Leishmania* (EL BAIDOURI et al, 2013), entre cepas de *L. donovani* (BOITÉ et al., 2014; SOLCÀ et al., 2014) e cepas de *L. braziliensis* (MARLOW et al., 2014). No entanto nenhum estudo focando nessa técnica foi realizado com a espécie pesquisada no presente trabalho, o que trouxe dúvidas quanto à eficiência dos marcadores para comparação entre os isolados obtidos. A escolha do painel de marcadores foi totalmente baseada em

locus informativos de variabilidade em outras espécies de *Leishmania* sp. No entanto, os resultados das análises comparativas das sequências de 10 marcadores não apresentaram nenhum indício de variabilidade intraespecífica, indicando que esses não são bons marcadores para análise de variabilidade em *L. infantum*. A baixa variabilidade já era esperada conforme o que é observado em outros estudos já mencionados, no entanto, o que se acreditava era que com a escolha de outros marcadores o cenário pudesse ser diferente. As cepas incluídas em nossa análise eram representantes de 12 estados brasileiros, sendo uma delas proveniente de MT e uma de MS. No trabalho de Ferreira e colaboradores em 2012, duas das três populações formadas incluíam amostras desses estados, variabilidade esta que não foi confirmada com os marcadores utilizados na MLSA. Em relação às cepas de SC, os dados obtidos para *L. infantum* corroboram com os resultados de MLSA de cepas de *L. braziliensis*, para as quais foi encontrada elevada homogeneidade genética, sugerindo que o surgimento de *L. braziliensis* no estado de SC parece ser um evento recente (MARLOW et al., 2014).

Durante os últimos meses do presente trabalho foram enviados os DNAs de quatro cepas de Florianópolis (LVC FL 0025, LVC FL 0028, LVC FL 0034 e LVH FL 0001) para sequenciamento completo do genoma. Esses genomas serão montados e comparados com os genomas das 12 cepas de outros estados brasileiros. Com essa comparação a nível genômico pretende-se encontrar regiões polimórficas para a criação de um novo painel de MLSA. Essas informações sobre a variabilidade genética dos parasitos podem ser de grande relevância para a saúde pública, visando ao controle da transmissão. Até agora os três casos humanos tratados não apresentaram resistência ao tratamento específico, sugerindo que o controle em uma região com cepas do parasito geneticamente homogêneas seja muito mais eficiente do que em regiões onde a heterogeneidade genética do parasito é elevada. No entanto, por se tratar de uma região com ciclo de transmissão complexo, o estudo da variabilidade genética das cepas de Florianópolis em comparação as de locais que tem a presença de *Lu. longipalpis* pode trazer informações da relação parasito –vetor, que poderá ser utilizada em outras áreas de expansão da LV sem a presença de *Lu. longipalpis* como também é o caso de Porto Alegre, RS (SOUZA et al., 2017).

Em regiões onde as principais espécies de flebotomíneos relacionados à propagação da doença não estão presentes, faz-se necessário o estudo das espécies locais e a pesquisa por insetos infectados com *Leishmania* sp.. Outro fator importante é a avaliação da

capacidade vetorial dos mesmos, através da identificação de infecção dos flebotomíneos por parasitos do gênero *Leishmania*, da colonização e permanência dos parasitos no sistema digestório do inseto, assim como a presença de promastigota metacíclicas, a forma infectiva para mamíferos. Isso se faz necessário, pois o fato de estarem infectados com o parasito não significa que sejam capazes de transmiti-lo para o hospedeiro (DANTAS-TORRES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2016; MORICONI et al., 2017).

No catálogo taxonômico da fauna brasileira está registrada a ocorrência de 16 espécies de flebotomíneos no estado de Santa Catarina (SHIMABUKURO et al., 2018), incluindo: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia nitzulescui*, *Brumptomyia troglodytes*, *Evandromyia (Barrettomyia) edwardsi*, *Expapillata firmatoi*, *Martinsmyia alphabetica*, *Migonemyia (Migonemyia) migonei*, *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia (Pifanomyia) monticola*, *Pintomyia (Pintomyia) fischeri*, *Pintomyia (Pintomyia) pessoai*, *Psathyromyia (Psathyromyia) lanei*, *Psathyromyia (Psathyromyia) pelsoni*, *Psychodopygus ayrozai*, *Psychodopygus geniculatus* e *Sciopemyia microps*. Dessas espécies, cinco foram registradas no presente estudo e a espécie *Evandromyia (Barrettomyia) petropolitanateve* no presente trabalho o primeiro registro na região sul do Brasil.

Apesar do número de coletas ter sido limitado para avaliar sazonalidade, a ocorrência de um maior número de indivíduos na primavera e verão está de acordo com a literatura. Vários registros apontam que os flebotomíneos são mais comumente encontrados nos meses mais quentes do ano (DE OLIVEIRA et al., 2016; GAGLIO et al., 2014; GÓES; MELO; JERALDO, 2012; SAGHAFIPOUR et al., 2016; SARAIVA et al., 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o clima afeta diretamente a epidemiologia das leishmanioses. Mudanças climáticas referentes à umidade, chuvas e temperatura podem afetar a ocorrência e distribuição dos insetos vetores, bem como dos animais reservatórios da doença. Em áreas tropicais, a população de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos, pois é a alta umidade resultante das primeiras chuvas que proporciona a eclosão das pupas (ALMEIDA et al., 2010). Por outro lado, usualmente se registra uma redução populacional durante longos períodos secos (ANDRADE, 2010), resultando um complexo dependente de fatores bióticos, físicos e ambientais para encontrar esses insetos (LEWIS, 1974). Além disto, flutuações sensíveis na temperatura podem afetar o ciclo biológico das formas promastigotas nos invertebrados (SHERLOCK, 2003).

Das seis espécies de flebotomíneos identificadas no bairro do Pantanal com registro de inúmeros casos de LVC, indivíduos de três espécies (*Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai*) foram positivos na PCR para o kDNA de *Leishmania* sp.. Os iniciadores descritos por Volpini et al, 2004 permitem a identificação da presença de DNA de parasitos do gênero *Leishmania* sp.. No entanto, embora o PCR para ITS-1 tenha confirmado essa informação, apenas o sequenciamento do produto permite a diferenciação específica e este procedimento ainda não foi realizado por problemas técnicos.

Dias et al. (2013) realizaram em 2010 uma pesquisa de flebotomíneos na Lagoa da Conceição, localidade do surto inicial de LVC em Florianópolis. Das 11 espécies identificadas nas coletas, as mesmas três encontradas no presente trabalho foram descritas como positivas para a presença de *Leishmania* sp., no entanto a infecção por *L. infantum* só foi confirmada em *Ny. neivai*. Essas três espécies são descritas como vetores de LC no Brasil (PITTA-PEREIRA et al. 2005, 2009, ROCHA et al. 2010, OLIVEIRA et al. 2011). Estudos em áreas de ocorrência de LC em SC apontam *Ny. neivai* como a espécie de flebotomíneo mais abundante (MARCONDES et al., 2005; TORMEN, DO NASCIMENTO, 2006; PORTES, 2008) e no município de Balneário Piçarras esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis*, sugerindo sua importância no ciclo de transmissão de LC em SC (MARCONDES et al., 2009).

Ny. neivai também foi encontrada infectada por *L. infantum* em uma área sem casos registrados de LV em Minas Gerais (SARAIVA et al. 2009). A presença de *L. infantum* também foi descrita em fêmeas de *Mg. migonei* no estado de Pernambuco e na Argentina (CARVALHO et al. 2010, SALOMÓN et al. 2010). No entanto, os estados de MG e PE também apresentam registros da principal espécie vetor de LV (SHIMABUKURO et al., 2018). Neste contexto, o município de Porto Alegre tem registrado diversos casos de LVC e LVH desde 2010 e o levantamento da fauna flebotomínica em vários bairros da cidade reforçam a ausência do vetor clássico *Lu. longipalpis* e a presença de espécies como *Ps. lanei*, *Lutzomyia gaminarai*, *Brumptomyia* sp., *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai* (SOUZA et al., 2015; 2017), sendo este um cenário epidemiológico semelhante ao de Florianópolis. Dentre as espécies descritas, exemplares de *Pi. fischeri* coletados em Porto Alegre foram positivos para *L. infantum* a partir de PCR (SOUZA et al., 2015). Dados mais recentes de Porto Alegre, após três casos humanos em bairros muito próximos, destacaram a ocorrência e prevalência de *Pi.*

fischeri e *Mg. migonei* nestas localidades e ausência de *Ny. neivai*, sendo esta a mais prevalente nos bairros com alta transmissão de LC. Outro fato importante é que nesses bairros as duas espécies foram também encontradas no intra e peridomicílio (SOUZA et al., 2017).

Pi. fischeri e *Mg. migonei* são espécies consideradas com notável grau de antropofilia (RANGEL; LAINSON, 2003), que podem ser capturadas em matas residuais, em anexos de animais domésticos e paredes internas do domicílio humano (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). O município de Florianópolis aponta para a maior ocorrência de casos de LVC em áreas de borda de mata, havendo provavelmente uma estreita relação do vetor com estas condições ambientais.

Guimarães et al. (2016) classificaram *Mg. migonei* como uma das espécies de flebotomíneos permissivas a várias espécies de *Leishmania* demonstrando a partir de alguns estudos laboratoriais que ela é altamente suscetível ao desenvolvimento de *L. infantum*, e concluíram que estas informações, juntamente com a sua conhecida antropofilia, abundância em focos da LV e exemplares com infecção natural por *L. infantum*, constituem importantes evidências de que esta deve ser outra espécie de vetor desse parasito na América Latina. Já Galvis-Ovallos e colaboradores (2017) demonstraram a grande atração de *Pi. fischeri* para alimentação em cães, sua suscetibilidade para infecção por *L. infantum*, alta expectativa de vida mesmo infectado pelo parasito e predominância em algumas áreas de SP sem captura de *Lu. longipalpis*. Nesse estudo foram comparadas as características acima para *Lu. longipalpis*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* e a conclusão foi que a capacidade vetorial de *Pi. fischeri* é 45 vezes maior que a de *Mg. migonei*, sendo mais provável que *Pi. fischeri* seja o vetor de LV em áreas sem *Lu. longipalpis*. No presente estudo, onde as coletas foram realizadas em área de alta ocorrência de LVC, a espécie de maior prevalência foi *Pi. fischeri* (58%), seguida de 5% de *Ny. neivai* e 0,5% de *Mg. migonei*. A abundância de *Pi. fischeri* em áreas desmatadas pode-se sugerir que está bem desenvolvida a viver no entorno de matas e ambientes com alterações antrópicas (AGUIAR et al., 1985; RANGEL; LAINSON, 2009).

De acordo com Killick-Kendrick (1990) quatro critérios devem ser preenchidos para incriminar uma espécie como vetor: 1) se alimentar em humanos e no reservatório animal; 2) manter a infecção pelo parasito após a ingestão e digestão do sangue ingerido; 3) possuir parasitos semelhantes aos isolados de pacientes; e 4) ser comprovadamente transmitido pela picada. Embora já existam evidências de algumas

destas premissas são atendidas pelas três espécies suspeitas de serem vetores de LV encontradas em Florianópolis, estudos mais específicos de capacidade vetorial são necessários. Dentre as espécies de flebotomíneos que têm sido experimentalmente investigadas como possíveis vetores de *L. infantum*, como *Lu. cruzi* (DE OLIVEIRA et al., 2017a, 2017b; DOS SANTOS et al., 1998), *Mg. migonei* (GUIMARAES et al., 2016) e *Pi. fischeri* (GALVIS-OVALLO et al., 2017), somente *Lu. cruzi* foi totalmente confirmada com capacidade vetorial, pois foi comprovada a transmissão do parasito para um hospedeiro mamífero (DE OLIVEIRA et al., 2017b). Neste sentido, é importante que estudos de capacidade vetorial sejam intensificados para as espécies suspeitas de serem vetores.

Apesar de ainda não conhecermos efetivamente a espécie vetor de LV é possível comprovar, através dos resultados deste estudo, a grande expansão da doença nos últimos anos em Florianópolis, que além de cães, agora acomete também humanos. Além disso, a prevalência da doença ainda é subestimada, pois não está sendo feito um estudo sistemático de coletas periódicas em cães em todos os bairros. Indá (2016) relata que a vigilância ativa realizada pelos órgãos públicos não é suficiente para a identificação efetivas de todos os novos casos e que um dos fatores que contribui para a dificuldade de identificação de novas áreas de foco é o baixo índice de notificações de suspeitas de LVC por estabelecimentos veterinários, de acordo com dados levantados pelo CCZ em 2015. Neste sentido, faz-se necessária uma campanha de conscientização da população em nível de município e não apenas de bairros restritos, visto que boa parte da ilha tem relato de casos e tanto cães quanto humanos, vêm aparecendo ao longo dos últimos meses.

6. Resumo dos Resultados

- Todas as amostras caninas e humanas obtidas tiveram o diagnóstico de LV confirmado por PCR, sendo *L. infantum* o agente etiológico em todos os casos.
- 43 cepas de *L. infantum* foram isoladas, sendo 42 de amostras caninas e 1 do primeiro caso humano de Florianópolis.
- Não foi possível identificar variabilidade genética entre as cepas de *L. infantum* com o uso das técnicas empregadas.
- A fauna flebotomínica descrita neste trabalho compreende seis espécies.

- Três espécies de flebotomíneos (*Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai*) apresentaram exemplares com PCR positivo para *Leishmania* sp., sendo possível que uma ou mais destas seja responsável pela transmissão da LV em Florianópolis.
- Devido à maior quantidade de insetos coletados nos meses mais quentes, sugere-se que haja maior chance de transmissão de *L. infantum* nestes períodos;
- O ciclo de transmissão da doença está bem estabelecido na região, visto a continuidade no surgimento de novos casos em cães e humanos;

7. Conclusão

No município de Florianópolis a espécie de responsável pelos casos de LV é *L. infantum* e as cepas isoladas na região a partir de casos caninos e humanos não apresentaram polimorfismos em relação a cepas de outros estados brasileiros com a técnica utilizada, sugerindo que apesar de se tratar de uma região de contexto epidemiológico diferenciado pela ausência do principal vetor a variabilidade genética é baixa. A partir dos flebotomíneos coletados em um dos bairros com alta transmissão de LV pode-se inferir que os meses mais quentes do ano são os de maior risco de transmissão da parasitose, sendo que as espécies suspeitas de serem os vetores de LV no município são *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai*.

8. Perspectivas

- Determinar um novo painel de marcadores para MLSA a partir da comparação dos dados genômicos de cepas de diferentes estados incluindo quatro de SC.
- Analisar o hábito alimentar dos flebotomíneos coletados.
- Ampliar as áreas de coletas de flebotomíneos.
- Realizar estudos de capacidade vetorial das espécies *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ny. neivai*.

9. Referências

AGUIAR, Gustavo Marins de et al. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro: IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 80, n. 4, p.465-482, dez. 1985. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761985000400014>.

AGUIAR, Gustavo Martins; MEDEIROS, Wagner Muniz de. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 207-255.

ALEIXO, J. A. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.79-82, jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.025>.

ALMEIDA, Paulo Silva de et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.723-727, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822010000600025>.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, e35671, 31 maio 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.

ALVES, Andréia Silva et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 93, n. 3, p.1329-1333, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.006>.

ANDRADE, Andrey José de. **Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae):** desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies. 2010. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ANTINORI, Spinello; SCHIFANELLA, Luca; CORBELLINO, Mario. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.109-118, 1 maio 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0>.

ASHFORD, Richard W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics In Dermatology**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.523-532, set. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x\(96\)00041-7](http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x(96)00041-7).

ASLAN, Hamide et al. New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. **Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 213, n. 11, p.1752-1761, 14 jan. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw022>.

BANETH, Gad et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 24, n. 7, p.324-330, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>.

BAÑULS, Anne-laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances In Parasitology Volume 64**, [s.l.], p.1-458, 2007. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x\(06\)64001-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-308x(06)64001-3).

BATISTA, Luis Fábio da S. et al. An Assessment of the Genetic Diversity of *Leishmania infantum* Isolates from Infected Dogs in Brazil. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 86, n. 5, p.799-806, 1 maio 2012. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0300>.

BEJARANO, Eduar Elías et al. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. **Transactions of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 95, n. 1, p.27-28, jan. 2001. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(01\)90320-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(01)90320-7).

BOITÉ, Mariana Côrtes et al. Polymorphisms and ambiguous sites present in DNA sequences of *Leishmania* clones: Looking closer. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 25, p.110-116, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.011>.

BOTILDE, Yanick et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.440-446, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2006.02.003>.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, p.120, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados sobre Leishmaniose Visceral (LV)**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalmms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em 02/2018

CARVALHO, Maria Rosimery de et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae). **Acta Tropica**, [s.l.], v. 116, n. 1, p.108-110, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>.

CARVALHO, Fábio Santos et al. Genetic variability of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in the state of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.389-394, 10 jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017037>.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em:

https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html. Acesso em: 02/2018.

CEVS. **Leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Sul**. Secretaria de Saúde, 2014.

CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.873-882, nov. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748>.

COLLINS, Frank H. et al. A Ribosomal RNA Gene Probe Differentiates Member Species of the *Anopheles gambiae* Complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.37-41, 1 jul. 1987. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.37>.

CUPOLILLO, Elisa et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.3126-3132, 1 jul. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.7.3126-3132.2003>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 149, n. 3-4, p.139-146, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>.

DANTAS-TORRES, Filipe et al. Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 137, p.67-73, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.034>.

DEBONI, Sandra Cristina; BARBOSA, Marília; RAMOS, Raquel Rocha. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p.1-3, mar. 2011.

OLIVEIRA, Everton Falcão de et al. Monthly Distribution of Phlebotomine Sand Flies, and Biotic and Abiotic Factors Related to Their Abundance, in an Urban Area to Which Visceral Leishmaniasis Is Endemic in Corumbá, Brazil. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 10, e0165155, 26 out. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165155>.

OLIVEIRA, Everton Falcão de et al. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.178-181, 14 nov. 2016. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0191>.

OLIVEIRA, Everton Falcão de et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae). **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 2, e0005401, 24 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005401>.

DESJEUX, Philippe. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.239-243, maio 2001. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(01\)90223-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(01)90223-8).

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.305-318, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>.

DIAS, Edelberto Santos et al. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Vector Ecology**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.193-196, 23 maio 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x>.

DOS SANTOS, Soraya Oliveira et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and**

Veterinary Entomology, [s.l.], v. 12, n. 3, p.315-317, ago. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00104.x>.

EL BAIDOURI, Fouad et al. Genetic Structure and Evolution of the *Leishmania* Genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1-2, 13 jun. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002255>.

EL TAI, Nahla Omer Ahmed et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 94, n. 5, p.575-579, set. 2000. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2).

FIGUEIREDO, Fabiano Borges et al. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 1, p.1-4, jan. 2012.

Fundação Oswaldo Cruz. **As Leishmanioses**. Disponível em <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>. 1997.

FERREIRA, Gabriel Eduardo Melim et al. The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, e36242, 11 maio 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036242>.

GAGLIO, Gabriella et al. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 133, p.73-77, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.008>.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Morfologia e taxonomia: Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, Elizabeth Ferreira;

LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Cap. 2.1. p. 23-51.

GALVIS-OVALLOS, Fredy et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischerias* potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, [s.l.], v. 24, p.2-10, 2017. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2017002>.

GANGNEUX, Jean-Pierre et al. Prospective Value of PCR Amplification and Sequencing for Diagnosis and Typing of Old World Leishmania Infections in an Area of Nonendemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.1419-1422, 1 abr. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.4.1419-1422.2003>.

GÓES, Marco Aurélio de Oliveira; MELO, Cláudia Moura de; JERALDO, Verônica de Lourdes Sierpe. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Aracaju, v. 15, n. 2, p.298-307, jan. 2012.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.419-433, abr. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.19>.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, 17 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>.

HUBÁLEK, Zdenek. Emerging Human Infectious Diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Saproponoses. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.403-404, mar. 2003. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid0903.020208>.

IHALAMULLA, Ranjan L.; RAJAPAKSA, Ushani S.; KARUNAWEEERA, Nadira D. Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions — Sri Lanka

experience. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s.l.], v. 99, n. 6, p.571-575, set. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/136485905x51364>.

INDÁ, Fábio de Melo Chaves. **Estudo epidemiológico de Leishmaniose Visceral Canina em seis localidades do município de Florianópolis, Santa Catarina**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

JAMJOOM, Manal B. et al. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.265-270, abr. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/000349802125000790>.

KILLICK-KENDRICK, Robert. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-24, jan. 1990. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>.

KOHANTEB, Jamshid; ARDEHALI, Sadreddin. Cross-Reaction of Sera from Patients with Various Infectious Diseases with *Leishmania infantum*. **Medical Principles and Practice**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.79-82, 2005. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000083915>.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth Ferreira. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 100, n. 8, p.811-827, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762005000800001>.

LAINSON, Ralph. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 1, n. 2, jun. 2010. Instituto Evandro Chagas. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232010000200002>.

LASKAY, Tamás et al. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain

reaction. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 89, n. 3, p.273-275, maio 1995. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90537-5](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(95)90537-5).

LAURENT, Thierry et al. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.206-212, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2006.08.005>.

LOPES, Josiane Valadão. **Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2014.

MAIA, Carla; CAMPINO, Lenea. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.341-344, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>.

MARCONDES, Carlos Brisola et al. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina - preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p.353-355, jul-ago, 2005.

MARCONDES, Carlos Brisola et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Transactions of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 103, n. 11, p.1093-1097, nov. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.006>.

MARLOW, Mariel A. et al. Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 2, e2962, 13 fev. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002695>.

MAURICIO, Isabel L. et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.757-769, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.006>.

MAZIERO, Nelí et al. Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 205, n. 1-2, p.92-95, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.005>.

MENDONÇA, Francisco. Aquecimento Global E Suas Manifestações Regionais E Locais: Alguns Indicadores Da Região Sul Do Brasil. **Revista Brasileira de Climatologia**, [s.l.], v. 2, 31 dez. 2006. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/abclima.v2i0.25388>.

MESLIN, François-Xavier. Global Aspects of Emerging and Potential Zoonoses: a WHO Perspective. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.223-228, jun. 1997. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid0302.970220>.

MONTEIRO, Érika Michalsky et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.147-152, abr. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000200004>.

MONTOYA, Liliana et al. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oakbrook Terrace, v. 76, n. 5, p.888-895, maio 2007.

MORICONI, Martina et al. Phlebotomine sand fly–borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 8,

e0005660, 10 ago. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005660>.

MURRAY, Henry W et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, [s.l.], v. 366, n. 9496, p.1561-1577, out. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67629-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67629-5).

NASEREDDIN, Abdelmajeed et al. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 161, n. 1-2, p.126-130, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.003>.

OCHSENREITHER, Sebastian et al. Multilocus Microsatellite Typing as a New Tool for Discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.495-503, 1 fev. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.44.2.495-503.2006>.

OLIVEIRA, Diego Molina et al. Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Vector-borne And Zoonotic Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.137-143, fev. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0218>.

PAHO. **Leishmaniasis Report Number 5**. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=en

PEIXOTO, Alexandre Afrânio et al. New molecular markers for phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 31, n. 5-6, p.635-639, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00149-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00149-7).

PIMENTA, Paulo F. P.; SECUNDINO, Nágila F. C.; BLANCO, Elsa E. Nieves. Interação Leishmania-Hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 275.

TRENCH, Flavia Julyana Pina et al. First Report of Autochthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in Foz do Iguaçu, Paraná State,

Southern Brazil. **Annals of Clinical Cytology and Pathology**, v. 6, n. 2, 2016.

PITA-PEREIRA, Daniela de et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 99, n. 12, p.905-913, dez. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>.

PITA-PEREIRA, Daniela et al. First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oakbrook Terrace, v. 80, n. 4, p.593-595, abr. 2009.

POCHÉ, David M. et al. Phlebotomine sandfly ecology on the Indian subcontinent: does village vegetation play a role in sandfly distribution in Bihar, India?. **Medical and Veterinary Entomology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.207-213, 20 jan. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12224>.

PORTES, Maria da Graça Teixeira. **Vetores e perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Santa Catarina, 2001 a 2008**. 2008. 10 f. Monografia (Especialização) - Curso de Curso de Especialização de Epidemiologia Aplicada Ao Serviço de Saúde, Departamento de Saúde Pública, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Ecologia das leishmanioses. In: RANGEL, Elizabeth F; LAINSON, Ralph. **Flebotômíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 291-311.

RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo**

Cruz, [s.l.], v. 104, n. 7, p.937-954, nov. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000700001>.

REITHINGER, Richard; DAVIES, Clive R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.289-290, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02296-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02296-1).

RIBOLLA, Paulo Eduardo Martins et al. *Leishmania infantum* Genetic Diversity and *Lutzomyia longipalpis* Mitochondrial Haplotypes in Brazil. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p.1-11, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9249217>.

ROCHA, Leonardo S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions Of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 104, n. 7, p.461-466, jul. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.02.005>.

ROMERO, Gustavo A. S.; BOELAERT, Marleen. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 1, e584, 19 jan. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.

SAGHAFIPOUR, Abedin et al. Spatial Distribution of Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae) in Qom Province, Central Iran. **Journal of Medical Entomology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.35-43, 28 set. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjw147>.

SALOMÓN, Oscar D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 113, n. 1, p.84-87, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.024>.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David William. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANTIS, Bianca de et al. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.771-773, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822011000600022>.

SANTOS, E; SILVA, F D; SOUZA, G D. Vigilância entomológica. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 2, 2011.

SANTOS, Demilson Rodrigues dos; FERREIRA, Adão Celestino; BISETTO JUNIOR, Alceu. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.643-645, out. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822012000500019>.

SARAIVA, Lara et al. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1159-1163, 1 set. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0525>.

SARAIVA, Lara et al. Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 112, n. 4, p.309-318, abr. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160438>.

SEGATTO, Marcela et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 107, n. 1, p.39-47, fev. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000100006>.

SHERLOCK, Italo Araujo. A Importância dos Flebotomíneos. In: RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 15.

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes, ANDRADE, Andrey José de, GALATI, Eunice Aparecida Bianchi CORDEIRO, Danilo Pacheco, BRAVO, Freddy 2018. Psychodidae in **Catálogo Taxonômico**

da Fauna do Brasil. PNUD. Available in: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/86260>>. Acesso em: 11 Abr. 2018

SOLCÁ, Manuela da Silva et al. Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 7, e103635, 30 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103635>.

SOUZA, Getúlio Dornelles; SANTOS, Edmilson dos; ANDRADE FILHO, José Dilermando. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 8, p.1181-1182, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000800017>.

SOUZA, Getúlio Dornelles; CARDOSO, Arminda; CARVALHO, Rosa Maria Jardim Silveira de. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma área com leishmaniose visceral canina, no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Boletim Epidemiológico**, Porto Alegre, v. 59, p.4-5, 2015.

SOUZA, Getúlio Dornelles et al. Estudo dos Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em área com Leishmaniose Visceral Humana , no Bairro Morro Santana - Porto Alegre- RS. **Boletim Epidemiológico**, Porto Alegre, v. 65, n. 1, p.5-7, jun. 2017.

STEINDEL, Mário et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p.490-496, abr. 2013.

TARTAROTTI, Ana Luisa et al. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p.3-6, mar. 2011.

TAVARES, Carlos Alberto P; FERNANDES, Ana Paula; MELO, Maria Norma. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of**

Molecular Diagnostics, [s.l.], v. 3, n. 5, p.657-667, set. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.3.5.657>.

TOLEDO, Antonio et al. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 119, n. 2, p.257-264, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00424-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00424-8).

TORMEN, Silvia Helena; NASCIMENTO, João Cézar do. **Levantamento de fauna flebotomínica relacionado ao surto de leishmaniose tegumentar americana em Blumenau – SC**. Florianópolis: Setor de Suporte Laboratorial, Divisão de Vigilância de Vetores, Reservatórios e Outros, Gêrencia de Controle de Zoonoses, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde, Estado de Santa Catarina, Secretaria de Estado da Saúde, 2006.

VAN DER AUWERA, Gert; DUJARDIN, Jean-claude. Species Typing in Dermal Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.265-294, 11 fev. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00104-14>.

VEGA-LOPEZ, Francisco. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.97-101, abr. 2003.

VELOZO, Daniela et al. Leishmaniose mucosa fatal em criança. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p.255-259, 2006.

VOLPINI, Ângela C et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 90, n. 1, p.31-37, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>.

WERNECK, Guilherme L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p.644-645, abr. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniases**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/44412>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Fact sheet 375. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.

ZEMANOVÁ, Eva et al. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.149-160, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.008>.

10. APÊNDICE

Apêndice A: Alinhamentos dos marcadores A2P, ALAT, ASAT, MTF, RSP, SF3B1, STK, UBE1, G6PDH e MPI.

```
REF_ILM-877 ..... 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
2788_H_ES .....
2972_H_FL .....
LVC_FL_0001 .....
2466_C_MS .....
2919_C_DF .....
3135_C_MT .....
3177_C_RN .....
3186_C_RN .....
3196_C_NS .....
3256_C_SF .....
3379_C_MG .....
3381_C_MG .....
LVC_FL_0050 .....
LVC_FL_0028 .....
LVC_FL_0034 .....
LVC_FL_0025 .....
REF_ILM-877 ..... 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
2788_H_ES .....
2972_H_FL .....
LVC_FL_0001 .....
2466_C_MS .....
2919_C_DF .....
3135_C_MT .....
3177_C_RN .....
3186_C_RN .....
3196_C_NS .....
3256_C_SF .....
3379_C_MG .....
3381_C_MG .....
LVC_FL_0050 .....
LVC_FL_0028 .....
LVC_FL_0034 .....
LVC_FL_0025 .....
```

A2P

```

REF_ILM--877 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
2788_H_ES
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
2972_H_PT
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVH_FL_0001
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
2666_C_MS
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
2919_C_DF
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3135_C_WT
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3177_C_RN
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3196_C_RS
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3286_C_SF
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3257_C_SP
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3379_C_WG
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
3381_C_MG
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVC_FL_0007
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVC_FL_0050
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVC_FL_0028
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVC_FL_0034
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
LVC_FL_0025
GGGAAAAGGCCCTTCAGGGTGGCTCAAGCTWCGCGTGGTGGCGGCACTGTTGGCTGGAGGGCGGCGCTTCCGGGCGCTGGTATACCGCGC
*****
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
REF_ILM--877 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2788_H_ES
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2972_H_PT
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVH_FL_0001
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2666_C_MS
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2919_C_DF
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2919_C_WT
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3135_C_RN
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3177_C_RS
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3196_C_SF
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3256_C_SP
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3257_C_SF
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3379_C_WG
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
3381_C_MG
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVC_FL_0007
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVC_FL_0050
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVC_FL_0028
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVC_FL_0034
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVC_FL_0025
CGGCCCCGAAAGCTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
*****
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
REF_ILM--877 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GAGCGGAGCCACTTCCTGTGTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2788_H_ES
GAGCGGAGCCACTTCCTGTGTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2972_H_PT
GAGCGGAGCCACTTCCTGTGTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
LVH_FL_0001
GAGCGGAGCCACTTCCTGTGTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG
2666_C_MS
GAGCGGAGCCACTTCCTGTGTGCTGAGGGCGGCTGTGGCACTCCCAAACTTCGGGAGCGGAGCAACTAACGCCTCAGCGCCGCGGGGCAACTTTTGTG

```

A2P


```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
REF_ILM-877 CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
2788_H_ES CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
2972_H_PI NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVH_FL_0001 -----GGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
2666_C_MS CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
2919_C_DF NCTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3135_C_WT NCTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3177_C_RN CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3196_C_RN CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3186_C_SS NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
3286_C_SF CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3257_C_SF CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3379_C_WG CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
3381_C_WG NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVC_FL_0057 -----GGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
LVC_FL_0007 -----GGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
LVC_FL_0050 -----GGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
LVC_FL_0028 CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
LVC_FL_0034 CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
LVC_FL_0025 CDTGAGCCCGCTGCGACGGTGAACGATATCTGCTGACACGGGCGGACGATGGGTGGTGAAGCTGCTTCCAGCTGCTGTTGGCGGCGGACGCGAC
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
REF_ILM-877 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
2788_H_ES GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
2972_H_PI NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVH_FL_0001 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
2666_C_MS GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
2919_C_DF GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3135_C_WT GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3177_C_RN GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3186_C_RN GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3196_C_RS GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3256_C_SF GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3257_C_SF GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3379_C_WG GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
3381_C_WG GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0057 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0007 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0050 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0028 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0034 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
LVC_FL_0025 GCTGTGATGATCCCGGTTCCGCAATCCGCTATCTCCCTCAGATCCGCTTACTTTGGCGGGGTGAAGGTGCCCTACTTCCGACGAGTCCGGAGGGGT
*****
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
REF_ILM-877 GGGCGATGAGTGGCCGGACCTTTGTGGCGGTACGAGGGGTGGCGTGGACGGCGCCGACCGCCGCTGTTTGTGTGCATCAACCCCGGGAAACC
2788_H_ES GGGCGATGAGTGGCCGGACCTTTGTGGCGGTACGAGGGGTGGCGTGGACGGCGCCGACCGCCGCTGTTTGTGTGCATCAACCCCGGGAAACC
2972_H_PI GGGCGATGAGTGGCCGGACCTTTGTGGCGGTACGAGGGGTGGCGTGGACGGCGCCGACCGCCGCTGTTTGTGTGCATCAACCCCGGGAAACC
LVH_FL_0001 GGGCGATGAGTGGCCGGACCTTTGTGGCGGTACGAGGGGTGGCGTGGACGGCGCCGACCGCCGCTGTTTGTGTGCATCAACCCCGGGAAACC

```

ALAT

IVC_FL_0057GATCAACCTGTGGCAA
IVC_FL_0007GATCAACCTGTGGCAA
IVC_FL_0050GATCAACCTGTGGCAA
IVC_FL_0028GATCAACCTGTGGCAA
IVC_FL_0034GATCAACCTGTGGCAA
IVC_FL_0025GATCAACCTGTGGCAA

ALAT


```

REF LIM--877 ..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50 ..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
2788_H_SS CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
2972_H_PT CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVH_FL_0001 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
2666_C_MS CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
2919_C_DF CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3177_C_WT CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3196_C_RN CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3196_C_RN CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3286_C_SF CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3297_C_SF CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3379_C_WG CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
3381_C_WG CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVC_FL_0057 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVC_FL_0058 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVC_FL_0059 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVC_FL_0034 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
LVC_FL_0025 CGCCAAAGGGGTGGGACGTGCTCTGAAAGCCGCTACTGGCCCGGTTGGCCCGCTTCGACCTGCTGGAGCCGACGACCTGGTGTGATCAAGACA
*****
..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150 ..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
2788_H_SS CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
2972_H_PT CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVH_FL_0001 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
2666_C_MS CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
2919_C_DF CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
3177_C_WT CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
3135_C_WT CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
3196_C_RN CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVC_FL_0057 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVC_FL_0058 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVC_FL_0059 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVC_FL_0034 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
LVC_FL_0025 CGCCACACATCGCTATTCCTCGAGTGTCTCGGANTTCGGTCTTACACTTCATTGAGACATGGGGACGCGCGCGTGGCGTTCGCGGGGATGACCTCGA
*****
..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250 ..... 260 ..... 270 ..... 280 ..... 290 ..... 300
CGCCGACTATCCCCACATCATCATGTCACGGGCGAGGTGAGCGCGGCTGAAGTGTTCATGATGTACGCGAAGCGGGATGCGCTTTGTGCACCCGACGAA
2788_H_SS CGCCGACTATCCCCACATCATCATGTCACGGGCGAGGTGAGCGCGGCTGAAGTGTTCATGATGTACGCGAAGCGGGATGCGCTTTGTGCACCCGACGAA
2972_H_PT CGCCGACTATCCCCACATCATCATGTCACGGGCGAGGTGAGCGCGGCTGAAGTGTTCATGATGTACGCGAAGCGGGATGCGCTTTGTGCACCCGACGAA

```

MTF


```

3186 C RN  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
3196 C RS  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
3256 C SP  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
3257 C SP  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
3379 C MG  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
3381 C MG  TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0057TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0007TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0050TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0028TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0034TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
LVC_FL_0025TCTTGGCTTCGGCAATTCCTGTGGACGGGCTTGAAGAGATCTCGCCAAATTCGCCGTACGGG
*****

```

MTF


```

LVH_FL_0001 GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
2666 C MS GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
2919 C DF GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3135 C WT GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3177 C RN GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3186 C RN GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3196 C RS GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3256 C SP GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3257 C SP GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3379 C MG GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
3381 C MG GCCGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0057 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0007 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0090 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0028 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0034 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0025 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
*****
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
REF_ILM-877 GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
2788 H ES GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
2972 H FI GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
LVH_FL_0001 GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
2666 C MS GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
2919 C DF GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3177 C RN GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3186 C RN GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3196 C RS GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3256 C SP GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3257 C SP GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
3379 C MG GCGGGGCGCAGCTGCAGGGCGCTCAAMGCTCGACGCTCAAGGGGAGGAAAGGACGAGCAGAAAGTGGTGTGCGAACGGCAGGAGCGCGCT
LVH_FL_0057 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0007 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0090 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0028 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0034 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
LVH_FL_0025 GCGGATGGGCACAGCGTCTCTGCGCTTTGCGTCCGACGCGTCTTAGCGCTGGCCAGACACCACCCGGTTCGGCGCTCCCCAAAGAGACGCGAA
*****
410 420 430 440 450 460
REF_ILM-877 TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
2788 H ES TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
2972 H FI TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
LVH_FL_0001 TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
2666 C MS TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
2919 C DF TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
3135 C WT TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT
3177 C RN TGCACATGAGCTCCGGCCACGGCTACTTGGCCCTTCCCGCGCCCTTCACACACATCAACAT

```

RSP

```

3186 C RN   TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACATCAACAT
3196 C RS   TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACATCAACAT
3256 C SP   TCAACATGNACTCCGNCACAGNCTACTTNCCTTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
3257 C SP   TCAACATGNACTCCGNCACAGNCTACTTNGCCTTCNNCCNGCCTTCACACACCTCAACNN
3379 C MG   TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACCTCAACAT
3381 C MG   TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVC_FL_0057TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCT-----
LVC_FL_0007TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCT-----
LVC_FL_0050TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCT-----
LVC_FL_0028TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACATCAACAT
LVC_FL_0034TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACATCAACAT
LVC_FL_0025TCAACATGAATCCGGGCCAGGCTACTTGCCTTCCGCCCGCCCTTCCACACATCAACAT
*****

```

RSP


```

3186 C RN TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
3196 C RS TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
3256 C SF TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
3257 C SP TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
3379 C MG TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
3381 C MG TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
LVC_FL_0007TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
LVC_FL_0028TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
LVC_FL_0034TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
LVC_FL_0095TCCGGTATAATTTTCGAGGCCATCGGTTTGCATCGGCCAAGGAGTAGCTATCCAAATGATCCCCGCTCTCTGGAGCGCGCCCTTGA CGGAGCAGCAATACAGAT
*****
310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400
REF_LIM-877 GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
2788 H ES GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
2972 H FI GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
2666 C MS GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
2919 C DF GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3135 C MT GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3177 C RN GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3186 C RN GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3256 C SF GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3257 C SF GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3379 C MG GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
3381 C MG GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
LVC_FL_0007GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
LVC_FL_0028GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
LVC_FL_0034GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
LVC_FL_0095GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
*****
LVC_FL_0025GCGACGATGGCCGCTGGAGGCCCTCGCCGCTTCTGCTCTGGCCGCGCAGCGCTTGGAGCACTGGCCGTCACCCCTCGTGAATTTGTCAC
410
REF_LIM-877 CCGAACAATTG
2788 H ES CCGAACAATTG
2972 H FI CCGAACAATTG
2666 C MS CCGAACAATTG
2919 C DF CCGAACAATTG
3135 C MT CCGAACAATTG
3177 C RN CCGAACAATTG
3186 C RN CCGAACAATTG
3256 C SF CCGAACAATTG
3257 C SF CCGAACAATTG
3379 C MG CCGAACAATTG
3381 C MG CCGAACAATTG
LVC_FL_0007CCGAAACATTTG
LVC_FL_0028CCGAAACATTTG
LVC_FL_0034CCGAAACATTTG
LVC_FL_0095CCGAAACATTTG

```

SF3B1

IVC_FL_0034CCGAAACATTG
IVC_FL_0025CCGAAACATTG

SF3B1

3186 C RN AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 3196 C RS AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAANN
 3256 C SP AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGANN
 3257 C SP AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 3379 C MG AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 3381 C MG AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 LVC_FL_0057AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCC-----
 LVC_FL_0007AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCC-----
 LVC_FL_0050AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCC-----
 LVC_FL_0028AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 LVC_FL_0034AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT
 LVC_FL_0025AGGAGCTGGTGCAGCTACTGCACGAGCCGCTACGAGCTCGAAGT

UBE1


```

3186 C RN CGAGGAGCTTCTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
3196 C RS CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
3256 C SF CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
3257 C SF CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
3379 C MG CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
3381 C MG CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0057 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0058 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0059 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0028 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0034 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
LVC_FL_0025 CGGAGACTCTTTGAACAACATCAGCTACTTTTCCGGAGCTACGATAGTGTGAGGACHTCAAGCGTCTTGACCGATGATTCGCGAGAGGAATGC
*****
..... 510 520 530 540 550 560 570 580 590 700
REF_LIM-877 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
2768 H ES CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
2972 H FT CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVH_FL_0001 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
2666 C MS CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
2919 C DF CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3135 C MT CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3177 C RN CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3186 C RN CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3196 C RS CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3256 C SF CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3257 C SF CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3379 C MG CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
3381 C MG NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVC_FL_0057 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVC_FL_0058 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVC_FL_0059 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVC_FL_0028 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVC_FL_0034 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
LVC_FL_0025 CTTTAAAGGCCCCGAGAGGGTGGAAACCGTCTTACCTTGCCTCCCAACGGTATTGCAAGTCTCGGAGAGCATTCACAAAGGCTGCATG
*****
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
REF_LIM-877 CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
2768 H ES CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
2972 H FT CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
LVH_FL_0001 CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
2666 C MS CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
2919 C DF CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3135 C MT CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3177 C RN CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3186 C RN CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3196 C RS CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3256 C SF CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3257 C SF CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT
3379 C MG CCGCAGCAAGTGTGGGGGAGTGGGTCCGGGTGATCATCGAAGCCCTTTGGCCGCAATCCAGAGCTCTCCGAGCTCCCAAGCCCTCGAGCCCTTCT

```

G6PDH


```

1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
REF ILM--877 CDTACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
2788 H ES CDTACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
2972 H PI CDTACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0001
2666 C MS CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
2919 C DF CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3135 C WT CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3177 C RN CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3186 C RN CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3196 C RN CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3246 C SF CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3257 C SF CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3379 C Mg CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
3381 C Mg CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0057
-----
LVH FL 0007
LVH FL 0050
LVH FL 0028 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0034 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0025 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
-----
1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
REF ILM--877 GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
2788 H ES GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
2972 H PI GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
LVH FL 0001
2666 C MS GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
2919 C DF GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3135 C WT GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3177 C RN GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3186 C RN GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3196 C RN GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3257 C SF GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3257 C SF GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3379 C Mg GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
3381 C Mg GCTGTGGAACAGAGTACGTGGCGATTTCGCATTCAGGATTCAGGGATGAGGTCCACCCTTAGCGGGGGGACACACGCGACGAGCTGTCATCCGTGCC
LVH FL 0057
-----
LVH FL 0007
LVH FL 0050
LVH FL 0028 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0034 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
LVH FL 0025 CDTFACCAGGGGCGACACTTTCGCCCAATTTGCGGTGATGCGACTCAACATCAACACGACCGTGGGGGGGTCCTTTTATTTCTCAAGSGCGGCAAG
-----
1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
REF ILM--877 AGCCGTCGAGGCTGATGATGTCAGATCCCAAAAGGTTCTTGCCCTTAGTGGATTTGCGCGAGGAGCTGCGACAGAGCTGGACCTCACAATCCA
2788 H ES AGCCGTCGAGGCTGATGATGTCAGATCCCAAAAGGTTCTTGCCCTTAGTGGATTTGCGCGAGGAGCTGCGACAGAGCTGGACCTCACAATCCA
2972 H PI AGCCGTCGAGGCTGATGATGTCAGATCCCAAAAGGTTCTTGCCCTTAGTGGATTTGCGCGAGGAGCTGCGACAGAGCTGGACCTCACAATCCA
LVH FL 0001

```

G6PDH

2666 C MS AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
2919 C DF AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3175 C WT AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3186 C RN AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3196 C RS AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3256 C SP AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3257 C SP AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3379 C MG AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
3381 C MG AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
LVC_FL_0057 -----
LVC_FL_0077 -----
LVC_FL_0090 -----
LVC_FL_0098AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
LVC_FL_0034AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
LVC_FL_0025AGCCGTCGAGGCTATGTGTCAAAGTACACCAAAAGSTTCTGGCCCTTAGTGGAGATTTGGCGACAGCCACACAGACAGCTGGAGCTCACAATACCA
..... 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
REF_ILM-877 CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
2788 H ES CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
2972 H FI CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
LVC_FL_0001 -----
2666 C MS CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
2919 C DF CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3135 C NT CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3177 C RN CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3186 C RN CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3196 C RS CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3256 C SP CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3257 C SP CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3379 C MG CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
3381 C MG CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
LVC_FL_0057 -----
LVC_FL_0077 -----
LVC_FL_0090 -----
LVC_FL_0098CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
LVC_FL_0034CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
LVC_FL_0025CACTTCGGTACGATGTGGCCCTTCCAGAGCCCTACGAGCCCTCATACGACGCACTCTGGCCCACTCGCAAACTTTGCGTAAAGGACGAGCTCGAT
..... 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
REF_ILM-877 GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
2788 H ES GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
2972 H FI GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
LVC_FL_0001 -----
2666 C MS GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
2919 C DF GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
3135 C NT GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
3177 C RN GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG
3186 C RN GTGGCATGSGGCACTTTCACGGCCCTCTGCAAGATTTGACTCTGGAAGATCAAAACCGATCCGTFACAGGCGGCAAGCGCGGGCCCTAAGGAAGCGG

G6PDH

```

3196 C RS GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
3256 C SF GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAANNNNNNNN
3257 C SF GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
3379 C MG GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
3381 C MG GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
LVC_FL_0057 -----
LVC_FL_0007 -----
LVC_FL_0050 -----
LVC_FL_0028GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
LVC_FL_0034GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
LVC_FL_0025GTGGCATGGCGCATCTTCCAGCGCGCTCTGCACACAGATTGACTCTGGAGAGATCAAACCGATCCOGTACAGGCGGCGGCA CGCGCGGCGCTTAAGGAAGCGG
-----
1610 1620 1630 1640 1650
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
REF_LIM-877ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
2788_H_ES ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
2972_H_FL ATGMAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCANNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVH_FL_0001 -----
2666_C_MS ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
2919_C_DF ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
3135_C_MT ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3177_C_RN ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3186_C_RN ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3196_C_RS ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3256_C_SF NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
3257_C_SF ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3379_C_MG ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
3381_C_MG ATGAATTCATGCGCAACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
LVC_FL_0057 -----
LVC_FL_0007 -----
LVC_FL_0050 -----
LVC_FL_0028ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
LVC_FL_0034ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG
LVC_FL_0025ATGAATTCATGCGCAACACAGCGCTTCAAGCACCAAGAGGCTACCCTGCG

```

G6PDH

1VH_FL_0001 GAACTATTTTTCAGAAAGCTCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 2666 C MS GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 2919 C DF GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3135 C WT GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3177 C RN GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3186 C RN GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3196 C RS GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3256 C SP GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3257 C SP GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3319 C MG GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 3381 C MG GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0067 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0007 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0050 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0028 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0034 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG
 1VH_FL_0025 GAACTACTTTTTCAAGATCCACAGGCGCACGACCTTCCGTGACACAGTGCCTTAOCTCTGGAAGANTTCTGCTGATTCGCACGGCCGCTGTCCATCCAGGCG

 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 REF_LIM-877 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 2788 H ES CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 2972 H FI CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0001 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 2666 C MS CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 2919 C DF CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3177 C RN CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3186 C RN CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3196 C RS CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3256 C SP CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3257 C SP CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3379 C MG CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 3381 C MG CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0057 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0050 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0028 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0034 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT
 1VH_FL_0025 CACCCGTCGAAGAGCTTCGCGAAGCTGCGACGAGCGCGGATTAAGTACAAGGACCGCGMCCACAGGCGAGGCTCAATTTGGCGCTTGACCCCT

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 REF_LIM-877 TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCGAAGCGGATTCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 2788 H ES TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCGAAGCGGATTCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 2972 H FI TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCGAAGCGGATTCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 1VH_FL_0001 TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCGAAGCGGATTCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 2666 C MS TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCFCCGCTATCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 2919 C DF TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCFCCGCTATCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 3135 C WT TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCFCCGCTATCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG
 3177 C RN TTGAGGCACTCTGCTGCTCCGACCTCGGCGCCATCFCCGCTATCFCCGCTATCFCCGAGCTGGCGAGCTTGTGGCGCCAGCGGCGGTGTGG

