



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

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA  
DEL VIRUS DISTEMPER CANINO EN MUESTRAS DE SANGRE DE  
PERROS.**

**MOLECULAR DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS  
PHOSPHOPROTEIN GENE IN DOG BLOOD SAMPLES.**

**Fernanda Rocío Mateo Ríos**

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

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS  
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO PROYECTO FIV 121014019102010

SANTIAGO, CHILE  
2015



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

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA DEL VIRUS  
DISTEMPER CANINO EN MUESTRAS DE SANGRE DE PERROS.**

**MOLE MOLECULAR DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS  
PHOSPHOPROTEIN GENE IN DOG BLOOD SAMPLES.**

**Fernanda Rocío Mateo Ríos**

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: JOSÉ PIZARRO LUCERO  | ..... | ..... |
| PROFESOR CONSEJERO: VICTOR NEIRA RAMÍREZ | ..... | ..... |

Financiado por Proyecto FIV 121014019102010.

SANTIAGO, CHILE  
2015

## RESUMEN

El Virus Distemper Canino (VDC) es el agente causal de una grave enfermedad multisistémica de perros y otras especies del orden *Carnívora*. Distemper Canino (DC) se presenta como una enfermedad altamente contagiosa, que puede alcanzar una elevada morbilidad y mortalidad.

El amplio espectro de signos clínicos dificulta el diagnóstico clínico de la enfermedad y hace necesario la confirmación a través de exámenes de laboratorio. La detección molecular de VDC presenta ventajas en el diagnóstico de la enfermedad. En el presente trabajo se implementó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa –versión anidada- previa transcripción inversa (n-RT-PCR) para la detección del gen de la fosfoproteína viral (gen P). Como controles positivos se utilizaron RNA proveniente de cepas vacunales y de muestras positivas a otros genes de VDC mediante RT-PCR. Como controles negativos se utilizó RNA de muestras de perros sin signos clínicos de la enfermedad y como control de reactivos agua libre de nucleasas.

Posteriormente, se utilizó la técnica en 10 muestras de campo de perros con sospecha clínica de la enfermedad, detectándose el genoma viral en el 100% de las muestras analizadas, generando una banda cercana a los 430 pb, correspondiente a la secuencia blanco buscada del gen de la fosfoproteína de VDC. Los productos de amplificación se caracterizaron por su gran intensidad y nitidez, no observándose bandas de amplificación inespecíficas.

Finalmente, se realizó la secuenciación de los productos obtenidos del n-RT-PCR, obteniendo un elevado porcentaje de identidad nucleotídica respecto a las secuencias nucleotídicas del gen P almacenadas en el GenBank®. Esto permitió establecer que el n-RT-PCR implementado en esta Memoria de Título permite la detección de VDC.

La implementación de esta técnica permitirá realizar la detección *antemortem* del virus y, por lo tanto, facilitar el diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** Virus Distemper Canino, Fosfoproteína, gen P, n-RT-PCR.

## ABSTRACT

The Canine distemper virus (CDV) is the causal agent of a severe multisystem disease in dogs and other species of the order *Carnivora*. Canine Distemper is presented as a highly contagious disease, which can reach high morbidity and mortality.

The broad spectrum of clinical signs hinders clinical diagnosis of the disease and necessary confirmation by laboratory tests. The molecular detection of CDV has advantages in the disease diagnosis. In this work the nested-Polymerase Chain Reaction prior reverse transcription (n-RT-PCR) was implemented to detect gene viral phosphoprotein (P gen). RNA from vaccine strains and positive samples of CDV by RT-PCR of other genes were used as positive controls. As negative controls RNA from dog samples without clinical signs of disease were used and nuclease-free water was used as reagents control.

The technique was used in 10 field samples from dogs with clinical suspicion of the disease, the viral genome was detected in 100% of the samples analyzed, generating a DNA fragment close to 430 bp, corresponding to the amplification of the phosphoprotein gene of CDV. The amplification products were characterized by their great intensity and sharpness and no nonspecific amplification bands were observed.

Finally, the sequencing of the products obtained from the n-RT-PCR was performed, obtaining a high percentage of nucleotide identity with the nucleotide sequences stored in the P gene GenBank®. This established that the n-RT-PCR implemented in this memory, allows the detection of CDV.

Implementing this technique to perform an *antemortem* virus detection would, therefore, facilitate diagnosis and early treatment of the disease.

**KEYWORDS:** Canine Distemper Virus, phosphoprotein, P gene, n-RT-PCR

## **INTRODUCCIÓN**

El Distemper Canino es una de las enfermedades virales más importantes en cánidos silvestres y domésticos del mundo. Sin embargo, también afecta a una amplia gama de animales de diversas familias de mamíferos como *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Viverridae*, *Hyaenidae* y *Felidae*. Puede comprometer drásticamente la conservación de las especies amenazadas debido a su alta letalidad (Pardo *et al.*, 2005).

El DC es una enfermedad grave y altamente contagiosa, que afecta principalmente los sistemas respiratorio, nervioso y gastrointestinal. Los perros se contagian tanto por medio de secreciones como también por aerosoles procedentes de la exposición a exudados respiratorios y por fluidos del animal infectado que elimina al ambiente junto a las partículas virales. El período de incubación del virus es de 6 a 9 días, pero los signos se observarán después de 2 a 3 semanas de haber estado expuestos al contagio. Los perros infectados pueden excretar el virus durante un máximo de 60 a 90 días post- infección (Greene y Appel, 1998; Pardo, 2006). Los perros entre 3 y 6 meses de edad tienen una mayor prevalencia de infección con VDC, que se correlaciona con la pérdida de los anticuerpos maternos (Greene y Appel, 1998). Sin embargo, en las poblaciones susceptibles, la enfermedad afecta a los perros de todas las edades (Johnson *et al.*, 1995).

El primer evento patogénico es la replicación local del virus en tracto respiratorio alto o en el epitelio conjuntival. Después de la multiplicación en los ganglios linfáticos regionales, el virus ingresa al torrente sanguíneo transportado por linfocitos, para producir la primera viremia. El virus se propaga, como consecuencia de la viremia, a todos los órganos linfoides (bazo, timo, entre otros). En este momento de la infección, si existe buena respuesta inmunológica por parte del animal, los signos clínicos son leves y el virus no se disemina al resto del organismo. Por otra parte, si la respuesta inmune es débil o tardía, el VDC invade todo el organismo, principalmente, los epitelios intestinal, urogenital, respiratorio y piel, e inclusive sistema nervioso central (Murphy *et al.*, 1999a).

### **Presentaciones clínicas**

En perros, las presentaciones clínicas pueden variar desde cuadros sistémicos agudos a crónicos, con elevadas tasas de mortalidad. Asimismo, la gravedad de los signos clínicos

observados depende de la virulencia del virus infectante, condiciones ambientales, así como la edad del hospedador y su estado inmunológico (Greene y Appel, 1998).

El virus replica en tejidos linfáticos de las vías respiratorias y llega posteriormente a diversos órganos, incluyendo las células de las vías respiratorias inferiores y tracto gastrointestinal, los órganos linfoides, la vejiga urinaria y el sistema nervioso. Esto puede resultar en, ya sea, una infección subclínica o una presentación de cuadros de las vías respiratorias, ocular, signos gastrointestinales, neurológicos y cutáneos o lesiones, que aparecen de forma simultánea o secuencial. Signos nerviosos pueden estar presentes en la forma crónica del DC junto con otras manifestaciones, o bien, pueden presentarse signos nerviosos de forma independiente (Elia *et al.*, 2006).

Dentro de los signos sistémicos pueden verse apatía, anorexia, deshidratación, fiebre y descarga serosa oculonasal. La secreción nasal con frecuencia progresa a mucopurulenta, con tos y disnea. Los signos de sistema nervioso se observan con frecuencia entre una y tres semanas después de que los animales afectados se recuperan de la forma sistémica de VDC. Sin embargo, signos nerviosos también pueden ocurrir simultáneamente con la enfermedad sistémica o, menos comúnmente, meses después de la infección (Pardo, 2006).

### **Agente etiológico: taxonomía y características virales**

Distemper Canino fue descrito por primera vez en España en 1791 y, el virus, aislado por Henri Carré en 1905. En Chile, si bien se desconoce cuándo surgieron los primeros casos, se sabe que esta enfermedad se ha presentado desde hace años, siendo su presencia sugerida en 1994, cuando se informó el aislamiento del virus desde un cachorro clínicamente enfermo que mostraba signos respiratorios y nerviosos (Cerdeira *et al.*, 1994).

El VDC pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus*, y está estrechamente relacionado con otros morbillivirus como el virus del sarampión en humanos, el virus de la peste bovina y de la peste de pequeños rumiantes, entre otros. El VDC, además de infectar a los carnívoros terrestres de la familia *Canidae* (perros, lobos, coyotes y chacales), infecta a otros mamíferos incluyendo especies de las familias *Mustelidae* (hurón, visón y tejón), *Procyonidae* (mapache y coatí), *Ursidae* (osos), *Viverridae* (civeta y gineta), *Hyaenidae* (hiena), y *Felidae* (felinos salvajes). También

afecta a carnívoros marinos como las focas y cetáceos como el delfín (Appel, 1978; Pardo *et al.*, 2005, Pozza *et al.*, 2007).

El genoma viral está constituido por RNA no segmentado, de hebra simple y polaridad negativa, posee envoltura y un tamaño entre 150 a 300 nm de diámetro (Murphy *et al.*, 1999a; Elia, *et al.*, 2006). El genoma de VDC es de aproximadamente 15.700 nucleótidos de longitud y contiene seis genes que codifican para las proteínas del virión. La proteína de matriz (gen M, 1 kb) presenta un papel fundamental en la morfología y ensamblaje del virión. La proteína de fusión (gen F, 1,9 kb), es una glicoproteína que es esencial para mediar en la fusión entre la partícula viral y la membrana de la célula hospedadora, proporciona al virus el mecanismo necesario para pasar de una célula a otra. La hemaglutinina (gen H, 1,8 kb), es la glicoproteína responsable de la adhesión viral a la célula hospedadora. La nucleocápside (gen N, 1,5 kb) es la proteína responsable de la protección del RNA viral. La polimerasa (gen L, 6,5 kb), y fosfoproteína (gen P, 1,5 kb) son las proteínas que forman un complejo de la polimerasa funcional y son responsables de replicación del RNA vírico (Murphy *et al.*, 1999a; Elia, *et al.*, 2006).

El gen P del VDC es un gen altamente conservado del virus (Rzezutka y Mizak, 2002) y, al igual que en otros virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, es policistrónico, codifica tres proteínas distintas P, V y C (Wakasa *et al.*, 2000; Vagnozzi y Carrillo, 2006; Sugai *et al.*, 2009). La proteína P es esencial para la replicación viral, es sintetizada en exceso en las células infectadas, y muestra una tasa de renovación alta, presentando funciones transitorias durante el ensamblado de la nucleocápside y la síntesis de RNA. Por otra parte, las proteínas C y V son consideradas no esenciales para la replicación. La proteína P unida a L, integra el complejo de polimerasa encargado de la síntesis de RNA (transcripción y replicación) (Karlin, *et al.*, 2002; Vagnozzi y Carrillo, 2006).

### **Diagnóstico**

El amplio espectro de signos clínicos, dificulta el diagnóstico y hace necesario la confirmación a través de exámenes de laboratorio (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006). Debido a lo anterior, existen diversas técnicas para el diagnóstico de DC, entre estas, se encuentra el diagnóstico histológico, en el cual se revelan cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos en numerosos tejidos. Los métodos serológicos, tales como el

inmunoenzimático (ELISA) y ensayos de seroneutralización, buscan la detección de anticuerpos específicos para VDC. En el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) es posible observar, un aumento de los títulos de inmunoglobulina anti-VDC (IgG e IgM) que son altamente sugestivos de infección por el VDC, además, de un incremento de concentración de proteína ( $> 25$  mg / dL) y recuento de células (10 células / mL con un predominio de linfocitos) que se observan en formas inflamatorias de VDC, como en una encefalomiелitis (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006). Todas estas técnicas tienen por desventaja el diagnóstico de falsos positivos, si se realizan post inmunización con vacuna. Mientras que el diagnóstico de VDC por aislamiento del virus, a pesar de ser un diagnóstico definitivo, es muy lento de realizar (Elia *et al.*, 2006).

En resumen, ninguno de los métodos mencionados anteriormente cumple los requisitos de ser un ensayo de detección rápido, sensible y específico para VDC (Frisk *et al.*, 1999).

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR fue desarrollada en los años ochenta, desde entonces, ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio de una amplia gama de genes. Se ha utilizado en múltiples áreas donde el inmenso potencial de la PCR para amplificar mínimas cantidades de DNA (o RNA) ha sido particularmente atractivo (Murphy *et al.*, 1999b). Recientemente, se ha aplicado con éxito para la detección de ácido nucleico, ya que es un método altamente específico, rápido y sensible para el diagnóstico *antemortem* de la infección por VDC en los perros, independientemente de la presentación de VDC, de la respuesta inmune humoral, y distribución del antígeno viral (Frisk *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2005; López, 2012).

Generalmente, para la detección de VDC por RT-PCR se utilizan ,como principales blancos para la amplificación, regiones conservadas dentro del genoma viral, como es el gen de la proteína de la nucleocápside (gen N) (Frisk *et al.*, 1999; López, 2012). Sin embargo, en nuestra Facultad, con anterioridad, se han desarrollado dos memorias de títulos basadas en la utilización de RT-PCR de VDC (Jara, 2011; Salas, 2013), enfocadas en el gen de la hemaglutinina (gen H), el cual presenta mayor variación antigénica y genética entre los genes de VDC. Por otra parte, Muñoz (2013) desarrolló una RT-PCR basada en la



detección del gen de la proteína de la nucleocápside, obteniendo mejoras en la detección de VDC en comparación a las dos experiencias anteriores.

Considerando los antecedentes expuestos, en esta propuesta de trabajo se planteó el establecer un método de diagnóstico molecular mediante la técnica de RT-PCR anidada para la detección del gen de la Fosfoproteína (gen P) del VDC, gen altamente conservado, en muestras de sangre de perros. Lo anterior, corroborado mediante la detección de un fragmento de DNA de aproximadamente 430 pares de bases y su posterior comprobación de la identidad del gen P del VDC en los fragmentos de DNA analizados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo experimental se llevó a cabo 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, bajo financiamiento del Proyecto FIV 121014019102010.

### **Muestras y Controles.**

Para la implementación del RT-PCR anidado se utilizaron como controles positivos, RNA extraído desde muestras positivas a la detección del gen H del VDC mediante RT-PCR (Jara, 2011; Salas, 2013) y, posteriormente, positivas a RT-PCR para la detección del gen N (Muñoz, 2013) (Cuadro n°1) y RNA extraído desde tres vacunas que contienen virus vivos atenuados del VDC: “Nobivac® Puppy DP”, “Canigen® MHA2PPi/L” y “Vanguard Plus 5/CV-L”, de diferentes cepas del virus; cepa Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill, respectivamente.

Como control negativo se utilizó RNA extraído desde sangre con anticoagulante (EDTA) de un perro sin signos clínicos de la enfermedad, sin antecedentes de riesgo y sin vacunación (animal no infectado) y como control de reactivos: agua libre de nucleasas.

| Canino | Raza     | Edad     | Sexo | Vacunación<br>contra VDC | RT-PCR<br>(gen H) | RT-PCR<br>(gen N) |
|--------|----------|----------|------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| A      | Mestizo  | 1,5 años | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| B      | Mestizo  | 2 años   | M    | No                       | positivo          | positivo          |
| C      | Mestizo  | 1,5 años | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| D      | Bóxer    | 3 años   | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| E      | Labrador | 1 año    | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| F      | Bóxer    | 2 años   | M    | No                       | positivo          | positivo          |
| G      | Mestizo  | 2,5 años | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| H      | Mestizo  | 1 año    | H    | Si                       | positivo          | positivo          |
| I      | Labrador | 1,5 años | M    | Si                       | positivo          | positivo          |
| J      | Mestizo  | 3 años   | M    | Si                       | positivo          | positivo          |

**Cuadro n°1:** Clasificación muestras de sangre provenientes de perros con signos clínicos de DC y clasificadas según: raza, edad, sexo, estado de vacunación contra VDC y resultado al RT-PCR para el gen H y gen N (Jara, 2011; Muñoz, 2013; Salas, 2013).

Así, una vez establecido el protocolo de n-RT-PCR se incorporaron a este estudio 10 muestras de sangre periférica con anticoagulante provenientes de perros que presentaron signología de DC, algunos con serología positiva a VDC (Cuadro n°2), provenientes de la casuística de diferentes clínicas veterinarias de Santiago. Estas muestras fueron sometidas con anterioridad a RT-PCR para gen H y gen N, arrojando diversos resultados.

| Canino | Raza         | Edad     | Sexo | Vacunación<br>contra VDC | Títulos<br>IgM | RT-PCR<br>(gen H) | RT-PCR<br>(gen N) |
|--------|--------------|----------|------|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| 1      | Mestizo      | 2 años   | H    | Si                       | 1:40           | negativo          | positivo          |
| 2      | Mestizo      | 1 año    | M    | No                       | 1:80           | negativo          | positivo          |
| 3      | Bull Terrier | 2 años   | H    | Si                       | 1:80           | negativo          | positivo          |
| 4      | Mestizo      | 1 año    | H    | Si                       | 1:80           | negativo          | positivo          |
| 5      | Mestizo      | 3 años   | H    | No                       | 1:40           | negativo          | positivo          |
| 6      | Mestizo      | 3,5 años | M    | No                       | -              | negativo          | positivo          |
| 7      | Bóxer        | 2 años   | M    | -                        | 1:40           | negativo          | positivo          |
| 8      | Mestizo      | 9 meses  | H    | No                       | 1:80           | negativo          | positivo          |
| 9      | Mestizo      | 1,5 años | H    | No                       | 1:20           | negativo          | positivo          |
| 10     | Mestizo      | 1 año    | M    | Si                       | 1:80           | negativo          | negativo          |

**Cuadro n°2:** Clasificación muestras de sangre provenientes de perros con signos clínicos de DC y clasificadas según: raza, edad, sexo, estado de vacunación contra VDC, títulos de IgM y resultado al RT-PCR para el gen H y gen N (modificado de Salas, 2013 y Muñoz, 2013).

## **Detección del gen de la fosfoproteína (gen P) del VDC mediante n-RT-PCR.**

**a) Extracción de RNA viral.** Se procedió a la extracción del RNA mediante el kit de extracción TRIZOL<sup>®</sup> LS (Invitrogen<sup>®</sup>), cuyo procedimiento se realizó a temperatura ambiente (TA). Se mezclaron 0,75 mL de reactivo con 0,25 mL de la muestra, para lisar células suspendidas, haciendo pasar la suspensión varias veces a través de una pipeta. Luego, se agregaron 0,2 mL de cloroformo y las muestras se agitaron durante 15 segundos. Se incubaron a TA por 15 minutos y se centrifugaron a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 0,5 mL de isopropanol. Se incubó a TA por 10 minutos y luego se centrifugó a 12.000xg por 8 minutos. Al precipitado se agregó etanol al 75% (1 mL), se agitó en vórtex y centrifugó a 7.500xg por 5 minutos a TA. El precipitado de RNA se secó al vacío durante 5 minutos y se resuspendió en 100 uL de agua libre de nucleasas. Finalmente, el RNA fue incubado durante 15 minutos a 50-60°C y mantenido a -20°C hasta su posterior uso.

**b) RT-PCR y n-RT-PCR.** Para la realización de la técnica, se usó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 de pocillos de 0.2 mL.

**Partidores.** Se utilizaron dos pares de partidores del gen P: CDV-1: 5`-GGATGTGGA GAACGCAATAC-3 y CDV-2: 5`-GGAGGTCTCTCAATAGTTGA-3`, que permiten la amplificación de 1069 pares de bases (pb) (Rzezutka y Mizak, 2002). El segundo par de partidores CDV-A: 5`-ATGTTTATGATCACAGCGGT-3` y CDV-B: 5`-ATTGGGTTGC ACCACTTGTC-3`, permite la amplificación de 429 pb (Barrett *et al.*, 1993). Los partidores fueron enviados para su elaboración a la empresa Bioscan.

**Mezcla de la reacción.** En la reacción RT-PCR se utilizaron los partidores CDV-1 y CDV-2 y el kit “SuperScript one step RT-PCR with platinum Taq” de Invitrogen<sup>®</sup>, siguiendo las indicaciones del fabricante, el cual consiste en 25 uL de “2x Reaction Mix” (0,4mM de cada desoxirribonucleótido y 3.2 mM de MgSO<sub>4</sub>), 2 uL de “SuperScript. III RT/Platinum Taq Mix”, 2 uL de cada partidor y 19 uL del templado de RNA para alcanzar un volumen de 50 uL totales. El primer paso consistió en la transcripción reversa que se

efectuó a 42°C por 50 minutos y luego una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos. Enseguida, un PCR de 35 ciclos (desnaturalización: 94°C durante un minuto; alineamiento: 50°C por 2 minutos; extensión 72°C durante 2 minutos) y una elongación final de 72° C por 6 minutos. Para cada muestra procedente del RT-PCR, el n-PCR se realizó en un tubo que contenía una mezcla de 11 uL de Master Mix 2X (Fermentas®), 5 uL del partidor CDV-A, 5 uL del partidor CDV-B y 1 uL de producto (muestra). Se incubó a 94 °C por 2 minutos y enseguida la amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineamiento a 55°C durante un minuto y elongación a 72 °C durante un minuto. La elongación final fue realizada a 72 °C durante 6 minutos.

**Visualización de los productos amplificados.** Se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2%. El producto de cada PCR se mezcló con un producto comercial de carga (Fermentas®), que contiene glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol, con el fin de chequear la migración de las bandas de DNA. La electroforesis se realizó a 90V por 45 minutos. Posterior a la electroforesis, se realizó la incubación con bromuro de etidio (BE; 0,5 ug/mL) durante 40 minutos y se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) en un transiluminador, para luego ser fotografiado.

#### **Determinación de la identidad nucleotídica del fragmento amplificado.**

**a) Secuenciación.** Para enviar a secuenciar las muestras positivas al n-RT-PCR se eligieron las muestras de las cuales se conocía el linaje según el gen H (Salas, 2013). Así, solo dos muestras fueron enviadas a secuenciar y corresponden a la muestra F (CDV/FMR1) y muestra H (CDV/FMR2), obtenidas de perros de diferentes edades, sexo y estado de vacunación (Cuadro nº1). Estas muestras fueron purificadas a través del kit “HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit” (RBC Bioscience®), según indicaciones del fabricante, y enviadas en triplicado, al Centro de Secuenciación de la empresa Genytec Ltda.

**b) Porcentaje de identidad nucleotídica (PIN).** Las secuencias entregadas por Genytec Ltda. se alinearon para obtener una secuencia consenso a través del programa *online* de

libre acceso Clustal W. La secuencia consenso fue ingresada al programa informático de alineamiento de secuencias BLAST, a modo de conocer su identidad nucleotídica.

### **Análisis de Resultados**

Se consideró positiva aquella muestra que luego del RT-PCR anidado originó un fragmento de DNA de aproximadamente 430 pares de bases y que luego del análisis con el programa BLAST su identidad nucleotídica correspondió a VDC, con un PIN respectivo mayor o igual a 80% ( $\text{PIN} \geq 80\%$ ).

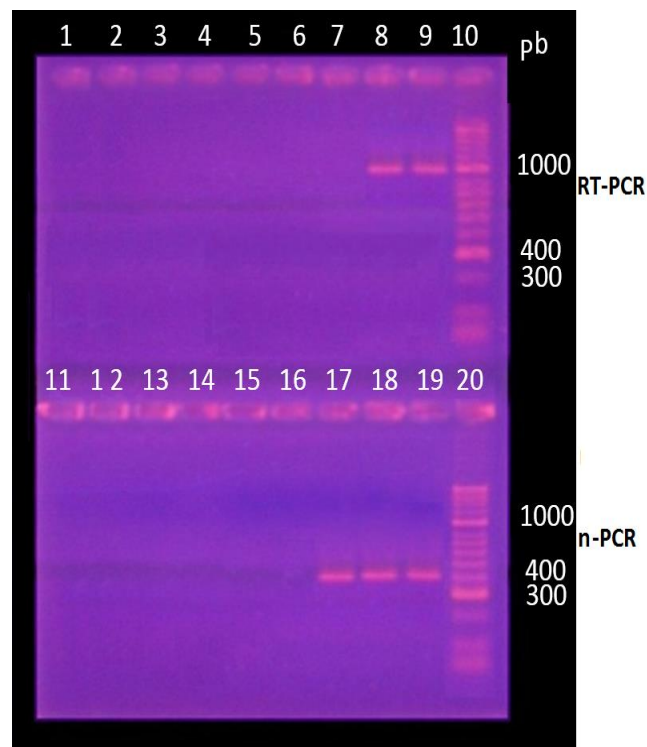
### **Medidas de bioseguridad**

Para la realización del trabajo de laboratorio, se adoptaron medidas de seguridad acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de Microbiología y Virología Animal. Estas consisten, principalmente, en el uso de material limpio y estéril, utilización de delantal blanco y guantes, tanto en la preparación de las mezclas de PCR como en la incubación del gel en BE. Por otra parte, la visualización de los productos amplificados, al involucrar la utilización de un transiluminador de luz UV, requirió del uso de una placa de acrílico y gafas con filtro UV, estas últimas, con el fin de proteger la visión del observador. Finalmente, el gel fue incinerado, ya que BE tiene propiedades mutagénicas.

## RESULTADOS

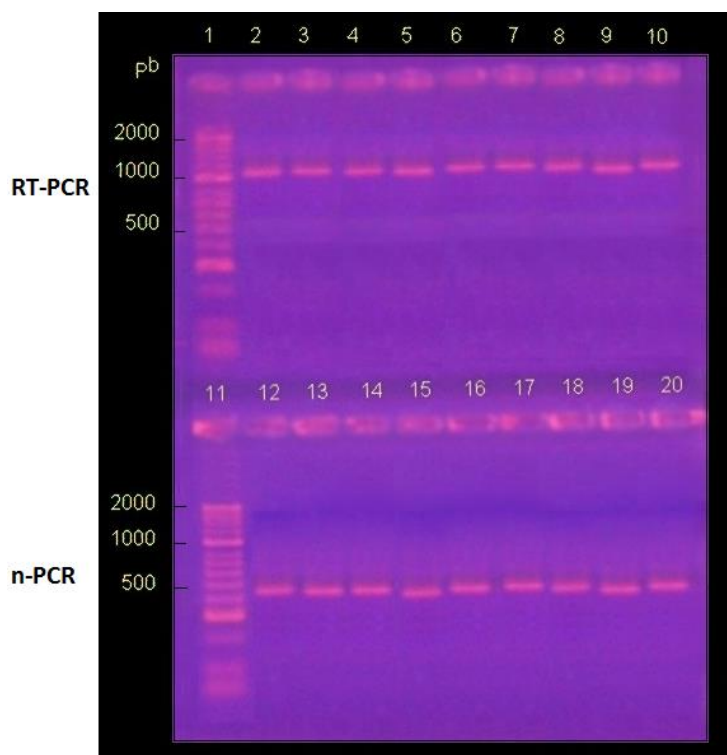
### a) Detección del gen P de VDC mediante RT-PCR anidado en muestras controles.

a.1) La reacción de RT-PCR permitió observar una banda ancha y nítida, para dos de las tres vacunas comerciales (cercano a 1100 pb); la vacuna Vanguard Plus 5/CV-L, no genera banda visible. Por otra parte, en el RT-PCR anidado, se pudo observar que las tres vacunas formaron un fragmento de DNA del tamaño esperado (cercano a 430 pb). En ambas reacciones no se observaron bandas inespecíficas (Figura 1).



**Figura 1: Detección del gen de la Fosfoproteína mediante RT-PCR.** Visualización de productos amplificados por RT-PCR anidado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE y posterior incubación en bromuro de etidio. Carriles 1, 2, 11 y 12: control de reactivos (agua libre de nucleasas, duplicados). Carril 3, 4, 13, 14: control negativo (perro sin infectar, duplicado); Carril 5,6, 15,16: Control de reactivos. Carril 7, 17: Cera Snyder Hill (Vanguard Plus 5/L4 CV). Carril 8, 18: Cera Lederle (Canigen@MHA2PPi/L). Carril 9 y 19: Cera Onderstepoort (Nobivac@Puppy DP). Carril 10 y 20: MM, marcador de tamaño molecular (50-2000 pb, Bioline @).

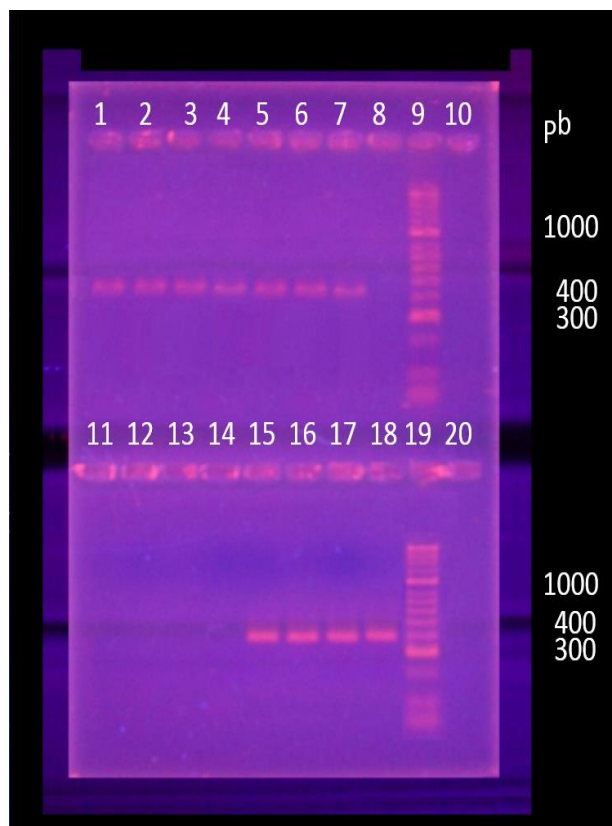
a.2) Al realizar el RT-PCR en las 10 muestras controles positivas al gen H y al gen N (Cuadro n°1), se observó que el 100% de estas muestras, arrojaron como resultado bandas nítidas y anchas, cercanas a las 1100 pares de bases. Al realizar, el n-RT-PCR se observaron bandas intensas cercanas a los 430 pares de bases, en el 100% de las muestras (Figura 2).



**Figura 2: Detección del gen de la Fosfoproteína mediante RT-PCR.** Visualización de productos amplificados por RT-PCR anidado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE y posterior incubación en bromuro de etidio. **Carriles 1 y 11:** MM, marcador de tamaño molecular (50-2000 pb, Bioline®). Los carriles del 2 al 10 y del 12 al 20, corresponden a controles positivos de RNA viral provenientes de aislados nacionales (cuadro n°1).

**b) Detección del gen P mediante n-RT-PCR en muestras sospechosas de VDC.**

Las 10 muestras de perros sospechosos de DC (Cuadro n°2), fueron sometidas al RT-PCR anidado para el gen P de VDC, y al visualizarse los productos, se pudo observar que las 10 muestras (100% de las muestras) arrojan una banda de alrededor de 430 pares de bases de diversa calidad de visualización (Figura 3).



**Figura 3: Detección del gen de la Fosfoproteína mediante RT-PCR anidado.** Visualización de productos amplificados por RT-PCR anidado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE y posterior incubación en bromuro de etidio. Los carriles número 1 al 7 (canino 1 al 7 respectivamente según cuadro n°2) y los carriles 15, 16 y 17 (canino 8 al 10 respectivamente según cuadro n°2) corresponden a muestras clínicas analizadas con anterioridad para el gen de la hemaglutinina (Salas, 2013). El carril 18 corresponde cepa Snyder Hill (Vanguard Plus 5/L4 CV); los carriles 8 y 11 corresponden a controles de reactivos, mientras que el carril 12,13 y 14 (triplicado) corresponde a control negativo, perro no infectado con el virus. Carriles 9 y 19 corresponden al marcador de tamaño molecular (50-2000 pb, Bioline ®). Carriles 10 y 20 no contienen muestra.

### c) **Determinación de la identidad nucleotídica respecto al GenBank®**

Los amplificadores procedentes de dos de las muestras positivas (correspondientes a las muestras F y H del cuadro n°1) fueron enviados en triplicado a secuenciar al Centro de Secuenciación Genytec Ltda., recepcionándose tres secuencias de alrededor de 430 pb para cada muestra (Anexo 1).



Luego, se procedió a realizar un alineamiento múltiple mediante el programa Clustal W, para obtener una secuencia consenso para cada muestra y así realizar la comparación con los datos oficiales del GenBank® (Anexo 2).

Las secuencias consenso, obtenidas a partir del programa Clustal W, fueron analizadas con el programa BLAST, el cual entregó valores de identidad nucleotídica respecto de VDC entre 87 a 90% para la secuencia CDV/FMR1 y de 94% a 99% para la secuencia CDV/FMR2 (Anexo 3).

## **DISCUSIÓN**

El diagnóstico de DC se realiza usualmente basándose en los signos clínicos y el historial de los perros. Sin embargo, resulta difícil diferenciar DC de otras enfermedades como la tos de las perreras en la etapa temprana y otras patologías virales producidas por coronavirus canino o por el virus de la hepatitis canina infecciosa, por ejemplo. La mayoría de los métodos de diagnóstico que se han utilizado tienen inconvenientes como el tiempo de entrega de resultados y la reacción cruzada en perros con vacunación reciente (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006). Así, se hace necesario un método rápido, sensible y específico para la detección de VDC.

En este contexto, el diagnóstico del VDC puede realizarse mediante el uso de técnicas de biología molecular y la PCR, y su variante RT-PCR, es una de las contribuciones más importantes en el área de diagnóstico, permitiendo procedimientos más rápidos y específicos (Frisk *et al.*, 1999). Así, la RT-PCR demuestra ser una herramienta efectiva para el diagnóstico de distemper canino, teniendo como ventaja la elevada sensibilidad, además los cortos tiempos de entrega de resultados, en comparación con otras técnicas (Frisk *et al.*, 1999; Rzezutka y Mizak, 2002).

Con el objetivo de detectar el gen de la Fosfoproteína del agente causal de Distemper Canino y en el marco de esta memoria de título, se utilizó la técnica molecular de RT-PCR anidada. Este método permitió la obtención de un fragmento de DNA de 430 pb a partir de RNA obtenido de cepas vacunales, desde muestras previamente positivas al gen H de VDC

y, posteriormente, positivas al gen N (controles positivos) y de muestras de campo sospechosos de infección por VDC. El análisis bioinformático de las secuencias involucradas permitió corroborar la identidad de las muestras incorporadas a este estudio.

Si bien los resultados del n-RT-PCR con las muestras positivas (vacunas) fueron los esperados (obtención de una banda de alrededor de 430 pb, Figura 1), resultó sorprendente la no obtención de un fragmento visible de alrededor de 1100 pb (al RT-PCR) en caso de la cepa vacunal Vanguard Plus 5/CV-L. Lo anterior puede ser explicado por un menor título viral en la vacuna o por la presencia de algún inhibidor en estas muestras. Esta particularidad, no se considera un problema, pues al realizar el n-RT-PCR, se obtienen los resultados esperados. Este mismo fenómeno también se observó al implementar el diagnóstico molecular de Virus herpes felino tiempo atrás (Macías, 2011). Si consideramos que existe amplificación y que las condiciones experimentales no permiten visualizar el fragmento generado, una posible solución involucraría mayor número de ciclos de PCR (Jara, 2011).

Los productos de amplificación del n-RT-PCR obtenidos en esta memoria, fueron visualizados con nitidez, no observándose bandas de amplificación inespecíficas o degradación del DNA en ningún caso. Cabe destacar que el 100% de las muestras, de los controles positivos y las tres cepas vacunales utilizadas generaron una banda cercana a los 430 pb. Además, tanto la muestra utilizada como control negativo (perro sin signos clínicos de la enfermedad) como el control de reactivos no generaron amplificación, confirmado por la inexistencia de bandas en la visualización del gel de agarosa. Lo anterior reflejaría una alta especificidad de los partidores utilizados (Barrett *et al.*, 1993; Rzezutka y Mizak, 2002). Así, la detección del gen de la fosfoproteína, una proteína altamente conservada entre los integrantes de la familia *Paramyxoviridae* (Rzezutka y Mizak, 2002), permite sugerir que la elección del gen P de la fosfoproteína como blanco a detectar mediante n-RT-PCR, debe ser considerado al momento de la elección final del mejor método diagnóstico del VDC.

Lo anteriormente mencionado puede ser respaldado al considerar la confirmación de la identidad nucleotídica realizada a los fragmentos de DNA obtenidos, pues los altos valores de PIN alcanzados muestran efectivamente que el fragmento de DNA amplificado corresponde al gen de la fosfoproteína (gen P) del VDC. Sin embargo, la elección del mejor método diagnóstico de VDC, debe necesariamente considerar otros estudios previos. Así, en Chile y en el mismo laboratorio, se han realizado experiencias basadas en la detección de VDC mediante RT-PCR, pero enfocadas en la detección del gen de la hemaglutinina (Jara, 2011; Salas, 2013). Esta glicoproteína es la encargada de la generación de respuesta inmune por parte del organismo afectado y, a pesar de ser comúnmente utilizada para el diagnóstico de DC (Murphy *et al.*, 1999a; Elia *et al.*, 2006), el gen H es el que posee mayor variación, por lo que no sería la mejor elección para diagnóstico del virus (Jara, 2011) sino más bien, para conocer el linaje al cual pertenecería el virus circulante (Salas, 2013).

Si bien en los dos estudios mencionados se obtienen resultados positivos en la detección del virus, las técnicas empleadas resultarían menos sensibles: por una parte, Jara (2011) logra detectar el virus en un 19% de las muestras, mientras que Salas (2013) detecta RNA viral en el 7% de las muestras testeadas. Lo anterior fue probado por Muñoz en 2013, quien al implementar un PCR para el gen N (un gen más conservado que codifica para la proteína de la nucleocápside viral de VDC) como blanco de detección y utilizando las mismas muestras logró un 90% de detección positiva, sugiriendo una mayor sensibilidad que las experiencias anteriores. Si bien no es el mismo gen considerado, la comparación es atingente debido a que el RT-PCR utilizado es el mismo: convencional.

Aunque el RT-PCR es una técnica sensible, su sensibilidad puede incrementarse aún más mediante la realización de un n-RT-PCR, ya que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de partidores en cada una. Primero se realiza una reacción con los partidores externos para amplificar una región de DNA más extensa, que contiene la secuencia blanco. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con partidores internos para amplificar la región específica (Goode *et al.*, 2002). Asimismo, se pudo observar que la sensibilidad de la técnica utilizada en esta memoria de título, se vio incrementada al realizar la segunda reacción de PCR (n-PCR),

debido a que la muestra obtenida de la vacuna Vanguard Plus 5/L4 (cepa Snyder Hill) que en un comienzo resultó negativa al RT-PCR, al realizar el n-PCR demostró un amplicon cercano a los 430 pb (Figura 1). Esto también fue observado por Rzesutka y Mizak (2002), que luego de realizar un n-PCR a seis muestras que resultaron negativas al RT-PCR, estas generaron amplificación. En los resultados de esta memoria de título, al ser utilizada la técnica de n-RT-PCR, se observaron mejoras en la detección de material genético viral, superando la técnica utilizada por Muñoz (2013).

El alto PIN obtenido a través del programa BLAST en las dos secuencias analizadas (entre 87 a 90% para la secuencia CDV/FMR1 y de 94 a 99% para la secuencia CDV/FMR2) respecto a los cien primeros resultados otorgados por el programa, permiten evidenciar que ambos fragmentos amplificados corresponden a VDC. Sin embargo, existe una notoria variación entre los PIN de ambas secuencias. Al alinear las dos secuencias consenso mediante el programa BLAST, se obtuvo un PIN de 90% entre ellas (Anexo 4), por lo que habría un 10% de variación entre estas secuencias. Esta variación podría explicarse debido a que según Salas (2013), las dos secuencias segregan para diferentes linajes (linaje America 1 y linaje Europeo).

Finalmente, cabe destacar que tanto en los resultados de Muñoz (2013) como en los de este estudio se utilizaron muestras de RNA (controles positivos) extraídas con más de un año de anterioridad y almacenados a una temperatura de -20°C, la cual no es la temperatura ideal descrita en la literatura para mantener la integridad del material genético. El RNA del virus, puede permanecer indefinidamente activo a -76°C o liofilizado y se puede mantener activo alrededor de un mes a -10°C (Pérez *et al.*, 1993). A pesar de esto, los resultados demuestran que la estabilidad del RNA no se vio afectada por este factor.

Los resultados obtenidos en esta memoria de título sugieren que la técnica molecular de RT-PCR anidado para el gen de la fosfoproteína de VDC, es un método rápido y altamente sensible, y que, por lo tanto, podría ser utilizado para el diagnóstico *antemortem* de infección por VDC. La sensibilidad y especificidad del protocolo de n-RT-PCR utilizado en esta memoria de título, fue corroborada con la amplificación del 100% tanto de controles

positivos, como de muestras de perros sospechosos, así como también, a la no amplificación en controles negativos. Sin embargo, para corroborar estos parámetros del método desarrollado en esta memoria de título, se requieren estudios adicionales.

## **CONCLUSIONES**

La técnica de RT-PCR anidada implementada en esta memoria de título, a través de la detección del gen de la fosfoproteína (gen P) de VDC, fue capaz de detectar el 100% de las muestras utilizadas, tanto controles positivos (cepas vacunales y muestras positivas) como muestras de animales sospechosos de presentar la enfermedad.

El alto PIN obtenido permite indicar que el método utilizado es específico para la detección de VDC

## BIBLIOGRAFÍA

**APPEL, M.** 1978. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* 41:385-393.

**BARRETT, T.; VISSER, I.; MAMAEV, L.; GOATLEY, L.; VAN BRESSEM, M.; OSTERHAUS, A.** 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010–1012

**CERDA, L.; MATHIEU, C.; QUINTEROS, G.** 1994. Primer aislamiento de virus distemper canino en Chile. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México.

**ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.; LORUSSO, E.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 136:171-176.

**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. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3634- 3643.

**GOODE, T.; HO, W.; O`CONNOR, T.; BUSTEED, S.; DOUGLAS, S.; SHANAHAN, F.; O`CONNELL, J.** 2002. Nested RT-PCR. **In:** RT-PCR protocols. *Methods in molecular biology*. 2da Ed. Human Press. Cork, Irlanda. Pp 65-79.

**GREENE G.; APPEL M.** 1998. Canine Distemper Virus. **In:** *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 2a ed. Greene GE Saunders, Philadelphia, PA. Pp 1-22.

**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. 18p.

**JOHNSON, R.; GLICKMAN L.; EMERICK T.; PATRONEK G.** 1995. Canine distemper infection in pet dogs: I. Surveillance in Indiana during a suspected outbreak. *J. Am. Anim. Hosp Assoc* 31 (3):223-229.

**KARLIN, D.; LONGHI, S.; RECEVEUR, V.; CANARD, B.** 2002. The N-terminal domain of the phosphoprotein of morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology* 296: 251-262.

**LÓPEZ, C.** 2012. Diagnóstico del Distemper Canino. **In:** Simposio Internacional de Actualización en Distemper. Santiago, Chile. 6-7 Agosto 2012. Instituto Neurológico. 1-35 pp.

**MACÍAS, P.** 2011. Implementación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada para la detección del gen de la proteína Timidin Kinasa del virus herpes felino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. De Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 20p.

**MUÑOZ, C.** 2013. 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. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. De Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 27p.

**MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORIZINEK, M.; STUDDERT, M.;** 1999a. Paramyxoviridae. In: Veterinary Virology. 3a ed. Academia Press. New York, USA. Pp 411-428.

**MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORIZINEK, M.; STUDDERT, M.;** 1999b. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: Veterinary Virology. 3a ed. Academia Press. New York, USA. Pp 193-224.

**PARDO, I.; JOHNSON, G.; KLEIBOEKER, S.** 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. J. Clin. Microbiol. 43(10): 5009-5017.

**PARDO, I.** 2006. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected in North America dogs. Thesis of the requirements for the degree Master of Science. Columbia, USA. University of Missouri-Columbia, Faculty of the Graduate School. 75 p.

**PÉREZ, S.; ITURBE, R; SALDÍVAR, E.** 1993. Caracterización del virus del Distemper (moquillo canino) em cultivos celulares, aislados de animales clínicamente enfermos. Veterinaria México 24 (1):15-19.

**POZZA, M.; SIMONETTI, A.; ESTEVES, P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.** 2007. Detecção do vírus da cinomose canina por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos para os genes da fosfoproteína, hemaglutinina e neuraminidase. Arq. Bras. Med.Vet. Zootec. 59(5):1154-1162.

**RZEZUTKA, A.; MIZAK, B.** 2002. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. Vet. Microbiol.88: 95-103.

**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. Cs Veterinarias y Pecuarias. 23 p.

**SUGAI, A.; KOORIYAMA, T.; SATO, H.; YONEDA, M.; KA, CH.** 2009. Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. Microbiol. Immunol. 53:667-674.

**VAGNOZZI, A.; CARRILLO, C.** 2006. Análisis comparativo del gen P de Rinderpest Virus (RPV). *InVet.* 8(1):67-91.

**WAKASA, C.; IWATSUKI, K.; OHASHI, K.; NAKAMURA, K.; KAI, CH.** 2000. Sequence analysis of the genes encoding the phosphoprotein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62(1):97-101.



## ANEXO 1

Alineamiento de las secuencias obtenidas desde Genytec Ltda para la muestra CDV/FMR1, mediante el programa Clustal W.

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| FMR1_1 | ATATGCTGACATTCTCGTGGTACCTGCATGCGCTGTCATTAATCGATGATTTCGATATATG | 60  |
| FMR1_2 | ---CGTTGACATTCTCGTGGTACCTGAATGATATGTCATTAATCGATGATTTCGATATATG | 57  |
| FMR1_3 | -GATGCTGACAGTCTCGTGGTCCCTGCAGGCGCTGTCAGTCATCGAGGATTTCGAGAGAGG | 59  |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | ATAATGAATCCTTGATGATATCACTGATGATTCTGGCGAATATTATTCGGATGGAAATGC  | 120 |
| FMR1_2 | ATAATGAATACTTGATGATATAACTGATGATTCTGGATAATATTATTCGGATGGAAATGA  | 117 |
| FMR1_3 | AGAAGGAAGCCTTGATGATCGCACTGAGGATTCTGGCGAAGATTCTTCGGAGGAAATGC   | 119 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | TTCATCTAACTGGGGATATTCTTTCGGCCTTAAACCATACATATCGGCTGATGTGATCAT  | 180 |
| FMR1_2 | TTCATCTAACTGGGGATATTCTTTCGGACTTAAACCATACATATATGATGATGTGATAAT  | 177 |
| FMR1_3 | TTCATCTCACTGGGGATCTTCTTTCGGCCTTCAACCAGACAGAGCGGCTGATGTGAGCAT  | 179 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | GCTGATGGAATATGAATTGATTGCTCTGCTCAATACAATCATAAATGTGGGGATTAATAA  | 240 |
| FMR1_2 | GATGATGGAATATGAATTGATTGATCTGATCAATACAATAATAAATGTGGGGATTAATAA  | 237 |
| FMR1_3 | GCTGATGGAAGAGGAATTGAGTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTCAGAA     | 239 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | AATGGATGGGAATACTCTGCATTTCCACACAAATCCCGAATGTAATACATATGATCCGGA  | 300 |
| FMR1_2 | AATGGATGGGAATACTCTGAATTTCCACACAAATCCCGAATGTAATACATATGATCCGGA  | 297 |
| FMR1_3 | AAGGGATGGGAAGACTCTGCAGTTCCACACAAATCCCGAAGGTCAGACAGAGGATCCGGA  | 299 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | TTGTGGACCCATTAAAAATGGCACATGATATATGTCATCCTCACATGGAATGGGGATATT  | 360 |
| FMR1_2 | TTGTGGACCCATTAAAAATGGAACATGATATATGTCATACTCACATGGAATGGGGATATT  | 357 |
| FMR1_3 | GTGTGGACCCATTCAAAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCACATGGAATGGGGATCGT   | 359 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | TGCTGGATCGACAAATGGTGAACCCAATCTGCACTCAATTCAACTGGGGGATCATCATG   | 420 |
| FMR1_2 | TGATGGATCGACAAATGGTGAACCCAATCTGAACTCAATTCAACTGGGGGATCATCATG   | 417 |
| FMR1_3 | TGCTGGATCGACAAATGGTGAACCCAATCTGCACTCAAGTCAACTGGGGGATCATCAGG   | 419 |
|        | * * * * *   |     |
| FMR1_1 | GCCAATTG-   | 428 |
| FMR1_2 | GACAATTGT   | 426 |
| FMR1_3 | GCCAAGTGT   | 428 |
|        | * * * * *   |     |

Alineamiento de las secuencias obtenidas desde Genytec Ltda para la muestra CDV/FMR2, mediante el programa Clustal W.

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| FMR2_1 | AAGATGCTGACAGTCTCGTGGT-ACCTGCAGGCGCTGTCAGTAATCGAGGATTCGAGAGA  | 59  |
| FMR2_3 | -AGATGCTGACATGCTC-TGGTGACCTGCAGGCGCTTGCATGAATCGAGGATTCGAGAGA  | 58  |
| FMR2_2 | ---ATGCTGACAGTCTCGTGGT-ACCTGCAGGTTCTGTCAGTATTCGAGGATTCGAGAGA  | 56  |
|        | ***** ** *  |     |
| FMR2_1 | GGAGAAGGAAGCCTTGATGATAGCACTGAGGATTCGGCGAAGATTCTCCGAGGGAAAT    | 119 |
| FMR2_3 | GGAGAAGGAAGCCTTGATGATAGCACTGAGGATTCGGCGAAGATTATTCGAGGGAAAT    | 118 |
| FMR2_2 | GGAGATGGATGCCTTGATGATAGCACTGAGGATTCGGTTATGATTCTCCGAGGGATAT    | 116 |
|        | ***** ** *  |     |
| FMR2_1 | GCTTCAACTAACTGGGGATCTTCTTTTCGGCCTTAAACCAGACAGAGCGGCTGATGTGAGC | 179 |
| FMR2_3 | GCTTCATCTAACTGGGGATATCTTTCGGCCTTAAACCAGACAGAGCGGCTGATTTGGAGC  | 178 |
| FMR2_2 | GCTTCATCTATCTGGGGATCTTCTTTTCGGCCTTATACCAGACAGAGTTGCTGATGTGAGC | 176 |
|        | ***** ** *  |     |
| FMR2_1 | AAGCTGATGGAAGAGGAATTGAGTGCTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTAAG  | 239 |
| FMR2_3 | ATGCTGATGGAAGAGGAATTGATGGCTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTAAG  | 238 |
| FMR2_2 | ATGCTGATGGATGAGGATTTGAGTGCTCTGCTCATGACATGCAGATATGTGGGGATTATG  | 236 |
|        | * ** *  |     |
| FMR2_1 | AAAAGGGATGGGAAGACTCTGCAGTCCCACACAATCCCGAAGGTAAGACAGAGGATCCG   | 299 |
| FMR2_3 | AAAAGGGATGGGAAGACTCTGCATGTCCCACACAATCCCGAAGTGAAGACAGAGGATCCG  | 298 |
| FMR2_2 | ATATGGGATGGGATGACTCTGCAGTCCCACACATCCCGATGGTATGACAGAGGATCCG    | 296 |
|        | * * ** *  |     |
| FMR2_1 | GAGTGTGG-ACCCAATAAAAAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCACAAAGGAATGGGGAT | 358 |
| FMR2_3 | GA-TGTGGGACCCATTA AAAAGGGCACAGGAGAGAGTGCAGCCTCACATGGAATGGGGAT | 357 |
| FMR2_2 | GAGTGTGG-ACCCATTATATAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCACATGGATGGGGAT   | 355 |
|        | ** ** ** * * *  |     |
| FMR2_1 | AGTTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAAGTCAACTGGGGGATCAAC  | 418 |
| FMR2_3 | ATGTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAATGCAACTGGGGGATCATC  | 417 |
| FMR2_2 | AGTTGCTGGATCGACATATGGTGCACTCCCATCTGCACTCATGTCATCTGGGGGATCATC  | 415 |
|        | * ** ** *   |     |
| FMR2_1 | AGGGCCAAGT-   | 428 |
| FMR2_3 | AGGGCCATCG-   | 427 |
| FMR2_2 | AGGGCCATGTT   | 426 |
|        | *****   |     |

## ANEXO 2

### Secuencia consenso muestra CDV/FMR1

```
ATATGCTGACATTCTCGTGGTACCTGCATGCGCTGTCATTAATCGATGATTCGATATATGATAATGAATCCTTGATGATACACTG
ATGATTCTGGCGAATATTATCCGATGGAAATGCTTCATCTAACTGGGGATATTCTTTTCGGCCTTAAACCATACATATCGGCTGAT
GTGATCATGCTGATGGAATATGAATTGATTGCTCTGCTCAATACAATCATAAATGTGGGGATTAATAAAAATGGATGGGAATACTCT
GCATTTCCACACAATCCCGAATGTAATACATATGATCCGGATTGTGGACCCATAAAAATGGCACATGATATATGTCATCCTCAC
ATGGAATGGGGATATTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAATTCACTGGGGGATCATCATGGCCAATTGT
```

### Secuencia consenso muestra CDV/FMR2

```
AAGATGCTGACAGTCTCGTGGTACCTGCAGGCGCTGTCAGTAATCGAGGATTCGAGAGAGGAGAAGGAAGCCTTGATGATAGCACT
GAGGATTCTGGCGAAGATTCTCCGAGGGAAATGCTTCATCTAACTGGGGATCTTCTTTTCGGCCTTAAACCAGACAGAGCGGCTGA
TGTGAGCATGCTGATGGAAGAGGAATTGAGTGCTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTAAGAAAAGGGATGGGAAGACTC
TGCAGTTCCACACAATCCCGAAGGTAAGACAGAGGATCCGGAGTGTGGACCCATAAAAAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCA
CATGGAATGGGGATAGTTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAAGTCACTGGGGGATCATCAGGGCCATGTT
```

### Alineamiento secuencias CDV/FMR1 Y CDV/FMR2 según Clustal W

```
CDV / FMR1      -ATATGCTGACATTCTCGTGGTACCTGCATGCGCTGTCATTAATCGATGATTCGATATAT
CDV / FMR2      AAGATGCTGACAGTCTCGTGGTACCTGCAGGCGCTGTCAGTAATCGAGGATTCGAGAGAG
          * ***** *
CDV / FMR1      GATAATGAATCCTTGATGATATCACTGATGATTCGGCGAATATTATCCGATGGAAATG
CDV / FMR2      GAGAAGGAAGCCTTGATGATAGCACTGAGGATTCGGCGAAGATTCTCCGAGGGAAATG
          ** ** * * ***** *
CDV / FMR1      CTTCATCTAACTGGGGATATTCTTTTCGGCCTTAAACCATACATATCGGCTGATGTGATCA
CDV / FMR2      CTTCATCTAACTGGGGATCTTCTTTTCGGCCTTAAACCAGACAGAGCGGCTGATGTGAGCA
          ***** *
CDV / FMR1      TGCTGATGGAATATGAATTGATTGCTCTGCTCAATACAATCATAAATGTGGGGATTAATA
CDV / FMR2      TGCTGATGGAAGAGGAATTGAGTGCTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTAAGA
          ***** *
CDV / FMR1      AAATGGATGGGAATACTCTGCATTTCCACACAATCCCGAATGTAATACATATGATCCGG
CDV / FMR2      AAAGGGATGGGAAGACTCTGCAGTTCCACACAATCCCGAAGGTAAGACAGAGGATCCGG
          *** ***** *
CDV / FMR1      ATGTGGACCCATTA AAAATGGGCATGATATATGTCATCCTCACATGGAATGGGGATAT
CDV / FMR2      AGTGTGGACCCATTA AAAAAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCACATGGAATGGGGATAG
          * ***** *
CDV / FMR1      TTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAATTCACTGGGGGATCATCAT
CDV / FMR2      TTGCTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAAGTCACTGGGGGATCATCAG
          ***** *
CDV / FMR1      GGCCAATTGT
CDV / FMR2      GGCCATGTT-
          ***** *
```

### ANEXO 3

Porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias CDV/FMR1 respecto a las secuencias de VDC de GenBank®, utilizando el programa BLAST.

| Description   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Yanaka</a>                  | 551       | 551         | 99%         | 2e-153  | 90%   | <a href="#">AB028914.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Jujo</a>                    | 545       | 545         | 99%         | 1e-151  | 90%   | <a href="#">AB028916.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06, complete genome</a>   | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">JX681125.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: Th12</a>       | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">AB755426.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: Ac96I-H358</a>                  | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">AB753776.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain PS, complete genome</a>  | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">JN896331.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome</a>  | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">HQ540293.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06 P protein (P) gene, complete cds</a>                         | 540       | 540         | 99%         | 5e-150  | 89%   | <a href="#">EU545143.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: Ac96I-VDS</a>                   | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">AB753775.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus RNA, complete genome, strain: CYN07-hV</a>                                  | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">AB687721.2</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus RNA, complete genome, strain: CYN07-dV</a>                                  | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">AB687720.2</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain ZJ7 phosphoprotein (P) mRNA, complete cds</a>                        | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">JF343963.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome</a>  | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">HQ540292.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate MKY-KM08, complete genome</a>                                       | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">HM852904.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Hamamatsu</a>               | 534       | 534         | 99%         | 2e-148  | 89%   | <a href="#">AB028915.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Hebei, complete genome</a>  | 529       | 529         | 99%         | 1e-146  | 89%   | <a href="#">KC427278.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: 82Con</a>      | 529       | 529         | 99%         | 1e-146  | 89%   | <a href="#">AB755428.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus phosphoprotein (P) gene, partial cds</a>                                    | 507       | 507         | 99%         | 5e-140  | 88%   | <a href="#">GU001866.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus phosphoprotein (P) gene, partial cds</a>                                    | 507       | 507         | 99%         | 5e-140  | 88%   | <a href="#">GU001865.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain vaccine X phosphoprotein (P) gene, complete cds</a>                  | 507       | 507         | 99%         | 5e-140  | 88%   | <a href="#">EU072201.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 5804P, complete genome</a>   | 507       | 507         | 99%         | 5e-140  | 88%   | <a href="#">AY386316.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 5804, complete genome</a>  | 507       | 507         | 99%         | 5e-140  | 88%   | <a href="#">AY386315.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Wa-CDV2013, complete genome</a>                                     | 501       | 501         | 99%         | 2e-138  | 88%   | <a href="#">KF914669.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 501       | 501         | 99%         | 2e-138  | 88%   | <a href="#">AF259551.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 501       | 501         | 99%         | 2e-138  | 88%   | <a href="#">AF259549.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain A75/17, complete genome</a>  | 496       | 496         | 99%         | 1e-136  | 88%   | <a href="#">AF164967.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: M25CR/H</a>                         | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB490681.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Cb/H</a>                          | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB490678.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C/H</a>                          | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB490674.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con</a>                           | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB476402.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C</a>                            | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB476401.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete genome, strain: M25CR</a>                             | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB475097.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: M24Cr</a>      | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB755427.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: 55L</a>        | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AB755425.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 484       | 484         | 99%         | 2e-133  | 87%   | <a href="#">AF259550.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/B</a>                         | 479       | 479         | 99%         | 1e-131  | 87%   | <a href="#">AB490680.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/H</a>                         | 479       | 479         | 99%         | 1e-131  | 87%   | <a href="#">AB490679.1</a> |

Porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias CDV/FMR2 respecto a las secuencias de VDC de GenBank®, utilizando el programa BLAST

| Description  | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Yanaka</a>                  | 774       | 774         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB028914.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06, complete genome</a>   | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">JX681125.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: Th12</a>       | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB755426.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: Ac96I-H358</a>                  | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB753776.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain PS, complete genome</a>  | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">JN896331.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome</a>  | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">HQ540293.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ1-06 P protein (P) gene, complete cds</a>                         | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">EU545143.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Juijo</a>                   | 763       | 763         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB028916.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: Ac96I-VDS</a>                   | 758       | 758         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB753775.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain ZJ7 phosphoprotein (P) mRNA, complete cds</a>                        | 758       | 758         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">JF343963.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome</a>  | 758       | 758         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">HQ540292.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus isolate MKY-KM08, complete genome</a>                                       | 758       | 758         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">HM852904.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain:Hamamatsu</a>               | 758       | 758         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB028915.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus isolate Hebei, complete genome</a>  | 752       | 752         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">KC427278.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: 82Con</a>      | 752       | 752         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB755428.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus RNA, complete genome, strain: CYN07-hV</a>                                  | 752       | 752         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB687721.2</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus RNA, complete genome, strain: CYN07-dV</a>                                  | 752       | 752         | 99%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AB687720.2</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus phosphoprotein (P) gene, partial cds</a>                                    | 730       | 730         | 99%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">GU001866.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus phosphoprotein (P) gene, partial cds</a>                                    | 730       | 730         | 99%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">GU001865.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain vaccine X phosphoprotein (P) gene, complete cds</a>                  | 730       | 730         | 99%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">EU072201.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain 5804P, complete genome</a>   | 730       | 730         | 99%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">AY386316.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain 5804, complete genome</a>  | 730       | 730         | 99%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">AY386315.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 719       | 719         | 99%         | 0.0     | 97%   | <a href="#">AF259549.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus strain A75/17, complete genome</a>  | 719       | 719         | 99%         | 0.0     | 97%   | <a href="#">AF164967.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus isolate Wa-CDV2013, complete genome</a>                                     | 708       | 708         | 99%         | 0.0     | 97%   | <a href="#">KF914669.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 708       | 708         | 99%         | 0.0     | 97%   | <a href="#">AF259551.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C protein (C) genes, complete cd</a> | 702       | 702         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AF259550.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus isolate 00-2601, complete genome</a>  | 697       | 697         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AY443350.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: M25CR/H</a>                         | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490681.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50CbI/H</a>                         | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490678.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C/H</a>                          | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490674.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con</a>                           | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB476402.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C</a>                            | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB476401.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete genome, strain: M25CR</a>                             | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB475097.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: M24Cr</a>      | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB755427.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genes for phosphoprotein P, C protein, complete cds, strain: 55L</a>        | 691       | 691         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB755425.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus isolate 25259 phosphoprotein gene, partial cds</a>                          | 688       | 688         | 93%         | 0.0     | 98%   | <a href="#">AY964113.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/E</a>                         | 686       | 686         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490680.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/H</a>                         | 686       | 686         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490679.1</a> |
| <a href="#">Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con/H</a>                         | 686       | 686         | 99%         | 0.0     | 96%   | <a href="#">AB490676.1</a> |

## ANEXO 4

### Alineación de secuencias consenso, CDV/FMR1 Y CDV/FMR2

Sequence ID: lc|Query\_3127 Length: 429 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 425 [Graphics](#)

| Score         | Expect   | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 536 bits(290) | 5e-157   | 378/422(90%) | 0/422(0%) | Plus/Plus |
| Query 3       | ATGCTGACATTCTCGTGGTACCTGCATGCGCTGTCATTAATCGATGATTCGATATATGAT   | 62           |           |           |
| Sbjct 4       | ATGCTGACAGTCTCGTGGTACCTGCAGGCGCTGTCAGTAATCGAGGATTCGAGAGAGGAG   | 63           |           |           |
| Query 63      | AATGAATCCTTGATGATATCACTGATGATTCTGGCGAATATTATTCCGATGGAAATGCTT   | 122          |           |           |
| Sbjct 64      | AAGGAAGCCTTGATGATAGCACTGAGGATTCTGGCGAAGATTCTTCCGAGGGAAATGCTT   | 123          |           |           |
| Query 123     | CATCTAACTGGGGATATTCTTTTCGGCCTTAAACCATACATATCGGCTGATGTGATCATGC  | 182          |           |           |
| Sbjct 124     | CATCTAACTGGGGATCTTCTTTTCGGCCTTAAACCAGACAGAGCGGCTGATGTGAGCATGC  | 183          |           |           |
| Query 183     | TGATGGAAATATGAATTGATTGCTCTGCTCAATAACAATCATAAATGTGGGGATTAATAAAA | 242          |           |           |
| Sbjct 184     | TGATGGAAAGAGGAATTGAGTGCTCTGCTCAAGACAAGCAGAAATGTGGGGATTAAGAAAA  | 243          |           |           |
| Query 243     | TGGATGGGAATACTCTGCATTTCCACACAATCCCGAATGTAATACATATGATCCGGATT    | 302          |           |           |
| Sbjct 244     | GGGATGGGAAGACTCTGCAGTTCCACACAATCCCGAAGGTAAGACAGAGGATCCGGAGT    | 303          |           |           |
| Query 303     | GTGGACCCATTAAAAATGGCACATGATATATGTCATCCTCACATGGAATGGGGATATTTG   | 362          |           |           |
| Sbjct 304     | GTGGACCCATTAAAAAGGGCACAGGAGAGAGGTCAGCCTCACATGGAATGGGGATAGTTG   | 363          |           |           |
| Query 363     | CTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAATTCAACTGGGGGATCATCATGGC   | 422          |           |           |
| Sbjct 364     | CTGGATCGACAAATGGTGCAACCCAATCTGCACTCAAGTCAACTGGGGGATCATCAGGGC   | 423          |           |           |
| Query 423     | CA 424   |              |           |           |
| Sbjct 424     | CA 425   |              |           |           |