



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“ Diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra GAPDH e ITS para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp. mediante secuenciación de lecturas largas ”

Realizado por:

Miguel Ángel Vélez Requenes

Director del proyecto:

PhD, José Rubén Ramírez

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 4 de octubre de 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Miguel Ángel Vélez Requenes, ecuatoriano, con cédula de ciudadanía N° 1105756801, declaro bajo juramento que la tesis titulada:

Diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra GAPDH e ITS para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp. mediante secuenciación de lecturas largas 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.



Miguel Ángel Vélez Requenes

C.C.: 1105756801

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

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



José Rubén Ramírez Iglesias

C.C.: 3050666993

LOS PROFESORES INFORMANTES

Wilson David Dávila Aldas

Gianina Lizeth Suarez Rodríguez

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

Wilson David Dávila Aldas

Gianina Lizeth Suarez Rodríguez

CC:

CC:

Quito, 4 de octubre de 2023

Diseño y validación *in silico* de primers dirigidos contra GAPDH e ITS para el estudio metagenómico de *Trypanosoma spp* mediante secuenciación de lecturas largas

Miguel Vélez ¹ and José Ramírez¹

¹ Universidad Internacional SEK (UISEK), Facultad de Ciencias de la Salud, Quito 170120, Ecuador, Programa de Maestría en Biomedicina

* Autor de Correspondencia: José Rubén Ramírez, PhD. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Tel.: +593-13050666993; Email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

Resumen: La Tripanosomosis es una enfermedad que provoca pérdidas económicas a nivel global y limita la productividad ganadera en varios países de la franja tropical. La secuenciación de próxima generación (NGS) se ha convertido en una herramienta estándar para diversas aplicaciones, destacando su capacidad para detectar múltiples especies de agentes infecciosos a partir de una amplia variedad de muestras. En este contexto, Ecuador cuenta con escasos estudios moleculares sobre la tripanosomosis, y ninguno aborda esta enfermedad desde la perspectiva metagenómica de lecturas largas (>800 pb). A pesar de esta situación, y ante la carencia de marcadores moleculares universales para detectar varias especies de tripanosomas, resulta esencial diseñar primers específicos dirigidos a regiones génicas informativas, para su implementación en flujos de trabajo destinados a la secuenciación NGS de lecturas largas. Por lo tanto, en este estudio se diseñaron primers degenerados dirigidos a las regiones de los genes Glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el espaciador interno transcrito (ITS) con el objetivo de llevar a cabo un estudio metagenómico de *Trypanosoma spp*. Para lograrlo, se obtuvieron los genes de interés mediante el análisis de secuencias de genomas de referencia de *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi*, obtenidas de la base de datos especializada Tryp-DB, y se complementaron con secuencias adicionales recuperadas de GenBank, mediante una búsqueda BLASTn. Estas secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal-Omega. Una vez alineadas, se diseñaron primers orientados a regiones conservadas, incluyendo nucleótidos degenerados, y se seleccionaron aquellos que permitieran la amplificación de amplicones de gran tamaño. Además, se realizó una validación *in silico* de los primers diseñados mediante un análisis de identidad de nucleótidos usando BLAST. Se identificaron numerosas secuencias para los genes GAPDH e ITS de diversas regiones geográficas y hospedadores. Sin embargo, no fue posible diseñar primers para el gen ITS, debido a la considerable variabilidad entre las secuencias recuperadas de las bases de datos. En el caso específico de los sets de amplificación del GAPDH, se lograron generar oligos con temperaturas de fusión (T_m) cercanas a los 55°C y productos de alrededor de 800 pb. Los primers diseñados para esta región presentan el potencial de generar amplicones largos, ideales para su uso en la preparación de librerías mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), especialmente enfocadas en secuenciación de lecturas largas, como es el caso de la plataforma de Oxford Nanopore. Es crucial realizar la validación en el laboratorio de cada uno de estos sets de primers utilizando cepas o aislados de referencia. Esto permitirá comprobar analíticamente su desempeño y potencial en laboratorios de alta complejidad, orientados a la metagenómica de tripanosomátidos.

Palabras clave: *Trypanosoma*, GAPDH, primers, secuencias, ITS, metagenómica,

Abstract: Trypanosomosis is a disease that causes economic losses globally and limits livestock productivity in several countries in the tropical zone. Next-generation sequencing (NGS) has

become a standard tool for various applications, highlighting its ability to detect multiple species of infectious agents from a wide variety of samples. In this context, Ecuador has few molecular studies on trypanosomiasis, and none address this disease from the metagenomic perspective of long reads (>800 bp). Despite this situation, and given the lack of universal molecular markers to detect various trypanosome species, it is essential to design specific primers targeting informative gene regions, for their implementation in workflows aimed at NGS sequencing of long reads. Therefore, in this study, degenerate primers were designed targeting the regions of the genes Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the internal transcribed spacer (ITS) with the aim of carrying out a metagenomic study of *Trypanosoma* spp. To achieve this, the genes of interest were obtained through the analysis of reference genome sequences of *T. vivax*, *T. theileri* and *T. evansi*, obtained from the specialized database Tryp-DB, and were complemented with additional sequences recovered from GenBank, using a BLASTn search. These sequences were aligned using the Clustal-Omega program. Once aligned, primers were designed targeting conserved regions, including degenerate nucleotides, and those that allowed the amplification of large amplicons were selected. In addition, an in silico validation of the designed primers was performed through nucleotide identity analysis using BLAST. Numerous sequences were identified for the GAPDH and ITS genes from various geographic regions and hosts. However, it was not possible to design primers for the ITS gene, due to the considerable variability between the sequences recovered from the databases. In the specific case of the GAPDH amplification sets, oligos were generated with melting temperatures (T_m) close to 55°C and products of around 800 bp. The primers designed for this region have the potential to generate long amplicons, ideal for use in the preparation of libraries using the polymerase chain reaction (PCR), especially focused on sequencing long reads, as is the case of the platform from Oxford Nanopore. It is crucial to carry out laboratory validation of each of these primer sets using reference strains or isolates. This will allow its performance and potential to be analytically verified in highly complex laboratories, aimed at trypanosomatid metagenomics.

Keywords: *Trypanosoma*, GAPDH, primers, sequences, ITS, metagenomics

1. Introducción

La tripanosomiasis es una enfermedad causada por varios miembros de la familia Tripanosomatidae, entre los cuales se encuentra el *Trypanosoma*, un protozoo flagelado unicelular que afecta a animales domésticos, salvajes y humanos en zonas rurales (Aregawi et al., 2019). Entre las especies de mayor importancia pecuaria se encuentran *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum*. Se conoce que *T. evansi* infecta a una gran diversidad de hospedadores mamíferos, incluidos animales salvajes en peligro de extinción. Su principal diferencia de los demás tripanosomatídeos es la ausencia de ADN maxicircular del kinetoplasto (ADNk) (Lun & Dessler, 1995). Se transmite mecánicamente por moscas hematófagas del género *Stomoxys* y *Tábanus*. Los mecanismos de transmisión dependen de la supervivencia de los parásitos en la cavidad oral del vector. En consecuencia, cuanto menor sea el intervalo de succión de sangre del vector entre un animal infectado y uno no infectado, mayor será el éxito de la transmisión del parásito (Aregawi et al., 2019). *T. vivax* también es una especie conocida por infectar animales domésticos y salvajes. Esta especie afecta a un gran número de animales de granja como: caprinos, ovinos, porcinos, equinos, etc. (Fetene et al., 2021). Infecciones por *T. vivax* en machos produce que la calidad del esperma se deteriore, lo que se manifiesta como un aumento de la atipia y una disminución de la motilidad y concentración de los espermatozoides. Esto puede afectar la capacidad de fertilizar y, en consecuencia, la productividad de cualquier rebaño expuesto a este parásito y su impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de la ganadería (Medina, 2017). *T. theileri* provoca infecciones en el ganado que suelen ser crónicas y asintomáticas, y permanecen así durante años, es un patógeno oportunista que puede causar infecciones en el ganado, especialmente cuando los animales están infectados simultáneamente con otros hemoparásitos o experimentan un estrés severo. Se ha observado que la parasitemia, es decir, la presencia de parásitos en la sangre, tiende a aumentar en animales inmunodeprimidos. Este incremento en la carga parasitaria desencadena la patogenicidad (Villa et al., 2008). *Trypanosoma equiperdum* es el agente causal de Durina

en caballos, a diferencia de otros tripanosomas de mamíferos, se transmite sexualmente y es principalmente un parásito tisular, por lo que es muy difícil de detectar en la sangre (Parra & Reyna, 2019). Cabe mencionar que se desconoce la distribución de *T. equiperdum*, siendo a veces confundido clínicamente con *T. evansi* (Gibson, 2005). Los parásitos raramente se detectan en la sangre periférica y evaden las respuestas inmunitarias a través de mecanismos que son completamente desconocidos (García et al., 2011).

En general, las enfermedades provocadas por estos parásitos se presentan en la regiones tropicales y subtropicales del mundo, lo cual incide negativamente en la productividad de las actividades pecuarias y limita severamente su desarrollo por la sintomatología y muerte que puede causar a los animales. La vulnerabilidad ante esta enfermedad por la falta de apreciación de gravedad de la misma por parte de instituciones sanitarias, radicándose asocia a la necesidad de realizar estudios sobre la diversidad de este tipo de parásitos, para así de esta manera evitar pérdidas económicas al sector pecuario (Chávez-Larrea et al., 2021).

La Tripanosomosis es una enfermedad desatendida que afectan principalmente a poblaciones rurales dedicadas a la actividad pecuaria y con un limitado acceso a los servicios de salud por parte de las instituciones responsables (Organización Mundial de la Salud, 2016). Actualmente en Ecuador esta enfermedad ha sido afectada y existe poca investigación al respecto, lo que ocasiona pérdidas económicas y problemas de salud animal. El primer estudio, realizado en 1977, encontró una tasa de seropositividad del 22,5 % (Wells, 1984). Así mismo un segundo estudio, realizado 40 años después, en la región Amazónica del Ecuador, Provincia de Pastaza, donde se realizó el diagnóstico de tripanosomosis por ELISA informó una tasa de positividad del 31 % (Medina, 2014). En general, se necesita un enfoque integrado y multidisciplinario para prevenir y controlar estas enfermedades. Este enfoque se basa frecuentemente en esfuerzos de control de vectores, con acciones multisectoriales e intervenciones asequibles para disminuir los efectos negativos en la industria ganadera (Rojas et al., 2021). Infecciones por *T. vivax* en machos produce que la calidad del esperma se deteriore, lo que se manifiesta como un aumento de la atipia y una disminución de la motilidad y concentración de los espermatozoides. Esto puede afectar la capacidad de fertilizar y, en consecuencia, la productividad de cualquier rebaño expuesto a este parásito y su impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de la ganadería (Medina, 2017).

La tripanosomosis se caracteriza por fiebre, anemia, pérdida de producción e incluso la muerte. Actualmente en Ecuador la ganadería es una de las actividades más representativas del sector agropecuario con aproximadamente 4,1 millones de cabezas de ganado distribuidas en las cuatro regiones naturales: 48,4% en la sierra (ganado de leche), 42,4% en la región costera (doble propósito, carne/leche), y 9.13% en la selva e Islas Galápagos (doble propósito, carne/leche) (INEC, 2020). Una de las provincias del Ecuador que presenta mayor porcentaje de ganado bovino es Manabí, y por su ubicación geográfica esta región y otras regiones del Ecuador ofrecen condiciones ecológicas favorables para la transmisión de la enfermedad la cual genera pérdidas económicas en el sector (Chávez-Larrea et al., 2021).

En las investigaciones generalmente se emplean técnicas moleculares, las cuales permiten determinar la variabilidad genotípica de agentes infecciosos. Sin embargo, las aproximaciones como PCR y secuenciación vía Sanger tienen limitaciones, por ejemplo, costos elevados al aumentar el número de muestras y limitación en la cantidad genotipos que se pueden detectar (Ramírez & Eleizalde, 2023). Es por ello que se necesitan estudios con tecnología moderna como los códigos de barras de ADN y secuenciación de lecturas largas (Gotteris, 2020). En la actualidad, la secuenciación de próxima generación (NGS) es una técnica común para numerosas aplicaciones de biología básica, así como para la investigación médica y agrícola (Majeau et al., 2019).

Recientemente, han surgido métodos de lectura larga/tercera generación que permiten la generación de ensamblajes de genomas de una calidad sin precedentes. Además, estas técnicas pueden detectar directamente modificaciones epigenéticas en el ADN nativo y secuenciar transcritos intactos sin ensamblaje (van Dijk et al., 2018). Sin embargo, en otros campos de la biología y la medicina, los códigos de barras estandarizados basados en secuencias brindan un método sensible y confiable para la

identificación de especies en una amplia gama de taxones, y actualmente son utilizados por miles de investigadores en todo el mundo (Hamilton & Stevens, 2004).

En investigaciones sobre códigos de barras en *Trypanosomas* Hutchinson & Stevens (2018) mencionan que el código de barras de longitud de fragmentos fluorescentes (FFLB) se ha utilizado para amplificar pequeñas regiones diana tanto en la subunidad pequeña de ARN ribosomal (ARNr) y 18S como en la subunidad grande de ARNr 28S. Aunque casi todas las filogenias de tripanosomas se han construido utilizando secuencias de ARNr 18S, señales inadecuadas en ciertas profundidades de filogenética la reconstrucción ha requerido el uso de marcadores genéticos de tripanosoma adicionales, como el gen del gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los genes GAPDH están relativamente conservados y, por lo tanto, son útiles para resolver problemas filogenéticos (Hamilton & Stevens, 2004). Se han realizado estudios usando el gene GAPDH donde se ha demostrado ser un marcador adecuado para determinar la filogenia dentro del género *Trypanosoma* (Egan et al., 2020), adicionalmente se ha utilizado con éxito junto con el ARNr 18S, para la identificación de tripanosomas, y a ser adecuado para especies nuevas e infecciones mixtas (Adams et al., 2008).

Las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) se han utilizado ampliamente como códigos de barras en diversos organismos, por ejemplo, hongos, sin embargo, tiene limitaciones su número de copias relativamente bajo (100– 200 repeticiones), comparado con el de lo que puede limitar la sensibilidad de las pruebas (Hutchinson & Stevens, 2018). En un estudio de detección e identificación molecular para *Trypanosoma* amplificaron regiones a partir de ITS y se detectaron simultáneamente tres especies principales de tripanosomas: *T. evansi*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma vivax* (El-Sayed et al., 2021).

En la actualidad, el diagnóstico de la metagenómica no se ha utilizado ampliamente en la detección de infecciones parasitarias como tripanosomosis, es por eso que la aplicación de la metagenómica está llamada a desempeñar un papel clave en el futuro en la recuperación de datos epidemiológicos genómicos y la determinación de la influencia de los parásitos en la ecología microbiana (Kiarie, 2019). El mayor reto de la metagenómica es la laboriosa preparación de las muestras y, por tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos que permitan la detección de parásitos en muestras crudas y/o sin amplificación (Griffing et al., 2011). Recientemente, se ha demostrado que las aplicaciones metagenómicas que hacen uso de la NGS son muy sensibles en la detección de variantes de baja frecuencia, tienen un mayor rendimiento con la multiplexación de muestras y tienen un límite más bajo de detección de ADN. Dado que los enfoques específicos aplican amplificación y secuenciación selectivas de regiones de genomas microbianos con alto contenido de información (sin amplificación del ADN de fondo), permiten la identificación taxonómica a una profundidad de secuenciación significativamente menor y, posteriormente, un análisis computacional menos complejo (Dekker, 2018). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue diseñar primers degenerados dirigidos a las regiones GAPDH e ITS mediante el análisis de secuencias de genomas de referencias, alineamiento y validación *in silico* de primers, para el estudio metagenómico de *Trypanosoma* spp, mediante secuenciación de lecturas largas.

2. Materiales y Métodos

Búsqueda de secuencias: En el estudio, se utilizaron secuencias de los genes asociados a GAPDH e ITS extraídas de cepas de referencia de las especies *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi* disponibles en la base de datos Tryp DB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>). El programa es un servidor que proporciona acceso a conjuntos de datos genómicos de patógenos eucariotas y vectores invertebrados de enfermedades. Respaldo por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) (Amos et al., 2022). Debido a restricciones en la disponibilidad de secuencias de GAPDH de *T. equiperdum*, dicha especie no se incluyó en el presente estudio.

Secuencias GenBank: Empleando las secuencias de las cepas de referencia, se realizó una búsqueda de secuencias adicionales en GenBank, mediante el uso de la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para los genes GAPDH e ITS de especies

diferentes, que incluyen *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi*. Estas secuencias fueron seleccionadas para cada especie con el objetivo de comparar, analizar su similitud genética y generar los alineamientos para el diseño de primers. El uso de BLASTn permitió identificar y recuperar secuencias similares en la base de datos Tryp DB, lo que proporcionó información valiosa sobre la variabilidad genética y la relación entre estas especies de tripanosomas.

Alineamiento de secuencias: Se llevó a cabo un proceso de alineamiento utilizando el programa Clustal-Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), el cual es una herramienta para alinear múltiples secuencias.

Diseño y Selección de primers: Utilizando la información obtenida del alineamiento, se identificaron regiones potenciales para el diseño de primers degenerados, las cuales contarán con la menor variabilidad para la unión de los oligos. Para el diseño de estos primers se tuvieron en cuenta varios factores importantes. En primer lugar, se consideró que los primers debían tener una longitud de 17 a 26 pares de bases. Además, se buscó que el contenido de G+C estuviera en el rango del 40% al 60% y que la temperatura de fusión (Tm) estuviera entre 55°C y 65°C. También se evitó incluir secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3', ya que esto podría llevar a la formación de dímeros. Se aseguró que las terminaciones 3' no fueran autocomplementarias para evitar problemas de hibridación no específica. Además, se descartaron primers que pudieran generar secuencias auto-complementarias. Uno de los aspectos clave fue establecer un límite máximo de degeneración recomendado, permitiendo hasta 64 combinaciones diferentes dentro de cada primer seleccionado. Como criterio adicional, se buscó generar primers que amplificaran productos de tamaño máximo. Estas consideraciones fueron tomadas en cuenta para asegurar la eficiencia y especificidad de los primers en la amplificación de las regiones de interés (Campos & Quesada, 2017; Li et al., 2015).

Temperatura de hibridación: Para determinar la temperatura de hibridación óptima de los primers diseñados, se utilizó la herramienta NEB Tm Calculator. En esta página web (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>), se ingresaron los datos requeridos y se obtuvo la temperatura de fusión (Tm) óptima para cada cebador diseñado. Esta información fue crucial para ajustar las condiciones de la reacción de PCR y optimizar la amplificación de los fragmentos deseados. El uso de herramientas bioinformáticas como esta brinda un enfoque efectivo para obtener información valiosa en el diseño y optimización de primers para la PCR (Menin & Nichols, 2013).

Validación in silico de primers: 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, se espera que cualquier desajuste (mismatch) esté relacionado únicamente con degeneraciones, dado el porcentaje de identidad y la cobertura indicada.

3. Resultados

3.1. Secuencias de genes asociados a GAPDH e ITS

Las secuencias de los genes GAPDH e ITS obtenidas provienen de diversas ubicaciones geográficas y diferentes hospedadores, lo que refleja la amplia distribución de los diferentes tipos de *Trypanosoma* en distintas regiones del mundo (tabla 1-2).

En total, se obtuvieron 3 secuencias de referencia para el gen GAPDH y 3 secuencias de referencia para el gen ITS de diferentes especies de *Trypanosoma*. Estos resultados representan un conjunto valioso de secuencias de referencia que pueden ser utilizadas en investigaciones futuras para estudiar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre estas especies de *Trypanosoma*.

Adicionalmente, se identificaron 7 secuencias adicionales de la base de datos GenBank, que también aportaron información sobre la diversidad genética de estos parásitos en diferentes ubicaciones geográficas. En específico, para el gen GAPDH, se obtuvieron 3 secuencias de *Trypanosoma vivax*, 3 de *Trypanosoma theileri* y 1 de *Trypanosoma evansi*. Las secuencias de GAPDH provienen de bovinos como *Tragelaphus angasii* de Mozambique y ganado vacuno de Brasil, Camerún y el Reino Unido. Respecto al gen ITS, se recolectaron un total de 7 secuencias, distribuidas en 3 para *Trypanosoma vivax*, 2 para *Trypanosoma theileri* y 2 para *Trypanosoma evansi*. Las secuencias obtenidas de ITS provienen de diferentes fuentes, incluyendo camellos en Egipto y ganado en Burkina Faso y Estados Unidos. Esto refleja la diversidad genética y la distribución de estos parásitos en distintas áreas geográficas.

Tabla 1. Secuencias obtenidas para el gen GAPDH de las bases de datos TrypDB Y GenBank

Descripción	Nombre científico	Acceso	Base de datos
>STIB805_Chr06 <i>Trypanosoma evansi</i> strain STIB 805 1202397 to 1203476	<i>Trypanosoma evansi</i>	STIB805_Chr06 (Secuencia de referencia)	TrypDB
>NBCO01000007 <i>Trypanosoma theileri</i> isolate Edinburgh 184180 to 185200	<i>Trypanosoma theileri</i>	NBCO01000007 (Secuencia de referencia)	TrypDB
>TvY486_06 <i>Trypanosoma vivax</i> Y486 1038383 to 1039459	<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_06 (Secuencia de referencia)	TrypDB
>AF053743.1 <i>Trypanosoma evansi</i> glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (gadph) gene, partial cds	<i>Trypanosoma evansi</i>	AF053743.1	GenBank
>AF053744.1 <i>Trypanosoma vivax</i> glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (gapdhg) gene, partial cds	<i>Trypanosoma vivax</i>	AF053744.1	GenBank
>FM876219.1 <i>Trypanosoma vivax</i> partial gapdh gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate	<i>Trypanosoma vivax</i>	FM876219.1	GenBank

dehydrogenase,
isolate TviMzCb12

>FM876220.1

Trypanosoma vivax
partial gapdh gene
for glycosomal
glyceraldehyde
phosphate
dehydrogenase,
isolate TviBrMi

Trypanosoma vivax

FM876220.1

GenBank

>MK674048.1

Trypanosoma theileri
clone RZ8 glycosomal
glyceraldehyde phosphate
dehydrogenase (GAPDH)
pseudogene, partial
sequence

*Trypanosoma
theileri*

MK674048.1

GenBank

>XM_029023637.1

Trypanosoma theileri
glyceraldehyde 3-
phosphate dehydrogenase
(TM35_000071910),
partial mRNA

*Trypanosoma
theileri*

XM_029023637.1

GenBank

>MK674021.1

Trypanosoma theileri
clone KK8 glycosomal
glyceraldehyde phosphate
dehydrogenase (GAPDH)
pseudogene, partial
sequence

*Trypanosoma
theileri*

MK674021.1

GenBank

Tabla 2. Secuencias obtenidas para el gen ITS de las bases de datos TrypDB Y GenBank

Descripción	Nombre científico	Acceso	Base de datos
>STIB805_Chr03 <i>Trypanosoma evansi</i> strain STIB 805 911020 to 912093	<i>Trypanosoma evansi</i>	STIB805_Chr03 (Secuencia de referencia)	TrypDB
>TvY486_03 <i>Trypanosoma vivax</i> Y486 779676 to 779933	<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_03 (Secuencia de referencia)	TrypDB
TM35_000312160 <i>Trypanosoma theileri</i> isolate edinburgh	<i>Trypanosoma theileri</i>	TM35.000312160 (Secuencia de referencia)	TrypDB

<p>>MN446740.1 <i>Trypanosoma evansi</i> isolate haB 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region</p>	<p><i>Trypanosoma evansi</i></p>	<p>MN446740.1</p>	<p>GenBank</p>
<p>>AB551921.1 <i>Trypanosoma evansi</i> <i>evansi</i> genes for 18S ribosomal RNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, isolate: Egy.3</p>	<p><i>Trypanosoma evansi</i></p>	<p>AB551921.1</p>	<p>GenBank</p>
<p>>KC196665.1 <i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBfMene clone 7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence</p>	<p><i>Trypanosoma vivax</i></p>	<p>KC196665.1</p>	<p>GenBank</p>
<p>>KC196671.1 <i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBfL445 clone 4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence</p>	<p><i>Trypanosoma vivax</i></p>	<p>KC196671.1</p>	<p>GenBank</p>
<p>>KC196667.1 <i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBfMene clone 9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence</p>	<p><i>Trypanosoma vivax</i></p>	<p>KC196667.1</p>	<p>GenBank</p>
<p>>JX178167.1 <i>Trypanosoma theileri</i> isolate Cow 3535 clone Cl 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete</p>	<p><i>Trypanosoma theileri</i></p>	<p>JX178167.1</p>	<p>GenBank</p>

sequence; and internal
transcribed spacer 2,
partial sequence

>JX178185.1

Trypanosoma theileri

isolate Cow 139 clone CI

11 18S ribosomal RNA

gene, partial sequence;

and internal transcribed

spacer 1, 5.8S ribosomal

RNA gene, and internal

transcribed spacer 2,

complete sequence

*Trypanosoma
theileri*

JX178185.1

GenBank

3.2. *Diseño de primers*

Inicialmente, se realizaron alineamientos de las secuencias de los genes GAPDH e ITS para identificar las áreas más conservadas en dichas secuencias. El alineamiento permitió identificar regiones conservadas para poder facilitar el diseño del primer y así al mismo tiempo nos permitiera generar los amplicones lo más largos posibles. Basándose en los resultados del alineamiento, se diseñaron primers degenerados que tuvieran la capacidad de amplificar las regiones seleccionadas. Estos primers degenerados se construyeron considerando las secuencias consenso obtenidas a partir del alineamiento de múltiples secuencias del gen. De esta forma, se facilita la amplificación y estudio de las regiones de interés en las diferentes especies de *Trypanosoma*.

La Figura 1 muestra el alineamiento de las secuencias correspondientes a los primers SET1/GAPDH, para ambas direcciones (forward y reverse). Estas figuras proporcionan una representación visual de las secuencias de los primers y su alineamiento, lo cual es útil para comprender de manera más clara la estructura y conservación de las regiones específicas de hibridación definidas, así también el resto de los alineamientos se pueden observar en el **Anexo 1**. Adicionalmente, dado que el alineamiento de las secuencias de ITS no produjo regiones lo bastante conservadas para desarrollar primers, por lo que no fue posible diseñarlos para este gen (**Anexo 2**).

Forward

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)	ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG	119
Trypanosomatheileri (NBC001000007)	ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG	180
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)	ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG	180
Trypanosomatheileri (MK674021.1)	ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG	78
Trypanosomavivax (AF053744.1)	ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG	165
Trypanosomavivax (FM876219.1)	ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG	92
Trypanosomavivax (TvY486_06)	ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG	178
Trypanosomavivax (FM876220.1)	ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG	87
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch06)	ACGGACGCTCGCTACTTCGCCTATCAGATGAAGTACGACTCCGTCACGGCAAGTTCAAG	180
Trypanosomaevansi (AF053743.1)	ACGGACGCTCGCTACTTCGCCTATCAGATGAAGTACGACTCCGTCACGGCAAGTTCAAG	165

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

Reverse

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)	ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGGCAGCTGCAAAACAATC	899
Trypanosomatheileri (NBC001000007)	ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGGCAGCTGCAAAACAATC	958
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)	ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGGCAGCTGCAAAACAATC	958
Trypanosomatheileri (MK674021.1)	ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGGCAGCTGCAAAACAATC	856
Trypanosomavivax (AF053744.1)	ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCTACACTCCAGAACAACC	943
Trypanosomavivax (FM876219.1)	ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCCA-----	849
Trypanosomavivax (TvY486_06)	ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCTACACTCCAGAACAACC	956
Trypanosomavivax (FM876220.1)	ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCC-----	843
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch06)	ACTTCATCAGCGACAGCGCAGCTCCATTACGACTCCAAGGGCAGCCTGCAGAACAACC	958
Trypanosomaevansi (AF053743.1)	ACTTCATCAGCGACAGCGCAGCTCCATTACGACTCCAAGGGCAGCCTGCAGAACAACC	943

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

Figura 1. Alineamiento representativo GAPDH SET 1. La imagen muestra el alineamiento donde se encuentra el primer juego de primers diseñados. En el primer alineamiento, se puede apreciar el primer forward, que es el oligonucleótido diseñado para unirse a la hebra de ADN en la dirección de lectura de 5' a 3' en la cadena molde o templada. En el segundo alineamiento, se encuentra el primer reverse, que es el oligonucleótido diseñado para unirse al extremo 3' del fragmento complementario en la cadena molde. Los primers se destacan en color verde.

En la Tabla 3 se encuentran detallados tres conjuntos de primers diseñados específicamente para el gen GAPDH. Cada par de primers viene acompañado de información relevante, como la temperatura de hibridación y el tamaño aproximado del amplicón resultante. Estos datos son esenciales para llevar a cabo con éxito la amplificación de las regiones de interés durante el estudio.

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

Sets	Primers	Tm	Tamaño aproximado del amplicón (pb)
Set 1	F: 5' CAGATGAAGTACGACRSHGTGCACGG 3' R: 5' CCTCAGCATYTACCTCGACGC 3'	55 °C	800 pb
Set 2	F: 5' GTGATTGARTCMACYGGCYTSTTCAC 3' R: 5' GYCCCGYGACTASTGKTGGAA 3'	56 °C	750-900 pb
Set 3	F: 5' GTGATGGGCGTGAAYCACMA 3' R: 5' CGYAGCTAGAGGAAGTACGA 3'	52 °C	800 pb

Nota: Se pueden observar tres conjuntos de primers destinados al gen GAPDH, junto con sus respectivas temperaturas de hibridación y aproximados tamaños de amplición. Además, se destacan en amarillo las designaciones de degeneración: Y (que representa la base C o T), R (que representa la base A o G), S (que representa la base G o C), K (que representa la base G o T), W (que representa la base A o C), M (que representa la base A o C) y H (que representa A, C o T).

3.3. Validación de primers

Los resultados de la validación del primer forward para el gen GAPDH en las secuencias de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma theileri* y *Trypanosoma vivax* se presentan en la figura 2. En cada caso, la alineación muestra una identidad del 88% entre el primer utilizado y la secuencia objetivo, sin la presencia de gaps, lo que sugiere una fuerte coincidencia. Además, los puntajes y los valores de expectativa respaldan la significativa similitud entre los primers y las secuencias diana en las tres especies. Estos resultados respaldan la idoneidad de los primers para la amplificación del gen GAPDH en las especies de *Trypanosoma* estudiadas.

A *Trypanosoma theileri* clone RZ8 glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) pseudogene, partial sequence
Sequence ID: [MK674048.1](#) Length: 924 Number of Matches: 1

Range 1: 84 to 109 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.3 bits(19)	3e-04	23/26(88%)	0/26(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CAGATGAAGTACGACRSHGTGCACGG 26
          |||
Sbjct 84  CAGATGAAGTACGACAGTGCACGG 109

```

B *Trypanosoma vivax* clone 852 glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) pseudogene, partial sequence
Sequence ID: [MK674046.1](#) Length: 876 Number of Matches: 1

Range 1: 69 to 94 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.3 bits(19)	3e-04	23/26(88%)	0/26(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CAGATGAAGTACGACRSHGTGCACGG 26
          |||
Sbjct 69  CAGATGAAGTACGACAGCTGCACGG 94

```

Trypanosoma evansi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gadhg) gene, partial cds

Sequence ID: [AF053743.1](#) Length: 1022 Number of Matches: 1

C

Range 1: 130 to 155 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
37.0 bits(17)	0.006	23/26(88%)	0/26(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   CAGATGAAGTACGACRSHGTGCACGG 26
          |||
Sbjct 130 CAGATGAAGTACGACTCCGTGCACGG 155
    
```

Figura 2. Validación in silico de primers forward para GAPDH. El gráfico muestra la alineación del primer con las secuencias analizadas. Secuencia: (A) *T. Theileri*; (B) *T. vivax*; (C) *T. evansi*.

Los resultados de la validación del primer reverse para las secuencias de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma theileri* y *Trypanosoma vivax* revelan diferentes niveles de similitud con las secuencias objetivo en la base de datos. En la Figura 3, se presenta la validación para *T. evansi*, donde se observa una alta similitud con un porcentaje de identidad del 92%. Asimismo, se muestra la validación para *T. theileri*, con una similitud aún más elevada, alcanzando un 93% de identidad. En el caso de *T. vivax*, aunque se encuentra similitud con un 91% de identidades lo que sugiere una similitud menos sólida en comparación con las otras dos secuencias.

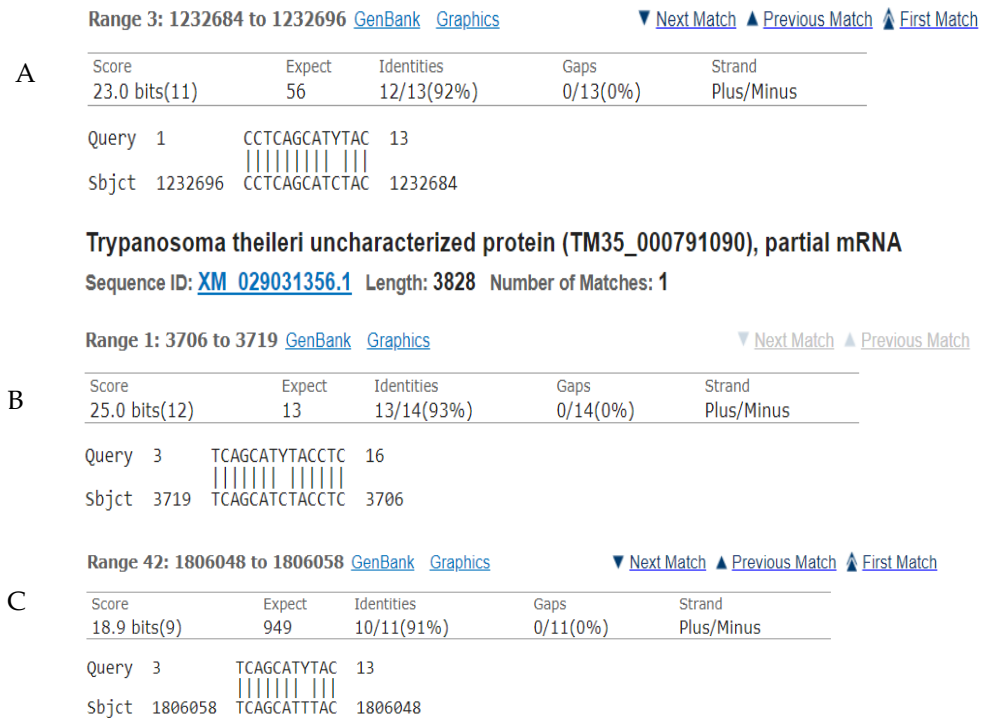


Figura 3. Validación in silico de primers reverse para GAPDH. El gráfico muestra la alineación del primer con las secuencias analizadas. Secuencia: (A) *T. evansi*; (B) *T. Theileri*; (C) *T. vivax*

4. Discusión

En esta investigación, se llevó a cabo un proceso de diseño y evaluación de primers con la finalidad de dirigirse hacia las regiones GAPDH e ITS, con el propósito de facilitar el análisis metagenómico de *Trypanosoma* spp.

Se logró la obtención de secuencias de los genes deseados, y es relevante destacar que se obtuvo un número ligeramente mayor de secuencias para el gen GAPDH en comparación con ITS. Este ligero aumento en la cantidad de secuencias disponibles para el gen GAPDH puede ser de gran utilidad para futuros análisis y estudios relacionados con este gen en particular (Abrams et al., 2019). Además, en el estudio de Kaur et al. (2023) sobre enfermedades hemoparasitarias transmitidas por vectores en el ganado bovino, se identificó a GAPDH como un gen de referencia clave para estas enfermedades. Así mismo, en la investigación de Arora et al. (2019), se destaca que aparte de su papel en los procesos metabólicos relacionados con la energía, GAPDH se ha reconocido como un gen con una expresión estable y ha sido ampliamente utilizado para normalizar los datos de expresión génica en numerosos estudios.

En un estudio por Castillo et al. (2021) evaluaron diferentes métodos moleculares para detectar la presencia de *Trypanosoma vivax* en ganado bovino después del tratamiento con fármacos tripanocidas, hicieron hincapié en el uso del gen GAPDH como una herramienta clave en el proceso, utilizando dos técnicas principales: PCR y LAMP. La PCR mostró una baja positividad en las muestras después del tratamiento, a pesar de que todas las muestras eran positivas para el gen GAPDH. En contraste, la técnica de LAMP, que se basa en el gen GAPDH, demostró ser más efectiva en la detección de *T. vivax*, especialmente en los momentos posteriores al tratamiento. Así mismo en otro estudio por de Mello et al. (2019) se centraron en investigar la presencia de hemoplasmas en ganado bovino en la región del Pantanal brasileño, que es endémica para la tripanosomiasis bovina. Utilizaron el gen GAPDH como control endógeno para garantizar la calidad de las muestras de ADN. Este estudio contribuye a la comprensión de las infecciones en el ganado bovino en esta región y destaca la importancia de utilizar el gen GAPDH en la investigación molecular.

Un estudio por Barbosa et al. (2016) han indicado que una diferencia genética en el gen GAPDH es lo bastante significativa como para establecer los límites de una nueva especie de tripanosoma. Así mismo, Reis-Cunha et al. (2022) desarrollaron un enfoque de secuenciación de nueva generación (NGS) para analizar la variabilidad y el número de copias de genes multicopia en el genoma del parásito *Trypanosoma cruzi*, este método reveló patrones específicos de variación en familias de genes clave y sugiere posibles aplicaciones en el diagnóstico y diseño de vacunas. Además, esta técnica puede ser utilizada en la investigación de genes multicopia en otros organismos complejos.

Es importante destacar que el uso del gen GAPDH como marcador filogenético para estudiar agentes infecciosos se ha revelado como una valiosa herramienta en la investigación taxonómica y filogenética. Según Egan et al. (2020) la capacidad de este gen para proporcionar una resolución más precisa y detallada en la determinación de relaciones evolutivas entre especies es evidente en este estudio sobre el género *Trypanosoma* ya que los resultados demostraron que GAPDH supera al locus 18S rRNA en la diferenciación y agrupación de especies dentro de este grupo de parásitos. Así, la aplicación de análisis filogenéticos basados en el este gen se convierte en una valiosa contribución para el estudio de agentes infecciosos, ya que puede ofrecer una visión más precisa de las relaciones filogenéticas y, por lo tanto, mejorar nuestra comprensión de la diversidad genética y la evolución de estos microorganismos.

Por otro lado, no se obtuvieron primers para ITS. La dificultad para obtener primers para la región ITS puede estar relacionada con la presencia de secuencias extremadamente diversas o altamente variables en el alineamiento. En tales casos, encontrar regiones conservadas lo suficientemente extensas para diseñar primers efectivos se convierte en un desafío considerable. La alta variabilidad en las secuencias puede hacer que sea complicado identificar áreas que sean lo suficientemente estables como para funcionar como sitios de unión para los primers (Schroeter et al., 2020). En el

estudio realizado por se destaca la importancia de utilizar múltiples conjuntos de cebadores en el enfoque molecular para la identificación precisa de aislados de *Trypanosoma*, especialmente aquellos del subgénero *Trypanozoon*. Mientras que en esta investigación no fue posible obtener primers para ITS, este estudio empleó con éxito ITS1, entre otros conjuntos de cebadores, para lograr resultados específicos y concluyentes en la identificación de *Trypanosoma equiperdum*. Esto demuestra la eficacia de un enfoque más completo y estratificado en la identificación de organismos, especialmente cuando se trata de patógenos como *Trypanosoma*. La identificación precisa de *Trypanosoma* es esencial para la comprensión y el control de enfermedades transmitidas por vectores en el ganado, lo que resalta la importancia de utilizar múltiples enfoques moleculares para obtener resultados fiables y detallados (Subekti et al., 2023).

5. Conclusiones

Se logró la generación de sets de primers para la generación, vía PCR, de amplicones largos del gen GAPDH, ideados para el estudio metagenómico basado en NGS de especies de tripanosomátidos. El uso del gen GAPDH ha demostrado ser fundamental en la investigación relacionada con *Trypanosoma* spp., especialmente en el contexto del análisis metagenómico, la detección de enfermedades hemoparasitarias en el ganado bovino. La versatilidad de GAPDH como marcador molecular, tanto en la identificación de especies como en la normalización de datos de expresión génica, lo convierte en una herramienta valiosa para investigadores en el campo de la biología molecular y la parasitología. Por otro lado, la dificultad para obtener primers efectivos para la región ITS destaca la importancia de abordar la identificación de *Trypanosoma* spp. desde múltiples enfoques moleculares, como se observa en estudios que han empleado diferentes conjuntos de cebadores para lograr resultados precisos. A pesar de que las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) se utilizan en códigos de barras para la identificación de especies en otros organismos, su número de copias relativamente bajo en *Trypanosoma* spp. puede limitar la sensibilidad de las pruebas. Esto resalta el desafío de lidiar con la variabilidad genética en la investigación de estos parásitos. Los primers propuestos en este estudio requieren validación analítica mediante el uso de cepas o aislados previamente caracterizados. Esto tiene como objetivo evaluar su eficacia en la detección de especies individuales y, posteriormente, considerar su aplicabilidad potencial en estudios metagenómicos basados en secuenciación de lecturas largas.

6. Patentes

Esta sección no es obligatoria, pero se puede agregar si existen patentes resultantes del trabajo mostrado en este manuscrito.

Contribución de los Autores: Para artículos de investigación con varios autores, se debe proporcionar un breve párrafo que especifique sus contribuciones individuales. Las siguientes afirmaciones deben usarse: “Conceptualización, X.X. y Y.Y.; metodología, X.X.; software, X.X.; validación, X.X., Y.Y. y Z.Z.; análisis formal, X.X. y X.X.; recursos, X.X.; curaduría de datos, X.X.; escritura—preparación de borrador o draft original, X.X.; escritura—revisión y edición, X.X.; visualización final, X.X.; supervisión, X.X.; administración y gestión de proyecto, X.X.; adquisición de fondos, Y.Y. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.” Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. La autoría debe limitarse a aquellos que hayan contribuido sustancialmente al trabajo informado.

Financiamiento/Fondos: “Esta investigación no recibió financiación externa” o “Esta investigación fue financiada por por la DII-UISEK-P000000” o “Esta investigación fue financiada por NOMBRE DEL FINANCIADOR, número de subvención XXX”, según sea el caso.

Agradecimientos: Personas, Instituciones. En esta sección, puede reconocer cualquier apoyo brindado que no esté cubierto por las secciones de contribución o financiamiento del autor. Esto puede incluir apoyo administrativo y técnico, logístico, o donaciones en especie (por ejemplo, materiales utilizados para experimentos).

Conflictos de Interés: Declarar conflictos de interés o indicar “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Los autores deben identificar y declarar cualquier circunstancia o interés personal que pueda percibirse como una influencia inapropiada en la representación o interpretación de los resultados de investigación informados. Cualquier papel de los financiadores en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados debe declararse en esta sección. Si no hay ningún papel, indique “Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados”.

Referencias citadas

- Abrams, Z. B., Johnson, T. S., Huang, K., Payne, P. R. O., & Coombes, K. (2019). A protocol to evaluate RNA sequencing normalization methods. *BMC Bioinformatics*, 20(24), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-3247-X/FIGURES/3>
- Adams, E. R., Hamilton, P. B., Malele, I. I., & Gibson, W. C. (2008). The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(4), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.013>
- 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* 2019 12:1, 12(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3311-4>
- Arora, R., Kumar, N., Sudarshan, S., Fairuze, M. N., Kaur, M., Sharma, A., Girdhar, Y., Sreesujatha, R. M., Devatkal, S. K., Ahlawat, S., Vijn, R. K., & Manjunatha, S. S. (2019). Transcriptome profiling of longissimus thoracis muscles identifies highly connected differentially expressed genes in meat type sheep of India. *PLOS ONE*, 14(6), e0217461. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217461>
- Barbosa, A. D., Mackie, J. T., Stenner, R., Gillett, A., Irwin, P., & Ryan, U. (2016). *Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). *Veterinary Parasitology*, 223, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.002>
- 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
- Castillo, K., García, A., Fidelis, O., Nagata, W., André, M., Geraldés, M., Zacarias, R., & Cadioli, F. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(1), e020220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2422–2428. <https://doi.org/10.1111/TBED.13906>
- de Mello, V. V. C., de Souza Ramos, I. A., Herrera, H. M., Mendes, N. S., Calchi, A. C., Campos, J. B. V., Macedo, G. C., Alves, J. V. A., Machado, R. Z., & André, M. R. (2019). Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66, 101337. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2019.101337>
- Dekker, J. P. (2018). Metagenomics for Clinical Infectious Disease Diagnostics Steps Closer to Reality. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00850-18>
- Egan, S. L., Ruiz-aravena, M., Austen, J. M., Barton, X., Comte, S., Hamilton, D. G., Hamede, R. K., Ryan, U. M., Irwin, P. J., Jones, M. E., & Oskam, C. L. (2020). Blood Parasites in Endangered Wildlife-Trypanosomes Discovered during a Survey of Haemoprotozoa from the Tasmanian Devil. *Pathogens*, 9(11), 873. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110873>
- El-Sayed, S. A. E. S., El-Adl, M. A., Ali, M. O., Al-Araby, M., Omar, M. A., El-Beskawy, M., Sorour, S. S., Rizk, M. A., & Elgiouhy, M. (2021). Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Trypanosoma* spp. in one-humped camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Egypt. *Veterinary World*, 14(3), 625–633.

<https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.625-633>

- 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>
- Garcia, H. A., Rodrigues, A. C., Martinkovic, F., Minervino, A. H. H., Campaner, M., Nunes, V. L. B., Paiva, F., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. G. (2011). Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International Journal for Parasitology*, 41(13–14), 1385–1396. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2011.09.001>
- Gibson, W. (2005). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in America Latina*. OIE (World organisation for animal health). <http://www.oie.int>
- 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>
- Griffing, S. M., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M. T., McCollum, A. M., Cabezas, C., Quezada, W. M., Barnwell, J. W., de Oliveira, A. M., Lucas, C., Arrospeide, N., Escalante, A. A., Bacon, D. J., & Udhayakumar, V. (2011). South American Plasmodium falciparum after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids. *PLOS ONE*, 6(9), e23486. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023486>
- Hamilton, P., & Stevens, J. (2004). Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, 34(12), 1393–1404. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011>
- 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/>
- Kaur, R., Ahlawat, S., Choudhary, V., Kumari, A., Kumar, A., Kaur, M., Arora, R., Sharma, R., & Vijh, R. K. (2023). Validation of stable reference genes in peripheral blood mononuclear cells for expression studies involving vector-borne haemoparasitic diseases in bovines. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(4), 102168. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2023.102168>
- Kiarie, A. (2019). *Application of metagenomic approaches in the comprehensive detection and characterization of trypanosomes, microbiome and blood meal sources in tsetse flies*. [Tesis doctoral, Universidad Hokkaido. Repositorio de la Universidad de Hokkaido.
- 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
- Lun, Z. R., & Desser, S. S. (1995). Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 11(4), 131–133. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80129-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80129-4)
- Majeau, A., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). An improved approach to trypanosoma cruzi molecular genotyping by next-generation sequencing of the mini-exon gene. *Methods in Molecular Biology*, 1955, 47–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_4/COVER
- Medina, V. (2014). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Espe*, 07(02), 963.
- Medina, V. (2017). *Diagnóstico de los hemotrópicos Anaplasma marginale, tripanosoma spp. y Babesia spp. en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador* [[Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas Espe]. Repositorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/13472%0Ahttps://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13472/1/A-ESPE-057312.pdf>
- Menin, J. F., & Nichols, N. M. (2013). Application notes for Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). *Engl. Biolabs Appl. Note*. www.neb.com/tmcalculator
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio: manual*. Organización

Mundial de La Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/252631>

- Parra, N., & Reyna, A. (2019). Parasitological, Hematological, and Immunological Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan Isolates of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Trypanosoma vivax*. *Journal of Parasitology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8528430>
- Reis-Cunha, J. L., Coqueiro-Dos-Santos, A., Pimenta-Carvalho, S. A., Marques, L. P., Rodrigues-Luiz, G. F., Baptista, R. P., de Almeida, L. V., Medeiros Honorato, N. R., Lobo, F. P., Fraga, V. G., da Cunha Galvão, L. M., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., Cardoso, M. S., Cerqueira, G. C., & Bartholomeu, D. C. (2022). Accessing the Variability of Multicopy Genes in Complex Genomes using Unassembled Next-Generation Sequencing Reads: The Case of *Trypanosoma cruzi* Multigene Families. *MBio*, 13(6). https://doi.org/10.1128/MBIO.02319-22/SUPPL_FILE/MBIO.02319-22-S0008.PDF
- Rojas, A., Monroy, C., Guhl, F., Sosa-Estani, S., Santos, W. S., & Abad-Franch, F. (2021). Chagas disease control-surveillance in the Americas: the multinational initiatives and the practical impossibility of interrupting vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760210130>
- Schroeter, J. C., Maloy, A. P., Rees, C. B., & Bartron, M. L. (2020). Fish mitochondrial genome sequencing: expanding genetic resources to support species detection and biodiversity monitoring using environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 12(3), 433–446. <https://doi.org/10.1007/S12686-019-01111-0/METRICS>
- Subekti, D. T., Ekawasti, F., Azmi, Z., Yuniarto, I., Fong, S., & Fahrimal, Y. (2023). DOES TRYPANOSOMA EVANSI HAVE THE MAXICIRCLE GENE, OR CAN TRYPANOSOMA EQUIPERDUM BE ISOLATED FROM BOVINES? *Journal of Parasitology*, 109(4), 436–444. <https://doi.org/10.1645/21-95>
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, 34(9), 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
- 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>
- Wells, E. A. (1984). Animal trypanosomiasis in South America. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1–4), 31–41. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90046-1)

Anexo 1

```
Trypanosomatheileri (>MK674048.1) -----
-----
0
Trypanosomatheileri (NBCO01000007)
ATGACCATCAAGGTTGGTATCAATGGTTTCGGCCGCATTGGTCGCATGGTGTCCAGTCA 60
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
ATGACCATCAAGGTTGGTATCAATGGTTTCGGCCGCATTGGTCGCATGGTGTCCAGTCA 60
Trypanosomatheileri (MK674021.1) -----
-----
0
Trypanosomavivax (AF053744.1) -----
GGCATCAACGGTTTTGGCCGCATGGCCGCATGGTGTCCAGGCC 45
Trypanosomavivax (FM876219.1) -----
-----
0
Trypanosomavivax (TvY486_06) --
gcccccaaggtcggtatcaatggctttggccgcattggccgcattggtgtccaggcc 58
Trypanosomavivax (FM876220.1) -----
-----
0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
ATGACTATTAAGTTGGCATCAATGGTTTCGGCCGTATTGGTCGCATGGTGTCCAGGCA 60
Trypanosomaevansi (AF053743.1) -----
GGCATCAATGGTTTTGGCCGTATTGGTCGCATGGTGTCCAGGCA 45

Trypanosomatheileri (>MK674048.1) -
TCCCGGATCCCAGGTTTATAGGAAGGAGATCGACGTTGTTGCTTGTGTCGACATGAAC 59
Trypanosomatheileri (NBCO01000007)
CTGTGCGAAGAAGGCTTCTTGGCAGGAGATCGACGTTGTTGCTGTTGTCGACATGAAC 120
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
CTGTGCGAAGAAGGCTTCTTGGCAGGAGATCGACGTTGTTGCTGTTGTCGACATGAAC 120
Trypanosomatheileri (MK674021.1) -----
CTTTGTAGACATCGCAAC 18
Trypanosomavivax (AF053744.1)
CTATGCGACGACGGTCTTCTCGGGACCGAGATCGATGTTGTTGGCTGTTGTTGACATGAAC 105
Trypanosomavivax (FM876219.1) -----
AGATCGATGTTGTTGGCTGTTGTTGACATGAAC 32
Trypanosomavivax (TvY486_06)
ctatgacgacggtcttctcgggaccgagatcgatggtgtggtggtgtgacatgaac 118
Trypanosomavivax (FM876220.1) -----
GATGTTGTTGGCTGTTGTTGACATGAAC 27
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
CTGTGCGACGACGGCTCCTCGGGAATGAGATTGATGTCGTTGCTGTTGTTGACATGAAC 120
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
CTGTGCGACGACGGCTCCTCGGGAATGAGATTGATGTCGTTGCTGTTGTTGACATGAAC 105

***

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)
ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG 119
Trypanosomatheileri (NBCO01000007)
ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG 180
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG 180
Trypanosomatheileri (MK674021.1)
ACGGACGCTGAATACTTTGCGTACCAGATGAAGTACGACACAGTGCACGGCAAGTTCAAG 78
Trypanosomavivax (AF053744.1)
ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG 165
Trypanosomavivax (FM876219.1)
ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGTGTGCACGGCAAGTTCAAG 92
Trypanosomavivax (TvY486_06)
acggatgccaagtactttgcctaccagatgaagtacgacagcggtgcacggcaagttcaag 178
Trypanosomavivax (FM876220.1)
ACGGATGCCAAGTACTTTGCCTACCAGATGAAGTACGACAGCGTGCACGGCAAGTTCAAG 87
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
ACGGACGCTCGCTACTTCGCCTATCAGATGAAGTACGACTCCGTTGCACGGCAAGTTCAAG 180
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
ACGGACGCTCGCTACTTCGCCTATCAGATGAAGTACGACTCCGTTGCACGGCAAGTTCAAG 165
***** ** ***** ** ** **********
*****
```


Trypanosomatheileri (NBC001000007) 480
 GCCAAGACACTTGTGATGGGCGTGAATCACCAGGAGTACAACCCCGTGAGCACCACGTT
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 480
 GCCAAGACACTTGTGATGGGCGTGAATCACCAGGAGTACAACCCCGTGAGCACCACGTT
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 378
 GCCAAGACACTTGTGATGGGCGTGAATCACCAGGAGTACAACCCCGTGAGCACCACGTT
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 465
 GCGAAGACCTTCGTGATGGGCGTGAACCACCAGGAGTACAACCCCTCGGGAGCACCATGTT
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 392
 GCGAAGACCTTCGTGATGGGCGTGAACCACCAGGAGTACAACCCCTCGCGAGCACCATGTT
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 478
 gcgaagaccttcgtgatgggctgaaccaccacagagtacaacccctcgcgagcaccatggt
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 387
 GCGAAGACCTTCGTGATGGGCGTGAACCACCAGGAGTACAACCCCTCGCGAGCACCATGTT
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 480
 GCCAAGACGTTTCGTGATGGGCGTGAACCACAACGACTACAACCCCTCGTGAACACCATGTG
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 465
 GCCAAGACGTTTCGTGATGGGCGTGAACCACAACGACTACAACCCCTCGTGAACACCATGTG

 Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 479
 GTGTGCAACGCGTCGTGTACCACCACTGCCTTGCCCCATTGTGCACGTGCTTGTGAAG
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 540
 GTGTGCAACGCGTCGTGTACCACCACTGCCTTGCCCCATTGTGCACGTGCTTGTGAAG
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 540
 GTGTGCAACGCGTCGTGTACCACCACTGCCTTGCCCCATTGTGCACGTGCTTGTGAAG
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 438
 GTGTGCAACGCGTCGTGTACCACCACTGCCTTGCCCCATTGTGCACGTGCTTGTGAAG
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 525
 GTGTCCAACGCTTCGTGCACGACCACTGCCTTGACCTTTTGTGCACGTGCTGGTGAAG
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 452
 GTGTCCAACGCTTCGTGCACGACCACTGCCTTGACCTTTTGTGCACGTGCTGGTGAAG
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 538
 gtgtccaacgcttcgtgcacgacccaactgccttgacacctcttgtgcacgtgctggatgaag
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 447
 GTGTCCAACGCTTCGTGCACGACCACTGCCTTGACCTTTTGTGCACGTGCTGGTGAAG
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 540
 GTGTGCAACGCTTCGTGCACCACTAATTTGCCTCGCCCCACTCGTGCACGTGTTGGTGAAG
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 525
 GTGTGCAACGCTTCGTGCACCACTAATTTGCCTCGCCCCACTCGTGCACGTGTTGGTGAAG

 Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 539
 GAGGGCTTTGGTGTGCAGACTGGTCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCAGCCACG
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 600
 GAGGGCTTTGGTGTGCAGACTGGTCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCAGCCACG
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 600
 GAGGGCTTTGGTGTGCAGACTGGTCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCAGCCACG
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 498
 GAGGGCTTTGGTGTGCAGACTGGTCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCAGCCACG
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 585
 GAGGGCTTTGGTGTGCCACTGGCCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCCACACAG
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 512
 GAGGGCTTTGGTGTGCCACTGGCCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCCACACAG
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 598
 gagggctttgggtgtgctccactggcctcatgacgacaattcactcatataccgccacacag
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 507
 GAGGGCTTTGGTGTGCCACTGGCCTCATGACGACAATCCACTCATAACAGCCACACAG
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 600
 GAGGGCTTCGGCATCTCCACTGGCCTCATGACCACTGTTCACTCGTACACAGCCACACAA
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 585
 GAGGGCTTCGGCATCTCCACTGGCCTCATGACCACTGTTCACTCGTACACAGCCACACAA

 Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 599
 AAGACAGTGGACGGTGTGTCTGTGAAGGACTGGCGTGGCGGGCGTGTGCGGCTGTTAAC
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 660
 AAGACAGTGGACGGTGTGTCTGTGAAGGACTGGCGTGGCGGGCGTGTGCGGCTGTTAAC
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 660
 AAGACAGTGGACGGTGTGTCTGTGAAGGACTGGCGTGGCGGGCGTGTGCGGCTGTTAAC
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 558
 AAGACAGTGGACGGTGTGTCTGTGAAGGACTGGCGTGGCGGGCGTGTGCGGCTGTTAAC
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 645
 AAGACTGTTGATGGTGTGTCAATCAGGACTGGCGCGGTGGCCGCGGGCAGCACTCAAC
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 572
 AAGACTGTTGATGGTGTGTCAATCAGGACTGGCGCGGTGGCCGCGGGCAGCGCTCAAC
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 658
 aagactggtgatggtgtgtcaatcaaggactggcgcggtggccgcgggcagcactcaac
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 567
 AAGACTGTTGATGGTGTGTCAATCAGGACTGGCGCGGTGGCCGCGGGCAGCACTCAAC
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 660
 AAGACCGTGTGATGGTGTTCCTGCAAGGACTGGCGTGGTGGTGCAGCCCTGAAC
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 645
 AAGACCGTGTGATGGTGTTCCTGCAAGGACTGGCGTGGTGGTGCAGCCCTGAAC

 Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 659
 ATCATTCCAAGCACCACAGCGCCGCAAGGCTGTCGGTATGGTGATTCCGAGCACACAG
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 720
 ATCATTCCAAGCACCACAGCGCCGCAAGGCTGTCGGTATGGTGATTCCGAGCACACAG

Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 720
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGCCGAAAGGCTGTCGGTATGGTGATTCCGAGCACACAG
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 618
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGCCGAAAGGCTGTCGGTATGGTGATTCCGAGCACACAG
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 705
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGGGTGGCATGGTGATTCCAAGCACTCAA
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 632
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGGGTGGCATGGTGATTCCAAGTACTCAA
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 718
 atcattcccagcagcactggtgctgcttaaggcgggtgggcatggtgattccaagcactcaa
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 627
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGGGTGGCATGGTGATTCCAAGCACTCAA
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 720
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGGGTGGCATGGTGATTCCGAGCACTCAG
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 705
 ATCATTTCCAAGCACACAGGCGGGTGGCATGGTGATTCCGAGCACTCAG
 ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

** **

Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 719
 GGCAAGTTGACCGGTATGTTCATTCCTGTCGCCACACCCGACGTGTCTGTGGTGGACCTC
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 780
 GGCAAGTTGACCGGTATGTTCATTCCTGTCGCCACACCCGACGTGTCTGTGGTGGACCTC
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 780
 GGCAAGTTGACCGGTATGTTCATTCCTGTCGCCACACCCGACGTGTCTGTGGTGGACCTC
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 678
 GGCAAGTTGACCGGTATGTTCATTCCTGTCGCCACACCCGACGTGTCTGTGGTGGACCTC
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 765
 GGCAAACTGACTGGCATGTCTTTCCGTGTGCCACCCGCGGACGTGTCCGTGTCTGATCTT
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 692
 GGCAAACTGACTGGCATGTCTTTCCGTGTGCCACCCGCGGACGTGTCCGTGTCTGATCTC
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 778
 ggcaaaactgactggcatgtctttccgtgtgccacccgcgacgtgtccgtgtctgcatctt
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 687
 GGCAAACTGACTGGCATGTCTTTCCGTGTGCCACCCGCGGACGTGTCCGTGTCTGATCTT
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 780
 GGCAAGCTTACGGGTATGGCTTCCGTGTCCACGGCTGATGTCTCTGTGGTGGACCTT
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 765
 GGCAAGCTTACGGGTATGGCTTCCGTGTCCACGGCTGATGTCTCTGTGGTGGACCTT
 ***** * ** ** ** ** * ***** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** **

** **

Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 779
 ACCTTACCAGCGACGCGGACACAAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGTGCC
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 840
 ACCTTACCAGCGACGCGGACACAAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGTGCC
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 840
 ACCTTACCAGCGACGCGGACACAAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGTGCC
 Trypanosomatheileri (MK674021.1) 738
 ACCTTACCAGCGACGCGGACACAAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGTGCC
 Trypanosomavivax (AF053744.1) 825
 ACCTTACCAGCGACCCGTGACACAAGCATCAAGGAGATCGATGCCGCCCTCAAGCGCGCC
 Trypanosomavivax (FM876219.1) 752
 ACCTTACCAGCGACCCGTGACACAAGCATCAAGGAGATCGATGCCGCCCTCAAGCGCGCC
 Trypanosomavivax (TvY486_06) 838
 accttaccgacccgtgacacaagcatcaaggagatcgatgccgccctcaagcgcgcc
 Trypanosomavivax (FM876220.1) 747
 ACCTTACCAGCGACCCGTGACACAAGCATCAAGGAGATCGATGCCGCCCTCAAGCGCGCC
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06) 840
 ACCTTATTGCGACGCGGACACGAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGCGCC
 Trypanosomaevansi (AF053743.1) 825
 ACCTTATTGCGACGCGGACACGAGCATCAAGGAGATCGACGCTGCCCTGAAGCGCGCC
 ***** ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

**** **

Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 839
 TCTAAGACCTACATGAAAGGTTTCACTTGGCTACACGAACGAAGAGCTTGTGAGCACCG
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) TCTAAGACCTACATGAAGGTT-- 898
 ATCCTTGGCTACACGAACGAAGAGCTTGTGAGCACCG TCTAAGACCTACATGAAGGTT-- 898
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) TCTAAGACCTACATGAAGGTT-- 796
 ATCCTTGGCTACACGAACGAAGAGCTCGTGAGCACCG TCGAAGACCTACATGAAGAAC-- 883
 Trypanosomavivax (AF053744.1) TCGAAGACCTACATGAAGAAC-- 810
 ATCCTTGGCTACACGACGAGGAGCTTGTGAGCACCG tcgaagactacatgaagaac-- 896
 Trypanosomavivax (FM876219.1) TCGAAGACCTACATGAAGAAC-- 805
 ATCCTTGGCTACACGACGAGGAGCTTGTGAGCACCG TCCAAGACATACATGAAGAAC-- 898
 Trypanosomavivax (TvY486_06) TCCAAGACATACATGAAGAAC-- 883
 atccttggctacacgacgagagcttgtgagcacgg ** ***** ***** ** ** ***** ** **

** *

Trypanosomatheileri (>MK674048.1) 899
 ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCGACGCTGCAAAAACAATC
 Trypanosomatheileri (NBC001000007) 958
 ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCGACGCTGCAAAAACAATC
 Trypanosomatheileri (XM_029023637.1) 958
 ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCGACGCTGCAAAAACAATC

```

Trypanosomatheileri (MK674021.1)
ACTTTATCAACGACAACCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCGACGCTGCAAAACAATC      856
Trypanosomavivax (AF053744.1)
ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCCAAGGCTACACTCCAGAACAACC      943
Trypanosomavivax (FM876219.1)
ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCCA-----
-----
849
Trypanosomavivax (TvY486_06)
acttcatcaatgacaatcgagctccatctacgactccaaggctacactccagaacaacc      956
Trypanosomavivax (FM876220.1)
ACTTCATCAATGACAATCGCAGCTCCATCTACGACTCC-----
-----
843
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
ACTTCATCAGCGACAGCCGAGCTCCATTTACGACTCCAAGGCGACCTGCAGAACAACC      958
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
ACTTCATCAGCGACAGCCGAGCTCCATTTACGACTCCAAGGCGACCTGCAGAACAACC      943
*****
*****

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)
TGCCACGAAAGCGCCGCTTCTCAGA-----
-----
924
Trypanosomatheileri (NBC001000007)
TGCCCAACGAGCGCCGCTTCTTCAAGATTGTGTCGTGGTACGACAACGAGTGGGGATACT      1018
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
TGCCCAACGAGCGCCGCTTCTTCAAGATTGTGTCGTGGTACGACAACGAGTGGGGATACT      1018
Trypanosomatheileri (MK674021.1)
TGCCACGAAAGCGCCGCTCTA-----
-----
876
Trypanosomavivax (AF053744.1)
TCCCAACGAGCGTCGTTTCTTCAAGATCGTCTCATGGTACGATAACGAGTGGGGCTACT      1003
Trypanosomavivax (FM876219.1)
-----
-----
849
Trypanosomavivax (TvY486_06)
tccccaacgagcgtcgtttcttcaagatcgctcatggtacgataacgagtgaggctact      1016
Trypanosomavivax (FM876220.1)
-----
-----
843
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
TCCCAACGAGCGTCGTTTCTTCAAGATTGTGTCGTGGTACGATAACGAGTGGGGTTATT      1018
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
TCCCAACGAGCGTCGTTTCTTCAAGATTGTGTCGTGGTACGATAACGAGTGGGGTTATT      1003

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)
-----
-----
924
Trypanosomatheileri (NBC001000007)
CCC-----
-----
1021
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
CCCACCGTGTGGTGGACCTTGTCCGTCACATGGCTGCAAAGGACCGCTCGGCCAAACTTT      1078
Trypanosomatheileri (MK674021.1)
-----
-----
876
Trypanosomavivax (AF053744.1)
CGCACCGCGTGGTGGACCT-----
-----
1022
Trypanosomavivax (FM876219.1)
-----
-----
849
Trypanosomavivax (TvY486_06)
cgcaccggtgttgggaccttgtgcccacatggcatcgaggatcgcgcccgaagctgt      1076
Trypanosomavivax (FM876220.1)
-----
-----
843
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
CCCACCGTGTGGTGGATCTGTCCGCCACATGGCCGCTCGGGACCGTGCAGCAAAGCTAT      1078
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
CCCACCGCGTGGTGGACCT-----
-----
1022

Trypanosomatheileri (>MK674048.1)
-- 924
Trypanosomatheileri (NBC001000007)
-- 1021
Trypanosomatheileri (XM_029023637.1)
AA 1080
Trypanosomatheileri (MK674021.1)
-- 876
Trypanosomavivax (AF053744.1)
-- 1022
Trypanosomavivax (FM876219.1)
-- 849
Trypanosomavivax (TvY486_06)
a- 1077
Trypanosomavivax (FM876220.1)
-- 843
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr06)
AA 1080
Trypanosomaevansi (AF053743.1)
-- 1022

```

Figura A1. Alineamiento GAPDH. Se pueden observar las secuencias de los genes GAPDH de los *Trypanosomas Theileri*, *Vivax* y *evansi*. 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.

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) -----
GAATCTGCGCATGGCTCATTACATC 25
Trypanosomaevansi (AB551921.1) -----
TTAGCCATGCATCCCTCAGAATCACTGCATTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACATC 60

```

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) -----
AGACGTAATCTGCCGCCAAAATTTGCGGTCTCCGCATTACTGGATAACTTGGCGAAACG 85
Trypanosomaevansi (AB551921.1) -----
AGACGTAATCTGCCGCCAAAATTTGCGGTCTCCGCATTACTGGATAACTTGGCGAAACG 120

```

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) -----
CCAAGCTAATACATGAACCAATCGGACGCTCTTTTTCTATGTCGGGCTTGTGTTTAC 145
Trypanosomaevansi (AB551921.1) -----
CCAAGCTAATACATGAACCAATCGGACGCTCTTTTTCTATGTCGGGCTTGTGTTTAC 180

```

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) -----
GCACTTGTCTGCGCATGGGACGCTCCAGCGAATGAATGAAATTAGAACCAACGCTCCAC 205

```

```

Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GCACTTGTCTGGCGATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAATTAGAACCAACGCTCCAC      240

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
GTGTGCCAGGCTC 13
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CCGGGGCAGTAACACTCAGACGTGTTGACTCAATTCATTCGGTGC GAAAGCCGAGCCTT      265
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CCGGGGCAGTAACACTCAGACGTGTTGACTCAATTCATTCGGTGC GAAAGCCGAGCCTT      300

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 58
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GTTGCTCGGCGTCTACTGACGAACAACTGCCCTATCAGCCAGTGATGGCCGTGTAGTGGA      325
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GTTGCTCGGCGTCTACTGACGAACAACTGCCCTATCAGCCAGTGATGGCCGTGTAGTGGA      360

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----CGTGTGTTGTGTTTCG-----
ACACTGAGACTGCGG      88
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGA      385
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGA      420

Trypanosomavivax (TvY486_03)
CCCATGCGCCGTTTGCCTTC--- 138
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATGCCCCAATGTCGAAAAAAT      444
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATGCCCCAATGTCGAAAAAAT      479

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 138

```

```

Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ACGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGAGCCGACCGTGCCTAGTGCATGGTTGTTTTCAAT 504
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ACGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGAGCCGACCGTGCCTAGTGCATGGTTGTTTTCAAT 539

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 138
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GGGGGATACTCAAACCCATCCAATATCGAGTAACAATTGGAGGACAAGTCTGGTGCCAGC 564
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GGGGGATACTCAAACCCATCCAATATCGAGTAACAATTGGAGGACAAGTCTGGTGCCAGC 599

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
AAAGACTGGGT 149
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
TCCAAAAGCGTATATTAATGCTGTGCTGTTAAAGGGTTCGT 42
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
TCCAAAAGCGTATATTAATGCTGTGCTGTTAAAGGGTTCGT 42
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ACCCGCGTAATCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAATGCTGTGCTGTTAAAGGGTTCGT 624
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ACCCGCGTAATCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAATGCTGTGCTGTTAAAGGGTTCGT 659

Trypanosomavivax (TvY486_03) AATCGAGTGG-----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) AGTTGAATTGTGGGCCTTTGAGGCGCAATGGTT---TGTCCCGTCCACCTC---
GGATTG 96
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) AGTTGAATTGTGGGCCTTTGAGGCGCAATGGTT---TGTCCCGTCCACCTC---
GGATTG 96
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
AGTTGAACTGTGGGCCACGTAGTTTTGTGCCGTGCCAGTCCCGTCCACCTCGGACGTGTT 684
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
AGTTGAACTGTGGGCCACGTAGTTTTGTGCCGTGCCAGTCCCGTCCACCTCGGACGTGTT 719

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0

```

Trypanosomatheileri (JX178167.1)	GTGACCCATGCCCTTGAGGTCCTGTA--	
ACAATCAGAAACAAAAACACGGGAGCGGTTTC	154	
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178185.1)	GTGACCCATGCCCTTGAGGTCCTGTA--	
ACAATCAGAAACAAAAACACGGGAGCGGTTTC	154	
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)	-----	
-----	0	
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
TTGACCCACGCCCTCGTGGCCCGTGAACACTCAGATACAAGAAACACGGGAGCGGTTTC		744
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
TTGACCCACGCCCTCGTGGCCCGTGAACACTCAGATACAAGAAACACGGGAGCGGTTTC		779
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	159	
Trypanosomavivax (KC196665.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196671.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196667.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178167.1)	C-	
TTCTGATTTTCGCATGTCATGCATGCCAGGGGCGTCCGTGATTTTTACTGTGACTA		213
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178185.1)	C-	
TTCTGATTTTCGCATGTCATGCATGCCAGGGGCGTCCGTGATTTTTACTGTGACTA		213
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)	-----	
-----	0	
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
CTCTCACTTTCACGCATGTCATGCATGCGAGGGGGCGTCCGTGAATTTTTACTGTGACCA		804
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
CTCTCACTTTCACGCATGTCATGCATGCGAGGGGGCGTCCGTGAATTTTTACTGTGACCA		839
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	159	
Trypanosomavivax (KC196665.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196671.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196667.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
AAGAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTCGACTTGAATTAGAAAGCATGGGATAACAAAGGAG		273
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
AAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTCGACTTGAATTAGAAAGCATGGGATAACAAAGGAG		273
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)	-----	
-----	0	
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
AAAAAGTGGACCAAAGCAGTCCTGCCGACTTGAATTACAAAGCATGGGATAACGAAGCAT		864
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
AAAAAGTGGACCAAAGCAGTCCTGCCGACTTGAATTACAAAGCATGGGATAACGAAGCAT		899
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	159	
Trypanosomavivax (KC196665.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196671.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196667.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
CAGCCTATGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGTCCATTGGAGATTATGGC		333
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
CAGCCTATGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAAGTCCATTGGAGATTATGGC		333
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)	-----	
-----	0	
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
CAGCCCTGGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAGTCCTGGGAGATTATGGG		924
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
CAGCCCTGGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAGAAGTCCTGGGAGATTATGGG		959
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	159	
Trypanosomavivax (KC196665.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196671.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomavivax (KC196667.1)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
GTCGTGCGACAAGCGTCTGGGTGTTTTCCCATCTTTGGGGCACCCGTCGCCTTTGCGAGA		393
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
-----	0	
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
GTCGTGCGACAAGCGTCTGGGTGTTTTCCCATCTTTGGGGCACCCGTCGCCTTTGCGAGA		393

```

Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) GCCGCGTGCCTTGGGTCGGTGTTCGTGTCTCATTTTGTGGCGGCACA-----
----- 974
Trypanosomaevansi (AB551921.1) GCCGCGTGCCTTGGGTCGGTGTTCGTGTCTCATTTTGTGGCGGCACA-----
----- 1009

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
AATCCGTGTCGGTGTGATGAGCTTCGGCCATCTCTCCGGCGCCTTCTCGTGACTCAGC 453
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
AATCCGTGTCGGTGTGATGAGCTTCGGCCATCTCTCCGGCGCCTTCTCGTGACTCAGC 453
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) -----
TTCGGCTCTTCGTGATGTTTTTTTACATTCATTGCGACGCGCG 1017
Trypanosomaevansi (AB551921.1) -----
TTCGGCTCTTCGTGATGTTTTTTTACATTCATTGCGACGCGCG 1052

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
GCATCCAGGAATGAAGGAGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGACGCGTCAGAGGTGAAA 513
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
GCATCCAGGAATGAAGGAGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGCGCGTCAGAGGTGAAA 513
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GCTTCCAGGAATGAAGGAGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAA 1077
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GCTTCCAGGAATGAAGGAGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAA 1112

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TTCTTAGACCGCGCCAGCAACTACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAA 573
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TTCTTAGACCGCGCCAGCAACTACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAA 573
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TTCTTAGACCGCACCAAGCAACTACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAA 1137
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TTCTTAGACCGCACCAAGCAACTACAGCGAAGGCATTCTCAAGGATACCTTCCTCAA 1172

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TCAAGAACC AAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGC AAA 633
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TCAAGAACC AAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGC AAA 633
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TCAAGAACC AAAAGTGTGGGGATCAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGC AAA 1197
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TCAAGAACC AAAAGTGTGGGGATCAAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACTGC AAA 1232

```

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) CGATGACACCCATGAATTGGGGAATTTTGGTTCGTAGGCGAGGTCGGGTTTC---
ATCTCG 690
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) CGATGACACCCATGAATTGGGGAATTTTGGTTCGTAGGCGAGGTCGGGTTTC---
ATCTCG 690
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CCATGACACCCATGAATTGGGGAACATCATTTGGGTGCCCGTGTGGCGGCCTTTTGTGCCG 1257
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CCATGACACCCATGAATTGGGGAACATCATTTGGGTGCCCGTGTGGCGGCCTTTTGTGCCG 1292

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) CTCCTCGCCTCGCCAATGGATATCAATTTACGTGCATATTCTTTTC-----
----- 736
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) CTCCTCGCCTCGCCAATGGATATCAATTTACGTGCATATTCTTTTC-----
----- 736
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ACCCTCGGCCCAATTTATTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTC 1317
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ACCCTCGGCCCAATTTATTTATCAATTTACGTGCCTATTCTATCACCCCGGTTCCCTC 1352

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) ---
GGTCCTCGCAAGGGGCGCTTTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTC 793
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1) ---
GGTCCTCGCAAGGGGCGCTTTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTC 793
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1) TTTTGAGGTTCTTCCGGGTTTTTTTACGGGAATATCCTCAGC-
ACGTTTCTTACTTCTTC 1376
Trypanosomaevansi (AB551921.1) TTTTGAGGTTCTTCCGGGTTTTTTTACGGGAATATCCTCAGC-
ACGTTTCTTACTTCTTC 1411

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
ACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTGCAAGAGTGAAACTTAA 853
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
ACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTGCAAGAGTGAAACTTAA 853
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTGCAAGAGTGAAACTTAA 1436
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTGCAAGAGTGAAACTTAA 1471

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0

```



```

Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
AGAAATTGACGGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACG 913
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
AGAAATTGACGGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACG 913
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
AGAAATTGACGGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACG 1496
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
AGAAATTGACGGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACG 1531

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
GGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATC 973
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
GGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATC 973
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATC 1556
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATC 1591

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
CCCTGAATGGTGGTGATGGCCGCTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCG 1033
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
CCCTGAATGGTGGTGATGGCCGCTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCG 1033
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CCCTGAATGGTGGTGATGGCCGCTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCG 1616
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CCCTGAATGGTGGTGATGGCCGCTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCG 1651

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATTCAGAATTGCCATAGGATAGCAA--T 1091
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATTCAGAATTGCCATAGGATAGCAA--T 1091
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATTCAGAATTGCCATAGGATAGCAA--T 1676
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATTCAGAATTGCCATAGGATAGCAA--T 1711

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 159
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
CCCTCCCGGGTTTTT---CCC-AAGGAGGGGGGATAT-----
TCGTTTGTATCCTT 1140
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 0

```

```

Trypanosomatheileri (JX178185.1)          CCCCTCCGCGGGTTTTT---CCC-AAGGAGGGGCGATAT-----
TCGTTTGTATCCCTT          1140
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)         -----
-----          0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CCCTCCGCGGGGATTTTTTCCCAACGGTGGTTCGTCATCCTTCTTTTTACAGGCCCTT          1736
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CCCTCCGCGGGGATTTTTTCCCAACGGTGGTTCGTCATCCTTCTTTTTACAGGCCCTT          1771

Trypanosomavivax (TvY486_03)              -----
TTCTGCAGATCATAACACTATCG 183
Trypanosomavivax (KC196665.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196671.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196667.1)             -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)          CTCTGCGGGATTCCCT--
TGTTTTGCGCAAGGTGGGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGA          1198
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)      -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)          CTCTGCGGGATTCCCT--
TGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGA          1198
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)         -----
-----          0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CTCTGCGGGATTCCCTTGTCTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGA          1796
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CTCTGCGGGATTCCCTTGTCTTTTCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGA          1831

Trypanosomavivax (TvY486_03)              CGCTTTG-----
-----          190
Trypanosomavivax (KC196665.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196671.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196667.1)             -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)          TGCTCCTCAATGTCTTGGGCGACACGCGCACTACAATGTGAGAGAACAAGAAAAACGA          1258
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)      -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)          TGCTCCTCAATGTCTTGGGCGACACGCGCACTACAATGTGAGAGAACAAGAAAAACGA          1258
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)         -----
-----          0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TGCTCCTCAATGTCTTGGGCGACACGCGCACTACAATGTGAGAGAACAAGAGTCCGAG          1856
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TGCTCCTCAATGTCTTGGGCGACACGCGCACTACAATGTGAGAGAACAAGAGTCCGAG          1891

Trypanosomavivax (TvY486_03)              -----
CTGCGTCTTCAACGAACCGGGAAGCCAAAGTCATC-----          225
Trypanosomavivax (KC196665.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196671.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196667.1)             -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)          C-----
TTTTGTCGGACCTACTTGATCAAAAAGGTGGGAAAACCCCGGAATCACAT          1309
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)      -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)          C-----
TTTTGTCGGACCTACTTGATCAAAAAGGTGGGAAAACCCCGGAATCACAT          1309
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)         -----
-----          0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CGGCACCTTCAATGTGCTCCCGCTTGATCAAAAAGAGCGGGGAAACCACGGAATCACGT          1916
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CGGCACCTTCAATGTGCTCCCGCTTGATCAAAAAGAGCGGGGAAACCACGGAATCACGT          1951

Trypanosomavivax (TvY486_03)              -----
TGCGGG          246
Trypanosomavivax (KC196665.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196671.1)             -----
-----          0
Trypanosomavivax (KC196667.1)             -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)          -----
AGACCCACTTGGGACCGAGTATTGCAATTATTGGTTCGCGCAACGAGGAATGTCTCGTAGG          1369
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)      -----
-----          0
Trypanosomatheileri (JX178185.1)          -----
AGACCCACTTGGGACCGAGTATTGCAATTATTGGTTCGCGCAACGAGGAATGTCTCGTAGG          1369
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)         -----
-----          0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)          -----
AGACCCACTTGGGACCGAGTATTGCAATTATTGGTTCGCGCAACGAGGAATGTCTCGTAGG          1976

```

```

Trypanosomaevansi (AB551921.1)
AGACCACCTTGGGACCGAGTATTGCAATTATTGGTCGCGCAACGAGGAATGTCTCGTAGG      2011

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1)
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
CGCAGCTCATCAAACCTGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTG      1429
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)
GTACACACCGCCCGTCGTTG      20
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
CGCAGCTCATCAAACCTGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTG      1429
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
CGCAGCTCATCAAACCTGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTG      2036
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
CGCAGCTCATCAAACCTGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTG      2071

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1)
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TTTCCGATGATGGTGAATACAGGTGAACGGACAGTCGAACGTTTCGTTTGACCGAAAAGT      1489
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)
TTTCCGATGATGGTGAATACAGGTGAACGGACAGTCGAACGTTTCGTTTGACCGAAAAGT      80
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TTTCCGATGATGGTGAATACAGGTGAACGGACAGTCGAACGTTTCGTTTGACCGAAAAGT      1489
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TTTCCGATGATGGTGAATACAGGTGATCGGACCGTCGCTCGTCTCGGGCGACCGAAAAGT      2096
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TTTCCGATGATGGTGAATACAGGTGATCGGACCGTCGCTCGTCTCGGGCGACCGAAAAGT      2131

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1)
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACC      1549
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)
TCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACC      140
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACC      1549
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)
----- 0
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACC      2156
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACC      2191

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1)
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1)
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
TGCAGCTGGATCATTTTCCGATGAGATTATGTATCACACATATTTTATATGTACCGCG-      1608
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)
TGCAGCTGGATCATTTTCCGATGAGATTATGTATCACACATATTTTATATGTACCGCG-      199
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
TGCAGCTGGATCATTTTCCGATGAGATTATGTATCACACATATTTTATATGTACCGCG-      1608
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)
TCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTA      44
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTA      2216
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTA      2251

Trypanosomavivax (TvY486_03)
----- 258

```

```

Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----GGGTGGAA-----
TAATATATTTTATGTATGTATATATACATAT 1647
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----GGGTGGAA-----
TAATATATTTTATGTATGTATATATACATAT 238
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----GGGTGGAA-----
TAATATATTTTATGTATGTATATATACATAT 1647
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
TAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTTCTAT 104
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTTCTAT 2276
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTTCTAT 2311

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 0
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 0
Trypanosomatheileri (JX178167.1) GTATATTTCTCTCGCACAGATGTAT---TACATA-----
TTGCATTTT 1690
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) GTATATTTCTCTCGCACAGATGTAT---TACATA-----
TTGCATTTT 281
Trypanosomatheileri (JX178185.1) GTATATTTCTCTCGCACAGATGTAT---TACATA-----
TTGCATTTT 1690
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
ATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAACATGT 164
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATTATGT 2336
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGT 2371

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----TTCCGACCCTC---
----- 11
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----TTCCGA---
----- 6
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----TTCCGACCCTC---
----- 11
Trypanosomatheileri (JX178167.1) GTCTGTTGTTGTGTGTTGGGTGTATATCTCT-----
CATGCACAGCCTCAGACAGTG 1741
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) GTCTGTTGTTGTGTGTTGGGTGTATATCTCT-----
CATGCACAGCCTCAGACAGTG 332
Trypanosomatheileri (JX178185.1) GTCTGTTGTTGTGTGTTGGGTGTATATCTCT-----
CATGCACAGCCTCAGACAGTG 1741
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
ATGTGTGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAG 224
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
ATGTGTGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAG 2396
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ATGTGTGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAG 2431

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----CTCTCTTCTCGTCGCGCCCGTCTCCCGCCACCGG-
GGCGGGACAGC 57
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----CCCTCTTCTCGTCGCGCCCGTCTCCCGCCACCGG-
GGCGGGACAGC 52
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----TTCTCTTCTCGTCGCGCCCGTCTCCCGCCACCGG-
GGCGGGACAGC 57
Trypanosomatheileri (JX178167.1) CAATAACAAA---AAA---AACTCATGCCGCTTGACTCTCT-----
----- 1776
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) CAATAACAAA---AAA---AACTCATGCCGCTTGACTCTCT-----
----- 368
Trypanosomatheileri (JX178185.1) CAATAACAAA---AAA---AACTCATGCCGCTTGACTCTCT-----
----- 1777
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
TAGTAATAACACAGAGAATACGTATGTAATGCGTATCTCCATATCTATATATATATATAT 284
Trypanosomaevansi (MN446740.1) TAGTAATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATA--
TATTTATGTAT 2454
Trypanosomaevansi (AB551921.1) TAGTAATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATA--
TATTTATGTAT 2489

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) AAACCACGACGCTGCCGCTCGACCCCGCGCAGGTGGAGCACGGCCCGCACAAAC 117
Trypanosomavivax (KC196671.1) AAACCACGACGCTGCCGCTCGACCCCGCGCAGGTGGAGCACGGCCCGCACAAAC 112
Trypanosomavivax (KC196667.1) AAACCACGACGCTGCCGCTCGACCCCGCGCAGGTGGAGCACGGCCCGCACAAAC 117

```

Trypanosomatheileri (JX178167.1)	-----	
TCACATAATAATAATAATATATATATGGTGATTGTTGAGAACGGCCCCAAC		1828
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)	-----	
TCACATAATAATAATAATATATATATGGTGATTGTTGAGAACGGCCCCAAC		420
Trypanosomatheileri (JX178185.1)	-----	
TCACATAATAATAATAATATATATATGGTGATTGTTGAGAACGGCCCCAAC		1829
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)		
ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCAAC		344
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCAAC		2514
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCAAC		2549
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	258	
Trypanosomavivax (KC196665.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCGTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGCGCGATAGT		177
Trypanosomavivax (KC196671.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCGTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGCGCGATAGT		172
Trypanosomavivax (KC196667.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCGTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGCGCGATAGT		177
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		1888
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		480
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		1889
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		404
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		2574
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCCTATTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCATAAG		2609
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	258	
Trypanosomavivax (KC196665.1)		
TGGTATGATCTGCAGAACCACTCGATTACCCAGTCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		237
Trypanosomavivax (KC196671.1)		
TGGTATGATCTGCAGAACCACTCGATTACCCAGTCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		232
Trypanosomavivax (KC196667.1)		
TGGTATGATCTGCAGAACCACTCGATTACCCAGTCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		237
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		1948
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		540
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		1949
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCATTGCCCAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		464
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCATTGCCCAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		2634
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
TGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCATTGCCCAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAG		2669
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	258	
Trypanosomavivax (KC196665.1)		
CAGCCCCCGGGTTCATCCCGTGCATGCCGAGTCTCAGTGTGCAACACAACACACGCC		297
Trypanosomavivax (KC196671.1)		
CAGCCCCCGGGTTCATCCCGTGCATGCCGAGTCTCAGTGTGCAACACAACACACGCC		292
Trypanosomavivax (KC196667.1)		
CAGCCCCCGGGTTCATCCCGTGCATGCCGAGTCTCAGTGTGCAACACAACACACGCC		297
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
AAGCTCCTCGGAGTTCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAACAAAAAAC		2008
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)		
AAGCTCCTCGGAGTTCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAACAAAAAAC		600
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
AAGCTCCTCGGAGTTCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAACAAAAAAC		2009
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03)		
AAGCTCTCTCGAGCCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAATATAAAAAACAA		524
Trypanosomaevansi (MN446740.1)		
AAGCTCTCTCGAGCCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAATATAAAAAACAA		2694
Trypanosomaevansi (AB551921.1)		
AAGCTCTCTCGAGCCATCCCGTGCATGCCCATATTTCTCAGTGTGCAATATAAAAAACAA		2729
Trypanosomavivax (TvY486_03)	-----	
-----	258	
Trypanosomavivax (KC196665.1)	GCCCCAC-	
GCACTGCGCACTGCACGTGCCGCGGGCGCCACCAACGAGCCTGGCACACACA		356
Trypanosomavivax (KC196671.1)	GCCCCAC-	
GCACTGCGCACTGCACGTGCCGCGGGCGCCACCAACGAGCCTGGCACACACA		351
Trypanosomavivax (KC196667.1)	GCCCCAC-	
GCACTGCGCACTGCACGTGCCGCGGGCGCCACCAACGAGCCTGGCACACACA		356
Trypanosomatheileri (JX178167.1)		
ACCATACAACATGTTATTGTGTATGTGTGTGGGAATTTTAAACAGAGAGCCCTTGGG		2068
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)		
ACCATACAACATGTTATTGTGTATGTGTGTGGGAATTTTAAACAGAGAGCCCTTGGG		660
Trypanosomatheileri (JX178185.1)		
ACCATACAACATGTTATTGTGTATGTGTGTGGGAATTTTAAACAGAGAGCCCTTGGG		2069

Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) ACGCACACCTATTTTGTGTGTTCAACGCACGCAAAAAATCCCGCCACCTCTTC-
 ----- 578
 Trypanosomaevansi (MN446740.1) 2751
 ACGCACACCTATTTTGTGTGTTCAACGCACGCAAAAAATCCCGCCACCTCTTTCTC---
 Trypanosomaevansi (AB551921.1) 2786
 ACACACACCTATTTTGTGTGTTCAACGCACGCAAAAAATCCCGCCACCTCTTTCTC---

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
 ----- 258
 Trypanosomavivax (KC196665.1) -- 414
 CACGCAGGGCACGCGCAGCGCGCAGCCCGGCCAGCGGACCCACACGCACGTGCGCAGC
 Trypanosomavivax (KC196671.1) 411
 CACACGCAGGGCACGCGCAGCGCGCAGCCCGGCCAGCGGTTCCACACGCACGTGCGCAGC
 Trypanosomavivax (KC196667.1) 416
 CACACGCAGGGCACGCGCAGCGCGCAGCCCGGCCAGCGGACCCACACGCACGTGCGCAGC
 Trypanosomatheileri (JX178167.1) GATACGGATGAAACACACT-----
 CTCGGCAGCGGTTTACTCGCATGCAGAAAGAGAGG 2123
 Trypanosomatheileri (TM35.000312160) GATACGGATGAAACACACT-----
 CTCGGCAGCGGTTTACTCGCATGCAGAAAGAGAGG 715
 Trypanosomatheileri (JX178185.1) GATACGGATGAAACACACT-----
 CTCGGCAGCGGTTTACTCGCATGCAGAAAGAGAGG 2124
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) TCCTCGTGTGGTGCATATT-----CATGTTTGTGAGTGTGCACATATACG-----
 ATATC 628
 Trypanosomaevansi (MN446740.1) CTCGTGTGGGTGCATATT-----CATGTTTGTGAGTGTGCACATATACG-----
 ATATC 2801
 Trypanosomaevansi (AB551921.1) CTCGTGT--GGTGCATATT-----CATGTTTGTGAGTGTGCACATATACG-----
 ATATC 2834

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
 ----- 258
 Trypanosomavivax (KC196665.1) GCACAGCACGCACGCATG-CACGCAAACGAGG----
 CAACGGCGCCGCGTACGCGCGCG 469
 Trypanosomavivax (KC196671.1) GCACAGCACGCACGCATG-CACGCAAACGAGG----
 CACCGCGCCGCGTACGCGCGCG 466
 Trypanosomavivax (KC196667.1) GCACAGCACGCACGCATG-CACGCAAACGAGG----
 CACCGCGCCGCGTACGCGCGCG 471
 Trypanosomatheileri (JX178167.1) 2183
 GCTACACTATTTTTTTAGTGTGGTATTTTTGTGTATGATCCGCTCCGGCGCTTGTGTGTG
 Trypanosomatheileri (TM35.000312160) 775
 GCTACACTATTTTTTTAGTGTGGTATTTTTGTGTATGATCCGCTCCGGCGCTTGTGTGTG
 Trypanosomatheileri (JX178185.1) 2184
 GCTACACTATTTTTTTAGTGTGGTATTTTTGTGTATGATCCGCTCCGGCGCTTGTGTGTG
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) TTTCA--ACTCTTTCTA--
 CTCGCACAATGGTGTATGTACGCATATACGTGTGTAGT 684
 Trypanosomaevansi (MN446740.1) TTTCA--ACTCTTTCTA--
 CTCGCACAATGGTGTATGTACGCATATACGTGTGTAGT 2857
 Trypanosomaevansi (AB551921.1) TTTCA--ACTCTTTCTA--
 CTCGCACAATGGTGTATGTACGCATATACGTGTGTAGT 2890

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
 ----- 258
 Trypanosomavivax (KC196665.1) CACCGCTCTGC-----CCTTCTGT-----
 ----- 488
 Trypanosomavivax (KC196671.1) CACCGCTCTGC-----CCTTCTGT-----
 ----- 485
 Trypanosomavivax (KC196667.1) CACCGCTCTGC-----CCTTCTGT-----
 ----- 490
 Trypanosomatheileri (JX178167.1) 2243
 TGTGCGTGTGCTCCTCTCTCACTTTGTACTCATATGTATATGTGTGTAAATTGA
 Trypanosomatheileri (TM35.000312160) 835
 TGTGCGTGTGCTCCTCTCTCACTTTGTACTCATATGTATATGTGTGTAAATTGA
 Trypanosomatheileri (JX178185.1) 2244
 TGTGCGTGTGCTCCTCTCTCACTTTGTACTCATATGTATATGTGTGTAAATTGA
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) GAGTGATATG-----GAAGAGAAATGGGAAAGGCATATATAT--
 ATGTATATACATAAT 736
 Trypanosomaevansi (MN446740.1) GAGTGATATG-----
 GAAGAGAAATGGGAAAGGCATATGTATATATACATAAT 2911
 Trypanosomaevansi (AB551921.1) GAGTGATATG-----
 GAAGAGAAATGGGAAAGGCATATATATATATGTATATACATAAT 2944

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
 ----- 258
 Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
 ----- 488
 Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
 ----- 485
 Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
 ----- 490
 Trypanosomatheileri (JX178167.1) GAAAAA-----GGGGGAATCATACC--
 ACATACATGTCTGTACAACA 2283
 Trypanosomatheileri (TM35.000312160) GAAAAA-----GGGGGAATCATACC--
 ACATACATGTCTGTACAACA 875
 Trypanosomatheileri (JX178185.1) GAAAAA-----GGGGGAATCATACC--
 ACATACATGTCTGTACAACA 2284
 Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) 796
 ATATATGTGTGTGGATTTGTGTGTTGAGCACATATAAGGAAAAGGTTGCGTGTATATAC
 Trypanosomaevansi (MN446740.1) 2971
 ATATATGTGTGTGGATTTGTGTGTTGAGCACATATAAGGAAAAGGTTGCGTGTATATAC
 Trypanosomaevansi (AB551921.1) 3004
 ATATATGTGTGTGGATTTGTGTGTTGAGCACATATAAGGAAAAGGTTGTGTATATAC

```

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1)
ACAACCAAAAACACCAACGAGAGAAAAAGATAAGAAAAGGATTGGGGCTTAGGTCTCTCT 2343
Trypanosomatheileri (TM35.000312160)
ACAACCAAAAACACCAACGAGAGAAAAAGATAAGAAAAGGATTGGGGCTTAGGTCTCTCT 935
Trypanosomatheileri (JX178185.1)
ACAACCAAAAACACCAACGAGAGAAAAAGATAAGAAAAGGATTGGGGCTTAGGTCTCTCT 2344
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) AGAGAGTCTGTGGCGGTTGGGACATGTGTAT---AAATATAT--
ATGTATATGTGTGTGT 851
Trypanosomaevansi (MN446740.1) AGAGAGTCTGTGGCGGTTGGGACATGTGTAT---AAATATAT--
ATGTATATGTGTGTGT 3026
Trypanosomaevansi (AB551921.1) AGAGAGTCTGTGGCGGTTGGGACATGTGTAT---
AAATATATATATGTATATGTGTGTGT 3061

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) TCTTT-----TTTTTCTTTTCTACGCCATGTGTGTA-----
TGGTATATAAAAAATTA 2391
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) TCTTT-----TTTTTCTTTTCTACGCCATGTGTGTA-----
TGGTATATAAAAAATTA 983
Trypanosomatheileri (JX178185.1) TCTTT-----TTTTTCTTTTCTACGCCATGTGTGTA-----
TGGTATATAAAAAATTA 2392
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03) TCCGCTGTGGAGATTTTATATCTTACGGAGAGTGTTCATA--
TATATGTTTGTACGCATG 909
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TCCGCTGTGGAGATTTTATATCTTACGGAGAGTGTTCATATATATATGTTTGTACGCATG 3086
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TCCGCTGTGGAGATTTTATATCTTACGGAGAGTGTTCATATATATATGTTTGTACGCATG 3121

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) TACTGTGTGGGTGCGTGTT-----
----- 2410
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) TACTGTGTGGGTGCGTGTT-----
----- 1001
Trypanosomatheileri (JX178185.1) TACTGTGTGGGTGCGTGTT-----
----- 2411
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
TATTTTGGCGCCCGTATAGAGATTAAGAAAAGGATAAGAAAAGGATTGCAAAAAGAGGCGGC 969
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
TATTTTGGCGCCCGTATAGAGATTAAGAAAAGGATAAGAAAAGGATTGCAAAAAGAGGCGGC 3146
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
TATTTTGGCGCCCGTATAGAGATTAAGAAAAGGATAAGAAAAGGATTGCAAAAAGAGGCGGC 3181

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 2410
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 1001
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 2411
Trypanosomaevansi (STIB805_Ch03)
GGATAGTGTGTATGTGTATTACAGCAAGCAACTATATTTGCTGCTTGTGAGTATAT 1029
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GGATAGTGTGTATGTGTATTACAGCAAGCAACTATATTTGCTGCTTGTGAGTATAT 3206
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GGATAGTGTGTATGTGTATTACAGCAAGCAACTATATTTGCTGCTTGTGAGTATAT 3241

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485

```

```

Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 2410
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 1001
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 2411
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) GCATATATGTACATTATGTGCTTGTGCTTCTTTTCGTGTACGCTTC-----
----- 1074
Trypanosomaevansi (MN446740.1)
GCATATATGTACATTATGTGCTTGTGCTTCTTTTCGTGTACGCTTCACCTTTTTTATATTGC 3266
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
GCATATATGTACATTATGTGCTTGTGCTTCTTTTCGTGTACGCTTCACCTTTTTTATATTGT 3301

Trypanosomavivax (TvY486_03) -----
----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) -----
----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) -----
----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) -----
----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) -----
----- 2410
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) -----
----- 1001
Trypanosomatheileri (JX178185.1) -----
----- 2411
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) -----
----- 1074
Trypanosomaevansi (MN446740.1) ATTTT-----
----- 3271
Trypanosomaevansi (AB551921.1)
ATTTTTTCAGACCTGAGTGTGGCAGGACCCCGCTAAACTTAAGCATATTACTCAGCGGA 3361

Trypanosomavivax (TvY486_03) ----- 258
Trypanosomavivax (KC196665.1) ----- 488
Trypanosomavivax (KC196671.1) ----- 485
Trypanosomavivax (KC196667.1) ----- 490
Trypanosomatheileri (JX178167.1) ----- 2410
Trypanosomatheileri (TM35.000312160) ----- 1001
Trypanosomatheileri (JX178185.1) ----- 2411
Trypanosomaevansi (STIB805_Chr03) ----- 1074
Trypanosomaevansi (MN446740.1) ----- 3271
Trypanosomaevansi (AB551921.1) GGAAAAGAAAACAA 3375

```

Figura A2. Alineamiento ITS. Se pueden observar las secuencias de los genes ITS de los parásitos *Evasi*, *Theileri* y *Vivax*. Se observa muestra que la calidad del alineamiento no es óptima.