



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DISTEMPER CANINO
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL GEN DE LA
PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE VIRAL**

**MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY
REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION
OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE**

Cynthia Adriana Muñoz Cordero

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

FINANCIAMIENTO PROYECTO FIV 121014019102010

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DISTEMPER CANINO
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL GEN DE LA
PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE VIRAL**

**MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY
REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION
OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE**

Cynthia Adriana Muñoz Cordero

NOTA FINAL:

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS

PROFESOR CONSEJERO: JOSE PIZARRO LUCERO

PROFESOR CONSEJERO: CLAUDIO ZUÑIGA MARTI

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quisiera dar mis sinceros agradecimientos a quienes me ayudaron a llevar a cabo esta carrera y que de una u otra forma estuvieron presentes en todos estos años de estudio.

Entre ellos, gracias a mis queridos padres, Oscar y Susana, quienes me otorgaron su amor y apoyo incondicional en cada momento, dándome las fuerzas para seguir adelante y siendo los segundos padres de mi bebé.

A mi abuelita Adriana y a mi tía Mirian, que siempre estuvieron a mi lado, dándome su cariño y asimismo me ayudaron con el cuidado de mi hija mientras yo estudiaba.

A mi pareja Alex, quien siempre me acompañó e incitó a terminar mis estudios, y con quien tuvimos a nuestra preciosa hija Ignacia, la cual nos llena de orgullo y felicidad.

A mi pequeño Pocholo, mi labrador bello, por su amor y espera incondicional.

A mi profesor guía Carlos Navarro, quien me enseñó el trabajo de laboratorio y me revisó la memoria en sus distintas etapas.

Para finalizar, quisiera agradecer a FAVET, por todo el conocimiento brindado durante el transcurso de la carrera.

RESUMEN

El Distemper Canino es una enfermedad viral de distribución mundial, letal y altamente contagiosa, producida por el Virus Distemper Canino, el cual afecta a un amplio rango de hospederos, como perros domésticos y representantes silvestres de distintas familias de carnívoros, comprometiendo drásticamente la conservación de especies amenazadas.

Para el diagnóstico definitivo *ante-mortem* de la enfermedad, se han sugerido una gran variedad de parámetros clínicos y diferentes tipos de ensayos, sin embargo, debido al curso imprevisible y variable de ésta, el diagnóstico final para algunos animales continúa siendo incierto.

En consideración a lo anterior y a que el desarrollo de técnicas moleculares ofrece diversos procedimientos para pruebas diagnósticas, el objetivo de esta memoria de título postuló la detección del gen de la proteína de la nucleocápside del Virus Distemper Canino mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa, como una forma de diagnóstico rápido y específico para la detección del virus.

La especificidad del método se evidenció por la amplificación del fragmento esperado en el 100% de los controles positivos a Virus Distemper Canino, tanto los tres controles vacunales (cepa Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill), como los diez controles de RNA viral provenientes desde aislados nacionales, y en la no amplificación del fragmento esperado en los controles negativos (perros no infectados con y sin vacunación). Sumado a esto, los fragmentos de DNA amplificados fueron enviados a secuenciar y mediante el programa BLAST, se confirmó que éstos correspondían a Virus Distemper Canino.

Además, se propone que el método podría tener una alta sensibilidad, debido a la amplificación del fragmento esperado en el 91% de las muestras de campo provenientes de perros sospechosos de Distemper Canino.

En base a lo anterior, el método implementado puede colaborar con la prevención y el control del aumento de Distemper Canino, tanto en la población canina, como en otros animales susceptibles a la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Virus Distemper Canino, proteína de la nucleocápside, RT-PCR.

ABSTRACT

Canine Distemper is a viral disease of worldwide distribution, lethal and highly contagious, caused by the Canine Distemper Virus, which affects a wide host range, as domestic dogs and wild representatives of different families of carnivores, compromising drastically the conservation of threatened species.

For the definitive diagnosis of the ante-mortem disease, have been suggested a variety of clinical parameters and different types of assays, however, due to unpredictable and variable course of this, the final diagnosis for some animals remains uncertain.

In consideration to the foregoing and to the recent development of molecular techniques provides various methods for diagnostic tests, the objective of this memory postulated the detection of the nucleocapsid protein gene of Canine Distemper Virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, as a form of rapid and specific diagnosis for the detection of the virus.

The specificity of the method was demonstrated by amplification of the expected fragment at 100% of the positive controls to Canine Distemper Virus, both three vaccine controls (strain Onderstepoort, Lederle and Snyder Hill), as ten controls of viral RNA from national isolated, and in the not amplification of the expected fragment in the negative controls (uninfected dogs with and without vaccination). In addition to this, the amplified DNA fragments were sent to sequence and by means the BLAST program, it was confirmed that these were corresponding to Canine Distemper Virus.

Additionally, it is proposed that the method could have high sensitivity, due to the amplification of the expected fragment at 91% of the field samples of dogs suspected of Canine Distemper.

Based on the above, the method implemented can contribute to the prevention and control of the increase of Canine Distemper, both in the canine population, as in other animals susceptible to the disease.

KEYWORDS: Canine Distemper Virus, nucleocapsid protein, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Virus Distemper Canino

El Virus Distemper Canino (VDC) pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramixoviridae*, orden *Mononegavirales* y está relacionado antigénicamente con los virus de la Peste Bovina y del Sarampión. Es un virus pleomórfico con envoltura lipídica, de un diámetro de 150 a 300 nm, cuyo genoma es un RNA de hebra simple, de sentido negativo y con una nucleocápside helicoidal. El genoma consta de alrededor de 15,7 kilobases (kb), que codifica para seis proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la polimerasa (L) y las glicoproteínas de envoltura, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H). Estas últimas dos, ubicadas en la envoltura lipídica que rodea el virión, son las encargadas del reconocimiento e ingreso del virus a la célula del hospedador, siendo los objetivos principales de los anticuerpos neutralizantes que sintetiza el sistema inmune del mismo (Shin *et al.*, 2004, Sidhu *et al.*, 1993; Summers y Appel, 1994; Von Messling *et al.*, 2001). La nucleocápside helicoidal, contiene las proteínas N, P y L, las que inician la replicación intracelular. La proteína M, conecta las glicoproteínas de la superficie y de la nucleocápside durante la maduración viral (Beineke *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2004).

El gen N, de alrededor de 1,5 kb, es uno de los genes más conservados del genoma VDC y su región central es la que presenta la menor variación. Posee regiones muy conservadas en los primeros 2/3 del gen entre los miembros del género *Morbillivirus* y codifica la más abundante de las proteínas virales estructurales, la proteína de la nucleocápside, que posee funciones reguladoras de la transcripción y replicación, así como la encapsidación del genoma RNA en una nucleocápside RNAsa resistente. No obstante, a pesar de ser una región muy conservada del genoma VDC, se han demostrado algunas variaciones del gen N entre aislados de campo (Castilho *et al.*, 2007; Frisk *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2007; Keawcharoen *et al.*, 2005).

El VDC, es un virus envuelto muy sensible al medio ambiente, sin embargo su constante eliminación a través de todo tipo de secreciones y fluidos corporales a partir del séptimo día postinfección, y su alta infectividad, permiten su rápida diseminación en el ecosistema.

Sumado a esto, existen animales infectados que eliminan el virus antes de manifestar signos asociados a la virosis (Summers y Appel, 1994).

Hospederos del Virus Distemper Canino

Los hospederos del VDC incluyen numerosas familias del orden de los carnívoros como *canidae* (perros, zorros), *Procyonidae* (mapaches), *Mustelidae* (hurones y visones), *Mephitidae* (zorrillos), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (osos), *Ailuridae* (pandas rojos), *Viverridae* (ginetas, civetas) y *Felidae* (tigres, leones, leopardos, jaguares), presentándose inclusive en mamíferos marinos como pinnípedos y cetáceos. El Distemper Canino (DC) se ha observado en grandes felinos, en el Parque Nacional del Serengeti de Tanzania en 1994, en los zoológicos de América del Norte en 1991 y 1992, en focas del Lago Baikal y Mar Caspio en 1988 y en pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona. Asimismo la enfermedad DC se ha presentado en primates no humanos, macaco japonés (*Macaca fuscata*) infectado naturalmente por primera vez en 1989 en Japón y en el 2006 en China, en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), donde 10.000 animales fueron infectados (Appel y Summers, 1999; Castilho *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008; Summers y Appel, 1994).

Por otro parte, una posible relación entre enfermedad de Paget en los humanos (osteítis deformante) e infección por VDC ha sido demostrada, debido al descubrimiento de RNA del virus en tejidos afectados (Frisk *et al.*, 1999; Mee *et al.*, 1998).

En Chile, en el año 1994 se informó del primer aislamiento del virus en cultivos celulares inoculados con secreciones de un canino con signos clínicos de DC. El diagnóstico clínico se confirmó por microscopía electrónica y estudios histopatológicos (Cerdeira *et al.*, 1994). En el año 2003 ocurrió un brote de DC en las poblaciones de zorros endémicos del Parque Nacional Fray Jorge (Región de Coquimbo), el cual se especuló que podría estar relacionado con la existencia de mustélidos nativos como el chingue y el quique (Moreira y Stutzin, 2005). Además en el 2007, hubo un brote de DC en la isla Robinson Crusoe (Región de Valparaíso), donde fueron afectados varios perros domésticos, pero no los lobos marinos endémicos de la isla (Jara *et al.*, 2007).

Patogenia del Virus Distemper Canino

La naturaleza de la enfermedad es variable y su curso depende en gran medida de las interacciones entre el virus y el sistema inmune del hospedero. Si bien todos los perros son susceptibles al VDC, principalmente son afectados los cachorros de tres a seis meses de edad, ya que han perdido los anticuerpos maternos y su sistema inmune tiene una menor eficiencia (Martella *et al.*, 2008, Summers y Appel, 1994).

El virus entra en el hospedero por vía ocular, nasal u oral, y rápidamente se inicia la replicación en nódulos linfáticos locales y en siete días a todos los tejidos linfáticos (viremia primaria), produciendo la infección temprana de linfocitos y células mononucleares, por medio del bloqueo de la síntesis y de las vías de señalización de interferones y citoquinas, disminuyendo la proliferación de linfocitos B y T, siendo más afectados estos últimos, lo que resulta en una grave inmunosupresión del hospedero (Von Messling *et al.*, 2001). Durante la segunda y tercera semana post infección, algunos perros inician una fuerte respuesta inmune humoral y celular y pueden recuperarse sin signos clínicos posteriores, mientras otros desarrollan una débil respuesta inmune y presentan la enfermedad aguda o subaguda, debido a que los linfocitos y células mononucleares infectadas transportan el virus a la superficie epitelial del tracto digestivo, respiratorio, urogenital, piel y/o al sistema nervioso central, con los signos clínicos respectivos (viremia secundaria) (Appel y Summers, 1999).

Signos clínicos de la enfermedad

Los signos pueden ser variables, desde leves a severos, con o sin compromiso del sistema nervioso central y con alrededor de un 50% de mortalidad (Appel y Summers, 1999).

Días después de la viremia primaria, generalmente aparecen signos como secreción nasal y ocular, conjuntivitis y anorexia (Martella *et al.*, 2008), y luego de la viremia secundaria, se pueden presentar signos como secreción nasal, tos, neumonía, diarrea, vómitos, pústulas dérmicas, entre otros, los que generalmente aparecen aumentados por la infección bacteriana secundaria. La localización en el sistema nervioso central, dependiendo de la cepa viral, genera la enfermedad aguda con mioclonía, hiperestesia y depresión, o la enfermedad subaguda con incoordinación, paresia, parálisis y temblores musculares (Appel y Summers, 1999).

Vacunas

Las vacunas utilizadas en su mayoría corresponden a vacunas polivalentes de virus atenuados, las cuales confieren una limitada protección a los individuos y además tienen el riesgo de provocar la enfermedad en los mismos, ya que mantienen su linfotropismo y capacidad de inducir inmunosupresión, sobretodo en animales inmunodeprimidos o menores de 6 meses (Keawcharoen *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2008).

Otras alternativas que presentan una mayor seguridad que las anteriores, son las vacunas recombinantes, que prescinden del patógeno y utilizan algunos de sus antígenos para estimular adecuadamente al sistema inmune del hospedero. Estas vacunas muestran una gran eficacia, con una producción de anticuerpos de mayor afinidad y duración que las vacunas de virus atenuados (Larson y Schultz, 2006).

Considerando que los cachorros no son inmunocompetentes antes de las ocho semanas de vida y que los anticuerpos maternos duran en el recién nacido aproximadamente entre ocho y diez semanas, se recomienda vacunar a las seis semanas de edad y para superar la posible interferencia de los anticuerpos maternos, se debe repetir la vacunación cada 3 semanas hasta las 12 semanas (2 dosis más), debiendo repetir una vacunación anualmente (Berríos y Durán, 2005).

Diagnóstico de VDC

De los métodos diagnósticos, la signología clínica es la principal herramienta utilizada por médicos veterinarios, no obstante, la inespecificidad de los signos en algunos casos imposibilita llegar a un diagnóstico final, por lo que es necesaria la utilización de pruebas de laboratorio. Entre ellas, una de las más utilizadas es el ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), que puede detectar anticuerpos séricos (Acs) IgM (contra las proteínas de la nucleocápside, N y P del VDC) o IgG (contra los antígenos de la envoltura, H y F del VDC). Sin embargo esta prueba no diferencia si los Acs producidos corresponden a Acs maternos, vacunales o por infección. Por lo demás la producción de Acs depende de la etapa de la enfermedad, pudiendo no encontrarse en fases iniciales y finales de ésta. En perros no vacunados con infección aguda, éstos pueden morir sin presentar Acs contra el virus. En animales con signos neurológicos, la determinación de Acs específicos contra VDC en líquido cefalorraquídeo no contaminado con sangre, es diagnóstico definitivo de

encefalitis por DC, sin embargo éste es un método muy invasivo y sus resultados son variables (Appel y Summers, 1999; Frisk *et al.*, 1999).

Otro método diagnóstico utilizado es la detección de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos por citología o por inmunofluorescencia, no obstante, éstos sólo se pueden visualizar en ciertos periodos de la enfermedad, generalmente estando ausentes cuando se generan los signos clínicos (Martella *et al.*, 2008; Summers y Appel, 1994). La inmunohistoquímica se utiliza para detectar antígenos virales y/o cuerpos de inclusión en tejidos, con resultados confiables sólo cuando existe una marcada viremia, además esta técnica se puede realizar exclusivamente en muestras tomadas *post-mortem* (Frisk *et al.*, 1999; Keawcharoen *et al.*, 2005). El aislamiento del virus, tiene una sensibilidad y especificidad muy alta, no obstante es un procedimiento laborioso y muy lento, por lo que no es utilizado rutinariamente para el diagnóstico (Martella *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa (RT-PCR), consiste en una amplificación exponencial de fragmentos de DNA del virus, previa transcripción inversa desde RNA a DNA complementario, permitiendo detectar la presencia del RNA del virus tempranamente, siendo a diferencia de las otras técnicas mencionadas, una prueba sensible, específica y rápida para el diagnóstico de VDC, y puede resultar positiva aún cuando otras pruebas no logran detectar al virus (Appel y Summers, 1999; Frisk *et al.*, 1999; Martella *et al.*, 2008).

En las últimas décadas, se han desarrollado diversos métodos basados en la RT-PCR para el diagnóstico de VDC, siendo los principales blancos para la amplificación, regiones genómicas que presentan un alto grado de conservación entre los aislamientos del virus. Es así, como en 1999 Frisk *et al.* desarrollaron un método, basado en la amplificación por RT-PCR de un fragmento conservado de 287 pb del gen N del VDC, el cual fue utilizado posteriormente por diversos autores, demostrando ser un técnica muy eficaz para la detección del genoma del virus (Calderón *et al.*, 2007; Frisk *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2007).

Esta memoria de título tiene como objetivo principal diagnosticar molecularmente el VDC, a través de la implementación del ensayo de la RT-PCR del gen de la proteína de la nucleocápside.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en los laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con financiamiento del PROYECTO FIV 121014019102010.

1.- Controles.

Controles positivos. Una vez establecido el protocolo de la RT-PCR, se probó el funcionamiento del método con controles positivos provenientes de vacunas y desde aislados nacionales del virus.

Para los controles positivos vacunales, se utilizó sangre del control negativo sin vacunación, contaminada con virus vivos atenuados del VDC obtenidos desde las vacunas “Nobivac® Puppy DP” (cepa Onderstepoort), “Canigen MHA2PPi/L” (cepa Lederle) y “Vanguard Plus 5/CV-L” (cepa Snyder Hill). Para esto cada vacuna fue reconstituida con 0,5 mL de cloruro de sodio 0.9%, y luego esta mezcla fue agregada a 0,5 ml de sangre, para posteriormente extraer el RNA.

Los diez controles positivos provenientes de aislados nacionales del virus, correspondieron a RNA viral que se encontraba guardado en el laboratorio de Virología Animal de FAVET, a -20 °C por más de un año. Estos aislados provenían de perros domésticos de Santiago de Chile y fueron confirmados como positivos por una RT-PCR previa basada en el gen de la hemaglutinina (Jara, 2011; Salas, 2013).

Controles negativos. Se utilizó sangre con anticoagulante de dos animales no infectados, de un perro adulto sin signos clínicos de la enfermedad, sin antecedentes de riesgo y sin vacunación y de un perro adulto sin signos clínicos de la enfermedad y sin antecedentes de riesgo, pero con calendario de vacunación al día (vacunado por última vez hace diez meses).

2.- Muestras sospechosas de DC

Una vez confirmado el funcionamiento del método con los controles, éste fue probado con muestras de campo nacionales, donde se analizaron once muestras de sangre periférica con anticoagulante (2 mL), provenientes de perros que presentaron signos nerviosos compatibles con DC y que en algunos casos se presentaron positivos a la prueba de ELISA

específica para VDC, con títulos de anticuerpos IgM $\geq 1:80$. Estas muestras fueron recolectadas de clínicas veterinarias de Santiago de Chile, mantenidas en refrigeración a 4 °C y procesadas en un tiempo menor a dos semanas. Además fueron clasificadas según: raza, sexo, edad, estado de vacunación contra VDC y títulos de anticuerpos IgM anti-VDC (Cuadro 1).

Canino N°	Raza	Sexo	Edad	Vacunación contra VDC	Títulos IgM
1	Poodle	Macho	6 años	-	-
2	Mestizo	Hembra	2 años	Sí	1:40
3	Mestizo	Macho	11 meses	No	1:80
4	Bull Terrier	Hembra	2 años	Sí	1:80
5	Mestizo	Hembra	1 año	Si	1:80
6	Mestizo	Hembra	3 años	No	1:40
7	Mestizo	Macho	3,5 años	No	-
8	Bóxer	Macho	2 años	-	1:40
9	Mestizo	Hembra	9 meses	No	1:80
10	Mestizo	Hembra	1,5 años	No	1:20
11	Mestizo	Macho	1 año	Sí	1:80

Cuadro 1: Clasificación de muestras de sangre periférica provenientes de perros con signos nerviosos sospechosos de DC, según: raza, sexo, edad, estado de vacunación contra VDC y títulos de anticuerpos IgM anti-VDC.

3.- Obtención de la capa flogística desde las muestras de sangre sospechosas

En las muestras de sangre con anticoagulante, de los controles negativos y de los animales sospechosos de DC, se utilizó la preparación “Histopaque®-1077” de Sigma-Aldrich® según instrucción del fabricante, para el aislamiento de linfocitos y otras células mononucleares, que son el blanco de la infección por VDC, por lo que se obtuvo una mayor concentración de RNA viral en las muestras donde se encontraba el virus. Para esto, se colocaron 2 mL de Histopaque®-1077 en tubos de centrifuga, agregándoles sobre esta solución, 2 mL de sangre con anticoagulante, para luego centrifugar a 400xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se transfirió con cuidado la banda mononuclear (interfaz opaca) con una pipeta de Pasteur, a un tubo de centrifuga limpio, se lavó con 10 mL de solución salina, se agitó y centrifugó a 250xg durante 10 minutos, para luego aspirar

el sobrenadante y desecharlo. Finalmente, las células mononucleares se resuspendieron en Trizol y se procedió a extraer el RNA.

4.- Extracción de RNA viral mediante kit “Trizol LS” de Invitrogen®

Para la extracción del RNA total de la muestra, se agregaron 750 µL de reactivo Trizol a las células sanguíneas mononucleares, obtenidas según se describió anteriormente y a 250 µL de los controles positivos vacunales (sangre contaminada con vacuna), incubando durante cinco minutos a temperatura ambiente. Luego, a cada tubo se le agregaron 200 µL de cloroformo, se mezclaron enérgicamente por quince segundos y se incubaron a temperatura ambiente por cinco minutos. Enseguida, se centrifugaron a 7000xg por quince minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Para la precipitación del RNA, se agregaron 0.5 mL de isopropanol, se dejaron diez minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 7000xg durante diez minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavaron tres veces con etanol 75% (1 mL), se agitaron quince segundos en vortex y se centrifugaron a 2000xg durante cinco minutos. Para la resuspensión del RNA se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado de RNA al vacío durante cinco minutos y se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. Para finalizar, el RNA fue incubado a 55-60 °C por diez minutos y mantenido a -20 °C para su uso posterior.

5.- RT-PCR

Se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo con temperaturas, tiempos y ciclos adecuados para cada etapa.

Partidores. Los partidores para el RT-PCR fueron enviados a sintetizar a la empresa Bioscan®, siendo sus secuencias localizadas en una región muy conservada del gen de la nucleocápside, y correspondieron a P1: 5' - ACAGGATTGCTGAGGACCTAT - 3' (nucleótido 769 - 789) y a P2: 5' - CAAGATAACCATGTACGGTGC - 3' (nucleótido 1055 - 1035). Estos partidores permitieron amplificar un fragmento de DNA de alrededor de 290 pares de bases (pb) (6).

Reacción RT-PCR. Ésta se realizó utilizando el kit “*SuperScript™ one step RT-PCR with platinum Taq*” (Invitrogen®) según instrucción del fabricante. La reacción en el termociclador comenzó con la síntesis de DNA complementario y una pre-desnaturalización realizada en un ciclo (45 °C durante treinta minutos y luego dos minutos

a 94 °C). Después se llevó a cabo la amplificación por PCR en cuarenta ciclos, la que consistió en una desnaturalización (94 °C durante un minuto), alineación de los partidores (60 °C por dos minutos), elongación (72 °C por dos minutos), y una extensión final en un ciclo (72 °C durante diez minutos) (6).

6.- Detección del fragmento de DNA sintetizado en la RT-PCR

Los productos del RT-PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel agarosa 2% en tampón Tris-HCl (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) y comparación de recorrido frente a un estándar de tamaño molecular: *Hyperladder IV* (Bioline®). El producto del PCR se mezcló con un producto comercial de carga (Fermentas®) y a continuación se realizó la electroforesis a 90 V por cuarenta y cinco minutos. Después de la electroforesis el gel fue incubado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante treinta minutos, luego fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y posteriormente fue fotografiado.

7.- Secuenciación de fragmentos amplificados

Los fragmentos de DNA obtenidos desde dos muestras positivas se enviaron a secuenciar, al Centro de Secuenciación de Genytec Ltda.

8.- Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de DNA

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa *online* gratuito ClustalW 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), obteniendo una secuencia de consenso para cada muestra utilizada. Además, las secuencias consenso fueron ingresadas al programa informático de alineamiento de secuencias BLAST 2.2.28 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificar el origen de los fragmentos de DNA obtenidos en la RT-PCR.

9.- Análisis de resultados

Se consideraron positivas aquellas muestras que luego del RT-PCR sintetizaron un fragmento de DNA de aproximadamente 290 pb y que luego del análisis con el programa BLAST su identidad nucleotídica correspondió a VDC.

RESULTADOS

Implementación del ensayo RT-PCR del gen de la proteína de la nucleocápside del VDC

Una vez establecido el protocolo de la RT-PCR del gen de la proteína de la nucleocápside del VDC, se procedió a probar el funcionamiento del método con los controles positivos y negativos, para posteriormente analizar las muestras de campo sospechosas de DC.

a.- Controles.

Se procesaron tres controles positivos provenientes de vacunas comerciales, diez controles positivos correspondientes a RNA del VDC (aislados nacionales) y dos controles negativos procedentes de perros no infectados. Todos estos controles fueron sometidos a la RT-PCR del gen de la nucleocápside del VDC y luego de la visualización de los productos, todos los controles positivos generaron bandas intensas de alrededor de 290 pb y en el caso de los controles negativos, éstos no presentaron bandas visibles (Figura 1).

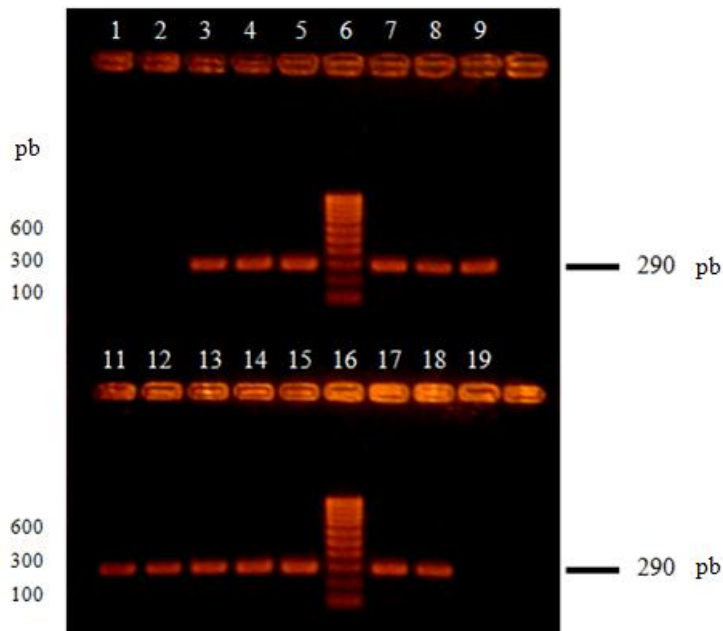


Figura 1: Visualización productos amplificados por RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y posterior incubación en bromuro de etidio. Los carriles 1 y 2 corresponden a los controles negativos, perro no infectado vacunado y sin vacunación respectivamente. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a los controles positivos vacunales, sangre de control negativo sin vacunación contaminada con vacuna cepa Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill respectivamente. Los carriles 6 y 16 corresponden al marcador de tamaño molecular (100 - 1000 pb). Los carriles 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 18 corresponden a los controles positivos de RNA viral provenientes de aislados nacionales a VDC.

b.- Muestras sospechosas de DC

Se recolectaron once muestras de sangre periférica de perros con signos nerviosos concordantes con DC y que en algunos casos se presentaron positivos a la prueba de ELISA específica para VDC (IgM) (Cuadro 1).

Todas estas muestras fueron sometidas a la RT-PCR del gen de la nucleocápside del VDC y luego de la visualización de los productos, diez muestras (canino N°1 al N°10, Cuadro 1) presentaron bandas de alrededor de 290 pb, correspondientes al fragmento de DNA esperado. Al contrario, la muestra proveniente del canino N°11 no generó bandas visibles (Figura 2).

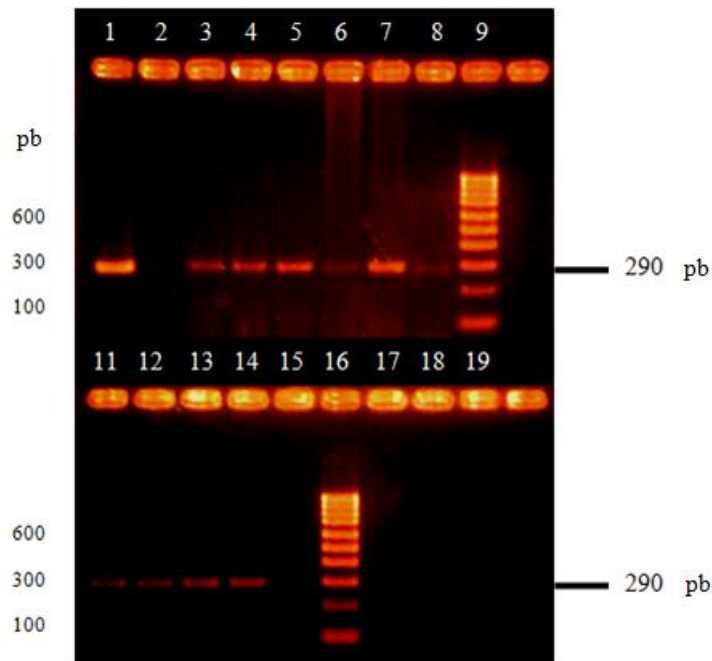


Figura 2: Visualización de productos amplificados por RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y posterior incubación en bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al control positivo vacunal, cepa Onderstepoort. El carril 2 corresponde al control negativo, perro no infectado sin vacunación. El carril 9 y 16 corresponden al marcador de tamaño molecular (100 - 1000 pb). Los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 y 14 corresponden a las muestras de sangre de los perros N°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente. El carril 15 corresponde al perro N°11 (Ver Cuadro 1).

c.- Secuenciación de fragmentos amplificados y análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA provenientes de dos muestras consideradas positivas (canino N°1 y canino N°3, Cuadro 1), fueron enviados a secuenciar por triplicado al Centro de Secuenciación de Genytec Ltda, obteniéndose cinco secuencias para cada muestra (Anexo 1). El criterio de selección de estas muestras se basó en las edades de los animales, donde se eligió el canino N°1, de seis años, que es la edad donde se presentaría con mayor frecuencia una encefalitis crónica debido a la infección por VDC, la cual podría estar relacionada con mayores variaciones nucleotídicas de acuerdo a Frisk *et al.* (1999). Asimismo se eligió el canino N°3, de once meses, que es la edad en la que generalmente se encuentran más animales infectados por VDC (menores de un año).

Luego las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW, obteniéndose una secuencia de consenso para cada muestra utilizada: del canino N°1 se obtuvo la secuencia CDV/CMC1 y del canino N°3 se obtuvo la secuencia CDV/CMC2 (Anexo 2).

A continuación, las secuencias consenso fueron ingresadas al programa BLAST, para identificar el origen de los fragmentos de DNA obtenidos en la RT-PCR, lo que reveló que la secuencia CDV/CMC1 presentó un porcentaje de identidad nucleotídica del 95% y la secuencia CDV/CMC2 del 94%, respecto a los primeros cien resultados correspondientes a VDC, y que en el caso de ambas secuencias, éstas correspondieron a VDC (Anexo 3).

Además según el análisis de las secuencias, la secuencia CDV/CMC1 y CDV/CMC2 mostraron un porcentaje de identidad nucleotídica de 98/97; 97/95 y 96/95%, respecto a las cepas vacunales Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill respectivamente (Anexo 4).

Por otra parte las secuencias CDV/CMC1 y CDV/CMC2 fueron comparadas mediante el programa BLAST con otras secuencias del gen N del VDC, representantes de tres linajes del virus (América 1, América 2 y Asia 1), de acuerdo a la clasificación de Gámiz *et al.* (2011). La secuencia CDV/CMC1 presentó un porcentaje de identidad nucleotídica de alrededor de un 97, 95 y 94% en relación a los linajes América 1, Asia 1 y América 2 respectivamente. La secuencia CDV/CMC2 presentó un porcentaje de identidad nucleotídica de alrededor de un 96, 94 y 93% en relación a los linajes América 1, Asia 1 y América 2 respectivamente (Anexo 5).

Sumado a lo anterior, las secuencias consenso fueron alineadas con el programa BLAST, encontrándose un porcentaje de identidad nucleotídica del 95% entre ellas (Anexo 6).

DISCUSIÓN

El DC, es una enfermedad de distribución mundial, viral y altamente contagiosa, que afecta a una amplia gama de carnívoros terrestres y algunos mamíferos marinos, los cuales han tenido un aumento progresivo en los últimos años, infectándose incluso animales con sus planes de vacunación al día. Es debido a este aumento de hospederos, que es trascendental un diagnóstico certero de la enfermedad causada por el VDC, para limitar la diseminación del mismo a otros animales y para dar un tratamiento oportuno a los enfermos.

Si bien el diagnóstico de DC se basa principalmente en los signos clínicos del paciente, en ciertas ocasiones, es difícil llegar a un diagnóstico final por esta vía, ya que los principales signos respiratorios y digestivos son comunes a otras enfermedades que afectan a los caninos y en el caso de los signos clínicos más específicos del DC, como signos nerviosos, éstos ocurren más comúnmente en las etapas posteriores de la infección, después de que ésta se ha hecho más generalizada. Asimismo, las distintas presentaciones clínicas del DC varían de un animal a otro, haciendo más complejo el diagnóstico final (Appel y Summers, 1999; Shin *et al.*, 2004).

Si bien existen variadas técnicas para ayudar al diagnóstico del DC, como por ejemplo, el aislamiento del virus, la inmunofluorescencia y la prueba de ELISA, la mayoría de éstos métodos son laboriosos, consumen mucho tiempo y pueden dar resultados falsos, por lo cual no son convenientes para el diagnóstico *ante-mortem* definitivo de la enfermedad.

Por esta razón, es necesario un método sensible, específico y rápido para descubrir una pequeña cantidad del virus tempranamente en la infección, lo que gracias al desarrollo de técnicas biológicas moleculares como la RT-PCR puede ser posible, donde se requiere una secuencia blanco bien conservada entre diferentes cepas del VDC, para evitar desajustes de los partidores y la posterior falla al amplificar la misma.

En base a lo anterior, en este trabajo se implementó un método diagnóstico para VDC mediante la RT-PCR, basado en la detección del gen de la proteína de la nucleocápside, una región altamente conservada del genoma VDC, lo que hace que este gen sea un buen blanco

para la detección molecular de este virus. De hecho, varios autores han revelado la idoneidad de los métodos de biología molecular basados en el gen de la proteína de la nucleocápside para la detección del VDC (Frisk *et al.*, 1999; Calderón *et al.*, 2007; Castilho *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2007; Gámiz *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2004). Adicionalmente, los partidores utilizados en este estudio, se encuentran localizados en la región más conservada del gen de la proteína de la nucleocápside, la zona central, lo cual aumentaría la sensibilidad del método (Frisk *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2007)

Aunque en nuestra facultad se han realizado dos memorias de título fundamentadas en la RT-PCR del VDC (Jara, 2011; Salas, 2013), éstas se basaron en el gen de la hemaglutinina, el cual posee la mayor variación antigénica y genética entre los genes del VDC, presentando alrededor de un 10% de variabilidad entre diferentes cepas de VDC, lo cual no lo hace el gen más adecuado para el diagnóstico del virus (Gallo *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008).

En el presente estudio se confirmaron las observaciones anteriores de la utilidad de RT-PCR del gen de la proteína de la nucleocápside del VDC, encontrándose el RNA del virus en cerca del 91% (10/11) de las muestras de campo sospechosas de DC (Figura 2). Este resultado sugiere que el protocolo utilizado en esta memoria de título, desde la obtención de la capa flogística hasta la visualización de los productos amplificados, podría ser altamente sensible. Al mismo tiempo, este método sería más sensible que los protocolos implementados en los trabajos anteriores, ya que Salas (2013), sólo encontró el RNA viral en el 7% (3/42) de las muestras analizadas que provenían de perros sospechosos de DC y en el caso de Jara (2011), éste encontró el RNA del virus en el 83% (5/6) de las muestras analizadas, que habían sido confirmadas anteriormente como positivas por otra RT-PCR, sin embargo en veinte muestras de campo de perros sospechosos de DC, no encontró el RNA viral (Jara, 2011). No obstante, para corroborar la sensibilidad del método implementado, se requieren estudios adicionales.

La especificidad del método fue corroborada con la amplificación del fragmento esperado en el 100% (10/10) de los controles positivos y en la no amplificación del fragmento esperado en los controles negativos (Figura 1).

En cuanto a los controles negativos, es importante destacar que uno de los animales usados para estos controles, presentaba su calendario de vacunación al día y había sido vacunado por última vez hace diez meses, lo cual apoya las observaciones preliminares de que una vacunación anterior no causa resultados falsos – positivos (Frisk *et al.*, 1999).

Por otra parte, el VDC puede permanecer activo indefinidamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido) o liofilizado y sólo se mantiene activo por alrededor de un mes a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pérez *et al.*, 1993), sin embargo en los controles positivos correspondientes a RNA del VDC (proveniente desde aislados nacionales), es importante destacar que este RNA había sido guardado por más de un año a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual no es la temperatura ideal para mantener la integridad y no degradación del mismo, pero a pesar de esto, la estabilidad del RNA del virus no se vio afectada.

En cuanto al tipo de muestra elegida para las muestras de campo, se escogió sangre con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético “EDTA”), debido a que es una de las más conveniente como substrato para la RT-PCR, ya que es una muestra fácil de obtener, mantiene la morfología celular por más tiempo impidiendo que el RNA viral sea degradado por RNAsas endógenas al salir de la célula y además la cantidad de EDTA presente en los tubos para la obtención de sangre, no inhibiría el resultado de la RT-PCR (Khosravinia y Ramesha, 2007). No obstante, también se han visto resultados similares con muestras de suero y orina, aumentando aun más la sensibilidad de la detección si se utiliza más de una para el diagnóstico de la enfermedad (Frisk *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2004).

Hasta ahora, la confirmación de la infección de VDC en perros vivos no era útil, principalmente debido al bajo nivel de sensibilidad de los métodos disponibles, como por ejemplo, la prueba de ELISA, donde el hallazgo de anticuerpos neutralizantes en general no guarda correlación con los resultados de la RT-PCR (Frisk *et al.*, 1999), tal como se dio en este estudio, donde algunos animales positivos a la infección por VDC presentaban títulos de anticuerpos inferiores a los considerados positivos ($<1:80$), lo que podría indicar el papel no contribuyente de los títulos de anticuerpos neutralizantes para el diagnóstico etiológico de la enfermedad.

La muestra de campo sospechosa de DC que resultó negativa después de ser analizada por el método propuesto (canino N°11, Cuadro 1), pudo deberse a la ausencia de RNA viral, ya

sea porque el virus no se encontraba en sangre, pudiendo estar localizado en otros epitelios del organismo o porque la muestra fue mal conservada o mal procesada.

Si bien la enfermedad DC es menos frecuente en países desarrollados debido a la inmunización, en años recientes, el virus que la produce ha surgido como un patógeno significativo de poblaciones de animales vacunados, y en el caso de este estudio, se muestra la presencia de algunos animales enfermos de DC, que a lo menos fueron vacunados una vez contra el virus, lo cual plantea la hipótesis de la falla en la inmunización de la vacuna, lo que podría estar dado por planes de vacunación incorrectos o por variaciones genéticas del virus (Castilho *et al.*, 2007), sin embargo para dar respuesta a estas presunciones es necesaria la realización de otros estudios sobre el tema.

Luego de obtener las secuencias de dos de las muestras que amplificaron un fragmento de aproximadamente 290 pb y definir la secuencia de consenso para cada una de ellas (Anexo 2), se utilizó el programa BLAST, donde se obtuvo que ambas secuencias presentaron un porcentaje de identidad nucleotídica mayor al 94% respecto a los primeros cien resultados correspondientes a VDC y que en ambos casos los fragmentos amplificados pertenecían a este virus, corroborándose la especificidad de método implementado.

Al alinear las secuencias consenso (CDV/CMC1 y CDV/CMC2) mediante el programa BLAST, se encontró un porcentaje de identidad nucleotídica del 95% entre ellas, por lo cual no habrían mayores variaciones entre ambas secuencias (Anexo 6).

Tanto la secuencia CDV/CMC1 como la secuencia CDV/CMC2, mostraron mayor homología a la cepa Onderstepoort del VDC (98/97% respectivamente) (Anexo 4), similar a los valores encontrados por Castilho *et al.* (2007).

A pesar que los fragmentos amplificados se encuentran en una zona altamente conservada del genoma VDC (gen N), se encontró una variación de las secuencias consenso respecto a la cepa Onderstepoort de alrededor del 2 – 3%. La posibilidad de que estas substituciones nucleotídicas pudieran tener un impacto luego de la traducción viral, tiene que ser justificada por estudios adicionales. Sin embargo en el caso de la secuencia CDV1/CMC1 se presenta una sustitución de un codón respecto a la cepa Onderstepoort (GGG por CCC, posición 1026 al 1028 de la cepa Onderstepoort, Anexo 4), lo cual podría ocasionar un cambio aminoacídico pudiendo modificar la estructura de la proteína. Asimismo en 1998,

Yoshida *et al.* encontraron que aislados de VDC en Japón tenían un grupo de sustituciones nucleotídicas que los distinguieron de la cepa de laboratorio Onderstepoort, pero que estas sustituciones de secuencia no tenían correlación con diferencias en la patología de la enfermedad (Yoshida *et al.*, 1998).

Según el análisis genómico de las secuencias CDV/CMC1 y CDV/CMC2, donde éstas fueron comparadas con otras secuencias del gen N del VDC (representantes de tres linajes del virus), ambas secuencias presentaron mayor similitud según el porcentaje de identidad nucleotídica, al linaje América 1 (Anexo 5).

La técnica implementada, permitiría el aislamiento temprano de los animales infectados y la instauración de un tratamiento adecuado. Además en el caso de animales silvestres, el diagnóstico rápido y específico que otorga este método, podría ayudar a la conservación de especies protegidas, las cuales se han visto en riesgo debido al aumento dramático de hospederos de VDC acontecido en los últimos años.

CONCLUSIONES

El sistema implementado, representa un método diagnóstico *ante-mortem* rápido y específico de la enfermedad Distemper Canino, resultando ser eficaz para la detección del virus.

La estabilidad del RNA del Virus Distemper Canino, no fue alterada al ser mantenido por más de un año a -20 °C.

Según el análisis genómico de las secuencias CDV/CMC1 y CDV/CMC2, ambas mostraron mayor similitud a la cepa Onderstepoort del Virus Distemper Canino y por otro lado, ambas secuencias mostraron mayor similitud al linaje América 1 del Virus Distemper Canino.

En base a los resultados de este estudio, el método implementado puede colaborar con la prevención y el control del aumento de Distemper Canino, ya que éste otorga un diagnóstico rápido y específico para la identificación del virus responsable, lo cual podría ayudar a mejorar la salud de la población canina, así como la de otros animales que son susceptibles a la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- **APPEL, M.; SUMMERS, J.** 1999. Distemper canino: estado actual. Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. 5p.
- **BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W.** 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine Distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127: 1-18.
- **BERRÍOS, P.; DURÁN, C.** 2005. Principales enfermedades virales de los caninos. Situación en Chile. *Monografías Electrónicas de Patología Veterinaria* 2: 68-93.
- **CALDERÓN, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J.** 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine Distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology* 125: 341-349.
- **CASTILHO, J.; BRANDÃO, P.; CARNIELI, P.; OLIVEIRA, R.; MACEDO, C.; PEIXOTO, Z.; CARRIERI, M.; KOTAIT, I.** 2007. Molecular analysis of the N gene of canine Distemper virus in dogs in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59: 654-659.
- **CERDA, L.; MATHIEU, C.; QUINTEROS, G.** 1994. Primer aislamiento de Virus Distemper Canino en Chile. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México.
- **FRISK, A.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W.** 1999. Detection of canine Distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with Distemper. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3634–3643.
- **GALLO, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J.** 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine Distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology* 125: 341–349.
- **GÁMIZ, C.; MARTELLA, V.; ULLOA, R.; FAJARDO, R.; QUIJANO, I.; MARTÍNEZ, S.** 2011. Identification of a new genotype of canine Distemper virus circulating in America. *Veterinary Research Communications* 35: 381–390.
- **JARA, C.; MATUS, P.; MOREIRA, R.** 2007. Distemper Canino en Isla Robinson Crusoe (Archipiélago Juan Fernández, V Región): antecedentes de un brote epidémico. *Boletín Veterinario Oficial. SAG, Chile* 8: 1-19.
- **JARA, P.** 2011. Detección del gen de la hemoaglutinina del Virus Distemper Canino mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.

- **KEAWCHAROEN, J.; THEAMBOONLERSC, A.; JANTARADSAMEEC, P.; RUNGSIPIPATB, A.; POOVORAWANC, Y.; ORAVEERAKULA, K.** 2005. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine Distemper virus isolates in Thailand. *Veterinary Microbiology* 105: 137–142.
- **KHOSRAVINIA, H; RAMESHA, K.** 2007. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology* 6 (3): 184-187.
- **LARSON, L.; SCHULTZ, R.** 2006. Effect of vaccination with recombinant canine Distemper virus vaccine immediately before exposure under shelter-like conditions. *Vet Ther* 7: 113-118.
- **MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine Distemper virus. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 38: 787–797.
- **MEE, A.; DIXON, J.; HOYLAND, J.; DAVIES, M.; SELBY, P.; MAWER, E.** 1998. Detection of canine Distemper virus in 100% of Paget’s disease samples by *in situ*-reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Bone* 23: 171-175.
- **MOREIRA, R.; STUTZIN, M.** 2005. Estudio de la mortalidad de zorros en la IV Región. *Boletín Veterinario Oficial. SAG, Chile* 3: 1-8.
- **PÉREZ, S.; ITURBE, R.; SALDÍVAR, E.** 1993. Caracterización del virus del Distemper (moquillo canino) en cultivos celulares, aislado de animales clínicamente enfermos. *Veterinaria México* 24 (1): 15-19.
- **SALAS, V.** 2013. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del Virus Distemper Canino en perros infectados naturalmente en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 23 p.
- **SHIN, Y.; CHO, K.; CHO, H.; KANG, S.; KIM, H.; KIM, Y.; PARK, H.; PARK, N.** 2004. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine Distemper virus in clinical samples. *Australian Veterinary Journal* 82: 83-86.
- **SIDHU, M.; HUSAR, W.; COOK, S.; DOWLING, P.; UDEM, S.** 1993. Canine Distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology* 193: 66-72.
- **SUMMERS, B.; APPEL, M.** 1994. Aspects of canine Distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 20: 525-534.
- **VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R.** 2001. The hemagglutinin of canine Distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology* 75 (14): 6418–6427.
- **YOSHIDA, E.; IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T.** 1998. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine Distemper in Japan. *Veterinary Microbiology* 59: 237–244.

ANEXO 1

Alineamiento de las secuencias obtenidas desde Genytec Ltda, para la muestra proveniente del canino N°1, mediante el programa ClustalW 2.1.

CA1	-CAGGATTGCTGAGGACCTTTCTTTGAGGCGACTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCT	59
CA2	--AGGATTGCTGAGGACCTTTCTTTGAGGCGACTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCA	58
CA5	ACAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGCTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCA	60
CA3	TCAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCCATTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATTT	60
CA4	TCAGGAT-GCTGAGGACCTATCTTTGAGGCCATTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATTT	59

CA1	TATGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGCAATGATTTGTGATATAGATAACTACA	119
CA2	TTAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGCAATGATTTGTGATATAGATAACTACA	118
CA5	ATTGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTCAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA	120
CA3	ATTGATCCCTAGGGAACAAGCCTAGAATTGCCGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA	120
CA4	AATGATCCCTAGGGAACAAGCCTAGAATTGCCGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA	119

CA1	TTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACCATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT	179
CA2	TTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATC-TAACCATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT	177
CA5	TTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACCATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT	180
CA3	TTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTACCTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT	180
CA4	TTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTACCTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT	179
	***** ** *	
CA1	ATCCGTTTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAACTAACAACCTATTGAATCCCTCATGA	239
CA2	ATCCGGCTCTTGGGTTGTTTGAAGTTTTCGGGAGAACTAACAACCTATTGAATCCCTCATGA	237
CA5	ATCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAACTAACAACCTATTGAATCCCTCATGA	240
CA3	ATCCGGCTCTTGGGTTGCATTTGTTTTCGGGAGAACTAACAACCTATTGAATCCCTCATGA	240
CA4	ATCCGGCTCTTGGGTTGCGGGAGTTTTCGGGAGAACTAACAACCTATTGAATCCCTCATGA	239

CA1	TGCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACACGGTTATCT--	284
CA2	TGCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACACGGTTATCTT-	283
CA5	TGCTTTATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACCTGGTTATCCC-	286
CA3	TGCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACATGGTTATC---	284
CA4	TGCTTTATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACATGGTTATCAAA	286
	**** *	

Alineamiento de las secuencias obtenidas desde Genytec Ltda, para la muestra proveniente del canino N°3, mediante el programa ClustalW 2.1.

CB1	TTCAGGATTGCTATGGCCCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATC	60
CB2	--CCAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATCCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATC	59
CB3	--CAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTGATCTTGGACATC	58
CB4	-TAAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTTGACATC	59
CB5	-CAAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTTGACATC	59

```

CB1 AAACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC 120
CB2 AAACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC 119
CB3 AAACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC 118
CB4 ACACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC 119
CB5 ACACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC 119
* *****

CB1 ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT 180
CB2 ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT 179
CB3 ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT 178
CB4 ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT 179
CB5 ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGT 179
*****

CB1 TTCCGGCCCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAATTTCTATTGAATCCCTCATGA 240
CB2 TTCTGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGACTTAATTTCTATTGAATCCCTCATGA 239
CB3 TTCCGGCTCTAGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAACACTATTGAATCCCTCATGA 238
CB4 TTCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAACCTTCTATTGAATCCCTCATGA 239
CB5 TTCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAACCTTCTATTGAATCCCTCATGA 239
*** ** * ** *****

CB1 TGCTATATCATCAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTAT---- 283
CB2 TGCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTATCTT- 285
CB3 TGCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTATCGGG 285
CB4 TGCTATATCATAAGATGGATCAAACAGCACCGTACATGGTTATTC-- 284
CB5 TGCTATATCATAAGATGGGTCAAACAGCACCGTACATGGTTATTG-- 284
***** * *****

```

ANEXO 2

Secuencia consenso para muestra de canino N°1, CDV/CMC1

TCAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCTATTGA
TCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACATTGTGGAAGC
TGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTATCCGGCTCTTGGGT
TGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAACAACCTATTGAATCCCTCATGATGCTATATCAACAGATCCCT
GAAACAGCACCGTACATGGTTATCTCA

Secuencia consenso para muestra de canino N°3, CDV/CMC2

TCCAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAAACG
ATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACATGTGGAAGC
TGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTTTCCGGCTCTTGGGT
TGCATGAGTTTTCGGGAGAATTAACCTTCTATTGAATCCCTCATGATGCTATATCATAAGATGGGT
GAAACAGCACCGTACATGGTTATTGTG

ANEXO 3

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC1 con respecto a secuencias del VDC de GenBank®, obtenidos por programa BLAST 2.2.28.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome	492	492	98%	8e-136	98%	AF305419.1
Canine distemper virus, complete genome	492	492	98%	8e-136	98%	AF014953.1
Canine distemper virus clone PCR235.D2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	486	486	98%	4e-134	98%	EU563089.1
Canine distemper virus nucleoprotein (N) gene, partial cds	486	486	98%	4e-134	98%	AY738625.1
Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome	486	486	98%	4e-134	98%	AF378705.1
Canine distemper virus (CDV) mRNA for nucleocapsid protein fragment	486	486	98%	4e-134	98%	X02000.1
Canine distemper virus clone PCR227.1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	481	481	98%	2e-132	97%	EU563093.1
Canine distemper virus strain Shuskiv, complete genome	475	475	98%	8e-131	97%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome	475	475	98%	8e-131	97%	HM046486.1
Canine distemper virus strain Lederle nucleoprotein gene, complete cds	475	475	98%	8e-131	97%	EF418783.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC-VR-1587, complete genome	470	470	98%	4e-129	96%	JN896987.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 nucleoprotein gene, complete cds	470	470	98%	4e-129	96%	HQ868110.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome	470	470	98%	4e-129	96%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate CDV3-C nucleocapsid protein (C) mRNA, partial cds	470	470	98%	4e-129	96%	FJ977579.1
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	470	470	98%	4e-129	96%	EU726268.1
Canine distemper virus strain CDV3 nucleocapsid protein (NP) gene, complete cds	470	470	98%	4e-129	96%	EF375619.1
Canine distemper virus isolate Hebei, complete genome	455	455	98%	1e-124	96%	KC427278.1
Canine distemper virus strain LHL06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	455	455	98%	1e-124	96%	EU715247.1
Canine distemper virus strain GZ0805 nucleocapsid (N) mRNA, partial cds	449	449	98%	5e-123	95%	KC867070.1
Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: Ac96I-VDS	449	449	98%	5e-123	95%	AB753775.1
Canine distemper virus strain PS, complete genome	449	449	98%	5e-123	95%	JN896331.1
Canine distemper virus isolate NU01 nucleocapsid protein gene, complete cds	449	449	98%	5e-123	95%	JF965338.1
Canine distemper virus isolate GS0904-8 nucleocapsid protein N gene, complete cds	449	449	98%	5e-123	95%	HM623892.1
Canine distemper virus isolate GS0903-2 nucleocapsid protein N gene, complete cds	449	449	98%	5e-123	95%	HM596310.1
Canine distemper virus strain HSN07-R2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	449	449	98%	5e-123	95%	EU716318.1
Canine distemper virus isolate HD nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	449	449	98%	5e-123	95%	EU409838.1
Canine distemper virus isolate ZD01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	449	449	98%	5e-123	95%	EF445050.1
Canine distemper virus strain HLJ1-06, complete genome	444	444	98%	2e-121	95%	JX681125.1
Canine distemper virus isolate GS0812-4 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	HQ850146.1
Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome	444	444	98%	2e-121	95%	HQ540293.1
Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome	444	444	98%	2e-121	95%	HQ540292.1
Canine distemper virus isolate XJ-5 nucleocapsid protein N gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	HM596313.1
Canine distemper virus isolate GS0901-8 nucleocapsid protein N gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	HM596308.1
Canine distemper virus isolate GS0812-1 nucleocapsid protein N gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	HM596307.1
Canine distemper virus strain SDWD06-M2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	444	444	98%	2e-121	95%	EU715246.1
Canine distemper virus strain JDAN07-R1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	444	444	98%	2e-121	95%	EU716323.1
Canine distemper virus strain LLY06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	444	444	98%	2e-121	95%	EU716316.1
Canine distemper virus strain SC01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	EF042819.1
Canine distemper virus isolate MS01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	DQ887066.1
Canine distemper virus strain TN N protein (N) mRNA, complete cds	444	444	98%	2e-121	95%	AY390348.1
Canine distemper virus isolate Pingtung nonfunctional N protein gene, complete sequence	442	442	98%	8e-121	95%	DQ435615.1
Canine distemper virus strain GZ0803 nucleocapsid protein (N) mRNA, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	KC590511.1
Canine distemper virus isolate PS-N nucleoprotein gene, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	JX276747.1
Canine distemper virus isolate GS0812-7 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	HQ850150.1
Canine distemper virus isolate GS0904-11 nucleocapsid protein N gene, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	HM623894.1
Canine distemper virus isolate GS0903-4 nucleocapsid protein N gene, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	HM596311.1
Canine distemper virus isolate GS0901-12 nucleocapsid protein N gene, complete cds	438	438	98%	1e-119	95%	HM596309.1
Canine distemper virus strain LHL06-M2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	438	438	98%	1e-119	95%	EU715248.1
Canine distemper virus strain SDWD06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	438	438	98%	1e-119	95%	EU715245.1
Canine distemper virus strain LDL05-F2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	438	438	98%	1e-119	95%	EU715244.1

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC2 con respecto a secuencias del VDC de GenBank®, obtenidos por programa BLAST 2.2.28.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome	470	470	97%	4e-129	97%	AF305419.1
Canine distemper virus, complete genome	470	470	97%	4e-129	97%	AF014953.1
Canine distemper virus clone PCR235_D2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	464	464	97%	2e-127	96%	EU563089.1
Canine distemper virus nucleoprotein (N) gene, partial cds	464	464	97%	2e-127	96%	AY738625.1
Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome	464	464	97%	2e-127	96%	AF378705.1
Canine distemper virus (CDV) mRNA for nucleocapsid protein fragment	464	464	97%	2e-127	96%	X02000.1
Canine distemper virus clone PCR227.1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	459	459	97%	8e-126	96%	EU563093.1
Canine distemper virus strain Shuskiy, complete genome	448	448	97%	2e-122	95%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome	448	448	97%	2e-122	95%	HM046486.1
Canine distemper virus isolate CDV3-C nucleocapsid protein (C) mRNA, partial cds	448	448	97%	2e-122	95%	FJ977579.1
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	448	448	97%	2e-122	95%	EU726268.1
Canine distemper virus strain Lederle nucleoprotein gene, complete cds	448	448	97%	2e-122	95%	EF418783.1
Canine distemper virus strain CDV3 nucleocapsid protein (NP) gene, complete cds	448	448	97%	2e-122	95%	EF375619.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome	442	442	97%	8e-121	95%	JN896987.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 nucleoprotein gene, complete cds	442	442	97%	8e-121	95%	HQ668110.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome	442	442	97%	8e-121	95%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate Hebel, complete genome	438	438	98%	1e-119	95%	KC427278.1
Canine distemper virus strain LHD06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	438	438	98%	1e-119	95%	EU715247.1
Canine distemper virus strain GZ0805 nucleocapsid (N) mRNA, partial cds	433	433	98%	5e-118	94%	KC667070.1
Canine distemper virus strain PS, complete genome	433	433	98%	5e-118	94%	JN896331.1
Canine distemper virus isolate NJ01 nucleocapsid protein gene, complete cds	433	433	98%	5e-118	94%	JF965338.1
Canine distemper virus isolate GS0904-8 nucleocapsid protein N gene, complete cds	433	433	98%	5e-118	94%	HM623892.1
Canine distemper virus isolate GS0903-2 nucleocapsid protein N gene, complete cds	433	433	98%	5e-118	94%	HM596310.1
Canine distemper virus strain HSN07-R2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	433	433	98%	5e-118	94%	EU716318.1
Canine distemper virus isolate HD nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	433	433	98%	5e-118	94%	EU409838.1
Canine distemper virus isolate ZD01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	433	433	98%	5e-118	94%	EF445050.1
Canine distemper virus strain HLJ1-06, complete genome	427	427	98%	2e-116	94%	JX681125.1
Canine distemper virus isolate GS0812-4 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	HQ850146.1
Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome	427	427	98%	2e-116	94%	HQ540293.1
Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome	427	427	98%	2e-116	94%	HQ540292.1
Canine distemper virus isolate XJ-5 nucleocapsid protein N gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	HM596313.1
Canine distemper virus isolate GS0901-8 nucleocapsid protein N gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	HM596308.1
Canine distemper virus isolate GS0812-1 nucleocapsid protein N gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	HM596307.1
Canine distemper virus strain SDWD06-M2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	427	427	98%	2e-116	94%	EU715246.1
Canine distemper virus strain JDAN07-R1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	427	427	98%	2e-116	94%	EU716323.1
Canine distemper virus strain LLY06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	427	427	98%	2e-116	94%	EU716316.1
Canine distemper virus strain SC01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	EF042819.1
Canine distemper virus isolate MS01 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	DQ887066.1
Canine distemper virus isolate Pingtung nonfunctional N protein gene, complete sequence	427	427	98%	2e-116	94%	DQ435615.1
Canine distemper virus strain TN N protein (N) mRNA, complete cds	427	427	98%	2e-116	94%	AY390348.1
Canine distemper virus isolate PS-N nucleoprotein gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	JX276747.1
Canine distemper virus isolate GS0812-7 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	HQ850150.1
Canine distemper virus isolate GS0904-11 nucleocapsid protein N gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	HM623894.1
Canine distemper virus isolate GS0904-7 nucleocapsid protein N gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	HM623890.1
Canine distemper virus isolate GS0903-4 nucleocapsid protein N gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	HM596311.1
Canine distemper virus isolate GS0901-12 nucleocapsid protein N gene, complete cds	422	422	98%	1e-114	94%	HM596309.1
Canine distemper virus strain LHD08-M2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	422	422	98%	1e-114	94%	EU715248.1
Canine distemper virus strain SDWD06-M1 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	422	422	98%	1e-114	94%	EU715245.1
Canine distemper virus strain LDL05-F2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds	422	422	98%	1e-114	94%	EU715244.1

ANEXO 4

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC1 respecto a las cepas vacunales Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill, según programa BLAST 2.2.28.

Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome
Sequence ID: [gb|AF305419.1|AF305419](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 770 to 1053 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
492 bits(266)	8e-136	278/284(98%)	0/284(0%)	Plus/Plus
Query 2	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCTA	61		
Sbjct 770	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA	829		
Query 62	TTGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	121		
Sbjct 830	ACGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	889		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	181		
Sbjct 890	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	949		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 950	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	1009		
Query 242	GCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCCGTACATGGTTATCT	285		
Sbjct 1010	GCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCCGTACATGGTTATCT	1053		

Canine distemper virus strain Lederle nucleoprotein gene, complete cds
Sequence ID: [gb|EF418783.1|](#) Length: 1707 Number of Matches: 1

Range 1: 678 to 961 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
475 bits(257)	8e-131	275/284(97%)	0/284(0%)	Plus/Plus
Query 2	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCTA	61		
Sbjct 678	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCACTCATTTTGGACATCAA	737		
Query 62	TTGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	121		
Sbjct 738	AAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	797		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	181		
Sbjct 798	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	857		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 858	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	917		
Query 242	GCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCCGTACATGGTTATCT	285		
Sbjct 918	GCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCCATACATGGTTATCT	961		

Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome
Sequence ID: [gb|JN896987.1|](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 770 to 1053 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
470 bits(254)	4e-129	274/284(96%)	0/284(0%)	Plus/Plus
Query 2	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCTA	61		
Sbjct 770	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCACTCATTTTGGACATCAA	829		
Query 62	TTGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	121		
Sbjct 830	AAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	889		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	181		
Sbjct 890	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	949		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 950	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACATTTGAATCCCTCATGAT	1009		
Query 242	GCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCCGTACATGGTTATCT	285		
Sbjct 1010	GCTATATCAACAAATGGGTGAAACAGCACCCATACATGGTTATCT	1053		

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC2 respecto a las cepas vacunales Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill, según programa BLAST 2.2.28.

Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome
Sequence ID: [gb|AF305419.1|AF305419](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 770 to 1051 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
470 bits(254)	4e-129	273/282(97%)	1/282(0%)	Plus/Plus
Query 3	CAGGATTGCTATGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA	62		
Sbjct 770	CAGGATTGCTGAGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA	829		
Query 63	ACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA-	121		
Sbjct 830	ACGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	889		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTT	181		
Sbjct 890	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	949		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAAGTTCTATTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 950	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAACAAGTTGAATCCCTCATGAT	1009		
Query 242	GCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCCGTACATGGTTAT	283		
Sbjct 1010	GCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCCGTACATGGTTAT	1051		

Canine distemper virus strain Lederle nucleoprotein gene, complete cds
Sequence ID: [gb|EF418783.1|](#) Length: 1707 Number of Matches: 1

Range 1: 678 to 959 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
448 bits(242)	2e-122	269/282(95%)	1/282(0%)	Plus/Plus
Query 3	CAGGATTGCTATGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA	62		
Sbjct 678	CAGGATTGCTGAGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCACTCATTITGGACATCAA	737		
Query 63	ACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA-	121		
Sbjct 738	AAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	797		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTT	181		
Sbjct 798	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	857		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAAGTTCTATTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 858	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAACAAGTTGAATCCCTCATGAT	917		
Query 242	GCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCCGTACATGGTTAT	283		
Sbjct 918	GCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCCATACATGGTTAT	959		

Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome
Sequence ID: [gb|JN896987.1|](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 770 to 1051 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
442 bits(239)	8e-121	268/282(95%)	1/282(0%)	Plus/Plus
Query 3	CAGGATTGCTATGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA	62		
Sbjct 770	CAGGATTGCTGAGGACCTAICTTTGAGGCGATTTCATGGTGGCACTCATTITGGACATCAA	829		
Query 63	ACGATCCCCAGGGAACAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA-	121		
Sbjct 830	AAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT	889		
Query 122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTT	181		
Sbjct 890	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA	949		
Query 182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAAGTTCTATTGAATCCCTCATGAT	241		
Sbjct 950	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTTCCGGGAGAATTAACAAGTTGAATCCCTCATGAT	1009		
Query 242	GCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCCGTACATGGTTAT	283		
Sbjct 1010	GCTATATCAACAAATGGGTGAAACAGCACCCATACATGGTTAT	1051		

ANEXO 5

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC1 respecto a secuencias representantes de 3 linajes del VDC, según BLAST 2.2.28.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
AF305419.1/OND	492	492	98%	5e-144	98%	10886
EF375619.1/Vac	470	470	98%	2e-137	96%	10887
FF418783.1/Lederle	475	475	98%	5e-139	97%	10888
GU138403.1/SnvderH	470	470	98%	2e-137	96%	10889
América 1						
EU715245.1	438	438	98%	6e-128	95%	10890
EU589210.1	438	438	98%	6e-128	95%	10891
EU715243.1	438	438	98%	6e-128	95%	10892
EU715248.1	438	438	98%	6e-128	95%	10893
Asia 1						
AY390348.1	444	444	98%	1e-129	95%	10894
FF042819.1	444	444	98%	1e-129	95%	10895
EF445050.1	449	449	98%	3e-131	95%	10896
EU716337.1	438	438	98%	8e-128	95%	10897
América 2						
AY649446.1	433	433	98%	3e-126	94%	10898
AF164967.1	433	433	98%	3e-126	94%	10899

Porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia CDV/CMC2 respecto a secuencias representantes de 3 linajes del VDC, según BLAST 2.2.28.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
AF305419.1/OND	470	470	97%	2e-137	97%	40170
EF375619.1/Vac	448	448	97%	1e-130	95%	40171
FF418783.1/Lederle	448	448	97%	1e-130	95%	40172
GU138403.1/SnvderH	442	442	97%	5e-129	95%	40173
América 1						
EU715245.1	420	420	97%	2e-122	94%	40174
EU589210.1	420	420	97%	2e-122	94%	40175
EU715243.1	420	420	97%	2e-122	94%	40176
EU715248.1	420	420	97%	2e-122	94%	40177
Asia 1						
AY390348.1	425	425	97%	5e-124	94%	40178
FF042819.1	425	425	97%	5e-124	94%	40179
EF445050.1	431	431	97%	1e-125	94%	40180
EU716337.1	422	422	98%	9e-123	94%	40181
América 2						
AY649446.1	414	414	97%	1e-120	93%	40182
AF164967.1	414	414	97%	1e-120	93%	40183

ANEXO 6

Alineación de secuencias consenso, CDV/CMC1 y CDV/CMC2, mediante BLAST 2.2.28.

Sequence ID: cl 55305 Length: 287 Number of Matches: 1					
Range 1: 3 to 283 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
436 bits(236)	2e-127	267/282(95%)	1/282(0%)	Plus/Plus	
Query	2	CAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTGATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCTA			61
Sbjct	3	CAGGATTGCTATGGACCTATCTTTGAGGCGATTGATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAA			62
Query	62	TTGATCCCCAGGGAACRAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACAT			121
Sbjct	63	ACGATCCCCAGGGAACRAAGCCTTGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACA-			121
Query	122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTA			181
Sbjct	122	TGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTT			181
Query	182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTCCGGAGAATTAACAACCTATTGAATCCCTCATGAT			241
Sbjct	182	TCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTCCGGAGAATTAACCTTCTATTGAATCCCTCATGAT			241
Query	242	GCTATATCAACAGATCCCTGAAACAGCACCGTACATGGTTAT		283	
Sbjct	242	GCTATATCATAAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTAT		283	