



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“DISEÑO Y VALIDACIÓN *in silico* DE PRIMERS DIRIGIDOS CONTRA LAS REGIONES 18s Y PFK PARA EL ESTUDIO METAGENÓMICO DE *Trypanosoma spp.*”

Realizado por:

KAREN JOHANNA MARIÑO SUÁREZ

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 4 de Octubre 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **KAREN JOHANNA MARIÑO SUÁREZ**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1719903732, declaro bajo juramento que la tesis titulada:

Diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra las regiones 18s y PFK para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp.

es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Karen Johanna Mariño

Suárez C.C.: 1719903732

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Rubén Ramírez Iglesias', is centered on the page.

José Rubén Ramírez Iglesias

C.C.: 3050666993

LOS PROFESORES INFORMANTES

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

ADRIANA GABRIELA CASTILLO LANDIN

Después de revisar la tesis presentada, lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.



JUAN CARLOS NAVARRO

CC: 1757166614



ADRIANA GABRIELA CASTILLO

CC: 1718555871

Quito, 4 de Octubre de 202

Artículo de tesis

Diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra las regiones 18s y PFK para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp.

Karen Mariño (Estudiante)^{1*} and José Ramírez (Tutor)¹

¹ Universidad Internacional SEK (UISEK), Facultad de Ciencias de la Salud, Quito 170120, Ecuador; Programa de Maestría en Biomedicina; karen.marino@uisek.edu.ec; jose.ramirez@uisek.edu.ec

* Autor de Correspondencia: Karen Mariño

Resumen: La Tripanosomosis es una enfermedad desatendida que genera pérdidas económicas en zonas tropicales del mundo y limita la productividad pecuaria de varios países en vías de desarrollo. La secuenciación de nueva generación (NGS) se ha convertido en una herramienta estándar para muchas aplicaciones, entre las cuales destaca su capacidad para detectar múltiples especies de agentes infecciosos, procedentes de una gran cantidad de muestras. Bajo este contexto, Ecuador tiene pocos estudios moleculares sobre tripanosomosis y ninguno estudia esta enfermedad bajo el enfoque metagenómico de lecturas largas (>800 pb). A pesar de este escenario, y debido a la falta de marcadores moleculares universales para detectar varias especies de tripanosomas, se hace necesario el diseño de primers orientados a regiones génicas informativas, para su empleo en los flujos de trabajo destinados a una secuenciación NGS de lecturas largas. Es por ello que en el presente estudio se diseñaron primers degenerados dirigidos a las regiones de los genes 18S y fosfofructocinasa (PFK) para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp. Para cumplir este objetivo, se realizó la búsqueda de genes de interés mediante el análisis de secuencias de genomas de referencia de *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum* y *T. evansi.*, extraídas de la base de datos especializada Tryp-DB y se recuperaron secuencias adicionales de la base de datos de GenBank, a través de un BLASTnt, seguido de un alineamiento de secuencias a través del programa Clustal-Omega. Una vez alineadas las secuencias, se diseñaron primers orientados a regiones conservadas, incluyendo nucleótidos degenerados y seleccionado solo aquellos que permitieran la amplificación de amplicones de gran tamaño. Adicionalmente, la validación *in silico* de los primers diseñados se efectuó mediante un BLAST de nucleótidos. Se hallaron numerosas secuencias para el gen 18S de varias regiones geográficas y hospedadores, mientras que para el gen PFK se observó una disponibilidad limitada de secuencias en la base de datos GenBank. Mediante los alineamientos, se logró el diseño de 4 sets de primers degenerados para cada gen para la amplificación selectiva de las áreas identificadas en los genes 18S y PFK de diferentes *Trypanosoma* spp. En el caso concreto de los sets para la amplificación del 18S, se lograron generar oligos con temperaturas de fusión (Tm) cercanas a los 60°C y productos esperados alrededor de las 1800 pb. Sin embargo, no se realizó la validación para el gen PFK dada la cantidad limitada de secuencias dentro del GenBank. Los primers diseñados para la región 18S presentan el potencial de generar amplicones largos, ideales para su uso en la preparación de librerías mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), enfocadas en secuenciación de lecturas largas, como es el caso de la plataforma de Oxford Nanopore. Es necesaria la validación en el laboratorio de cada uno de estos sets de primers, empleando cepas o aislados de referencia, con la finalidad de comprobar analíticamente su desempeño y potencial en el trabajo de laboratorios de alta complejidad, orientados a la metagenómica de tripanosomátidos.

Palabras clave: tripanosomosis, bioinformática, primers, análisis filogenético, 18S, PFK

Abstract: Trypanosomosis is a neglected disease that generates economic losses in tropical areas of the world and limits livestock productivity in several developing countries. Next generation sequencing (NGS) has become a standard tool for many applications, among which its ability to detect multiple species of infectious agents from a large number of samples stands out. Under this context, Ecuador has few molecular studies on trypanosomosis and none studies this disease under the metagenomic approach of long reads (>800 bp). Despite this scenario, and due to the lack of universal molecular markers to detect various species of trypanosomes, the design of primers aimed at informative gene regions is necessary for use in workflows aimed at NGS sequencing of reads. long. That is why in the present study degenerate primers were designed targeting the regions of the 18S and phosphofructokinase (PFK) genes for the metagenomic study of *Trypanosoma* spp. To meet this objective, the search for genes of interest was carried out by analyzing reference genome sequences of *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum* and *T. evansi*., extracted from the specialized database Tryp-DB. and additional sequences were recovered from the GenBank database, through a BLASTnt, followed by a sequence alignment through the Clustal-Omega program. Once the sequences were aligned, primers were designed targeting conserved regions, including degenerate nucleotides and selecting only those that allowed the amplification of large amplicons. Additionally, *in silico* validation of the designed primers was carried out using a nucleotide BLAST. Numerous sequences were found for the 18S gene from various geographic regions and hosts, while for the PFK gene, limited availability of sequences was observed in the GenBank database. Through the alignments, the design of 4 sets of degenerate primers for each gene was achieved for the selective amplification of the areas identified in the 18S and PFK genes of different *Trypanosoma* spp. In the specific case of the sets for the amplification of 18S, oligos were generated with melting temperatures (T_m) close to 60°C and expected products around 1800 bp. However, validation was not performed for the PFK gene given the limited number of sequences within GenBank. The primers designed for the 18S region have the potential to generate long amplicons, ideal for use in the preparation of libraries by polymerase chain reaction (PCR), focused on sequencing long reads, as is the case of the platform Oxford Nanopore. Validation in the laboratory of each of these primer sets is necessary, using reference strains or isolates, in order to analytically verify their performance and potential in the work of highly complex laboratories, oriented to the metagenomics of trypanosomatids.

Keywords: trypanosomosis, bioinformatics, bioinformatics, primers, phylogenetic analysis, 18S, PFK

1. Introducción

La tripanosomosis es una enfermedad debilitante y mortal en varios animales, causando un impacto negativo significativo en la producción de alimentos y limitando el crecimiento económico en muchas partes del mundo (Ebhodaghe et al., 2018). Esta enfermedad es provocada por las especies del género *Trypanosoma*, entre las cuales podemos mencionar *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum* y *T. evansi*, que afectan a los seres humanos, así como a los animales domésticos y salvajes (Cecchi et al., 2014; Fetene et al., 2021). *Trypanosoma evansi* se transmite mecánicamente por moscas hematofagas de los géneros *Stomoxys* y *Tabanus*, su transmisión mecánica depende de la supervivencia de los parásitos en la cavidad oral del vector. La presencia de *T. evansi* ha sido reportada en siete países sudamericanos, entre ellos, Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana, Perú y Venezuela. Mata a miles de animales cada año. El curso de la infección va desde una enfermedad aguda con alta mortalidad hasta una infección crónica caracterizada por edema subcutáneo, fiebre, letargo, pérdida de peso, aborto, hemorragia nasal y ocular, y rigidez de las extremidades (Aregawi et al., 2019). *T. vivax*, es una de las especies más importantes que se sabe que infectan tanto a los animales domésticos como a los salvajes. El parásito tiene la capacidad de ser transmitido mecánicamente por moscas hematofagas como *Tabanus* spp., *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*, que son responsables de la propagación del agente infeccioso en las zonas libres de África y en América Latina (Fetene et al., 2021). *T. theileri* es un patógeno oportunista, la infección por esta especie se ha relacionado con la patogenicidad en ganado infectado por otros hemoparásitos o sometido a estrés

extremo. Dado que los parásitos se propagan a través de varios órganos, incluido el Sistema Nervioso Central, la parasitemia parece aumentar en animales inmunodeprimidos, lo que contribuye a la patogenicidad de *T. theileri*. Estas infecciones pueden causar anemia, aborto y muerte tanto en el ternero recién nacidos como en adultos (Villa et al., 2008). *T. equiperdum*, es causante de la enfermedad durina, una patología crónica de los caballos y burros. La diferencia de otros tripanosomas es que esta se transmite sexualmente y es principalmente un parásito tisular, muy difícil de encontrar en la sangre (Yasine et al., 2019).

Es de suma importancia estudiar las enfermedades que causan estas especies, ya que la ganadería y la producción pecuaria en general son de las actividades más representativas en Ecuador, con aproximadamente 4,1 millones de cabezas de ganado distribuidas en las cuatro regiones del país: 48,4% en la sierra (ganado de leche), 42,4% en la región costera (carne y leche), y 9,13% en la selva e Islas Galápagos (carne y leche). Un ejemplo de ello lo representa la provincia de Manabí, la cual se encuentra en la región costera y contiene el mayor porcentaje de ganado vacuno (22,7%) del país (INEC, 2020).

Existen pocos estudios sobre esta enfermedad en Ecuador; sin embargo, la investigación de Hinojosa, (2021) reportó una prevalencia de 16,82% de tripanosomosis bovina en el Oriente ecuatoriano. Asimismo, provincias como Napo (6,82%), Orellana (22,22%) y Sucumbíos (24,44%) presentan seroprevalencia a estos hemoparásitos. Por otra parte, *T. theileri* fue reportado en estudios recientes sobre la prevalencia y detección de tripanosomosis en bovinos en Limoncocha, Sucumbíos. Los autores de este estudio concluyeron que debido a la actividad ganadera se concentrada en la costa y oriente de Ecuador, la presencia de *T. theileri* en el territorio puede aumentar el riesgo en animales inmunocomprometidos o con enfermedades concomitantes, poniendo en riesgo las unidades de producción (De la Cadena et al., 2023).

Existen varios métodos de diagnóstico de la tripanosomosis. Puede realizarse por métodos parasitológicos, serológicos y moleculares, sin embargo, existen variaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Ramírez-Iglesias et al., 2017). No obstante, métodos como la PCR y la secuenciación de Sanger presentan inconvenientes como costos elevados al aumentar el número de muestras, la necesidad de clonación en algunos casos y limitación en la cantidad de genotipos que se pueden detectar. Es por ello que se necesitan estudios con tecnología moderna como los códigos de barras de ADN y secuenciación masiva (Goterris, 2020). Hoy en día, la secuenciación de nueva generación (NGS) se ha convertido en una herramienta estándar para muchas aplicaciones en biología básica, así como para investigación clínica y agronómica. Es por esto que su uso es importante en el país, ya que aún no se han hecho estudios metagenómicos de tripanosomas de interés veterinario y existen pocos trabajos que indiquen variabilidad genotípica de especies.

A pesar de las crecientes bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN para animales, plantas y hongos, actualmente no existe ningún de código de barras genético universal para las especies de tripanosomas, por lo cual resulta de gran interés el estudio en curso, principalmente (Hutchinson & Stevens, 2018). Entre las regiones usadas para epidemiología molecular existe el código de barras 18s en el estudio de los *Trypanosomas*, debido a que es altamente conservado en la mayoría de los organismos y, por lo tanto, se pueden utilizar para estudiar la relación filogenética entre diferentes especies de *Trypanosomas*. El gen 18S es ampliamente utilizado en estudios de filogenia molecular debido a su alta conservación y su capacidad para diferenciar entre diferentes grupos de organismos. Por otro lado, el gen fosfofructokinasa (PFK) codifica para una enzima que es esencial en el metabolismo de los *Trypanosomas* y su estudio puede ser de gran importancia para comprender la fisiología de estos organismos y su relación con el hospedero, así como probar su capacidad de informativa para identificación y diferenciación de tripanosomátidos. En resumen, el uso de los genes 18S y PFK en el estudio de los *Trypanosomas* es esencial para entender su biología y su relación con otros organismos (Pinto et al., 2012). Acoplando el uso de códigos de barra génicos junto con plataformas de secuenciación NGS de lecturas largas, podría mejorar nuestra comprensión sobre las especies y genotipos de tripanosomas de interés veterinario circulantes en el país.

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo del presente trabajo fue diseñar primers degenerados dirigidos a las regiones 18S y PFK mediante el análisis de secuencias de genomas de referencias, alineamiento y validación *in silico* de primers, para la detección, identificación y genotipificación de los tripanosomas de las especies *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum* y *T. evansi*.

2. Materiales y Métodos

Recuperación inicial de secuencias de los genes de interés

Se usaron secuencias de los genes asociados a 18S y PFK presentes en cepas de referencia, extraídas de la base de datos Tryp DB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>). Este servidor brinda acceso a diversos conjuntos de datos genómicos y de gran escala relacionados con patógenos eucariotas y vectores invertebrados de enfermedades. Los organismos respaldados por este recurso incluyen, entre otros, la lista de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) (Amos et al., 2022).

Búsqueda de secuencias adicionales.

Fueron extraídas mediante la base de datos del GenBank, empleando la herramienta BLASTnt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando las secuencias de aislados de referencia. La herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística de las coincidencias. Se escogieron 4 a 5 secuencias para cada especie *T. vivax*, *T. theileri*, *T. equiperdum* y *T. evansi*, tanto para 18s como para PFK.

Alineamiento de secuencias.

Se realizó un alineamiento por medio del programa Clustal-Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), el cual es un programa de alineación de secuencias múltiples que utiliza árboles guía y técnicas de perfil-perfil HMM (modelos estadísticos de la estructura primaria de las secuencias) para generar alineaciones entre tres o más secuencias, de las cuales se escogerán las mejores regiones para la generación de primers degenerados.

Selección de primers.

Con base en la información obtenida del alineamiento, se identificaron potenciales regiones de unión a primers de menor variabilidad entre especies, que faciliten la unión de los oligos, y se diseñaron varios pares de primers degenerados (forward and reverse). Para diseñar primers degenerados se tuvo en cuenta varios factores. Las características de los primers deben tener una longitud de 17 – 24pb, el contenido de G+C debe estar alrededor del 40-60%, la temperatura de Melting Tm debe estar entre 55 - 65°C, evitar secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3', las terminaciones no deben ser autocomplementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros y debe evitarse los primers que formen secuencias auto-complementarias (Campos & Quesada, 2017; Li et al., 2015). Una de las consideraciones clave es el grado de degeneración permitido en el primer. Se estableció que el límite de degeneración recomendado llegue hasta 64 combinaciones (el número de secuencias diferentes dentro del cebador de mezcla). Como criterio adicional se buscó la generación de primers que amplificaran productos del mayor tamaño posible (Campos & Quesada, 2017).

Temperatura de Hibridación

Para determinar la temperatura de hibridación óptima de los primers diseñados, se realizó un análisis en la página NEB Tm Calculator (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>). Al ingresar los datos requeridos, se obtuvo la Tm óptima para cada cebador, lo que permitirá ajustar las condiciones de PCR para optimizar la amplificación (Menin & Nichols, 2013).

Validación de secuencias

La validación *in silico* se realizó por el medio de BLAST de nucleótidos, siguiendo los procedimientos descritos por Kumar and Chrodia. (2015). Brevemente, las secuencias independientes de los primers diseñados, forward y reverse, fueron cotejadas con las bases de datos, limitadas por especies, en el BLASTn bajo parámetros predeterminados. El resultado se evaluó con base en la primera secuencia mostrada en los resultados, el porcentaje de identidad y la cobertura señalada. Se esperan mismatches asociados únicamente a degenerancias, en caso de presentarse.

3. Resultados

Búsqueda de secuencias inicial de genes de interés

Las secuencias de los genes 18S y PFK obtenidas provienen de diversas ubicaciones geográficas y diferentes hospedadores, lo que refleja la amplia distribución de los diferentes tipos de tripanosomas en distintas regiones del mundo (tabla 1-2).

Se obtuvieron un total de 4 secuencias de referencia para el gen 18S, que incluyen 1 de *Trypanosoma theileri*, 1 de *Trypanosoma evansi*, 1 de *Trypanosoma vivax* y 1 de *Trypanosoma equiperdum*. Además, se recuperaron 9 secuencias adicionales de la base de datos GenBank, que constan de 3 secuencias de *Trypanosoma evansi*, 1 de *Trypanosoma theileri* y 3 de *Trypanosoma vivax*. Estas secuencias proporcionan información valiosa sobre la diversidad genética de estos parásitos en diversas ubicaciones geográficas, incluyendo especímenes procedentes de la India, Egipto, Etiopía y Nigeria, así como de diferentes tipos de animales, como caballos, camellos y bovinos.

Con respecto a las secuencias del gen PFK, se identificaron 3 secuencias de referencia, que corresponden a 1 *Trypanosoma theileri*, 1 *Trypanosoma evansi* y 1 *Trypanosoma vivax*. En cuanto a las secuencias obtenidas del GenBank, se encontró solo una secuencia que pertenece a *Trypanosoma theileri*, la cual se halló en bovinos en Escocia. La presencia de una única secuencia específica podría sugerir su prevalencia en una región particular.

Tabla 1. Secuencias recuperadas del gen 18s

Descripción	Nombre científico	Accesión	Base de datos
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	<i>Trypanosoma equiperum</i>	TEOVI_00028 4500 (Secuencia de referencia)	Tryp DB
<i>Trypanosoma equiperdum</i> , small subunit ribosomal RNA gene 18s	<i>Trypanosoma equiperum</i>	AJ223564.1	GenBank
<i>Trypanosoma equiperdum</i> 18S rRNA gene, isolate STIB 818	<i>Trypanosoma equiperum</i>	AJ009153.1	GenBank
<i>Trypanosoma evansi</i> strain	<i>Trypanosoma evansi</i>	STIB805_Chr0 3	Tryp DB

		(Secuencia de referencia)	
<i>Trypanosoma evansi</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Trypanosoma evansi</i>	KT023565.1	GenBank
<i>Trypanosoma evansi</i> isolate PH1 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	<i>Trypanosoma evansi</i>	KY114576.1	GenBank
<i>Trypanosoma evansi</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer region (ITS), and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Trypanosoma evansi</i>	AB5519221	GenBank
<i>Trypanosoma theileri</i> isolate Edinburgh	<i>Trypanosoma theileri</i>	NBCO01000006 (Secuencia de referencia)	Tryp DB
<i>Trypanosoma theileri</i> 18S rRNA gene, isolate TREU 124	<i>Trypanosoma theileri</i>	AJ009163.1	GenBank
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_03 (Secuencia de referencia)	Tryp DB
<i>T. vivax</i> isolate MBOVET2012AU-CVMA004	<i>Trypanosoma vivax</i>	KM391827.1	GenBank
TvY486(ILRAD700) clone 1 18S	<i>Trypanosoma vivax</i>	KM391829.1	GenBank
<i>vivax</i> isolate TviMzNy 18S	<i>Trypanosoma vivax</i>	EU477537.1	GenBank

Tabla 2. Secuencias recuperadas del gen PFK

Descripción	Nombre científico	Accesión	Base de datos
6-phospho-1-fructokinase <i>Trypanosoma equiperdum</i>	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	TEOVI_000845600 (Secuencia de referencia)	Tryp DB
<i>Trypanosoma evansi</i> genome assembly, chromosome: STIB805_03	<i>Trypanosoma evansi</i>	OU830654.1(Secuencia de referencia)	Tryp DB
<i>Trypanosoma theileri</i> isolate Edinburgh	<i>Trypanosoma theileri</i>	TM35_000013140-t36_1 (Secuencia de referencia)	Tryp DB

<i>Trypanosoma theileri</i> 6-phospho-1-fructokinase partial mRNA	<i>Trypanosoma theileri</i>	XM_029020995.1	GenBank
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0302630 (Secuencia de referencia)	Tryp DB

Diseño de primers

Se realizaron análisis exhaustivos de alineamiento para los genes 18S y PFK con el fin de identificar las regiones de mayor calidad y conservación en las secuencias. Estos análisis permitieron determinar las áreas más relevantes para el estudio de interés. Con base en los resultados del alineamiento, se diseñaron primers degenerados que pudieran amplificar de manera específica y eficiente las regiones seleccionadas. Los primers degenerados se construyeron teniendo en cuenta las secuencias consenso obtenidas a partir del alineamiento de múltiples secuencias del gen.

Las Figuras 1 y 2 presentan los alineamientos representativos de las secuencias correspondientes a los primers SET1/18S y SET2/PFK, respectivamente. Estas figuras brindan una representación visual de las secuencias de los primers y su correspondiente alineamiento, lo cual ayuda a comprender mejor la estructura y conservación de las regiones de hibridación definidas. Dado que hay una limitada disponibilidad de secuencias para el gen PFK, se tomó la decisión de incluir secuencias de *T. rangeli* y *T. cruzi* con el propósito de generar primers adicionales, cuyo alineamiento se detalla en el Anexo 1. Además, los alineamientos restantes para 18S y PFK se encuentran disponibles en el Anexo 2 y 3.

Figura 1. Alineamiento SET1/18S. En el primer alineamiento se observa el primer forward, este es el oligonucleótido que se diseña para unirse a la hebra de ADN en la dirección de lectura del 5' al 3' en la cadena molde o templado. En el segundo alineamiento se encuentra el primer reverse, es el oligonucleótido diseñado para unirse al extremo 3' del fragmento complementario en la cadena molde. Los primers se encuentran resaltados en color amarillo.

Figura 2. Alineamiento SET2/PFK. En el primer alineamiento se observa el primer forward, este es el oligonucleótido que se diseña para unirse a la hebra de ADN en la dirección de lectura del 5' al 3' en la cadena molde o templado. En el segundo alineamiento se encuentra el primer reverse, es el oligonucleótido diseñado para unirse al extremo 3' del fragmento complementario en la cadena molde. Los primers se encuentran resaltados en color amarillo.

Forward		
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ009153.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	98
18S_Trypanosoma_evansi (KY114576.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_evasi (AB551922.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_evansi (KT023565.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000284500)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ223564.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	112
18S_Trypanosoma_theileri (AJ009163.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	98
18S_Trypanosoma_vivax (EU477537.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_vivax (KM391827.1)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	119
18S_Trypanosoma_vivax (TvY486_03)	CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	120
18S_Trypanosoma_vivax (KM391829.1)	CAGAACTCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC	119

REVERSE		
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ009153.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1510
18S_Trypanosoma_evansi (KY114576.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_evasi (AB551922.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_evansi (KT023565.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000284500)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ223564.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1525
18S_Trypanosoma_theileri (AJ009163.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1488
18S_Trypanosoma_vivax (EU477537.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1454
18S_Trypanosoma_vivax (KM391827.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1451
18S_Trypanosoma_vivax (TvY486_03)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1452
18S_Trypanosoma_vivax (KM391829.1)	TACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGC	1451

En la Tabla 3 se detallan un total de cuatro pares de primers diseñados para el gen 18S, mientras que en la Tabla 4 se presentan los cuatro pares de primers correspondientes al gen PFK. Para cada par de primers, se proporciona la temperatura de melting (Tm) y el tamaño aproximado del amplicón resultante.

En particular, se destaca el uso del SET1/18S para el gen 18S y el SET2/PFK para el gen PFK. Estos primers fueron seleccionados tomando en cuenta la menor variabilidad de región de unión y el máximo tamaño de amplicón generado a su alta. Estos enfoques y resultados obtenidos son fundamentales para el desarrollo de estudios posteriores que requieran la amplificación y análisis de los genes 18S y PFK, proporcionando herramientas efectivas para investigaciones relacionadas con la biología molecular y la genética.

Tabla 3. Primers diseñados para la identificación de *Trypanosoma* spp. mediante amplificación del gen 18S

Secuencia	Temperatura	Tamaño aproximado amplicón
SET 1/18S F: 5' AATCACTGCAYTGCAGGAATCT 3' R: 5' GAAATTCAAAGTGAGAACGC 3'	Tm= 64 Tm= 62	1500 pb
SET 2/18S F: 5' GCATGGGATAACRARGSAKACAG 3' R: 5' TCGTAGTGTCTGGACGACAA 3'	Tm= 60 Tm= 60	1800 pb
SET 3/18S F: 5' GCAWYAYTGGATAACTTGGC 3' R: 5' ACTYCKTTATAGCCACTTGAA 3'	Tm= 58 Tm= 60	2100 pb
SET 4/18S F: 5' GCCCTATCAGCCAGTGATGGC 3' R: 5' CCAGGGTTCACMCAGATRCA 3'	Tm= 64 Tm= 62	2000 pb

Nomenclatura de degenerancias: Y= por la base C o T; R= por la base A o G; S= por la base G O C; K= por la base G o T; W= por la base A o C; M= por la base A o C

Tabla 4. Primers diseñados para la identificación de *Trypanosoma* spp. mediante amplificación del gen PFK

Secuencia	Temperatura	Tamaño amplicón
SET 1/PFK F: 5' ATYGYACRTGYGGTGGYATTT 3' R: 5' TCCAGYTMSTGYGCCGCCTG 3'	Tm= 66 Tm= 68	1300 pb
SET 2/PFK F: 5' CTCAAYGAYGTSATYCGTTC 3' R: 5' CTCCTCCYAGYTRYATRAAKTG 3'	Tm= 56 Tm= 58	1100 pb
SET 3/PFK F: 5' AGCGHCTYGGWGTMAAYATYC 3' R: 5' ASYGCGTASCCTTAYTAYGTC 3'	Tm= 62 Tm= 64	1200 pb
SET 4/PFK F: 5' CGYGTBACVAGCAARCTSGT3' R: 5' GTMGCACCWGKCATVGCCTC 3'	Tm= 62 Tm= 64	1200 pb

Nomenclatura de degenerancias: Y= por la base C o T; R= por la base A o G; S= por la base G O C; K= por la base G o T; W= por la base A o C; M= por la base A o C; V= por la base A o C o G

Tabla 5. Primers adicionales para la identificación de *T. cruzi* y *T. rangeli* para el gen PFK

Secuencia	Temperatura	Tamaño amplicón
SET 5/PFK F: 5' ATYGTYACRTGYGGCGGYATTG 3' R: 5' AGAAYAGAGCHTCYTTHGCKGA 3'	Tm= 64 Tm= 64	1190 pb
SET 6/PFK F: 5' GTRAARCGBGTBATTGGBTCC 3' R: 5' CCTTYATYGGDACBAGYATYTA 3'	Tm= 62 Tm= 62	1100 pb

Nomenclatura de degenerancias: Y= por la base C o T; R= por la base A o G; H= por la base A o C o T; K= por la base G o T; B= por la base C o G o T

Validación de secuencias

Se realizaron pruebas de validación para los conjuntos de primers SET1, diseñados tanto para el gen 18S como para el gen PFK, utilizando el programa BLAST. En el caso del gen 18S, los resultados específicos relacionados con el primer forward y las secuencias de referencia de las especies *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. theileri* y *T. vivax* están disponibles para su revisión en la Figura 3. En todos los casos, se encontraron 21 coincidencias exactas en un total de 22 caracteres, lo que representa una sorprendente similitud del 95%, sin que se detecten brechas ni inserciones en los alineamientos. Además, es importante destacar que ambas secuencias se encuentran en la misma dirección (Plus/Plus), lo que refuerza la validez de los sets de primers en relación con las secuencias de referencia.

Adicionalmente, se llevó a cabo la validación de los primers, incluyendo el primer reverse, con respecto a las mismas secuencias correspondientes a las especies mencionadas. Los resultados de esta validación se encuentran detallados en la Figura 4 para su análisis y evaluación. Esto permite una evaluación completa de la eficacia de los primers tanto en la dirección forward como en la dirección reverse en relación con las secuencias de referencia de las especies *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. theileri* y *T. vivax*. Hubo una coincidencia perfecta del 100% de identidades sin brechas o inserciones. La dirección del alineamiento es en sentido "Plus/Minus", lo que indica una orientación opuesta entre la secuencia de consulta y la secuencia de referencia en este caso.

La validación del gen PFK no pudo llevarse a cabo debido a la baja cantidad de secuencias disponibles en la base de datos GenBank.

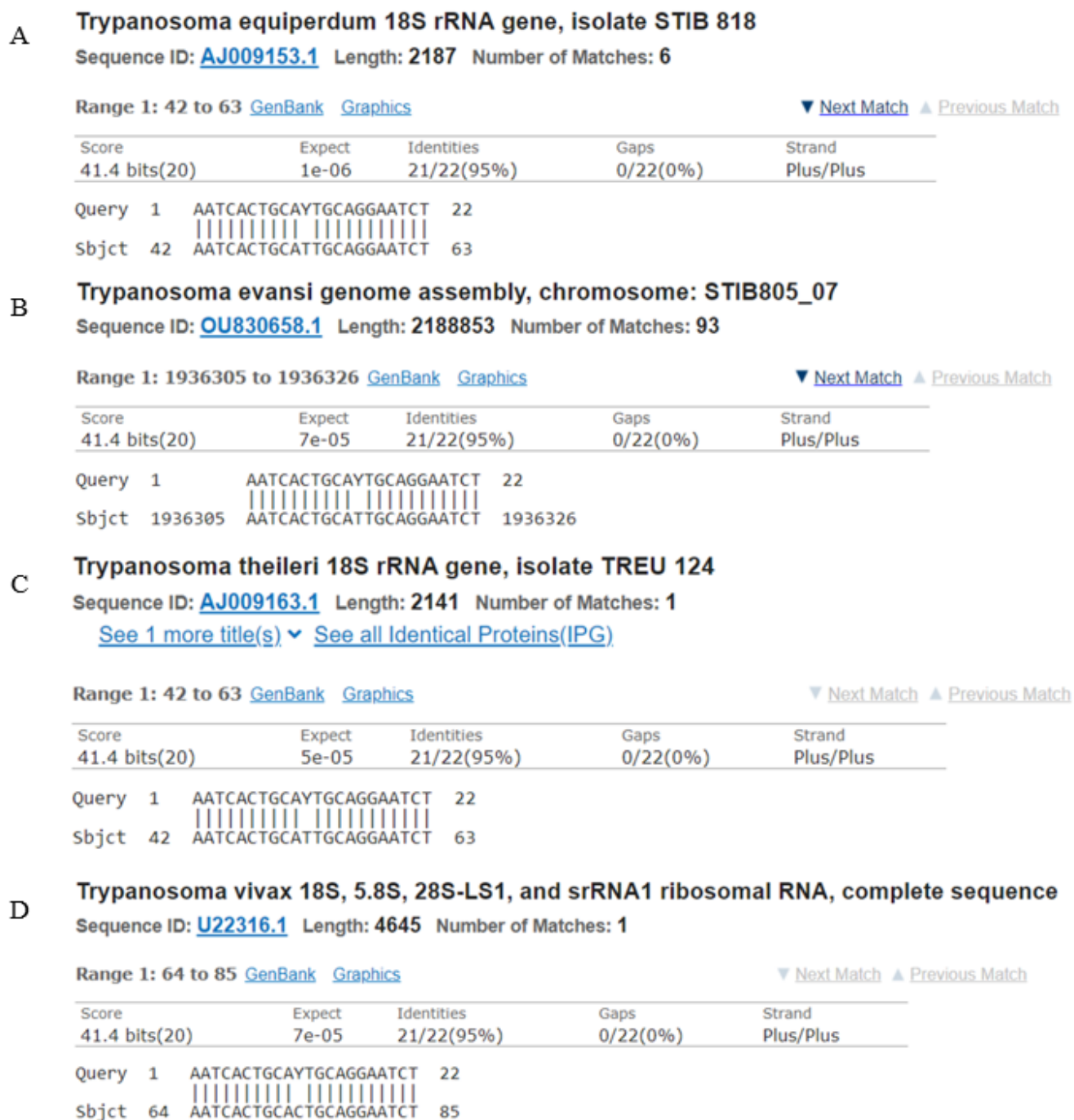


Figura 3. Validación del primer forward del gen 18S con la secuencia de analizadas. Secuencia: (A) *T. equiperdum*; (B) *T. evansi*; (C) *T. theileri*; (D) *T. vivax*.

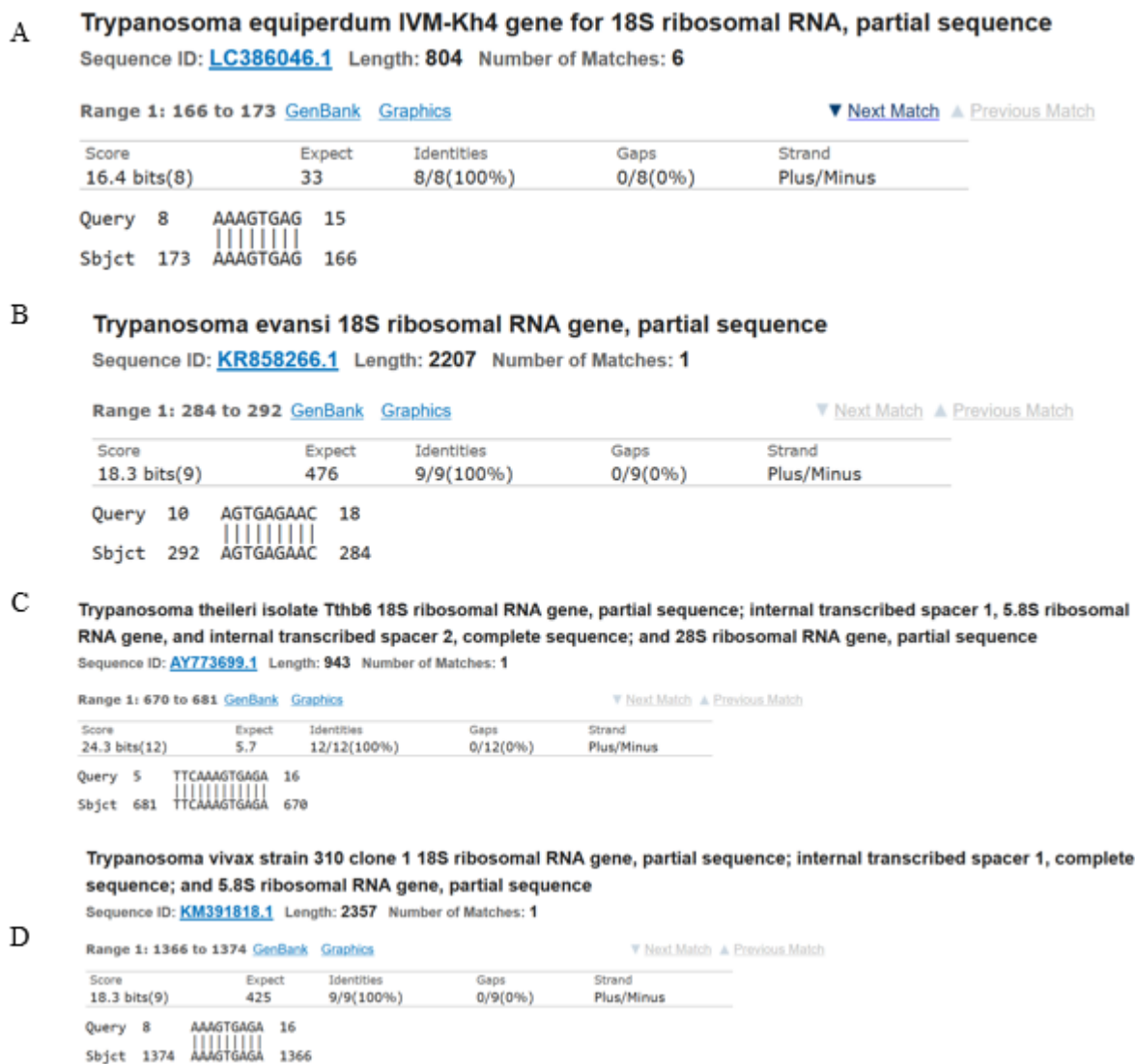


Figura 4. Validación del primer reverse del gen 18S con la secuencia de analizadas. Secuencia: (A) *T. equiperdum*; (B) *T. evansi*; (C) *T. theileri*; (D) *T. vivax*.

4. Discusión

En el presente estudio, se llevó a cabo el diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra las regiones 18S y PFK para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp. En lugar de basarse en la longitud de los fragmentos amplificados, se propone utilizar una técnica que clasifique las especies dentro de un grupo determinado según su similitud en un gen específico, como el gen 18S y PFK.

Se obtuvieron las secuencias para ambos genes a partir de referencias conocidas. Para el gen 18s se observó una gran cantidad de secuencias, estas secuencias proporcionan una herramienta invaluable para identificar y clasificar con precisión las diferentes especies de *Trypanosoma*, lo que facilita la comprensión de su diversidad y distribución geográfica (Keatley et al., 2020). Además, el uso de primers específicos basados en el gen 18S permite un diagnóstico temprano y preciso de enfermedades transmitidas por tripanosomas (Gaithuma et al., 2019). Así mismo, se utiliza para estudiar la evolución y las relaciones filogenéticas dentro del género *Trypanosoma* y con otros organismos relacionados (Moya et al., 2020). Esto proporciona información sobre la historia evolutiva de estos parásitos, sus relaciones con otros patógenos y su diversidad genética. En un estudio llevado a cabo en Ecuador por De la Cadena et al. (2023) se

investigó la presencia de *Trypanosoma theileri* en ganado bovino en la región amazónica del país. Esta área carecía de información suficiente sobre la tripanosomosis. Durante el período de 2014 a 2019, se tomaron muestras de sangre de bovinos en las provincias de Orellana y Sucumbíos como parte de campañas para detectar hemoparásitos. En este proceso, se utilizaron tres marcadores moleculares diferentes, incluido el marcador genético 18S. Este marcador 18S desempeñó un papel esencial en la identificación y caracterización del parásito en los bovinos examinados. El estudio encontró la presencia de *Trypanosoma theileri* en la provincia de Sucumbíos, con una prevalencia molecular específica del 8,6%.

Por otro lado, Darwish et al. (2023) menciona que la secuenciación del amplicón 18S en su estudio reveló una sorprendente riqueza de diversidad dentro de *T. evansi*, particularmente en ejemplares provenientes de camellos egipcios en comparación con camellos argelinos. Esta variabilidad genética podría reflejar tanto un prolongado aislamiento en las regiones de Egipto y Argelia como la posible participación de una amplia gama de vectores en la transmisión. Así también, Suganuma et al. (2016), llevó a cabo la caracterización molecular utilizando la técnica de amplificación por PCR del gen del ARN ribosómico 18S de *Trypanosoma equiperdum*. Los resultados obtenidos resaltan la efectividad del gen 18S rRNA para lograr una identificación precisa de las especies y para entender las relaciones filogenéticas.

En el caso del gen PFK, es importante destacar que no se pudo obtener evidencia de secuencias específicas de *Trypanosoma* para el gen PFK en GenBank. Esto puede deberse a diversas a una posibilidad es que el gen PFK de *Trypanosoma*, en particular, no haya sido ampliamente secuenciado y depositado en GenBank, así también a la falta de investigaciones previas que se hayan centrado en secuenciar y estudiar específicamente el gen PFK en esta especie (Tshitenge et al., 2022). Debido a la importancia del estudio del gen 18S en el género *Trypanosoma* y a los avances en la comprensión de la diversidad y filogenia de estas especies, se optó por incluir secuencias adicionales de *T. rangeli* y *T. cruzi* en la investigación. Al agregar más secuencias de estos dos parásitos, se amplía la representatividad de la información genética disponible, lo que permite obtener un panorama más completo y preciso de la variabilidad genética de estas especies. Además, estos nuevos sets de primers pueden tener aplicaciones en estudios epidemiológicos y de vigilancia, permitiendo un mejor seguimiento y monitoreo de la distribución y propagación de *T. rangeli* y *T. cruzi* en distintas regiones geográficas (Velásquez-Ortiz et al., 2022).

Se encontraron más secuencias para *T. evansi* y *T. vivax*. Esto es importante ya que *T. vivax* se distribuye fuera de África y puede transmitirse tanto cíclicamente por la mosca tsetse como también mecánicamente, mientras que la etiología y la patogenia de otras especies de *Trypanosomas* son poco conocidas (Jaimes-Dueñez et al., 2019). Mediante un análisis metagenómico Eleizalde et al. (2021) en su estudio se centró en el diagnóstico molecular de tripanosomas bovinos en Venezuela y proporcionó evidencia de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*. Así mismo, en otro estudio usó PCR para detectar la infección por *Trypanosoma* en la fauna australiana nativa usando cebadores dirigidos a un fragmento anidado de 320 pb del ARNr 18S (Eleizalde et al., 2021).

5. Conclusiones

En la búsqueda de regiones conservadas para la generación de primers degenerados, se identificaron áreas altamente conservadas en el gen 18S a través del análisis de múltiples secuencias de *Trypanosoma*. Estas regiones prometedoras ofrecen la posibilidad de amplificar amplicones largos, lo que resulta esencial para llevar a cabo un análisis metagenómico de estas especies a partir de una única muestra biológica. Además, los primers degenerados diseñados para amplificar las regiones conservadas en los genes 18S y PFK se sometieron a una validación *in silico*. Los resultados indicaron que los primers diseñados para el gen 18S tienen un alto potencial para unirse eficazmente a sus secuencias objetivo.

Sin embargo, en el caso del gen PFK, se encontraron limitaciones significativas debido a la escasa disponibilidad de secuencias específicas de *Trypanosoma* spp. en la base de datos GenBank. Estas limitaciones pueden atribuirse a la falta de secuenciaciones previas y estudio del gen PFK en estas especies.

Los primers aquí propuestos deben validarse analíticamente, empleando cepas o aislados previamente caracterizados, con la finalidad de probar su utilidad para la detección de especies individuales y luego su potencial aplicación para estudios metagenómico basados en secuenciación de lecturas largas.

Financiamiento/Fondos: “Esta investigación no recibió financiación externa”

Agradecimientos: A la Universidad Internacional SEK y la Maestría de Biomedicina.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

- Amos, B., Aurrecochea, C., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E. Y., Bazant, W., Belnap, R., Blevins, A. S., Böhme, U., Brestelli, J., Brunk, B. P., Caddick, M., Callan, D., Campbell, L., Christensen, M. B., Christophides, G. K., Crouch, K., Davis, K., Debarry, J., ... Zheng, J. (2022). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D898–D911. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB929>
- Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Büscher, P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasites & Vectors*, 12(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3311-4>
- Campos, M. J., & Quesada, A. (2017). Strategies to improve efficiency and specificity of degenerate primers in PCR. *Methods in Molecular Biology*, 1620, 75–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_4
- Cecchi, G., Paone, M., Feldmann, U., Vreysen, M. J., Diall, O., & Mattioli, R. C. (2014). Assembling a geospatial database of tsetse-transmitted animal trypanosomosis for Africa. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-39/FIGURES/4>
- Darwish, A. M., Sharaf, A., Gaouar, S. B. S., Ali, N. I., El-Aziz, T. H. A., Abushady, A. M., Kaouadji, Z., Othman, O. E., & Obornik, M. (2023). Biochemical and genotyping analyses of camels (*Camelus dromedaries*) trypanosomiasis in North Africa. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34086-y>
- De la Cadena, E., Camacho, M., Vaca, F., Enríquez, S., Eleizalde, M. C., Arrivillaga-Henríquez, J., Mendoza, M., Navarro, J. C., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2023). Molecular identification of *Trypanosoma theileri* in cattle from the Ecuadorian Amazon. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 37, 100824. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2022.100824>
- Ebhodaghe, F., Isaac, C., & Ohiolei, J. A. (2018). A meta-analysis of the prevalence of bovine trypanosomiasis in some African countries from 2000 to 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, 160, 35–46. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2018.09.018>
- Eleizalde, M. C., Gómez-Piñeres, E., Ramírez-Iglesias, J. R., & Mendoza, M. (2021). Evaluation of five primer sets for molecular detection of *Trypanosoma vivax* by polymerase chain reaction (PCR) and their implementation for diagnosis in naturally infected ruminants from Venezuela. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 25. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2021.100594>
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04584-X>
- Gaithuma, A. K., Yamagishi, J., Martinelli, A., Hayashida, K., Kawai, N., Marsela, M., & Sugimoto, C. (2019). A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of Trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006842>
- Goterris, L. (2020). *Pneumocystis jirovecii* en el siglo XXI [Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona. Respositorio Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/671130>
- Hinojosa, D. (2021). “Determinación de la seroprevalencia de tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma* spp. en tres provincias del oriente ecuatoriano (Napo, Orellana, Sucumbios)” [Tesis de pregrado, Universidad Internacional]. Respositorio de la Universidad Internacional SEK]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4253>
- Hutchinson, R., & Stevens, J. R. (2018). Barcoding in trypanosomes. *Parasitology*, 145(5), 563–573. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002049>
- INEC. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-2019/>
- Jaimés-Dueñez, J., Zapata-Zapata, C., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2019). Evaluation of an alternative indirect-ELISA test using *in vitro*-propagated *Trypanosoma brucei* whole cell lysate as antigen for the detection of

- anti-Trypanosoma evansi IgG in Colombian livestock. *Preventive Veterinary Medicine*, 169. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.104712>
- Keatley, S., Botero, A., Fosu-Nyarko, J., Pallant, L., Northover, A., & Thompson, R. C. A. (2020). Species-level identification of trypanosomes infecting Australian wildlife by High-Resolution Melting - Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (HRM-qPCR). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 13, 261. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2020.11.003>
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). In silico PCR primer designing and validation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1275, 143–151. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_10
- Li, K., Shrivastava, S., & Stockwell, T. B. (2015). Degenerate primer design for highly variable genomes. *Methods in Molecular Biology*, 1275, 103–115. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_7
- Menin, J. F., & Nichols, N. M. (2013). Application notes for Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). *Engl. Biolabs Appl. Note*. www.neb.com/tmcalculator
- Moya, S. L., Pech-May, A., Quintana, M. G., Manteca-Acosta, M., & Salomón, O. D. (2020). Phylogenetic relationships of closely-related phlebotomine sand flies (diptera: psychodidae) of nyssomyia genus and Lutzomyia subgenus. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115(8), 1–10. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200220>
- Peña, C. (2011). Comentario: Métodos de inferencia filogenética. *Rev. Peru. Biol*, 18(2), 265–267. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v18n2/a23v18n2.pdf>
- Pinto, C. M., Kalko, E. K. V., Cottontail, I., Wellinghausen, N., & Cottontail, V. M. (2012). TcBat a bat-exclusive lineage of Trypanosoma cruzi in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(6), 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2012.04.013>
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2017). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax infections. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 41(2), 450. <https://doi.org/10.1007/S12639-016-0826-X>
- Suganuma, K., Narantsatsral, S., Battur, B., Yamasaki, S., Otgonsuren, D., Musinguzi, S. P., Davaasuren, B., Battsetseg, B., & Inoue, N. (2016). Isolation, cultivation and molecular characterization of a new Trypanosoma equiperdum strain in Mongolia. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1755-3/FIGURES/4>
- Tshitenge, T. B., Reichert, L., Liu, B., & Clayton, C. (2022). Several different sequences are implicated in bloodstream-form-specific gene expression in Trypanosoma brucei. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010030>
- Velásquez-Ortiz, N., Hernández, C., Cantillo-Barraza, O., Medina, M., Medina-Alfonso, M., Suescún-Carrero, S., Muñoz, M., Vega, L., Castañeda, S., Cruz-Saavedra, L., Ballesteros, N., & Ramírez, J. D. (2022). Estimating the genetic structure of Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae) and the transmission dynamics of Trypanosoma cruzi in Boyacá, eastern Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(7), e0010534. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010534>
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P. V., Büscher, P., & Touratier, L. (2008). Presence of Trypanosoma theileri in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 352–354. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1428.016>
- Yasine, A., Ashenafi, H., Geldhof, P., Van Brantegem, L., Vercauteren, G., Bekana, M., Tola, A., Van Soom, A., Duchateau, L., Goddeeris, B., & Govaere, J. (2019). Histopathological lesions in reproductive organs, distal spinal cord and peripheral nerves of horses naturally infected with Trypanosoma equiperdum. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1916-7>

Anexo 1

Forward

```

PFK_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000845600)      GGTATTGTCACGTGCGGTGGTATTGCCCCGGCCTCAACGACGTCATCCGTTCCATCACC 360
PFK_Trypanosoma_evansi (OU830654.1)              GGTATTGTCACGTGCGGTGGTATTGCCCCGGCCTCAACGACGTCATCCGTTCCATCACC 360
Trypanosoma_vivax (HE573019.1)                   GGCATCGTTACGTGCGGTGGCATTGTCCCTGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCCATCACT 351
PFK_Trypanosoma_theileri (TM35_000013140)        GGTATCGTTACATGTGGTGGTATTGCCCCGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCTTTGACC 354
PFK_Trypanosoma_theileri (XM_029020995.1)       GGTATCGTTACATGTGGTGGTATTGCCCCGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCTTTGACC 354
PFK_Trypanosoma_cruzi (XM_816960.1)              GGCATTGTACATGCGGAGGTATTGCCCCGGCTTGAATGACGTTGATTTCGTTCTTTGACT 354
PFK_Trypanosoma_rangeli (XM_029385192.1)        GGCATTGTACGTGCGGCGGTATTGCCCCGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCTTTGACT 357
*****

```

Reverse

```

PFK_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000845600)      ATGATTCGTGCTTGCCCACCGTCGGCCAATGACGCCCTCTTCTGCGCCACCCTTGCCACT 1200
PFK_Trypanosoma_evansi (OU830654.1)              ATGATTCGTGCTTGCCCACCGTCGGCCAATGACGCCCTCTTCTGCGCCACCCTTGCCACT 1200
Trypanosoma_vivax (HE573019.1)                   ATGATCCGTGCTTGCCCACCGCTGCGCCAATGACGCCCTCTTCTGCTCAACGCTGGCCACT 1191
PFK_Trypanosoma_theileri (TM35_000013140)        ATGATCCGTGCTGCCCCACCGTCTGCTAATGATGCTCTCTTCTGCGCCACTTTGGCAACT 1194
PFK_Trypanosoma_theileri (XM_029020995.1)       ATGATCCGTGCTGCCCCACCGTCTGCTAATGATGCTCTCTTCTGCGCCACTTTGGCAACT 1194
PFK_Trypanosoma_cruzi (XM_816960.1)              ATGATTCGCGCGCTGTCGCCCTCGGCAAAATGACGCTCTTTCTGCGCCACTCTTTCCACA 1194
PFK_Trypanosoma_rangeli (XM_029385192.1)        ATGATTCGAGCTTGCCCCACCGTCGGCAAAATGACGCTCTCTTCTGCGCCACCCTTGCCACA 1197
*****

```

Figura A1. Alineamiento SET3/PFK. Se observan nuevos primers adicionando secuencias de *T. rangeli* y *T. cruzi*. En el primer alineamiento se observa el primer forward, este es el oligonucleótido que se diseña para unirse a la hebra de ADN en la dirección de lectura del 5' al 3' en la cadena molde o templado. En el segundo alineamiento se encuentra el primer reverse, es el oligonucleótido diseñado para unirse al extremo 3' del fragmento complementario en la cadena molde. Los primers se encuentran resaltados en color amarillo.

Anexo 2

```

18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ009153.1)          -----GTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 38
18S_Trypanosoma_evansi (KY114576.1)              GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_evansi (AB551922.1)              GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_evansi (KT023565.1)              GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000284500)     GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ223564.1)          -----TGATTCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 52
18S_Trypanosoma_theileri (AJ009163.1)            -----GTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 38
18S_Trypanosoma_vivax (EU477537.1)              GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_vivax (KM391827.1)              -CTCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 59
18S_Trypanosoma_vivax (TvY486_03)                GATCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 60
18S_Trypanosoma_vivax (KM391829.1)              -CTCTGGTTGATCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTTTCAAGGACTTAGCCATGCATGCCT 59
*****

18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ009153.1)          CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 98
18S_Trypanosoma_evansi (KY114576.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 120
18S_Trypanosoma_evansi (AB551922.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 120
18S_Trypanosoma_evansi (KT023565.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 120
18S_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000284500)     CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 112
18S_Trypanosoma_theileri (AJ009163.1)            CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 98
18S_Trypanosoma_vivax (EU477537.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 120
18S_Trypanosoma_vivax (KM391827.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 119
18S_Trypanosoma_vivax (TvY486_03)                CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 120
18S_Trypanosoma_vivax (KM391829.1)              CAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATCAGACGTAATCTGCCGC 119
*****

18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ009153.1)          CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 157
18S_Trypanosoma_evansi (KY114576.1)              CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 179
18S_Trypanosoma_evansi (AB551922.1)              CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 179
18S_Trypanosoma_evansi (KT023565.1)              CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 179
18S_Trypanosoma_equiperdum (TEOVI_000284500)     CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 179
18S_Trypanosoma_equiperdum (AJ223564.1)          CAAAATTTTGGCGTC-TCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 171
18S_Trypanosoma_theileri (AJ009163.1)            AAAAATCTTGGCGTT-TCCGCAACATTTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 157
18S_Trypanosoma_vivax (EU477537.1)              AATCACTTTTGGCGTCTCCGCATTACTGGATAAATTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATG 180

```

Table with 3 columns: Accession ID (e.g., 18S_Trypanosoma_vivax_KM391827.1), Primer Sequence (e.g., AATCACTTTGCGGTCTCCGCATTACTGGATAA...), and Position (e.g., 179). The table lists multiple primer pairs for various Trypanosoma species across different regions.

Table with 4 columns: Species/Accession, Primer Sequence, Species/Accession, and Page Number. The table lists various Trypanosoma species and their corresponding primer sequences, with page numbers ranging from 599 to 922.

```
***** ** * * * * * ***** * * * * * *****

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      997
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      1019
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      1019
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      1019
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      1019
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAAGTCCTGGGAGATTATGGGGCCCGCTGCCTGGGT      1011
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       GTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGTCCTATGGAGATTATGGGGCTCGCGCAACGGT      968
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          GATTCGGCTTTTGTGGTTTTAGCAGTCCGTTGGAGATTGGGGCCCGCGCAGCAGGCA      983
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          GATTCGGCTTTTGTGGTTTTAACAGTCCGTTGGAGATTATGGGGCCCGCGCAGCAGGCA      982
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           GATTCGGCTTTTGTGGTTTTAACAGTCCGTTGGAGATTATGGGGCCCGCGCAGCAGGCA      983
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          GATTCGGCTTTTGTGGTTTTAACAGTCCGTTGGAGATTATGGGGCCCGCGCAGCAGGCA      982
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1034
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1056
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1056
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1056
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1056
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     CGGTGTTTCGTTGCTCATTTTTGTGGCGGCACATTC-----                1048
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       CTGGGTGATTCCCTTCGCGGGCACCCTGCGCTTTCGCGGAAATCCGTGTCGGTGTGA      1028
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          CCGCGGATTCCGCTCGGAACACGCGCACGCCCCGCGGCG-----            1024
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          CCGCGGATTCCGCTCGGAACACGCGCACGCCCCGCGGCG-----            1023
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           CCGCGGATTCCGCTCGGAACACGCGCACGCCCCGCGGCG-----            1024
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          CCGCGGATTCCGCTCGGAACACGCGCACGCCCCGCGGCG-----            1023
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1091
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1114
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1114
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1114
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1114
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     --GGCTCTTCGTTGATGTTT--TTTACATTCATTGCGACGCGCGGCTCCAGGAATGAAGGA      1106
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       TGAGCTTCGCGCCATCTCTCCGCGCCTTCCCGTACTCAGCAGCAGCAGGAAATGAAGGA      1088
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          -----CCTCGCGCTCGCGGCTCGCGGCGCGGAAATGAAGGA      1062
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          -----CCTCGCGCTCGCGGCTCGCGGCGCGGAAATGAAGGA      1061
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           -----CCTCGCGCTCGCGGCTCGCGGCGCGGAAATGAAGGA      1062
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          -----CCTCGCGCTCGCGGCTCGCGGCGCGGAAATGAAGGA      1061
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1151
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1174
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1174
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1174
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1174
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1166
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       GGGTAGTTCGCGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1148
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          GGGCGGCTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1122
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          GGGCGGCTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1121
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           GGGCGGCTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1122
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          GGGCGGCTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATCTTAGACCCGACCAAG      1121
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1211
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1234
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1234
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1234
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1234
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1226
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       ACGAATACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1208
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          ACGAACCACAGCGAAGGCATTCTCAAGGACGCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1182
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          ACGAACCACAGCGAAGGCATTCTCAAGGACGCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1181
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           ACGAACCACAGCGAAGGCATTCTCAAGGACGCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1182
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          ACGAACCACAGCGAAGGCATTCTCAAGGACGCTTCCTCAATCAAGAACCAGAGTGTTGG      1181
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1271
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1294
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1294
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1294
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1294
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     GGATCAAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1286
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)       GGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACACCCATGAATT      1268
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)          GGATCGAAGATGATCAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACGCCATGGATT      1242
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)          GGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACGCCATGAATT      1241
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)           GGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACGCCATGAATT      1242
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)          GGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGCAAACCATGACGCCATGAATT      1241
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)      GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1331
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)         GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1354
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)         GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1354
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)         GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1354
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500) GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1354
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)     GGGGAACATCATTTGGGTGCCGCTGTGGCGGCCTTTTGTGCCGACCTCGGCCCAATTTA      1346
```

18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GGGGAAATTTTGGTGCAGCGGGGGTTCAGATTCTATCTCG--CTCCTCGCCTCGCCAATG	1325
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GGGGACCTGTGGCCAGCGCGCCCGGGCTCGCCCGCG--CGCGCGCGCTCCACCA	1299
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GGGGACCTGTGGCCAGCGCGCCCGGGCTCGCCCGCG--CGCGCGCTCCACCA	1298
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GGGGACCTGTGGCCAGCGCGCCCGGGCTCGCCCGCG--CGCGCGCTCCACCA	1299
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GGGGACCTGTGGCCAGCGCGCCCGGGCTCGCCCGCG--CGCGCGCTCCACCA	1298
	**** * * * * *	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1391
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1414
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1414
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1414
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1414
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	TTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTCTTTTGGAGTCTTCCGGG	1406
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GATATCAATTTACGTGCATATTCTTTTCGGTC-----CTCGCAAGGGG	1368
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	A----CCATCACGTGCTATTCTTTGGCGC-----GCCCTCGCGCC	1339
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	A----CCATCACGTGCTATTCTTTGGCGC-----GCTTCGGCC--C	1335
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	A----CCATCACGTGCTATTCTTTGGCGC-----GCTTCGGCC--C	1336
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	A----CCATCACGTGCTATTCTTTGGCGC-----GCTTCGGCC--C	1335
	* * * * *	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1450
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1473
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1473
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1473
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1473
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GTTTTTTACGGGAATATCCTCAGCAGCT-TTCTTACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1465
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GCCTTTAACGGGAATATCCTCAGCAGCTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1428
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	CGCCGATAAGGGGAATGCTCTCAGCA----CGTCCA-ACCGCCACGCGAAGCTTGGAGGT	1394
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	CGCCGCTACGGGAATGCTCTCAGCA----CGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1391
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	CGCCGCTACGGGAATGCTCTCAGCA----CGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1392
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	CGCCGCTACGGGAATGCTCTCAGCA----CGTCTCACTGCCACGCGAAAGCTTGGAGGT	1391
	* * * * *	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1510
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1533
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1525
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1488
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1454
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1451
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1452
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	TACAGTCTCAGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATGACGGAATGGC	1451

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1570
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1593
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1593
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1593
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1593
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1585
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1548
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1514
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1511
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1512
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	ACCACAAGAGCTGGAGCGTCCGGTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGATCC	1511

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1630
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1653
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1653
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1653
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1653
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1645
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1608
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1574
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1571
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1572
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GGACAGGGTGGAGATTGACAGATGGAGTGTCTTCTCGATCCCTGAATGGTGGTGCAT	1571

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1690
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1713
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1713
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1713
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1713
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1705
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAA	1668
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAG	1634
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAG	1631
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAG	1632
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GGCCGCTTTTGGTCCGTTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCTGCAACGGACGAGATCCAG	1631

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GCTGCCAGTGGAGTCCGGGATTTGCCACAGGACAGCAGTCCCTCCGGGGGATTTT	1750

18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1773
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1773
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1773
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1773
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1765
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GCTGCCAGTAGGTGCCGGGATGTCCACACAGGACAGCAGTCCCTCCGGCGGGATTTT	1724
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GCCGCCATTAGGCCCGGGATCAGCACAGGACAGCAGCCCGCGG---CGGGCCG--C	1688
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GCCGCCAGTAGGCCCGGGATCAGCACAGGACAGCAGCAGCGGTGGC---GGGCCCT--C	1687
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GCCGCCAGTAGGCCCGGGATCAGCACAGGACAGCAGCAGCGGTGGC---GGGCCCT--C	1688
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GCCGCCAGTAGGCCCGGGATCAGCACAGGACAGCAGCAGCGGTGGC---GGGCCCT--C	1687
	** ***** **	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1810
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1833
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1833
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1833
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1833
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	TTCCCCAACGGTGGTGCATCCTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGGGATTCCTTGC	1825
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	TCCCAAGG-AG-GGGC-----ATATTCTGTTTGTATCCTTCTCTGCGGGA--TTCCTT	1773
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	AAGCCCAA-CGCCGCA-----GCATCCGGCCGGGCTTCTCTGCGGGA---TTCCT	1737
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GGGCCAA-CGCCGTC-----GCATCCGGTCGGGCTTCTCTGCGGGA---TTCCT	1736
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GGGCCAA-CGCCGTC-----GCATCCGGTCGGGCTTCTCTGCGGGA---TTCCT	1737
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GGGCCAA-CGCCGTC-----GCATCCGGTCGGGCTTCTCTGCGGGA---TTCCT	1736
	* * * * *	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1870
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1893
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1893
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1893
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1893
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1885
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	TTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1833
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	TTCGCGCAAGGTGAGATGCTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1797
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	TGCACGCGCAAGGTGAGATGCTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1796
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	TGCACGCGCAAGGTGAGATGCTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1797
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	TGCACGCGCAAGGTGAGATGCTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGG	1796

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1930
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1953
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1953
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1953
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1953
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1945
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1884
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1846
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1845
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1846
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GCGACACGCGCACTACAATGTCAAGTGCAGTGGGAAACAGAGTCCGAGCGGCACTTCCAAATGTCG	1845

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1990
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	2013
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	2013
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	2013
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	2013
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	CTCCCGCTTGATCAAAGAGCGGGGAAACCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	2005
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GACCTACTTGATCAAAGAGTGGGAAACCCCGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1944
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	CGCCCGCTGACCAAAGGGCGGGGAAAGCAGCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1906
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	CGCCCGCTGACCAAAGGGCGGGGAAAGCAGCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1905
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	CGCCCGCTGACCAAAGGGCGGGGAAAGCAGCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1906
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	CGCCCGCTGACCAAAGGGCGGGGAAAGCAGCAGGAAATCAGTAGACCCACTTGGGACCGA	1905
	** * * * * * * * * * *	
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2050
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2073
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2073
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2073
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2073
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2065
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	2004
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCGCTCATCAAACCCG	1966
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	1965
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	1966
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	GTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCGTAAGGCGCAGCTCATCAAACCTGT	1965

18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2110
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2133
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2133
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2133
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2133
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2125
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2064
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2026
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	GCCGATTACGTCCTGCCATTTGTACACACCGCCGTCGTTGTTCCGATGATGGTGCAA	2025

18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	-----	2251
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	-----	2220
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	-----	2141
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	-----	2140
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	-----	2108
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	-----	2187
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	-----	2251
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	CTCGCATATTTTCTCCCTGTGACCACGGCTCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG	2613
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	-----	2216
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	-----	2251
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	-----	2220
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	-----	2141
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	-----	2140
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	-----	2108
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	-----	2187
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	-----	2251
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	CTTCTATTTTCGTTGAAGAACGACGAAAGTCCGGTAAGTGGTATCAATTGCAGAATCAT	2673
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	-----	2216
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	-----	2251
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	-----	2220
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	-----	2141
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	-----	2140
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	-----	2108
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ009153.1)	-----	2187
18S_Trypanosoma_evansi_(KY114576.1)	-----	2251
18S_Trypanosoma_evansi_(AB551922.1)	TTCATTGCCCAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCT	2717
18S_Trypanosoma_evansi_(KT023565.1)	-----	2216
18S_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000284500)	-----	2251
18S_Trypanosoma_equiperdum_(AJ223564.1)	-----	2220
18S_Trypanosoma_theileri_(AJ009163.1)	-----	2141
18S_Trypanosoma_vivax_(EU477537.1)	-----	2140
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391827.1)	-----	2344
18S_Trypanosoma_vivax_(TvY486_03)	-----	2108
18S_Trypanosoma_vivax_(KM391829.1)	-----	2344
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ATGGCCGTTGAATCTCGCAGCCGCGTTACGAGCAAGCTCGTCAAGGCCACCCGCGCCATG	60
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ATGGCCGTTGAATCTCGCAGCCGCGTTACGAGCAAGCTCGTCAAGGCCACCCGCGCCATG	60
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	-----ATGGAGTCTCGTCTGTCACCCAGCAAACCTGGTCTCTCTCCGCGCCCTCA	54
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	-----ATGGAGTCTCGTCTGTCACCCAGCAAACCTGGTCTCTCTCCGCGCCCTCA	54
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	-----ATGGAAACCCGTCACAGTGTGACAAAGCAAGCTCGTGGCTTCCAACCAAGCCATG	54
	* * * * *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CTGAACAGCGTACTCAGGAGGACCTCAAGGTGGACCGCCTCCCGGTGCGGATTACCCG	120
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CTGAACAGCGTACTCAGGAGGACCTCAAGGTGGACCGCCTCCCGGTGCGGATTACCCG	120
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	CTGAGCAAAGTGACACAGGAGGATCTTAATGTGGAGCGTCTCCGGGACGCAATACGTA	114
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	CTGAGCAAAGTGACACAGGAGGATCTTAATGTGGAGCGTCTCCGGGACGCAATACGTA	114
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CTGAAGAATGTAACCTCAGAGTGACCTTAAGGTGCACCGTCTTCCCTGGCACCACACTACGCC	114
	**** * * * * *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	AACCCGTCCAAAAAATATTCGTCGCGCACAGAGTTCCGTGACAAGACGGATTACATCATG	180
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	AACCCGTCCAAAAAATATTCGTCGCGCACAGAGTTCCGTGACAAGACGGATTACATCATG	180
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	AATCCAAGCAGGAAACATGTGATGCGTGAGGAGTTTCTGACCGTATTGAACACATCATG	174
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	AATCCAAGCAGGAAACATGTGATGCGTGAGGAGTTTCTGACCGTATTGAACACATCATG	174
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	AATCCCTCGAAGAAAG---TACACCACGCAAGAGTTCTCTGAAAGGATTGAGCACATCATG	171
	** * * * * * * * * * *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	TACAACCCCGCCCCAGGGATGAACCCCTCTTCGGAGAACCCTGTATCGGTGAGCCCACTC	240
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	TACAACCCCGCCCCAGGGATGAACCCCTCTTCGGAGAACCCTGTATCGGTGAGCCCACTC	240
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TACGACCACGCCCCACAAGAGGGATCTCCCTCTAATAATCTATCTCTTTAAGCCCCCTT	234
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TACGACCACGCCCCACAAGAGGGATCTCCCTCTAATAATCTATCTCTTTAAGCCCCCTT	234
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	TATGATCCTCGTCCACAGGAGGAGTGTGAGGGCAATCCAGTCTCTGAGCCCTTT	231
	** * * * * * * * * * *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CTTTGCGAAGTGTCTGCTGCCCGCTCGCGCATTCACCTTCAACCCGACGGAGACCACCGTT	300
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CTTTGCGAAGTGTCTGCTGCCCGCTCGCGCATTCACCTTCAACCCGACGGAGACCACCGTT	300
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	CTCTGTGAGCTTCCCGCACCCCGTTCATCGCCTTCACTTTAACCAGCCGATACAGTTGTA	294
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	CTCTGTGAGCTTCCCGCACCCCGTTCATCGCCTTCACTTTAACCAGCCGATACAGTTGTA	294

Figura A2. Alineamiento 18S. Se pueden observar las secuencias de los genes 18S de los parásitos *Equiperdum*, *Evansi*, *Theileri* y *Vivax*. Cada secuencia está representada por una serie de bases nucleotídicas, y las similitudes y diferencias entre ellas pueden ser analizadas para comprender mejor las relaciones genéticas entre estos organismos.

Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CTGTGTGAAC TTGCCGCTCCGGCTCACGCACTTCACTTTAAACCCGGTAAACTGTCATT * * * * *	291
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GGTATTGTACAGTTCGGTGGTATTGGCCCCGCTCAACGACGTCATCCGTTCCATCACC	360
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GGTATTGTACAGTTCGGTGGTATTGGCCCCGCTCAACGACGTCATCCGTTCCATCACC	360
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	GGTATCGTTACATGTGGTGGTATTGGCCCTGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCTTTGACC	354
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	GGTATCGTTACATGTGGTGGTATTGGCCCTGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCTTTGACC	354
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	GGCATCGTTACGTTCGGTGGCATTTGTCCTGGTCTCAATGATGTGATTTCGTTCCATCACT * * * * *	351
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CTTACCGGCATCAACGTGTACAACGTAAGCGCGTGATTGGCTTCCGCTTCGGATACTGG	420
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CTTACCGGCATCAACGTGTACAACGTAAGCGCGTGATTGGCTTCCGCTTCGGATACTGG	420
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	CTTACTGCTATTAAGGCCTACAGTGTAAACGTTGTTATGGTTTCCGTTTGGTACTGG	414
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	CTTACTGCTATTAAGGCCTACAGTGTAAACGTTGTTATGGTTTCCGTTTGGTACTGG	414
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CTGACGCCATCAATGCATACACGTAAGCGTGATTGGCTTCCGCTTCGGATACTGG * * * * *	411
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GGCCTTTCCAAGAAGGCGAGTGTACAACGTAAGCGCGTGATTGGCTTCCGCTTCGGATACTGG	480
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GGCCTTTCCAAGAAGGCGAGTGTACAACGTAAGCGCGTGATTGGCTTCCGCTTCGGATACTGG	480
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	GGTCTGTCTAAGAGTGGTCCCCACACTGCTATGGAGCTTTACCCGAGCTCTGTTACAAGC	474
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	GGTCTGTCTAAGAGTGGTCCCCACACTGCTATGGAGCTTTACCCGAGCTCTGTTACAAGC	474
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	GGTCTCTCCAAGAAGGGAAGCCACACTGCAATGGAACTTCATCCGAGCTCCGTAACCAAC * * * * *	471
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ATCCACCACATATGGCGGCACCATCTCAGGCAGCAGCCGTTGCCACAGGACCCCAAGGAG	540
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ATCCACCACATATGGCGGCACCATCTCAGGCAGCAGCCGTTGCCACAGGACCCCAAGGAG	540
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ATTCACCGCCATGGTGGTACAATTCCTGGAAAGCAGCCGTTGCCACAGGATCCAAAGGAA	534
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ATTCACCGCCATGGTGGTACAATTCCTGGAAAGCAGCCGTTGCCACAGGATCCAAAGGAA	534
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	ATTCACCGCCAGCGTGGTACGATTTGGGGAGCAGCCGTTGCCACAGGACCCCAAGGAG * * * * *	531
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ATGGTTGATACTCTCAGCGCCTCGGTGTCAACATCCTCTTACCCTGGTGGTACGGC	600
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ATGGTTGATACTCTCAGCGCCTCGGTGTCAACATCCTCTTACCCTGGTGGTACGGC	600
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ATGGTTGACACATTCGAGCGACTGGTGTAAATATTCCTTACTGTGGTGGAGATGGA	594
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ATGGTTGACACATTCGAGCGACTGGTGTAAATATTCCTTACTGTGGTGGAGATGGA	594
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	ATGGTTGACACCGCTCCAGCGCTCTGGAGTCAACATTCCTTACCCTGGTGGTACGGC * * * * *	591
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ACGCAGCGCGGTTCGCTCCTCCTCAAGAAGCCAAGCGCGGGTGTGCATCTCC	660
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ACGCAGCGCGGTTCGCTCCTCCTCAAGAAGCCAAGCGCGGGTGTGCATCTCC	660
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ACACAACGTTGGTCCCTCTCAATTCCTCAAGAAGCCAAGCGCTGCAGGATGCATTGCT	654
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ACACAACGTTGGTCCCTCTCAATTCCTCAAGAAGCCAAGCGCTGCAGGATGCATTGCT	654
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	ACACAGCGCGGTGCCCTTGTCTTGCAGGAAAGCCAGCAGCCCGGTTGCCGACATTGCG * * * * *	651
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GTTTTTTGGTGTTCCTCAAGACTATTGACAACGACCTCAGCTTCTCACCAGCAGTTCGGC	720
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GTTTTTTGGTGTTCCTCAAGACTATTGACAACGACCTCAGCTTCTCACCAGCAGTTCGGC	720
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	GTTTTTTGGTGTTCCTCAAAACCATTGATAACGACCTCAGTTTTTTACACCGTACATTTGGT	714
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	GTTTTTTGGTGTTCCTCAAAACCATTGATAACGACCTCAGTTTTTTACACCGTACATTTGGT	714
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	GTCCTTGAAGCTTCCCAAAAGCATTGACATGACCTCAGCTTTTCTCACCAGCAGTTCGGC * * * * *	711
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	TTCCAGACTGCTGTTGAGAAGGCTGTGCAGGCCATCCGCGCGCGGTATGCTGAGGCTGTC	780
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	TTCCAGACTGCTGTTGAGAAGGCTGTGCAGGCCATCCGCGCGCGGTATGCTGAGGCTGTC	780
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TTCCAAACTGCTGTGGAAAGGCTGTCAAGCTATTCGTCGCCGATACCGTGGGCTATT	774
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TTCCAAACTGCTGTGGAAAGGCTGTCAAGCTATTCGTCGCCGATACCGTGGGCTATT	774
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	TTCCAGACCCTGTGGAAAGGCTATTCAGGCCATCCGTCGCTACCGAGAAGCCATT * * * * *	771
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	TCCGCCAACTATGGTGTGGCGTTGTGAAGCTCATGGTTCGTCACGCGGCTTCATTGCC	840
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	TCCGCCAACTATGGTGTGGCGTTGTGAAGCTCATGGTTCGTCACGCGGCTTCATTGCC	840
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TCTCTCAATTACGGTGTGGCGTTGTAAAGCTCATGGTTCGTCACAGTGGTTTCATTGCT	834
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TCTCTCAATTACGGTGTGGCGTTGTAAAGCTCATGGTTCGTCACAGTGGTTTCATTGCT	834
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	TCACTTAACATATGGTGTGGTGTGTAAAGCTCATGGGCGCGACAGTGGTTTCATTGCT * * * * *	831
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GCTCAGGCTGCAGTGGCCAGTGCAGCCGCAATATCTGCCTTGTTCCTGAAAACCCCATC	900
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GCTCAGGCTGCAGTGGCCAGTGCAGCCGCAATATCTGCCTTGTTCCTGAAAACCCCATC	900
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	GCGCAAGCAGCTGTGGCAAGCGCCAGGCAATATTTGCCTTGTTCCTGAAAACCCATC	894
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	GCGCAAGCAGCTGTGGCAAGCGCCAGGCAATATTTGCCTTGTTCCTGAAAACCCATC	894
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	GCCGCAAGCGCGGTGGAGGCTGCAGTGTGCAGCCCAACATCTGCCTGTACCGGAATCCGATT * * * * *	891
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	TCCGAGCAGGAGGTGATGTCCTTCTGGAGCGCGATTTGCCATTCGCCCTTCCGTCGCTC	960
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	TCCGAGCAGGAGGTGATGTCCTTCTGGAGCGCGATTTGCCATTCGCCCTTCCGTCGCTC	960
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	CCTGAAGAAACAGTAATGAAGCTGATGAACGCCGCTTTGAGACTTCCCGCAGCTGTGTT	954
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	CCTGAAGAAACAGTAATGAAGCTGATGAACGCCGCTTTGAGACTTCCCGCAGCTGTGTT	954
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CCTGAGGAAAGGAGTGTGGCCCTGATTGCAGCCGCTTTGCCACCTCCAGCAGCTGCGTC * * * * *	951
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ATCATCGCTCAGTGGGATTCGGGCAAGACTGGGCGCGGCTCTGGTGGTTATGATGCG	1020
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ATCATCGCTCAGTGGGATTCGGGCAAGACTGGGCGCGGCTCTGGTGGTTATGATGCG	1020
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ATCATCTTCGAGAGGTTTGGCCAGAACTGGGAGGAAAGTTCTCTCGCTATGATGCC	1014
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ATCATCTTCGAGAGGTTTGGCCAGAACTGGGAGGAAAGTTCTCTCGCTATGATGCC	1014
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	ATTTATTGCTGAGGCTTTGGCCAGGACTGGGAGAAGATTTCGTTGGATACGATGCC * * * * *	1011

PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	TCTGGCAACAAGAAGCTGATTGACATCGGCGTTATCCTCACGGAGAAAGTGAAGGCTTTC	1080
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	TCTGGCAACAAGAAGCTGATTGACATCGGCGTTATCCTCACGGAGAAAGTGAAGGCTTTC	1080
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TCAGGCAACAAGAATAATGTTGGACATTTGGTATTGTTCTCACGAAGAGGATTCAAAAGTGG	1074
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TCAGGCAACAAGAATAATGTTGGACATTTGGTATTGTTCTCACGAAGAGGATTCAAAAGTGG	1074
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	TCTGGCAACAAGAAGTATTGACATCGGCGTTATCCTCACGGAGAAAGTGAAGGCTTGG	1071
	** ***** ** * ***** ** * * ***** ** * * * *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CTCAAGGCAACAAGTCTCGCTACCTGACTCGACAGTTAAATACATTGACCCCTCGTAC	1140
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CTCAAGGCAACAAGTCTCGCTACCTGACTCGACAGTTAAATACATTGACCCCTCGTAC	1140
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TTGAAGGAGAACCCTGATCGTTATCCTCATGGCACAGTGAAGTATATTGATCCCTCATAT	1134
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TTGAAGGAGAACCCTGATCGTTATCCTCATGGCACAGTGAAGTATATTGATCCCTCATAT	1134
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CTCAAGGCAACAAGAACGGTACCTGCGGCGCTCCGTTAAGTATGTGGATCCCTCTTAC	1131
	* **** * ** *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	ATGATTCGTGCTTGGCCACCCTGCGCAATGACGCCCTTCTTTCGCGCCACCCTTGGCACT	1200
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	ATGATTCGTGCTTGGCCACCCTGCGCAATGACGCCCTTCTTTCGCGCCACCCTTGGCACT	1200
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ATGATCCGTGCATGCCACCTTCTGCTAATGATGCTCTCTTCTGCGCCACTTTGGCAACT	1194
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ATGATCCGTGCATGCCACCTTCTGCTAATGATGCTCTCTTCTGCGCCACTTTGGCAACT	1194
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	ATGATCCGTGCTTGGCCACCCTGCGCAACGACGCACTCTTCTGCTCAACGCTGGCCACT	1191
	***** ***** ***** ** *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CTTGGCGTACATGAGGCAATGGCTGGTGGCCACGGGCTGCATTATTGCCATGCGGCACAAC	1260
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CTTGGCGTACATGAGGCAATGGCTGGTGGCCACGGGCTGCATTATTGCCATGCGGCACAAC	1260
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	CTCGCCATGCATGAGGCGATGGCTGGTGGCCCAACTGTATCATTGGCATGCGCTACAAC	1254
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	CTCGCCATGCATGAGGCGATGGCTGGTGGCCCAACTGTATCATTGGCATGCGCTACAAC	1254
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CTCGCGGTGCACGAGGCCATGTCAGGTGCAACCGACTGCATCATTGCCATGCGCTACAAC	1251
	** *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	AACTATATTCTTGTGCCCATCAAGGTGGCCACTTCCGTCGCCGCTGTGCTCGACCTCCGC	1320
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	AACTATATTCTTGTGCCCATCAAGGTGGCCACTTCCGTCGCCGCTGTGCTCGACCTCCGC	1320
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	AATTACATTTCTTGTCCCATTAAGGTGGCTACTTCCAGTCCGCGGTGTGATTGACCTTCGG	1314
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	AATTACATTTCTTGTCCCATTAAGGTGGCTACTTCCAGTCCGCGGTGTGATTGACCTTCGG	1314
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	AACTACATCCTGTACCTATCAAGGTGTGCTACTTCTGTCGCCGCGTCCCTTGACCTTAAAC	1311
	** *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GGACAGCTGTGGCGTCAAGTGGCTGAAATCACAGTGGATCTGGGCAGCGACGTCCGCGCTG	1380
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GGACAGCTGTGGCGTCAAGTGGCTGAAATCACAGTGGATCTGGGCAGCGACGTCCGCGCTG	1380
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	GGTCAGCTCTGGCGTCAAGTGGCGGAGATCACTGTTGGACTTACGACGATGTACGCGCC	1374
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	GGTCAGCTCTGGCGTCAAGTGGCGGAGATCACTGTTGGACTTACGACGATGTACGCGCC	1374
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	GGTCAGCTGTGGCGCAGGTGGCGGAGATCACTGTGGATCTCAGCGACGACGTGGCGACT	1371
	** ***** ***** ** *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	GCTCGTAAATGGAGATCCGCCGTGAACGGAGCAATCAACAGGAATCGCGACCGCCTC	1440
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	GCTCGTAAATGGAGATCCGCCGTGAACGGAGCAATCAACAGGAATCGCGACCGCCTC	1440
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	TGTAAGGAAACAGAAATCCGTCGTGAGCTTGAGGCAATGGATTGATTCGTGAGCGTCTT	1434
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	TGTAAGGAAACAGAAATCCGTCGTGAGCTTGAGGCAATGGATTGATTCGTGAGCGTCTT	1434
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	CAAAGGAGTGCAGATCCGCCGAGCTGGAGGCTCTCAGCATTACCAGAGGCGCCTC	1431
	* *	
PFK_Trypanosoma_equiperdum_(TEOVI_000845600)	CACGAGGAATGGCCAAGCTCTAA	1464
PFK_Trypanosoma_evansi_(OU830654.1)	CACGAGGAATGGCCAAGCTCTAA	1464
PFK_Trypanosoma_theileri_(TM35_000013140)	ATCAATGAGTTGTCCAGGCTGTAG	1458
PFK_Trypanosoma_theileri_(XM_029020995.1)	ATCAATGAGTTGTCCAGGCTGTAG	1458
Trypanosoma_vivax_(HE573019.1)	AACGAAGAGCTTCAAAAACCTCTAA	1455
	* *	

Figura A3. Alineamiento PFK. Se pueden observar las secuencias de PFK para *Trypanosoma Equiperdum*, *Evasi*, *Theileri* y *Vivax*. Cada secuencia está representada por una serie de bases nucleotídicas, y las similitudes y diferencias entre ellas pueden ser analizadas para comprender mejor las relaciones genéticas entre estos organismos.