



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

DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA POLIMERASA  
GRANDE (L) DEL VIRUS DISTEMPER CANINO

**DIEGO ANÍBAL PINCHEIRA DONOSO**

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

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE

2015



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

DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA POLIMERASA  
GRANDE (L) DEL VIRUS DISTEMPER CANINO

**DIEGO ANÍBAL PINCHEIRA DONOSO**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: VÍCTOR NEIRA	.....	.....

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Dedico esta memoria principalmente a mi adorada y admirada madre Valeria Donoso, quien ha consagrado su vida para sacar adelante a sus hijos y que con su eterna sabiduría, carácter inquebrantable y esfuerzos hizo posible la obtención de este título. A mis hermanos David, Daniel, Gaspar, Sebastián y Francisca por ser pilares esenciales durante mi vida, todos maravillosos, todos increíbles. A mis primos hermanos (más hermanos que primos) Sebi y Nico por su constante compañía en distintas instancias. A mis amigos de la vida Carlos, Gonzalo, Francisco y Vivi con quienes por años he podido contar en las buenas y en las malas. A mis amigos Ale, Nacho, Juaco, Jorge y Lalo por hacer cada día de la carrera una etapa excelente. A mis instructores Raúl, Alejandro y Carlos y mi compañero de tantas prácticas Marcel por colaborar todos ellos en mi formación como artista marcial lo que conllevó a la disciplina con la que enfrenté los estudios e incluso la vida misma. A Carlos Navarro mi profesor guía, gran responsable de la realización de esta memoria, desde la idea, desarrollo y finalización de la misma. Finalmente, a quien llegó en esta última etapa a mi vida, mi compañera incondicional y amada Sara, quien hace de cada momento un momento inolvidable con su risa, ternura y amor permanente.

MEMORIA DE TÍTULO

**“DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA POLIMERASA GRANDE (L) DEL VIRUS DISTEMPER CANINO”**

**“MOLECULAR DETECTION OF THE LARGE (L) POLYMERASE GENE OF THE CANINE DISTEMPER VIRUS”**

**Diego Aníbal Pincheira Donoso\***

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento: Proyecto FIV 121014019102010. FAVET. Universidad de Chile

## **RESUMEN**

El Virus Distemper Canino (VDC) es un agente infeccioso de amplia distribución, responsable de la enfermedad denominada Distemper Canino (DC) que afecta a una amplia diversidad de carnívoros terrestres (reportándose incluso en primates) y marinos. Afecta agresivamente a perros domésticos (con una tasa de mortalidad aproximada del 50%). Por tanto, el impacto clínico del VDC es importante. El VDC es codificado por 6 genes, N, P/V/C, M, F, H y L. Casi todos ellos se han usado para identificación de linajes y diagnóstico de la enfermedad. En este trabajo y utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Retrotranscripción (RT-PCR) se analizaron 22 fragmentos de Ácido Ribonucleico (RNA) obtenidos de sangre periférica de 22 perros diagnosticados con VDC clínicamente y positivos a VDC mediante RT-PCR (gen N) con el objetivo de lograr implementar la detección del gen de la proteína grande (L) como alternativa diagnóstica. En este sentido, se diseñó un par de partidores que generaron un fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) de alrededor de 450 pares de bases (pb), el cual mediante análisis bioinformático confirmó su identidad (PIN>94%). Así, esta implementación abre la discusión sobre el mejor método alternativo, en conocimiento de que la detección del gen P mediante RT-PCR anidado lo es actualmente. Un análisis de sensibilidad pondría dilucidar esta incógnita prontamente. Se concluye por tanto que esta técnica molecular ofrece un efectivo método diagnóstico para la presencia de VDC en perros domésticos.

*Palabras clave:* Gen L, virus distemper canino, diseño de partidores, reacción en cadena de la polimerasa

## **ABSTRACT**

The Canine Distemper Virus (CDV) is a widespread responsible for the Canine Distemper Disease that affects a broad diversity of carnivore mammals (and some cases in primates have been reported) globally. Domestic dogs are extensively and aggressively (with a ~50% mortality rate) infected by the CDV. Therefore, the clinical impact of the CDV is remarkable. The CDV is encoded by six genes, N, P/V/C, M, F, H and L. Almost all of which have been previously studied for lineage identification and disease diagnosis. In this study we used Reverse Polymerase Chain Reaction tests (RT-PCR) to analyse obtain 22 fragments of Ribonucleic acid (RNA) from peripheral blood of 22 subject dogs clinically diagnosed with CDV and positive to

CDV by RT-PCR (N gene). The aim of this study was to implement a protocol of detection of the Large Protein Gene (L) to be employed as an alternative diagnostic. To achieve this, a pair of primers that generated a fragment of deoxyribonucleic acid (DNA) of ~450 base pairs (bp) was designed, which, using a bioinformatic analysis, confirmed its identity (PIN > 94%). Therefore, the implementation of this protocol opens the discussion about the best alternative method, within the context that the detection of the P gene through Nested RT-PCR is currently the best available protocol. A sensitivity analysis may potentially elucidate this question. Consequently, the main conclusion is that the molecular technique implemented in this study offers an effective diagnostic method to optimize the detection of VDC in domestic dogs.

*Keywords:* L gene, canine distemper virus, primer design, polymerase chain reaction

## INTRODUCCIÓN

El Virus Distemper Canino afecta a una amplia variedad de especies, la mayoría de familias de carnívoros terrestres como *Canidae*, *Mustelidae* y *Procyonidae*, (Appel y Summers, 1999), *Ailuridae*, *Hyaenidae*, *Ursidae*, *Viverridae* (Appel y Summers, 1995), grandes felinos (Appel *et al*, 1994), carnívoros marinos como la foca del caspio (*Phoca caspica*) reportado por Kennedy *et al* el año 2000 e incluso se ha documentado su presencia en primates no humanos (Sakai *et al*, 2013).

El genoma del VDC presenta 6 genes cuya función es codificar las seis proteínas estructurales del virión. Dichos genes son N, P/V/C, M, F, H, L, encargándose cada uno de ellos de codificar una única proteína, con la excepción de P/V/C que codifica la fosfoproteína estructural P y las no estructurales V y C (Lamb y Parks, 2007).

El gen H es el que presenta mayor variabilidad genética y por tanto se usa en distintos estudios de caracterización de cepas y linajes del virus (Martella *et al*, 2006), existiendo estudios de su detección mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a retrotranscripción (RT-PCR) como hace Jara el año 2011. Además ha sido usado con éxito para la determinación de nuevos genotipos virales en perros en Japón (Mochizuki *et al*, 1999) así como para la identificación de al menos dos genotipos del virus presentes en Chile (Salas, 2013). Para el diagnóstico de la enfermedad se suele utilizar RT-PCR sobre el gen N (Alcalde *et al*, 2013, Muñoz, 2013).

El principal objetivo de este estudio es lograr la detección del gen de la proteína grande (L) del virus distemper canino mediante el uso de RT-PCR, a través del diseño de los partidores necesarios para la reacción, la amplificación de un fragmento de DNA de 450 pb y finalmente el establecimiento de la identidad nucleotídica del fragmento obtenido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo 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.

**Muestras:** Como controles positivos para la reacción del RT-PCR se utilizaron 2 cepas de VDC provenientes de vacunas comerciales (Lederle y Onderstepoort). Para el análisis se usaron 22 muestras de RNA viral obtenidos de sangre periférica de perros de distintas razas, edades y estado de vacunación contra VDC, con signos clínicos de DC y positivos al RT-PCR sobre el gen N (Cuadro 1). Como control negativo se usaron dos muestras de RNA extraído de perros sin signología a DC y negativos a RT-PCR sobre el gen N. Como control de reactivos se ocupó agua libre de nucleasas.

**Diseño de los partidores:** Los partidores para la reacción se obtuvieron mediante el uso del programa *online* de acceso libre OligoPerfect™ Designer de *Life Technologies*™. Para esto, se ingresó en el programa la secuencia nucleotídica de la región que comprende desde el nucleótido 9030 hasta el 15584 correspondiente al gen de la proteína grande L disponible en el GenBank® (anexo 1), con la finalidad de obtener un fragmento de DNA de aproximadamente 450 pb. Una vez diseñados los partidores se mandaron a sintetizar a Bioscan®.

**RT-PCR:** Para la implementación de esta técnica se empleó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo que contempló denaturación a 94 °C durante un minuto, alineación a 55 °C durante un minuto, elongación a 72 °C durante un minuto y elongación final a 72 °C durante siete minutos.

Mezcla de la reacción: Se utilizaron 15 µL del kit comercial “SuperScript one step RT-PCR with platinum taq” (*Taq* ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y los desoxiribonucleótidos trifostatos), 5 µL del DNA molde y 5 µL de cada partidor específico (denominados P1 y P2 respectivamente), llegando a un volumen final de 30 µL (detalles en cuadro 2)

**Amplificación del DNA:** La técnica PCR contempla una etapa de denaturación del DNA, seguido de una etapa de alineamiento de los partidores y una etapa final de elongación para terminar un ciclo. A través de un termociclador de gradiente de temperatura (Px2 Thermal Cycler), se determinaron las temperaturas óptimas de alineamiento para el par de partidores,



siendo dicha temperatura 55° C. Transcurridos 35 ciclos se procedió a visualizar el producto amplificado.

**Detección de productos amplificados:** La detección del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®) y posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Fermelo®). Se tomaron 5 µL del producto de PCR, y se mezclaron con 1 µL de un producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), el cual posee glicerol para proporcionar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar el progreso de la migración de las bandas de DNA. La electroforesis se llevó a cabo a 90V por 90 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó *Hyperladder I* (Bioline®), el cual contiene fragmentos de DNA entre 50 y 1000 pares de bases. Con este producto se comparó el tamaño de los fragmentos amplificados. Al finalizar la electroforesis, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Transiluminator UVP®), y se fotografió con cámara digital y filtro adecuado.

**Determinación de la identidad nucleotídica del fragmento amplificado:**

a) Secuenciación. Se secuenciaron 3 muestras positivas al RT-PCR, las que fueron purificadas a través del kit “HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit” (RBC Bioscience®) 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 para cada muestra, a través del programa *online* Clustal W. Las secuencias consenso fueron ingresadas al programa informático de alineamiento de secuencias BLAST, a modo de conocer su identidad nucleotídica respecto a los primeros 15 resultados entregados por Clustal W.

**Análisis de resultados:** Se consideró como muestra positiva toda aquella que originó un fragmento de DNA de aproximadamente 450 pb y PIN mayor a 90%.

**Medidas de bioseguridad:** Como medidas de bioseguridad se emplearon delantal manga larga y cerrado, guantes de látex para la manipulación de productos potencialmente nocivos o tóxicos. Al utilizar el transiluminador de luz ultravioleta se utilizó una placa de acrílico como filtro protector y los geles utilizados fueron envueltos en los guantes de látex, depositados en un contenedor especialmente destinado y posteriormente fueron incinerados, en tanto, el material contaminado con virus se esterilizó mediante autoclave.

## RESULTADOS

### Diseño de los partidores requeridos para la reacción

Los partidores diseñados mediante el programa OligoPerfect™ Designer de *Life Technologies*™ fueron denominados PGL1 F: 5'- ACTCACAACCTGTCGCAAACG-3' y PGL1 R: 5'- TTGGGTAAAGGTTTGGAAACG-3' (Anexo 3).

### Amplificación del fragmento de DNA de 450 pb

La visualización del gel de agarosa al 2% en el transiluminador de luz UV permitió determinar la presencia de bandas fluorescentes únicas y nítidas de alrededor a las 450 pb. en los controles positivos y en el total de muestras positivas mediante RT-PCR al gen N de VDC. No se observó presencia de bandas fluorescentes en los controles negativos ni en el control de reactivos.

En la figura 1 es posible observar los fragmentos de DNA sintetizados en la reacción de RT-PCR de las distintas muestras y controles.

### Determinación del Porcentaje de Identidad Nucleotídica (PIN)

a) Secuenciación: De las 22 muestras provenientes de perros positivos a CDV que generaron una banda fluorescente de tamaño molecular de alrededor de 450 pb, se enviaron a secuenciar en triplicado las provenientes de los individuos A, F y H (ver Cuadro 1). Las secuencias recibidas desde Genytec Ltda. se muestran en el Anexo 2. Mediante el programa *on line* Clustal W se obtuvo para cada trío de secuencias una secuencia consenso (Cuadro 3). Adicionalmente, al alinear las secuencias consenso entre sí, se determinó las identidades intersecuencias (Cuadro 4).

b) Porcentaje de identidad nucleotídica (PIN):

El ingreso individual de las secuencias consenso ingresadas al programa *on line* BLAST permitió determinar la identidad nucleotídica de cada una, respecto a los primeros 15 resultados entregados por Clustal W. Adicionalmente a modo de ejemplo se alineó cada secuencia con una de las cepas entregadas por Blast escogidas de manera aleatoria (Anexos 4, 5, 6; Cuadro 5), indicando sólo identidad nucleotídica respecto de datos de cepas de VDC.

## DISCUSIÓN

El Distemper Canino es una enfermedad contagiosa y en muchos casos fatal que afecta a variadas familias de mamíferos, principalmente carnívoros (Appel y Summers, 1999), siendo producida por el Virus Distemper Canino. Para su identificación existen distintas técnicas diagnósticas, dentro de las que se incluye la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a retrotranscripción (RT-PCR). Para ello se ha usado como blanco la mayoría de sus genes, sin embargo, dado el impacto tanto en animales domésticos como silvestres que produce la infección del VDC es que resulta necesario el establecimiento de una cada vez mejor técnica diagnóstica, lo que implica el estudio de todos sus genes como blanco para determinar cuál de ellos resulta en un mejor RT-PCR. Estudios recientes mantienen como gen de elección el gen N, tal como hacen Jiang *et al* el 2013 para la secuenciación nucleotídica completa de una cepa viral de VDC en China o Silva *et al* 2014 en su estudio sobre detección molecular de VDC y otros virus, o el uso del gen H, tanto para la determinación de 8 linajes del VDC (Sarute *et al*, 2013) así como para la identificación del linaje “Ártico” en un brote de DC en Italia (Di Sabatino *et al*, 2014), entre otros.

A la fecha no existen trabajos que usen como blanco el gen de la proteína grande L y por ello resulta atractiva dicha investigación.

El presente estudio determinó que para las condiciones establecidas, resulta efectivo el RT-PCR sobre el gen L como método diagnóstico para la detección de VDC.

De las 22 muestras de RNA analizadas, las 22 resultaron positivas a VDC, lo que corresponde a un 100%. En contraste con otros estudios de RT-PCR para VDC realizados en la misma Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, que usando como blanco el gen H arrojaron valores positivos de 7% (Salas, 2013) y 83% (Jara, 2011), y sobre el gen N un 91% (Muñoz, 2013). Estos resultados pudieran sugerir una mayor sensibilidad del RT-PCR sobre el gen L en comparación con otros genes.

En cuanto a los controles positivos y negativos, al visualizar el gel de agarosa al 2% en el transiluminador de luz UV, ambos controles positivos mostraron bandas fluorescentes nítidas de 450 pb mientras que ambos controles negativos, no arrojaron bandas para ningún tamaño molecular. Estos resultados podrían aventurar en primera instancia una alta especificidad del método instaurado.

A la luz de los resultados pudiera asumirse una alta sensibilidad y especificidad del RT-PCR sobre el gen L, sin embargo para confirmar tal afirmación se requieren estudios posteriores

orientados a pruebas diagnósticas que determinen parámetros de validez como son sensibilidad y especificidad, parámetros que no fueron evaluados en este estudio, así como tampoco fueron evaluados parámetros de eficacia.

Cabe destacar que de las 22 muestras analizadas y que finalmente resultaron positivas, 12 de ellas provenían de perros vacunados contra VDC, lo que corrobora estudios que señalan que la vacunación no genera una inmunidad completamente efectiva (Appel y Summers, 1999; Gemma *et al*, 1996), lo que sugiere la existencia de diferencias antigénicas importantes entre aislados de VDC de distintas áreas geográficas con las cepas vacunales, que pudieran ser responsables del resurgimiento de la enfermedad (Harder y Osterhaus, 1997).

Aunque el presente estudio sugiere que la RT-PCR del gen L es una buena prueba diagnóstica para el VDC, no determina parámetros de validez (especificidad y sensibilidad) ni de eficacia (valor predictivo positivo y valor predictivo negativo), los que debieran ser evaluados en estudios posteriores.

El haber confirmado la efectividad del RT-PCR sobre el gen L, aporta de gran manera a ampliar el conocimiento sobre el diagnóstico molecular sobre el VDC.

Los resultados de este trabajo, más los resultados previos obtenidos usando otros genes del VDC, llevan a la necesidad de realizar a futuro estudios comparativos entre las reacciones de RT-PCR, que usen como blanco los 6 genes del VDC. Estableciendo para cada uno de ellos parámetros de validez y eficacia que permitan de esta manera, determinar cuál de ellos constituye una mejor prueba diagnóstica para el VDC.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALCALDE, R.; KOGIKA, M.; FORTUNATO, V.; COELHO, B.; LOPES, L.; PAIVA, P.; DURIGON, E.** 2013. Canine distemper virus: detection of viral RNA by Nested RT-PCR in dogs with clinical diagnosis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50: 74-76.
- APPEL, M.; YATES, R.; FOLEY, G.; BERNSTEIN, J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L.; MILLER, L.; ARP, L.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B.** 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 277-288.
- APPEL, M.; SUMMERS, B.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* 44: 187-191.
- APPEL, M.; SUMMERS, B.** 1999. Distemper canino: Estado actual. [en línea] International Veterinary Information Service<[http://www.ivis.org/advances/infect\\_dis\\_carmichael/appel\\_es/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf)> [consulta: 27-01-2013].
- DI SABATINO, D.; LORUSSO, A.; DI FRANCESCO, C.; GENTILE, L.; DI PIRRO, V.; BELLACICCO, A.; GIOVANINNI, A.; DI FRANCESCO, G.; MARRUCHELLA, G.; MARSILIO, F.; SAVINI, G.** 2014. Arctic Lineage-Canine Distemper Virus as a Cause of Death in Apennine Wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Plos One.* 9(1): e82356.
- GEMMA, T.; WATARI, T.; AKIYAMA, K.; MIYASHITA, N.; SHIN, YS.; IWATSUKI, K.; KAI, C.; MIKAMI, T.** 1996. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo área. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 547-550.
- HARDER, T.; OSTERHAUS, A.** 1997. Canine distemper virus a morbillivirus in search of new host. *Trends. Microbiol.* 5: 120-124.
- 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 de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 16 h.
- JIANG, Q.; HU, X.; GE, Y.; LIN, H.; JIANG, Y.; LIU, J.; GUO, D.; SI, C.; QU, L.** 2013. Complete Nucleotide Sequence of Canine Distemper Virus HLJ1-06, Isolated from Foxes in China. *Genome A.* 1(1): e00065-12.
- KENNEDY, S.; KUIKEN, T.; JEPSON, P.; DEAVILLE, R.; FORSYTH, M.; BARRETT, T.; VAN DE BILDT, M.; OSTERHAUS, A.; EYBATOV, T.; DUCK, C.; KYDYRMANOV, A.; MITROFANOV, I.; WILSON, S.** 2000. Mass Die-Off of Caspian Seals Caused by Canine Distemper Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 6(6): 637-639.

**LAMB, R.; PARKS, G.** 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en Fields Virology, Williams y Wilkins, 5° edición. [en línea] <[http://books.google.cl/books?id=5O0somr0w18Cypg=PA1449ylpg=PA1449ydq=paramyxoviridae+the+virus+and+their+replication&source=blyots=FqpCleV48yysig=Sm5ovxCG7N6IDkAhNem3c\\_4AaN0yhl=es-419ysa=Xyei=4-U4UaDtKpTi8gT\\_6oGYCgyved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=paramyxoviridae%20the%20virus%20and%20their%20replication&f=false](http://books.google.cl/books?id=5O0somr0w18Cypg=PA1449ylpg=PA1449ydq=paramyxoviridae+the+virus+and+their+replication&source=blyots=FqpCleV48yysig=Sm5ovxCG7N6IDkAhNem3c_4AaN0yhl=es-419ysa=Xyei=4-U4UaDtKpTi8gT_6oGYCgyved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=paramyxoviridae%20the%20virus%20and%20their%20replication&f=false)> [consulta: 14-01-2013]

**MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M.; BELLACICCO, A.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; CARMICHAEL, L.; BUONAVOGLIA.** 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116 (4): 301-309.

**MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURO, S.** 1999. Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 37(9): 2936.

**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 de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 32 p.

**SAKAI, K.; NAGATA, N.; AMI, Y.; SEKI, F.; SUZAKI, I.; IWATA-YOSHIKAWA, N.; SUZUKI, T.; FUKUSHI, S.; MIZUTANI, T.; YOSHIKAWA, T.; OTSUKI, N.; KURANE, I.; KOMASE, K.; YAMAGUCHI, R.; HASEGAWA, S.; SAIJO, M.; TAKEDA, M.; MORIKAWA, S.** 2013. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan. *J. Virol.* 87(2): 1105-1114.

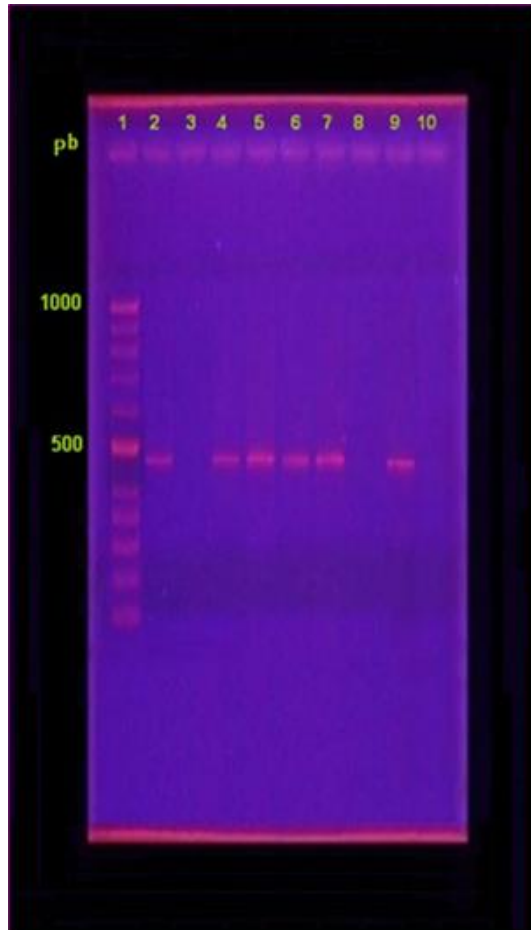
**SALAS, V.** 2013. Análisis filogenético del gen de la Hemaglutinina del Virus Distemper Canino en perros naturalmente infectados en Chile. Memoria de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 23 h.

**SARUTE, N.; GALLO, M.; PÉREZ, R.; LA TORRE, J.; HERNÁNDEZ, M.; FRANCIA, L.; PANZERA, Y.** 2013. The Fusion Protein Signal-Peptide-Coding Region of Canine Distemper Virus: A Useful Tool for Phylogenetic Reconstruction and Lineage Identification. *Plos One.* 8(5): e63595.

**SILVA, A.; BODNAR, L.; ARLINGTON, S.; FERNANDES, A.; ALCINDO, A.** 2014. Molecular detection of canine distemper virus (CDV), canine adenovirus A types 1 and 2 (CAV-1 and CAV-2), and canine parvovirus type 2 (CPV-2) in the urine of naturally infected dogs. *Semina: Ciencias Agrarias.* 35(6): 3231.

## FIGURAS

Figura 1: RT-PCR del gen L de VDC de muestras positivas y negativas del virus. Carril 1: MTM (marcador de tamaño molecular de 100 a 1000 pb). Carril 2: VDC (cepa Lederle). Carril 3: muestra negativa. Carril 4: muestra 1. Carril 5: muestra A. Carril 6: muestra H. Carril 7: muestra F. Carril 8: muestra negativa. Carril 9: VDC (cepa Onderstepoort). Carril 10: control de reactivos.



## CUADROS

Cuadro 1: Muestras de RNA positivas a VDC provenientes de perros de distintas razas, sexo, edad y estado de vacunación contra VDC (S/I: sin información)

CANINO	RAZA	SEXO	EDAD (años)	VACUNA
1	Poodle	Macho	6	S/I
2	Poodle	Macho	6	S/I
3	Mestizo	Hembra	2	SÍ
4	Mestizo	Macho	1	NO
5	Bulterrier	Hembra	2	SÍ
6	Mestizo	Hembra	1	SÍ
7	Mestizo	Hembra	3	NO
8	Mestizo	Macho	3,5	NO
9	Bóxer	Macho	2	S/I
10	Mestizo	Hembra	0,75	NO
11	Mestizo	Hembra	1,5	NO
12	Mestizo	Macho	1	SÍ
A	Mestizo	Macho	1,5	SÍ
B	Mestizo	Macho	2	NO
C	Mestizo	Macho	1,5	SÍ
D	Bóxer	Macho	3	SÍ
E	Labrador	Macho	1	SÍ
F	Bóxer	Macho	2	NO
G	Mestizo	Macho	2,5	SÍ
H	Mestizo	Hembra	1	SÍ
I	Labrador	Macho	1,5	SÍ
J	Mestizo	Macho	3	SÍ

Cuadro 2: Mezcla de reacción según fabricante para uso de “*SuperScript one step RT-PCR with platinum taq*”

Componentes	Volumen 50/ul	Concentración final
2x reaction mix	25	1x
Templado	5	
P1 (1 uM)	5	0,2 uM
P2 (1 uM)	5	0,2 uM
RT/Platinum	1	
Agua libre de nucleasas	9	



Cuadro 3: Secuencias de consenso obtenidas a partir de alineación mediante programa Clustal W

CANINO	SECUENCIA CONSENSO
A	CATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACCTTCAGGAACGAAAGGCTTC CAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACTATATGACACCCAAATTATCCAA GATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAGAAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGAT GCTCAGTCAACCTGGGACCAGTGAAGATAATTCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAAA TATTCAGACCAGTCTTGCATCAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAACTTAGGACCC AGGTCCAACAACCCGATCAATCATTTCATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGG CATAACCATGTGAGCAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCAG
F	AACCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACCTTCAGAGACGAAAGGC TTCCAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACTATGACACCCAAATTATC CAAGATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAA GATGCTCAGTCAACCTGGGACCAGTGAAGAAAATTTCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATT AAATATTCAGACCAGTCTTGAATCAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAACTTAGGA CCCAGGTCCAACAACCCGATCAATCATTTCATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAAC AGGAGTACCATGTGAGCAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCA
H	CCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACCTTCAGAGACGAAAGGCTT CCAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACAATGACACCCAAATTATCCA AGATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAATA TTCTCAGTCAACCTGGGACCAGTGAAGAAAATTTCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAA ATATTCAGACCAGTCTTGAACAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAACTTAGGACC CAGGTCCAACAACCCGATCAATCATTTCATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAG GACAACCATGTGAGCAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCAG

Cuadro 4: Identidades nucleotídicas intersecuencias para los caninos A, H y F, según Clustal W

Seq	Name	Lentgh	Seq	Name	Length	Score
1	Canino A	451	2	Canino F	453	97,56
1	Canino A	451	3	Canino H	452	97,12
2	Canino F	453	3	Canino H	452	98,45

Cuadro 5: Porcentaje de Identidad Nucleotídica (PIN) respecto de cepas de VDC según Blast

CANINO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD NUCLEOTÍDICA (PIN)
A	94,8
F	94,4
H	93,8

**Anexo 1: Secuencia nucleotídica del gen L de Virus Distemper Canino. NC\_001921.1  
9030 - 15584**

```

TGGACTCTGT ATCAGTGAAC CAGATTCTAT
9061 ACCCTGAGGT CCATCTAGAT AGCCCAATTG TAACCAATAA GCTAGTATCT ATTTTAGAAT
9121 ACGCACGAAT TAGACATAAC TATCAGCTCC TTGATACAAC ATTAGTGCGT AATATCAAAG
9181 AGAGAATTTT AGAAGGGTTC TCAAACCAGA TGATCATTAA CTGCATCGAA ATTGGGAGCA
9241 TTATTAATCA GACCTTGTTA TCTTATCCCA AACACAACCA TGTGATATAC CCAAATTGCA
9301 ACAAACCTTCT ATTTTCATGCA CAGGATCGAG TCATCTCTCT GAGGCTGAGA AATATATATCA
9361 AAAGAGGAAA TAGCATCTAT AGCAAAATAA CAGACGGGGT CAAAAAATGC TTAAACGATA
9421 TTAATCTTAA TATTGGTTTA GGGGGTGCAC TGGACAAGAC TATTGGGACC AAAATTGATG
9481 AAGCAGGCAT AATTATGCAA AGCTCACAGT GGTTCGAACC TTTCCTTCTA TGGTTTACAA
9541 TTA AACACAGA AATGAGATCA GTGATTA AAT CCTCTACTCA CAACTGTCCG AAGCGGAGGC
9601 AGAACCCCTGT CTTTGTA AAA GGTGAATCAT TGAATGTGTT AGTCTCTAGG GACCTTGATG
9661 CCTTCTTTAG AAGTTTCGGT CACC CAAGGT CACATGTTTT ATTACCTAAC ATTTGAAATG GTCCTGATGT
9721 ACTGTGATGT AATAGAAGGG AGGCTAATGA CTGATACTGC TATGGCAATT GATCAACGTT
9781 ACTCAACTTT GCATGTCAGG ATCAGGTATC TCTGGGATCT AATTGACGGA TTCTTCCCGG
9841 ATCTGGGAAA TTCAACCTAT CAATTGGTGG CTCTACTGGA GCCTCTCTCA TTGGCTTACT
9901 TGA AAT TAAA AGACATCACC TTCTCTCTCA GGGGTGCTTT TCTGAGTCAC TGCTTTGCTG
9961 AAATTCAGGA GATTTTACAG GACAATGGCT TCTATACTGA AGAGACGTTT CAAACTTTAA
10021 CCAAAGCTCT AGACTTCGTT TTCATCACAG AGGATATACA TATAACAGGA GAAATCTTTT
10081 CCTTCTTTAG AAGTTTCGGT CACC CAAGGT TAGAAGCAAT AACAGCAGCA GAGAACGTAC
10141 GGAAACACAT GAATCAACCC AAAGTTGTCT CCTATGAGAC TATGATGAAG GGACACGCTA
10201 TATTCTGTGG GATAATCATT AACGGTTATC GGGATAGACA TGGGGGGACT TGGCCTCCGA
10261 TGGATCTTCC TGTCATGCA TCTCCTATCA TCAGAAATGC TCATGCCTCA GGGGAGGGA
10321 TCACCTATAG TCAATGTATA GAAAATTGGA AATCCTTCGC AGGAATTCCA TTTAAATGCT
10381 TTATGCCTCT TAGCCTAGAC AGTGATTTGA CCATGTACCT GAAAGATAAG GCTTTGGCAG
10441 CCCTAAGAAA AGAGTGGGAC TCAGTGTACC CAAAAGAATT CCTCAGGTAC AATCCCAGTC
10501 GCTCCACTGA GTCTCGGAGA CTTGTTAATG TGTTTCTAGA GGACTCTCAG TTTGACCTT
10561 ATAACATGAT TATGTACGTT ATCTCAGGTC AATATCTAGA AGATCCTGAT TTCAACCTAT
10621 CATAACGCTT CAAAGAGAAA GAGATTA AAG AGGTAGGGAG ATTATTCGCT AAAATGACCT
10681 ACAAATGCG AGCCTGTCAG GTCATAGCAG AAAACTTGAT ATCTAATGGA ATTGGGAAGT
10741 ACTTCAAGGA CAATGGGATG GCAAAGGATG AACACGATCT CACTAAATCA TTGCACACTC
10801 TGGCTGTGTC CGGGGTCCG AAAGACAAGA AAGATTCCCA TCGTGGCCTC ACTAACCAGC
10861 GTAAATCCCT GAAGCCTGCA CCTTATCGAG GAACCCGTCA CTCCGTCTCT TCCCCAGTA
10921 GTAGATATAT AGACCCAAAC CCAAATTTTT GCACCAGTAG AAGAGAAGAC AATGACATAG
10981 AGATCTATGA AACTGTAAGT GCATTTATAA CTACAGATCT CAAAAGTAC TGTCTGAATT
11041 GCGTTATGA GACCATCAGT ATTTTGTCTC AGAGAT TAAA TGAAATCTAT GGTCTCCCCT
11101 CATTTTTCCA ATGGTTGCAC AGAAGATTGG AACAGTCGAT CTTATACGTA AGTGACCCCC
11161 ACTGCCCTCC AGATCTCGAT CGTCATGTGG ACTTGAATAC AGCCCCTAAC TCTCAAATAT
11221 TCATCAAATA CCAATGGGA GGGGTGGAGG GGTATTGTCA GAAGTTATGG ACTATTAGCA
11281 CCATACCTTA TCTGTACTTG GCGGCACATG AGAGTGGTGT CAGAATTGCA TCACCTGTCC
11341 AAGGTGATAA CCAAAC TATT GCTGTCACTA AAAGAGTACC AAGCACCTGG TCCTATGCCT
11401 TGAAGAAATC TGAAGCCAGT CGAGTGACCA CAGAATACTT TATAGCCTTG AGACAGAGGT
11461 TACATGATGT CGGACATCAT TTGAAAGCAA ATGAAACAAT AATCTCTTCC CACTTTTTTG
11521 TATACTCAA AGGAATCTAT TATGATGGAA TGTTAATTTT ACAATCCCTG AAGAGTATAG
11581 CTAGGTGTGT ATTTTGGTCA GAAACAATAG TGGATGAGAC CCGAGCCCGG TGCAGCAACA
11641 TTCAACAAC ATTAGCGAAA GCCATTGAGA AAGGGTTTGA CCGATATTTA GCCTAACCGC
11701 TGAACATTTT AAAAATCATC CAACAAGTAT TAATTTTATT AGGATTCACT ATCAATCAG
11761 CGATGACACG GGATGTGATA GAACCCCTCT TACAAGATCA CTGTCTCTTG ACCAAGATGG
11821 CAATCTCCC CGCACCCATT GCGGTTTTTA ATTACCTCAA TATGAGTAGG CTCTTTGTCA
11881 GGATATCGG GGATCCCGTG ACATCTTCTA TTGCTGACCT CAAACGAATG ATCCGATCAG
11941 GCCTTCTTGG AGTGGAGATT CTACATCAGG TCATGACTCA ATACCCAGGT GACTCTTCTT
12001 ATTTAGATTG GGCAAGTGAC CCTTATTCTG CCAATCTGCC CTGTGTCCAG AGCATAACCC
12061 GACTCCTTAA AATATCACA GCTAGGCATG TCCTTATCAA CAGTCCAAAT CCGATGCTGA
12121 GAGGATTGTT CCATGATGAA AGTCAGGATG AGGATGAAGC TTTAGCAGCT TTCTTGATGG
12181 ATAGGAAAAT TATTATCCCA AGGGCTGCAC ATGAAATCTT GGATAACACA ATCACGGGTG
12241 CAAGAGAGGC AATTGCCGGA ATGCTAGACA CCACAAAGGG GTTGATAAGA GCAAGCATGA
12301 AAAGAGGAGG TCTAACCCTT AGAATAATAA CCCGTTTGTG AACTTACGAT TATGAGCAAT

```

12361 TTAGGGCAGG TATCAGACTG TTCTCAGGGA AGGGGCATGA TCAGCTCATC GATCAAGACT  
12421 CATGTTCCGT CCAGTTAGCG AGAGCATTAA GGAACCACAT GTGGGCCAAG CTGGCGAAGG  
12481 GTCGTCCTAT TTATGGTCTA GAAGTCCCAG ATATCCTTGA ATCAATGAAG GGTTATATGA  
12541 TTAGAAGACA TGAATCCTGT TTGCTTTGCG CATCAGGCTC TCATAACTAT GGTTGGTTTT  
12601 TTATAACCAGC GAATTGCCAA TTGGATAGTA TTACAGAGGG AACATCTGCA CTGAGGGTGC  
12661 CATACATAGG GTCCACAACA GAAGAAAGAA CAGACATGAA ACTAGCATTC GTCAAATCTC  
12721 CTAGTAGGTC TCTAAAATCA GCAGTGAGAA TAGCAACTGT GACTCATGG GCCTATGGTG  
12781 ATGATGACGA ATCTTGCCAA GAGGCTTGGA CCTTGGCAA ACAGAGAGCG GACATCTCAC  
12841 TTGAGGAATT ACGAATGATT ACCCCAATTT CCACTTCTAC TAATCTAGCT CACCGACTAA  
12901 GAGACAAGAG TACTCAAGTC AAATACTCAG GGACCTCTCT CATCAGAGTA GCCCGTATG  
12961 CAACTATCTC GAATGATAAT CTTTCTTTTA TTATAGATGA CAAGAAAGTG GACACAAATT  
13021 TTATTTATCA ACAAGGTATG CTCCTGGGCC TGGGGATCCT TGAGCACTTA TTTAGATTGT  
13081 CTCAACCAC CGGCGACTCT AACACCGTGT TACATTTACA TGTTGAAACA GATTGTTGCG  
13141 TAATACCCAT GAGTGACCAT CCAAGAGTCC CAGGGCTCAG AAAGGTCGTC ATACCAAGAA  
13201 ATATTTGTAC AAATCCTTTG ATTTATGACA GTAACCCTAT TATTGAGAAA GATGCAGTCA  
13261 GACTTTATAA CCAGAGTCAC AGAAAGCACA TTGTAGAGTT TGTACATGG ACAACAGGC  
13321 AGCTTTATCA TGTGCTAGCT AAATCTACTG CTATGTCTAT GGTGAGATG ATTACAAAGT  
13381 TTGAAAAGGA CCACCTAAAT GAAGTCACTG CGTTAATTGG CGATGATGAT ATCAATAGTT  
13441 TTATCACTGA GTTCTTCTA GTTGAGCCTA GATTATTTAC TGTATATCTA GGTCAATGTG  
13501 CTGCAATCAA CTGGGGCTTT GAAATTCATT ATCACCACC TTCTGGAAAG TACCAAATGG  
13561 GTGAGTTGTT GTTCTCTTTC CTGAGTAGAA TGAGTAAAGG AGTCTTCAA ATTTTAGCCA  
13621 ATGCATTGAG CCATCCTAAA GTATATAGAC GGTTTTGGGA CAGTGGGATG ATTGAACCTG  
13681 TTCATGGACC CTCTCTTGAC TCCAAAAC TACATATAAC TGTATGCAAC CTGACTATA  
13741 ACTGTTACAT GATTTACCTA GACCTTCTGT TAAATGATGA ATTAGATGAT TTCTCATCA  
13801 TTTTATGCGA AAGTGACGAG GATGTCATAC CTGAAAGATT TGACAACATA CAAGCCAGGC  
13861 ACCTATGCAT CTTATCTGAC CTTTATTGTA ACCCTCGTGA TTGTCCCCAG ATTCGTGGGT  
13921 TGACACCAAC ACAGAAATGT GCTGTGTTGT CGGGGTACTT AAAATCAAAA GCCCTAGAAT  
13981 CCCATGTTGG TCTGACATGG AATGACAAAC CTATCTTAAT AGATCAATAT TCATGTTCCC  
14041 TGACATATCT TAGAAGAGGC TCAATCAAGC AGATAAGATT GAGAGTGGAT CCCGGATTCA  
14101 TCACTGATGC TGTGGATGC TTAGAAAGCC GTCCCTAAG AAATAATTCT CTTCTGAGT  
14161 CCTCAGAATT AACGTCAGGA TTTGACCCAC CGAAAGATGA CTTGGCTAAA CTTCTGAGT  
14221 AGCTGTCAAC AAGGACACAT AACTTACCTA TTACAGGATT AGGAGTCCGG AACTATGAGG  
14281 TTCATTCATT CAGAAGAATT GGGATCAACT CTAAGCATG TTACAAGGCA GTTGAATAG  
14341 CTCCGTGAT TAAGAACGAA TTTACGTCTG AAGAACACGG ATTATTCCTA GGAGAAGGTT  
14401 CAGGTGCAAT GTTGACAGTA TATAAAGAGC TATTAAGATT GTCAAGATGT TATTATAACA  
14461 GTGGTGTGTC GGTAGAATCC AGAACTGGAC AACGAGAGAT TTCACCTTAC CCTTCTGAGG  
14521 TCAGTCTGGT GGAACATCAA TTAGGACTCG ATAAATTGGT GACTGTGCTT TTCAATGGGA  
14581 GACCAGAAGT AACTTGGGTT GGGAGTGTG ATTGTTACAA GTACATACTG AGCCAGATCT  
14641 CTGCTAGCAG TCTTGGGTTG ATTCACTCGG ATATAGAGTC ACTACCGGAT AAAGACATAA  
14701 TTGAAAAGTT GGAAGAATTG TCTGCTATAT TATCAATGAC TTTGATATTA GGAAGGTAG  
14761 GGTCAAGTGT AGTAATTAAG ATCATGCCAG TTAGTGGCGA CTGGGTTCAA GGATTTATTT  
14821 TGATGCACAT CCCACATTTT CTTCGAAGTT TCATAGTTTA CCCAAGATAC AGCAATTTTG  
14881 TGCAACAGA GGCCTACCTT GTTTTACC GTCCTAGAGC AGGGAGACTA ATCAATCCTG  
14941 AGGGGATTAA ACAACAGATT TTGCGAGTCG GTATTGCAAC TTCACCCGGG TTGGTAGGGC  
15001 ACATCCTTTC ATCAAAGCAG ACAGCATGTG TGCAGTCTTT GCATGGACCT CCATTTTCATG  
15061 CTAAATCTTT CAATCCTCAC CTTCAGGGTT TAACAAGTAT TGAGAAGGTA TTAATCAATT  
15121 GTGGGCTTAC AATTAATGGT CTAAAGTAT GTAAGAACCT GCTTCACCAT GATATTTCTG  
15181 CAGGCGAGGA AGGGCTGAAA GGATCTATCA CGATCCTTTA CCGGGAACCT GCAAGTTCA  
15241 AGGATAACCA CCAATCTTCA CATGGAATGT TCCATGCATA CCCTGTGTTA ATCGCAAGT  
15301 AGGAAAGGGA GCTCGTATCT ATCATTGCAA AGAAGTACTG TGGCTATATT TTGCTGTACT  
15361 CGGGCGACTT ATACGAAATT ACCAGGATTG TCCGAAACCT GAAAGCCAAC CACATAATTT  
15421 TCGACCTGCA TCGTAATTTA TTCATGGATA ATCTGTCCAG ATCTGACAGG TCTCTCATCC  
15481 TAACGACAAT CCCCAAAAAG AATTGGCTCT TTCAGCTCGA GACAAAAGAG ATAAAGGAGT  
15541 GGTCAAAATT ATTAGGTTAT AGTGCACCTGA TTAGAAATCA CTGA

**Anexo 2:** Secuencias de los triplicados de muestras de caninos A (DP1, DP2 y DP3), H (DP4, DP5 y DP6) y F (DP7, DP8 y DP9) obtenidas por el Centro de Secuenciación Genytec Ltda.

>DP1

```
CATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACTTCAGGAACGAAAGGCTTCCAGG
GTATACCCCAGATTTCAACAGTTCTGAATTGAGTGAGTCACTATATTACACCCAAATTTCCAAGATTATTG
AAATTACGATTATCGGAAATCGATTGAAGAAATCGCCAAGATTAGGATTCTTACTAAGATTCTCAGTCAACC
TGGGACCAGTGAAGATAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATCAAGACCAGTCT
TGCATCAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAECTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATCA
ATCATTATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATTGCAGAGGAACAGGCATACCATTTTCAGCAAAGGGCTGG
AATTCCTCAAAGCCCT
```

>DP2

```
CATCAACAAGAGGTTCAGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACTTCAGGAACGAAAGGCTTCAAGG
GTATACCCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACTATATGACACCCAAATTTCAAAGATGATGG
AAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAGAAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACC
TGGGACCAGTGAAGATAATCTCATGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATCAAGACCAGTCT
TGCATCAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAECTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATCA
ATCATTATCAGACCACCCGTTCTATCACTAAATGGCAGAGGAACAGGCATACCATGTCAGCAAAGGGCTGG
AATGCCTCAAAGCCCTC
```

>DP3

```
ATCAACAAGAGGTCCGTAACCAGGGAGGAGACTAATACCCCATTCACTTCAGGAACGTAAGGCTTCCAGGG
TATACCCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACTATATGACACCCAAATTTCCAAGATGATGGT
AATGACGATGATCGGTAATCGATGGAAGAAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACCT
GGGACCAGTGAAGATAATCTCCTGTTTATAGTGATTAAGAGCTACTCAATTTAATATCAAGACCAGTCTT
GCATCAGTCAACAATTATCATTCTTAACTCATTATTAATAAECTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATCAA
TCATTATCCGACCACCCGTTCTATCCCTTAATGGCAGAGGAACAGGCATACCATGTCAGCTAAGGGCTGGA
ATGCCTCTAAGCCCTCAG
```

>DP4

```
CATTGGTAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACTTCAGAGACGAAAGGCTTCCAGG
GTATACCCCAGATGTTGGTAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACTATGACACCCAAATTTCCAAGATGATGG
AAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTTGGTC
TGGGACCAGTGAAGAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATCAAGACCAGTCT
TGAATCAGTTGGTAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAECTTAGGACCCAGGTCTGGTAAACCCGATCA
ATCATTATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGAGTACCATGTCAGCAAAGGGCTGG
AATGCCTCAAAGCCCTCA
```

>DP5

```
ACCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACTTCAGAGACGAAAGGCTTCCA
GGGTATACCCATATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACTATGACACCCAAATTTCCAAGATGATGG
GGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAA
CCTGGGACCAGTGAAGAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATCAAGACCAGT
CTTGAATCAGTCAACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAECTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGAT
CAATCATTATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGTATAGGAACAGGAGTACCATGTCAGCAAAGGGCT
GGAATGCCTCAAAGCCCTTA
```

>DP6

```
AACCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCAAATACAATAGAGACGAAAGGCAATC
AGGGTATACCCCAGATGTCAACAGAATTGAATGGAGTGAGTCACTATGACACCCAAATTTCCAAGATGA
TGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCA
ACCTGGGACCAGTGAAGAAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATTAATAAGACCAG
TCTTGAATCAGTCAACAATTATCAAATTAACCTCATTATAAAAAAECTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGA
TCAATCAAATATCCGACCACCCGAATTAATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGAGTACCATGTCAGCAAAGGGC
TGGAAATGCCTCAAAGCCCT
```

>DP7

CATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCCTTCAGAGACGAAAGGCTTCCAGG  
GTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACAATGACACCCAAATAATCCAAGATGATGG  
AAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAAAATGCTCAGTCAACC  
TGGGACCAGTGAAGAAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCATTTAAATATCAAGACCAGTCT  
TGAAACAGTCAACAATTTTCATTCTAAACTCATTATAAAAAACTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATCA  
ATCATTATCCGACCACACGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGACAACCATGTCAGCAAAGGGCTGG  
AATGCCTAAAAGCTCTCAG

>DP8

CCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACTAATACCCCATTCCTTCAGAGACGAAAGGCTTCCAA  
GGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACAATGACACTCAAATATCCAAGATGATA  
GAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATACTCAGTCAAC  
CTGGGACCAGTGAAGAAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAATAGCTACTCAATTAATATCAAGACCAGTC  
TTGAAACAGTCAAAAATATCATTCTAAACACATTATAAAAAACTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATC  
AATCATTCATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGACAACCATGTCAGCAAAGGACTG  
GAAAGCCTCAAAGCCCTCA

>DP9

CCATCAACAAGAGGACCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCCTTCAGAGACGAAAGGCTTCCAG  
GGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACAATGACACCCAAATATCCAAGATGATG  
GAAATGACGATGATAGGAAATCGATGGAAACAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAATATTTCTCAGTCAAC  
CTGGGACCAGTGAAGAAAAATCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGATACTCAATTAATATCAAGACCAGTC  
TTGAAACAGTCAACAATATCATTCTAAACTCATTATAAAAAACTTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATC  
AAACATTCATCCGACCACCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGACAACCATGTCAGCAAAGGCTG  
GAATACCTCAAAGCCCTC

**Anexo 3:** Diseño de partidores según OligoPerfect™ Designer de *Life Technologies*™

```

1301 TCAATGTRTAGAAAATTGGAAATCCTTCGCRAGGAATTCGATTTBAATGCTTTTATGCTCTTAGCCTAGACAGTGAATTTGACCATGTACCTGAAAGATRAG
1401 GCTTTGGCAGCCCTTAGAAAAGGTGGGACTCAGTGTCCCAAAGGARTTCCTCAGGTACAATCCGCCTCGCTCCACTGAGTCTCGGAGACTTGTTRATG
1501 TGTTTC TAGAGGACTCTCAGTTTGACCCCTTATACATGATTTATGTACGTTTATCTCAGGTCAATATCTTAGAAGATCCTGATTTCAACCTATCAATACAGTCT
1601 CAAAGAGAAAAGAGATTAAAGAGGTAGGGAGATTTATTCGCTTAAATGACCTTCAAAAATGCGAGCCTGTTCAGGTCAATAGCAGAAAACCTTGATATCTAATSGA
1701 ATTGGGAAGTACTTCAAGGACCAATGGGATGGCAAGGATGACACCGATTCACATRAATCATTGCAACACTCTGGCTGTGTCCGGGGTTCCGAAAGACAGA
1801 AAGATTCCCATCTGTGGCTCACATACCCAGCGTAAATCCCTTAAGCCTGCACCTTATCGAGGAACCCCGTCACTCCGCTCTTCCCAAGTAGTAGATATRT
1901 AGACCCAAACCCAAATTTTTCACCCAGTGAAGAGAAAGACATGACATAGAGATCTRTGAACTGTAGTGCATTTTATACATACAGATCTCAAAAAGTAC
    
```

Rank: 1   Product Length: 457   Product Region: 1404-1860				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> PGL 1 F	45.00	FWD	20	59.95
<input type="checkbox"/> PGL 1 R	55.00	REV	20	59.98
5' Addition	Primer Sequence			
		T T G G C A G C C C T A A G A A A G A		
		C T C G A T A A G G T G C A G G C T T C		

## Anexo 4:

### a) Identidad nucleotídica según programa Blast: Canino A (94,8%)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, complete genome</a>	800	800	100%	0.0	99%	<a href="#">AF014953.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome</a>	795	795	100%	0.0	98%	<a href="#">AF305419.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome</a>	778	778	100%	0.0	98%	<a href="#">AF378705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome</a>	761	761	100%	0.0	97%	<a href="#">JN896987.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome</a>	761	761	100%	0.0	97%	<a href="#">GU138403.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Shuskiv, complete genome</a>	695	695	100%	0.0	94%	<a href="#">HM063009.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome</a>	695	695	100%	0.0	94%	<a href="#">HM046486.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDV3, complete genome</a>	689	689	100%	0.0	94%	<a href="#">EU726268.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome</a>	673	673	100%	0.0	94%	<a href="#">AY542312.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome</a>	673	673	100%	0.0	94%	<a href="#">AY466011.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome</a>	673	673	100%	0.0	94%	<a href="#">AY445077.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain A75/17, complete genome</a>	656	656	100%	0.0	93%	<a href="#">AF164967.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 164071, complete genome</a>	651	651	100%	0.0	93%	<a href="#">EU716337.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 01-2689, complete genome</a>	640	640	100%	8e-180	92%	<a href="#">AY649446.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 00-2601, complete genome</a>	634	634	100%	4e-178	92%	<a href="#">AY443350.1</a>

### b) Ejemplo de alineamiento con secuencia AY445077.21

Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome  
 Sequence ID: [gb|AY445077.2|](#) Length: 15690 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1409 to 1859 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	0.0	422/451(94%)	0/451(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATCAACAAGAGGTC	CGAAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCATTCACTTCAGGAACGA	60	
Sbjct 1409	CATCAACAAGAGGTC	CGAGAACCAAGGAGGAGACAAATACCCATCCACTTCAGTGATGA	1468	
Query 61	AAGGCTTCCAGGGTATACCC	CAGATGTCAACAGTTCTGAAATGGAGTGAGTCACTATATGA	120	
Sbjct 1469	ACGGTTTCCGGGGTATACCC	CAGATGTCAACGGCTCCGAATGGAGTGAATCACGCTATGA	1528	
Query 121	CACCCAAATATTC	CAAGATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAAGAAATCGC	180	
Sbjct 1529	TACCCAAACTATT	CAAGATGATGGAAACGACGATGACCGGAAATCGATGGAAAGCAATCGC	1588	
Query 181	CAAGATGAGGATGCTTACTA	AGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTGAAGATAATTTCTCC	240	
Sbjct 1589	CAAGATGAGAATGCTTACTA	AGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTGAAGATAATTTCTCC	1648	
Query 241	TGTTTATAGTGATAAAGAGCT	ACTCAATTAATATTCAGACCAAGTCTTGCATCAGTCAA	300	
Sbjct 1649	TGTTTATAATGATAGAGAGCT	ACTCAATTAATATTCAGACCAAGTCTTGCATCAGTCAA	1708	
Query 301	CAATTATCATTCTAAACTC	ATTATAAAAAAATAGGACCCAGGTCACAAACCCCGATCA	360	
Sbjct 1709	CAATTATCATTCTAAACTC	ATTATAAAAAAATAGGACCCAGGTCACAAACCCCGATCA	1768	
Query 361	ATCATTATCCGACCCACCCG	TTCATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGCATACCATGTCA	420	
Sbjct 1769	ACCATTATCCGACCCACCCG	TTCATCCCTAAATGGCAGAGGAGGAGGCTACCATGTCA	1828	
Query 421	GCAAAGGGCTGGAATGCCT	CAAAGCCCTCAG 451		
Sbjct 1829	GCAAAGGGCTGGAATGCCT	CAAAGCCCTCAG 1859		

## Anexo 5:

### a) Identidad nucleotídica según programa Blast: Canino F (94,45%)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, complete genome</a>	798	798	100%	0.0	98%	<a href="#">AF014953.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome</a>	793	793	100%	0.0	98%	<a href="#">AF305419.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome</a>	776	776	100%	0.0	98%	<a href="#">AF378705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome</a>	758	758	99%	0.0	97%	<a href="#">JN896987.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome</a>	758	758	99%	0.0	97%	<a href="#">GU138403.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Shuskiy, complete genome</a>	691	691	99%	0.0	94%	<a href="#">HM063009.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome</a>	691	691	99%	0.0	94%	<a href="#">HM046486.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDV3, complete genome</a>	686	686	99%	0.0	94%	<a href="#">EU726268.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome</a>	667	667	99%	0.0	93%	<a href="#">AY542312.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome</a>	667	667	99%	0.0	93%	<a href="#">AY466011.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome</a>	667	667	99%	0.0	93%	<a href="#">AY445077.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain A75/17, complete genome</a>	660	660	100%	0.0	93%	<a href="#">AF164967.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 164071, complete genome</a>	654	654	100%	0.0	93%	<a href="#">EU716337.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 01-2689, complete genome</a>	643	643	100%	0.0	92%	<a href="#">AY649446.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 00-2601, complete genome</a>	634	634	99%	4e-178	92%	<a href="#">AY443350.1</a>

### b) Ejemplo de alineamiento con secuencia AY466011.21

Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome  
Sequence ID: [gb|AY466011.2|](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 1408 to 1858 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
667 bits(361)	0.0	421/451(93%)	0/451(0%)	Plus/Plus
Query 3	CCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCGGGAGGAGACAATACCCATTCACCTTCAGAGACG			62
Sbjct 1408	CCATCAACAAGAGGTCCGAGAACAAGGAGGAGACAATACCCATTCACCTTCAGTGATG			1467
Query 63	AAAGGCTTCCAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAAATGGAGTGAGTCACACTATG			122
Sbjct 1468	AACGGTTTCCGGGGTATACCCAGATGTCAACGGCTCCGAATGGAGTGAATCACGCTATG			1527
Query 123	ACACCCAAATTCAGATGATGGAATCAGCATGATCGGAAATCGATGGAACAATCG			182
Sbjct 1528	ATACCCAAACTATTCAAGATGATGGAACCACGATGACCGGAAATCGATGGAAGCAATCG			1587
Query 183	CCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTGAAGAAAATTCTC			242
Sbjct 1588	CCAAGATGAGAATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTGAAGATAGTTCTC			1647
Query 243	CTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATTCAAGACCAAGTCTTGAATCAGTCA			302
Sbjct 1648	CTGTTTATAATGATAGAGAGCTACTCAATTAATATTCAAGACCAAGTCTTGCATCAGTCA			1707
Query 303	ACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAATTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATC			362
Sbjct 1708	ACAATTATCATTCTAAACTCATTATAAAAAAATTAGGACCCAGGTCCAACAAACCCGATC			1767
Query 363	AATCATTCATCCGACCCCGTTCTATCCCTAAATGGCAGAGGAACAGGAGTACCATGTC			422
Sbjct 1768	AACCATTCATCCGACCCCGTTCCATCCCTAAATGGCAGAGGAGCAGGCTACCATGTC			1827
Query 423	AGCAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCA		453	
Sbjct 1828	AGCAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCA		1858	



**Anexo 6:**

**a) Identidad nucleotídica según programa Blast: Canino H (93,8%)**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, complete genome</a>	774	774	100%	0.0	98%	<a href="#">AF014953.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome</a>	769	769	100%	0.0	97%	<a href="#">AF305419.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome</a>	752	752	100%	0.0	97%	<a href="#">AF378705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genom</a>	736	736	100%	0.0	96%	<a href="#">JN896987.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome</a>	736	736	100%	0.0	96%	<a href="#">GU138403.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Shuskiy, complete genome</a>	675	675	100%	0.0	94%	<a href="#">HM063009.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome</a>	675	675	100%	0.0	94%	<a href="#">HM046486.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDV3, complete genome</a>	669	669	100%	0.0	93%	<a href="#">EU726268.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome</a>	647	647	100%	0.0	92%	<a href="#">AY542312.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome</a>	647	647	100%	0.0	92%	<a href="#">AY486011.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome</a>	647	647	100%	0.0	92%	<a href="#">AY445077.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain A75/17, complete genome</a>	636	636	100%	1e-178	92%	<a href="#">AF164967.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 164071, complete genome</a>	630	630	100%	5e-177	92%	<a href="#">EU716337.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 01-2689, complete genome</a>	619	619	100%	1e-173	91%	<a href="#">AY649446.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 00-2601, complete genome</a>	614	614	100%	5e-172	91%	<a href="#">AY443350.1</a>

**b) Ejemplo de alineamiento con secuencia AY542312.2**

Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome  
 Sequence ID: [gb|AY542312.2](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 1408 to 1859 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	418/452(92%)	0/452(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCATTCACTTCAGAGACG	60		
Sbjct 1408	CCATCAACAAGAGGTCCGAGAACCAGGGAGGAGACAAATACCCATCCACTTCAGTGATG	1467		
Query 61	AAAGGCTTCCAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCACACAATG	120		
Sbjct 1468	AACGGTTCCGGGGTATACCCAGATGTCAACGGCTCGAATGGAGTGAATCAGCCTATG	1527		
Query 121	ACACCCAAATATCCAAGATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAACAATCG	180		
Sbjct 1528	ATACCCAAACTATTCAAGATGATGGAAACGACGATGACCGGAAATCGATGGAAAGCAATCG	1587		
Query 181	CCAAGATGAGGATGCTTACTAATATTCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTCAAGAAAAATTC	240		
Sbjct 1588	CCAAGATGAGAAATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAAGTGAAGATAGTTCT	1647		
Query 241	CTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAATTAATATTCAAGACCAAGTCTTGAAACAGTCA	300		
Sbjct 1648	CTGTTTATAATGATAGAGAGCTACTCAATTAATATTCAAGACCAAGTCTTGATCAGTCA	1707		
Query 301	ACAATTATCATTCTAAACTCAITATAAAAAAATTAGGACCCAGGTCCAACAACCCGATC	360		
Sbjct 1708	ACAATTATCATTCTAAACTCAITATAAAAAAATTAGGACCCAGGTCCAACAACCCGATC	1767		
Query 361	AATCATTCATCCGACCCCGTTCATCCCTAAATGGCAGAGGAAACAGGACAACCATGTC	420		
Sbjct 1768	AACCATTCATCCGACCCCGTTCATCCCTAAATGGCAGAGGAGCAGGCTACCATGTC	1827		
Query 421	AGCAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCAG	452		
Sbjct 1828	AGCAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGCCCTCAG	1859		