



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

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN DE LA HEMAGLUTININA  
DEL VIRUS DISTEMPER CANINO EN PERROS INFECTADOS  
NATURALMENTE EN CHILE**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE HEMAGGLUTININ GENE OF  
CANINE DISTEMPER VIRUS DETECTED IN NATURALLY  
INFECTED DOGS IN CHILE**

**VERÓNICA PAZ SALAS RETAMAL**

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

**PROFESOR GUÍA  
CARLOS NAVARRO VENEGAS**

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FIV 121014019102010

**SANTIAGO, CHILE  
2013**



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

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN DE LA HEMAGLUTININA  
DEL VIRUS DISTEMPER CANINO EN PERROS INFECTADOS  
NATURALMENTE EN CHILE**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE HEMAGGLUTININ GENE OF  
CANINE DISTEMPER VIRUS DETECTED IN NATURALLY  
INFECTED DOGS IN CHILE**

**VERÓNICA PAZ SALAS RETAMAL**

NOTA FINAL: .....

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

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: JOSE PIZARRO LUCERO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO.....	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2013**

## **RESUMEN**

Las enfermedades infecciosas emergentes constituyen uno de los mayores desafíos que enfrenta tanto la salud humana como animal, así como la conservación de la biodiversidad. El virus distemper canino ha llamado fuertemente la atención en este aspecto, ya que posee una alta prevalencia en la población canina mundial.

El distemper canino es una enfermedad viral sistémica y altamente contagiosa, siendo una de las principales causas de muerte en caninos domésticos y otros carnívoros.

En los últimos años, la incidencia de distemper canino parece haber aumentado, documentándose la aparición de nuevas e inusuales cepas; las razones que explicarían estos cambios y sus efectos en su epidemiología aún son desconocidas.

El virus distemper canino posee un alto grado de heterogeneidad genética, principalmente dado por la proteína hemaglutinina, la que demuestra patrones geográficos de diversificación que se utilizan para monitorear la epidemiología molecular del virus.

En esta memoria de título se detectó el gen de la hemaglutinina (gen H) del virus distemper canino mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa previa transcripción reversa, se secuenció el fragmento de ADN amplificado y esta secuencia nucleotídica se incluyó en el análisis filogenético para el gen H utilizando secuencias oficiales y conocidas de virus distemper canino, incluyendo a las cepas vacunales utilizadas para la prevención de la enfermedad (Genbank®). Los resultados evidencian que en Chile al menos existirían dos de los linajes conocidos para VDC: Europa y América 1.

**PALABRAS CLAVE:** distemper canino, hemaglutinina, vacuna.

## **ABSTRACT**

Emerging infectious diseases constitute one of the biggest problems facing human and animal health, and biodiversity conservation. Canine distemper virus has been strongly called attention in this regard, since it possesses a high prevalence in the canine population worldwide.

Canine distemper is a systemic viral disease, highly contagious, one of the major causes of death in domestic dogs and other carnivores. In recent years, the incidence of canine distemper seems to have increased, documenting the occurrence of new and unusual strains. The reasons that explain these changes and their impact on the epidemiology of the virus still unknown.

Canine distemper virus appears genetically heterogeneous, markedly in the hemagglutinin protein, which shows geographic patterns of diversification that are useful to monitoring the molecular epidemiology of canine distemper virus.

In this study was detected hemagglutinin gene (H gene) of canine distemper virus using the Reverse Transcription PCR method, was sequenced the amplified DNA fragment and this nucleotide sequence was included in the phylogenetic analysis for the gene H using known sequences and official of canine distemper virus, including vaccine strains used for the prevention of disease (Genbank®). The results show that in Chile would be at least two of the lineages known for canine distemper virus: Europe and America-1.

**KEYWORDS:** canine distemper, hemagglutinin, vaccine.

## **INTRODUCCIÓN**

El virus distemper canino (VDC) se clasifica dentro del género *Morbillivirus* de la familia *Paramixoviridae*. A este género también pertenecen el virus del sarampión, el virus de la peste bovina, el de la peste de los pequeños rumiantes, el distemper de las focas y el morbilivirus de los cetáceos. Su genoma está constituido por una cadena simple de ARN no segmentado de polaridad negativa, la cual codifica para una proteína de membrana M, dos tipos de glicoproteínas (hemaglutinina H y proteína de fusión F), dos proteínas asociadas a la transcriptasa (fosfoproteína P y polimerasa L) y para la proteína de la nucleocápside N que encapsula al ARN viral (13). Las proteínas F y H inducen la producción de anticuerpos neutralizantes sintetizados por el sistema inmune del hospedador (2). Algunos estudios comparativos entre cepas de VDC revelan que el gen H está sujeto a mayores variaciones genéticas y antigénicas que los otros genes de VDC: su secuencia aminoacídica varía aproximadamente en un 10% entre las diferentes cepas de VDC (13) y a pesar de existir diferencias antigénicas entre cepas del VDC demostradas serológicamente, se acepta que existe un solo serotipo. Sin embargo, existen diferencias considerables en cuanto a su patogenicidad (2).

El rango de hospederos del VDC comprende a todas las especies de la familia *Canidae* (perro, dingo, zorro, coyote, chacal, lobo), *Procionidae* (mapache, coatí, panda rojo), *Mustelidae* (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armiño, garduña, nutria), a los grandes felinos de la familia *Felidae* (león, leopardo, chita, tigre) y al pecarí de collar. Los numerosos reportes de brotes de distemper en leones del Parque Nacional Serengeti de Tanzania y casos ocurridos en leopardos chinos (*Panthera pardus japonensis*), y otros grandes felinos en zoológicos, han confirmado gráficamente la capacidad del virus de invadir nuevos hospederos (12, 14).

### **Patogenia de la Enfermedad**

Los perros jóvenes son más susceptibles que los adultos a la infección por VDC, mostrando la mayor susceptibilidad dentro de los cuatro a seis meses de vida, después de que los cachorros han perdido sus anticuerpos maternos (16).

La transmisión del virus ocurre principalmente vía contacto directo, por secreciones o aerosoles, ya que no es estable en el ambiente. El VDC es eliminado por todas las secreciones y excreciones, a partir del quinto día post infección antes de que comiencen los signos clínicos, y continúa eliminándose incluso durante semanas (12). Una vez dentro del organismo el VDC comienza rápidamente a replicar en tejidos linfoides, resultando una severa inmunosupresión, donde las células T linfocíticas son las más afectadas: La baja de linfocitos T CD4+ es rápida y persiste por varias semanas (13).

El periodo de incubación viral puede ir de una a cuatro semanas o más. Dentro de este período pueden existir signos como fiebre recurrente que alcanza su máximo a los tres o seis días post infección y se asocia con el inicio de la diseminación del virus al organismo, también se puede observar anorexia, ligera depresión, descarga nasal y ocular, tonsilitis. Para el día seis o nueve post infección, ocurre la difusión sistémica del virus dirigiéndose hacia las células epiteliales de la mayoría de los órganos. En esta etapa, el resultado de la infección y la severidad de los signos varían marcadamente dependiendo en gran medida de las interacciones entre las características biológicas del virus (virulencia de la cepa, tropismo, polimorfismo genético) y el sistema inmune del hospedero, siendo este último uno de los principales factores en determinar el curso, consecuencias y letalidad de la infección (4).

Si la respuesta inmune es adecuada, los anticuerpos neutralizantes alcanzarán niveles adecuados y eliminarán al virus de los tejidos, recuperándose el animal completamente. Si la respuesta inmune es débil o tardía, el virus es capaz de alcanzar a los tejidos epiteliales y causar una severa enfermedad multisistémica la que incluye signos respiratorios, digestivos y posteriormente, del sistema nervioso central (13). Los signos neurológicos pueden ser causados directamente por el virus, o bien ser resultado de la respuesta inmune en contra del SNC. En este último caso, los perros tienen un nivel de inmunidad intermedio, y el subsecuente compromiso del SNC se puede desarrollar meses o años después (7).

Actualmente no existe un tratamiento efectivo contra el distemper canino (DC), consistiendo solo en cuidados de soporte y antibióticos para evitar infecciones bacterianas

secundarias, frecuentes en animales inmunocomprometidos (13). En perros que sobreviven a la infección subclínica o subaguda los signos iniciales desaparecen, pero el virus persiste por largos periodos en tejido neuronal, uvea o en urotelio y en algunas zonas de la piel (ejemplo: hiperqueratosis de la almohadilla plantar o de la nariz). Los signos neurológicos seguirán evolucionando de manera progresiva, aunque descontinuadamente. Algunos perros pueden recuperarse, sin embargo, los movimientos involuntarios compulsivos, tales como mioclonos o ataxia, tenderán a persistir (13). Finalmente el perro muere por daño masivo al SNC derivado del proceso inflamatorio exagerado (4).

### **Métodos de Diagnóstico**

El DC debe ser siempre considerado dentro de los prediagnósticos frente a cualquier cachorro con condiciones febriles y síntomas multisistémicos (13). Si bien la enfermedad sistémica es fácil de reconocer, la forma neurológica puede ser más complicada. Los cambios clínicos patológicos incluyen cuerpos de inclusión en eritrocitos y citología mononuclear de líquido cerebro espinal. La radiografía de tórax puede ayudar a demostrar neumonía viral con infección bacteriana secundaria (7). No obstante, es necesario un diagnóstico de laboratorio para excluir otras enfermedades que posean similares manifestaciones clínicas (12). Así, es posible incluir varias técnicas diagnósticas como:

- a) Inmunofluorescencia: Es útil para demostrar la presencia del VDC en frotis de raspado conjuntival y biopsias de piel (antemortem) o tejido de pulmón, intestino, estómago, riñón, cerebro y vejiga recolectados a la necropsia (12). Sin embargo, esta técnica no es tan sensible y además, la inmunofluorescencia directa sólo puede detectar antígenos de VDC dentro de las tres primeras semanas post infección, cuando el virus esté presente en las células epiteliales (13).
- b) Análisis de líquido cerebroespinal (LCE): Es posible hallar antígenos virales en células de LCE en casos agudos de encefalitis por distemper; esto es patognomónico en perros con la barrera hematoencefálica intacta, pero su ausencia no excluiría la infección (2).
- c) ELISA para la detección de IgM específica contra VDC: Es una prueba útil ya que la IgM en perros infectados por VDC persiste durante cinco semanas a tres meses

dependiendo de la cepa y la respuesta del hospedero. En perros vacunados la IgM persiste sólo alrededor de tres semanas (2).

- d) Aislamiento viral: Se puede aislar el virus distemper en líneas celulares, de frotis conjuntival o de tejidos como bazo e hígado, sin embargo es un proceso laborioso por lo que no se realiza de manera rutinaria (13).
- e) Técnicas moleculares: Se han utilizado técnicas moleculares como el PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*), posterior a la transcripción reversa del genoma viral (RT-PCR) para el estudio de la epidemiología del virus distemper y su dinámica de circulación de las variadas cepas en animales susceptibles. Utilizando estas técnicas se ha podido reconocer a nivel mundial la existencia de al menos ocho distintas líneas de distemper canino, basadas en el análisis de secuenciación del gen H (Asia 1, Asia 2, América 1, América 2, Ártico, Europeo, Europeo silvestre y Sudafricano) y probablemente cepas nuevas e inusuales serán identificadas a futuro (12, 19). Ejemplo de lo anterior, es el trabajo de Gamiz *et al.* (2011) en que se describiría un noveno linaje en México (6).

Los resultados utilizando esta técnica son prometedores para el diagnóstico de distemper neuronal cuando el virus se encuentre en tejidos y fluidos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que podría entregar resultados falsos positivos en perros que se ponen en contacto con bajos niveles del virus y se recuperan después de una leve infección o bien en perros vacunados (13).

## **Vacunación**

En animales correctamente inmunizados, la infección es incapaz de establecer un estado de inmunosupresión gracias a la sólida respuesta inmune antiviral. Se recomienda que el protocolo de vacunación en cachorros comience a las seis u ocho semanas. A esta edad se deben dar mínimo tres dosis cada una con tres o cuatro semanas de separación, seguido de un “booster” anual (7).

En individuos menores de dieciocho meses de edad, el sistema inmune no está completamente maduro, por lo cual es recomendable recurrir a vacunas recombinantes que precinden del patógeno. Esta última afirmación se sustenta en la evidencia de la capacidad



de la vacuna a virus atenuado de revertir de manera fugaz su virulencia y causar encefalomiелitis postvacunal letal en caninos (4).

Si bien las vacunas polivalentes convencionales son capaces de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes, éstas sólo tienen una distribución sérica y un limitado poder de difusión a superficies mucosas. Su limitado poder de protección se explica por la variabilidad genética (polimorfismo) del virus, demostrándose una diferencia marcada en las características genéticas de cepas vacunales y las causantes de brotes epidémicos en América del Norte, África, Europa, Japón y Argentina, tanto en poblaciones de caninos domésticos como silvestres. Efectivamente, el análisis de polimorfismo genético ha demostrado diferencias significativas entre aislados clínicos y cepas vacunales utilizadas hace décadas tales como SnyderHill, Onderstepoort, Rockborn, Convac y Lederle (3, 4, 5).

En este contexto, esta memoria de título propone como objetivo principal conocer cuál(es) de los linajes existentes del VDC estarían presentes en Chile, a través del secuenciamiento parcial del gen H del VDC posterior a la prueba de PCR. Al parecer y de acuerdo a la literatura consultada este estudio sería el primer aporte en relación a comprender probablemente el por qué perros vacunados enferman y mueren.

## **Materiales y Métodos**

### **Muestras clínicas y vacunales**

Durante los años 2011 y 2012 se obtuvieron cuarenta y dos muestras de sangre periférica de perros domésticos en diferentes clínicas veterinarias de Santiago de Chile con una amplia gama de sintomatología compatible con DC, sin restricción de raza, edad, o sexo. Como virus de referencia se utilizaron dos cepas de VDC provenientes de vacunas comerciales (Lederle y Onderstepoort).

### **Obtención ARN Viral**

La extracción de ARN se realizó mediante un kit de extracción (Trizol LS, Invitrogen©). Brevemente, 250 uL de suero se mezclaron con 750 uL de reactivo trizol. Se dejó a temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos y posteriormente, se agregaron 0,2 mL

de cloroformo. Se mezcló vigorosamente durante quince segundos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por cinco minutos.

Posteriormente, se centrifugó a  $7.000\times g$  durante quince minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio con un volumen de isopropanol. Se dejó a temperatura ambiente durante diez minutos y se centrifugó a  $7.000\times g$  durante diez minutos. Luego se eliminó el sobrenadante, se lavó tres veces con etanol (1 mL etanol 75%), se agitó mediante vórtex por quince segundos y se centrifugó a  $2.000\times g$  durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío durante diez minutos y se resuspendió en 100 uL de agua estéril, libre de nucleasas. Finalmente, el ARN se incubó a  $55-60^{\circ} C$  por diez minutos y se guardó a  $-20^{\circ} C$ , hasta realizar el RT-PCR.

### **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 involucra temperaturas y tiempos para cada etapa, así como el número de ciclos necesarios para el gen a detectar.

**Mezcla de la reacción.** Se utilizó el “kit SuperScript one step RT-PCR with platinum Taq” (Invitrogen®) y el protocolo contempló una incubación a  $50^{\circ} C$  durante cuarenta minutos y otra a  $94^{\circ} C$  durante dos minutos. En la reacción de PCR se utilizaron los partidores CDV1: 5'-GTCCTTCTCATCCTACTGG-3' y CDV2: 5'-ACACTCCGTCTGAGATAGC-3' (los que fueron encargados a Bioscan® para su síntesis) y un protocolo que incluye treinta y cinco ciclos ( $94^{\circ} C$  por un minuto;  $50^{\circ} C$  durante dos minutos; dos minutos a  $72^{\circ} C$ ) y una extensión final a  $72^{\circ} C$  durante dos minutos. Este protocolo permitió obtener un fragmento de ADN de alrededor de quinientos sesenta pares de bases (pb) (17).

Todas las muestras fueron analizadas en duplicado para la confirmación de resultados.

### **Visualización de productos amplificados**

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®) y posterior incubación con bromuro de etidio ( $0,5 \mu g/ml$ ) (Fermelo®). Se tomaron 5  $\mu L$  del producto de PCR, y se mezclaron con 1  $\mu L$  de un producto comercial de carga, *6X Mass Ruler*

*Loading Dye Solution* (Fermentas®), para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN. La electroforesis se realizó a 90V por noventa minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó *Hyperladder I* (Bioline®), el cual contiene fragmentos de ADN entre cincuenta y mil pares de bases. Con este producto se comparó el tamaño de los fragmentos amplificados. Al finalizar la electroforesis, las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (*Transiluminator UVP*®), y se fotografió con cámara digital y filtro adecuado.

### **Secuenciación y análisis filogenético del producto amplificado**

El fragmento de ADN amplificado se envió al centro de secuenciación de la empresa Genytec® cumpliendo con sus requerimientos. Las secuencias obtenidas se alinearon usando el programa Clustal W 2.0.12 de libre acceso (18) para obtener una secuencia de consenso y posteriormente se obtuvo el porcentaje de identidad nucleotídica respecto de secuencias de VDC almacenadas en el GenBank® utilizando el programa de libre acceso BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó mediante el programa MEGA de análisis bioinformático (10), en donde las secuencias nucleotídicas se alinearon usando el programa Clustal W 2.0.12 (18). Las distancias genéticas existentes entre ellas se calcularon usando el método de dos parámetros de Kimura y los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de "neighbor-joining" (9). La robustez del árbol filogenético obtenido se determinó por análisis de "bootstrap" de mil réplicas.

## **RESULTADOS**

### **a) Muestras clínicas**

Se procesaron un total de cuarenta y dos muestras obtenidas de pacientes caninos de diferentes clínicas veterinarias de Santiago de Chile. Las primeras veinte muestras se obtuvieron de Marzo a Julio de 2010 en perros con una marcada sintomatología compatible con la fase neurológica de DC, todas se guardaron a 4°C para luego procesarse en Agosto de 2010. Las siguientes muestras se obtuvieron de veintidós perros provenientes de

distintas clínicas veterinarias desde Septiembre de 2010 a Marzo de 2011, con diferentes estadios sintomatológicos con sospecha de DC, las que se mantuvieron a 4°C. El criterio de inclusión para estas muestras consideró que todas fueran positivas para el test de ELISA específico para VDC (IgM positivo). A su vez fueron procesadas en un periodo menor a dos semanas desde su obtención desde los animales. En el cuadro a continuación muestra las características de los pacientes de los que se extrajeron las últimas veintidós muestras obtenidas (Cuadro 1).

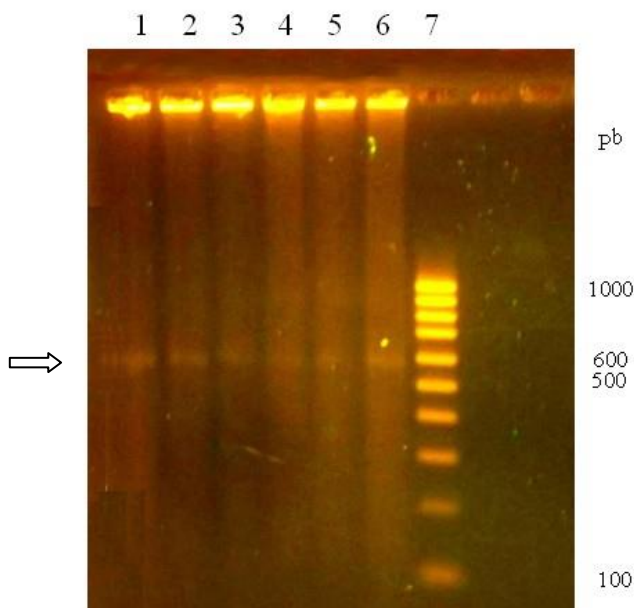
Nombre	Raza	Edad aprox.	Vacunación contra DC	Nivel de signología neurológica	Títulos Ac IgM
Happy	<i>Mestizo</i>	6 meses	No	+	1:80
Cholo	<i>Mestizo</i>	4 años	No	++	1:80
Josefa	<i>Mestizo</i>	2 años	No	++	1:80
Black Jack	<i>Mestizo</i>	2,5 años	Si	++	1:40
Charlotte	<i>Mestizo</i>	1 año	No	++	1:80
Martín	<i>Bóxer</i>	2 años	Si	++	1:40
Sofía	<i>Mestizo</i>	8 meses	No	++	1:80
Snoopy	<i>Beagle</i>	1 año	Si	++	1:80
Lazy	<i>Mestizo</i>	4 años	No	+	1:40
Rosita	<i>Mestizo</i>	3 años	No	+	1:80
Estrellita	<i>Mestizo</i>	2,5 años	Si	+++	1:80
Cachupin	<i>Mestizo</i>	6 años	No	++	1:640
Pascual	<i>Mestizo</i>	2 años	Si	+	1:80
NN	<i>Mestizo</i>	2 años	?	+	1:80
Milo	<i>Labrador</i>	2 años	Si	+	1:40
Agustina	<i>Mestizo</i>	2,5 años	No	+++	1:80
Renata	<i>Mestizo</i>	3,5 años	No	+	1:80
Tontín	<i>Mestizo</i>	2 años	?	+	1:40
Tatán	<i>O. Alemán</i>	8 años	?	+	1:40
Cookie	<i>Mestizo</i>	2 años	No	++	1:20
Facundo	<i>Bóxer</i>	2 años	No	++	1:40
Estrellita2	<i>Mestizo</i>	1 año	Si	+	1:80
	<i>Mestizo</i>	2 años		+	τ

**Cuadro 1:** Características de muestras de sangre periférica de perros IgM positivos a DC. Se define la raza, edad aproximada, si fueron inmunizados o no con la vacuna para distemper, el grado de sintomatología neurológica y los títulos de anticuerpos obtenidos.

#### b) Identificación de las muestras positivas a VDC mediante la detección del gen H

Todas las muestras fueron sometidas a la prueba de la Reacción de la Polimerasa en Cadena asociada a transcripción reversa (RT-PCR) para la detección del gen H del VDC.

Posteriormente la visualización del material amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En el gel se logró visualizar en tres muestras clínicas (correspondientes a los pacientes Charlotte, Facundo y Estrellita-2) y en dos cepas vacunales una banda correspondiente al fragmento de ADN de tamaño compatible a lo esperado: mayor a quinientos pares de bases (Figura 1).



**Figura 1:** Visualización de productos amplificados por RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE y posterior incubación en bromuro de etidio. Los carriles número 1, 2 y 3 corresponden a muestras clínicas de los pacientes Charlotte, Facundo y Estrellita-2 respectivamente (ver cuadro 1). El carril número 4 corresponde al control positivo vacunal cepa Lederle. Los carriles número 5 y 6 corresponden a controles positivos vacunales cepa Onderstepoort. El carril número 7 corresponde al marcador de tamaño molecular con fragmentos de entre cincuenta y mil pb. La flecha indica la visualización de bandas de ADN de un tamaño cercano a los seiscientos pb.

### **c) Secuenciación y determinación del porcentaje de identidad nucleotídica de las muestras positivas a RT-PCR**

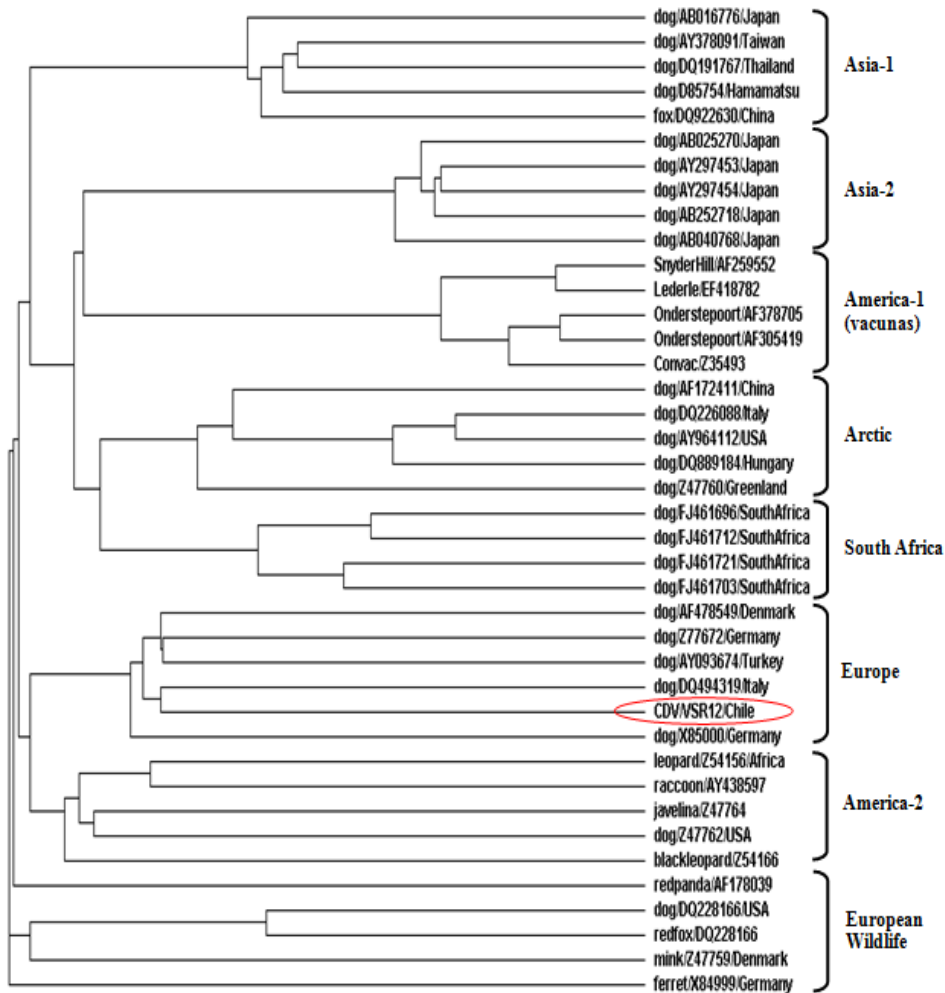
Dos de las muestras positivas se enviaron para su secuenciación a la empresa Genytec® (correspondientes a los pacientes Facundo y Estrellita-2 del Cuadro 1). Una vez obtenidas las secuencias se determinó su porcentaje de identidad nucleotídica respecto de secuencias publicadas en la base de datos BLAST (Anexo 3). Dentro de las primeras cincuenta

secuencias alineadas, todas corresponden a VDC. Además, ambas secuencias arrojaron un porcentaje de identidad nucleotídica superior a un 96% con respecto a las primeras cien secuencias de VDC almacenadas en Genbank®. Esto demuestra indiscutiblemente que las muestras obtenidas corresponden a VDC.

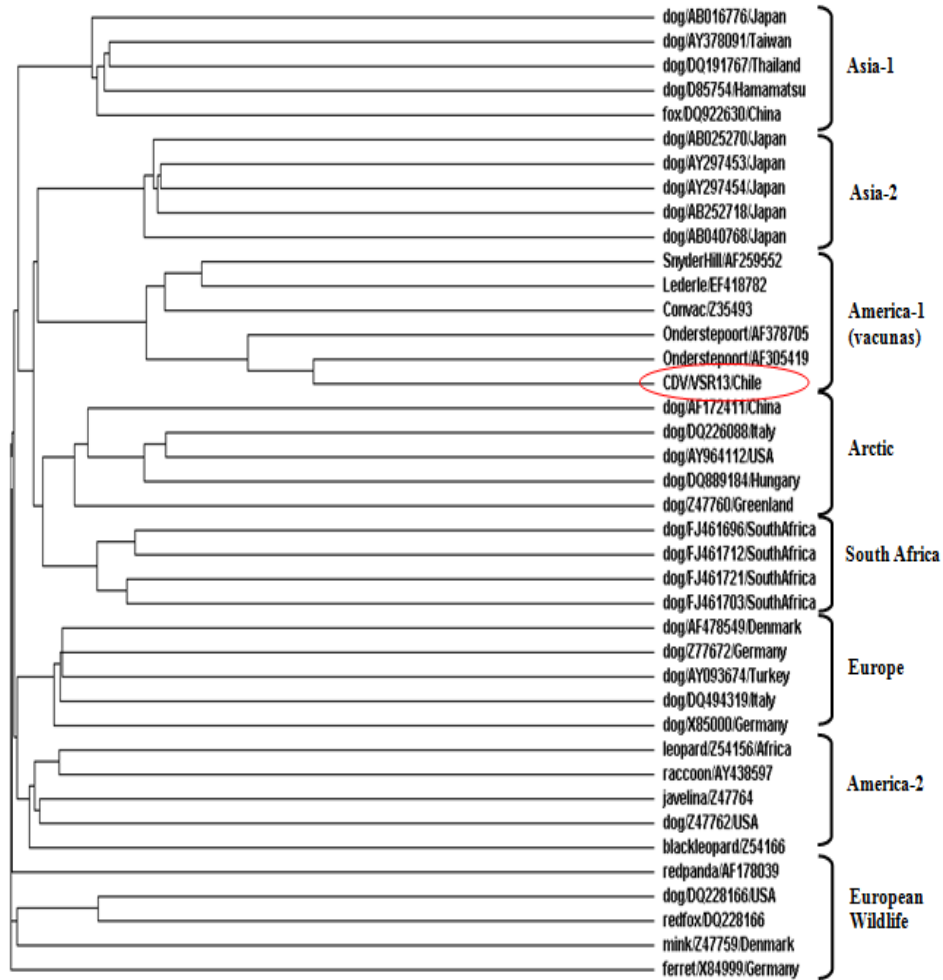
#### **d) Análisis filogenético**

De ambas muestras enviadas se obtuvieron tres secuencias, las que se alinearon usando el programa Clustal W 2.0.12, obteniéndose una secuencia consenso para cada muestra: del paciente Facundo se obtuvo la secuencia CDV13/VSR/Chile y del paciente Estrellita-2 CDV12/VSR/Chile (Anexo 1 y 2).

Se construyó el árbol filogenético de la muestra CDV12/VSR/Chile utilizando una región de cuatrocientos cincuenta pares de bases alineándola en conjunto con distintas secuencias de VDC representantes de los ocho linajes principales conocidos sacados de GenBank®. Así mismo, el árbol para la muestra CDV13/VSR/Chile se construyó alineando cuatrocientos sesenta y cinco pares de bases junto con distintas secuencias de VDC representantes de las ocho líneas reconocidas oficialmente. Los resultados del alineamiento permitió conocer el patrón geográfico de segregación correspondiente; así la secuencia CDV12/VSR/Chile segregó en el linaje Europeo (Figura 2), mientras que la secuencia CDV13/VSR/Chile lo hizo en el linaje América 1 (Figura 3).



**Figura 2:** Relación filogenética entre cepas de VDC sacadas de GenBank® con la muestra CDV/VSR12/Chile, usando el programa Clustal W 2.0.12. Se utilizaron distintas cepas de VDC representantes de cada linaje principal conocido actualmente. La especie, número de acceso para GenBank® y lugar donde fue aislada están indicados en cada muestra. El círculo rojo indica el lugar en que la muestra CDV/VSR12/Chile se asoció quedando dentro del linaje europeo.



**Figura 3:** Relación filogenética entre cepas de VDC sacadas de GenBank® con la muestra CDV/VSR13/Chile, usando el programa Clustal W 2.0.12. Se utilizaron distintas cepas de VDC representantes de cada linaje principal conocido actualmente. La especie, número de acceso para GenBank® y lugar donde fue aislada están indicados en cada muestra. El círculo rojo indica el lugar en que la muestra CDV/VSR13/Chile se asoció quedando dentro del linaje América 1.

## DISCUSIÓN

Desde hace décadas que el control del DC en los perros domésticos del mundo se basa principalmente en vacunas preparadas con virus vivo modificado del linaje América 1 (Onderstepoort, Leederle, etc). Actualmente, en varios países se describe un aumento en el número de infectados a pesar de ser perros con su programa de vacunación al día (13). En consideración a lo anterior se han planteado posibles hipótesis respecto de este notorio y



preocupante aumento de infección en los canes domésticos, entre las cuales es posible destacar la circulación de nuevas variantes genéticas del virus, malos programas de vacunación o bien un limitado poder de protección adquirido con las vacunas convencionales. De acuerdo a la literatura consultada, actualmente en Chile no hay estudios epidemiológicos que permitan identificar -si existen- diferencias a nivel genómico, antigénico o biológico entre diferentes aislados nacionales del virus versus las cepas vacunales.

Así, los resultados de este trabajo muestran que de cuarenta y dos muestras de sangre periférica de perros se logró detectar sólo en tres un fragmento de ADN de alrededor de quinientos pares de bases y dos de ellas se mandaron a secuenciar. Si bien es sabido que el método PCR es una herramienta diagnóstica altamente sensible, se plantea la duda de posibles falsos negativos en las veinte primeras muestras en primera instancia por el tiempo que quedaron guardadas en refrigeración desde su obtención hasta su procesamiento en el laboratorio, ya que es sabido de la labilidad del ARN viral luego de su extracción, el cual puede fácilmente ser degradado por la acción de ARNasas presentes en la piel y por temperaturas superiores a 4°C. Otra hipótesis es la fase en que la enfermedad se encontraba en los pacientes, donde el virus posiblemente ya no se encontraba a nivel sanguíneo sino que principalmente en el tejido epitelial.

Para las siguientes muestras se consideró que todas fueran positivas para el test de IgM específico para VDC con títulos de anticuerpos mayor a 1:40 y se trabajaron en un período de menos de dos semanas desde su obtención del hospedero hasta su procesamiento. De las veintidós muestras obtenidas en tres de ellas se logró detectar un fragmento de ADN del tamaño deseado correspondientes a los pacientes Charlotte, Facundo y Estrellita-2 además de dos muestras vacunales correspondientes a las cepas Leederle y Onderstepoort (Figura 1). Posibles hipótesis de falsos negativos en las otras muestras es que el error puede ser humano (ajuste incorrecto de instrumentos, contaminación de muestras, protocolo de diagnóstico aún no definido, etc) debido a la inexperiencia de trabajar con el gen H como herramienta diagnóstico o bien debido a la labilidad del ARN viral.

Es importante señalar que las tres muestras positivas presentaron altos títulos de seroneutralización para distemper y a su vez fueron las que tuvieron menos tiempo desde su extracción del hospedero hasta su procesamiento en el laboratorio. Estas características según el trabajo de Jara, 2011 son ideales para implementar el método PCR en virus RNA y confirma así que es posible utilizar partidores para el gen H como herramienta diagnóstica para VDC (8).

Actualmente, gracias al análisis de secuencias del gen H ha sido factible clasificar a las cepas de VDC obtenidas dentro de ocho principales líneas o linajes genéticos mundiales aceptados (13), y los que presentan la mayor diversidad genética y antigénica son las cepas vacunales (linaje América 1) con respecto a los otros linajes de VDC (3, 4, 5, 13). Al incorporar las secuencias obtenidas y construir el árbol filogenético mediante el programa MEGA se evidenció que la secuencia CDV/VSR13/Chile correspondiente al paciente Facundo segrega dentro del linaje América 1, el mismo grupo de las vacunas (Figura 3). En este caso el paciente no estaba inmunizado contra DC, por lo tanto el virus detectado corresponde a una cepa de campo que circula en la población de perro. Se podría inferir que las vacunas utilizadas en Chile podrían ser eficaces para este grupo de virus (linaje América 1) y que en este caso el perro enfermó al no estar vacunado. Sin embargo para comprobar esta afirmación sería necesario desafiar experimentalmente a perros vacunados contra virus nacionales de este linaje.

Por otro lado la existencia de la secuencia CDV/VSR12/Chile proveniente del paciente Estrellita-2 confirmaría que en Chile no solo están presentes virus del linaje América 1, sino que también virus del linaje Europeo (Figura 2). Por otra parte el paciente sí estaba vacunado contra DC, dato que apoyaría la hipótesis de nuevas y diferentes cepas del virus que se escaparían del poder protectorio de las vacunas convencionales. Sin embargo no es una afirmación totalmente garantizada ya que pueden existir otros factores relevantes tales como un mal programa de vacunación o la presencia de anticuerpos maternos al momento de la inmunización, entre otros.

En conclusión y bajo los resultados de esta memoria, podemos inferir que una vacuna ideal debe ser diseñada considerando el polimorfismo genético propio de la zona geográfica. Sin

embargo, en Chile no existen estudios acabados que permitan desarrollar prototipos de vacuna que consideren las variantes genéticas circulantes en el país (4).

La importancia de DC no sólo se restringe a la medicina de animales domésticos; en todo el mundo la enfermedad de distemper canino es una de las principales amenazas para la conservación de especies silvestres en peligro de extinción (11). Aunque no hay datos que determinen la situación de la fauna silvestre nacional, existen reportes que reconocen la infección esporádica en zorros endémicos del bosque de Fray Jorge (15), existiendo altas posibilidades de que los perros urbanos estén actuando como reservorios de VDC en esa zona (1). El riesgo que corren estas poblaciones exige la aplicación de vacunas seguras capaces generar una buena respuesta inmune considerando las cepas nacionales, ya que la presencia de reservorios de VDC puede significar la repentina declinación de una población susceptible, incluso llegando a su extinción.

Finalmente, mediante este estudio se ha logrado establecer la existencia en Chile de dos de los ocho linajes conocidos de VDC y que sólo uno de ellos estaría genéticamente relacionado con las cepas vacunales, lo cual si bien no clarifica el verdadero patrón epidemiológico que ha tomado el virus en el país, sugiere la posible participación de otros linajes causales de la enfermedad, los cuales pudiesen estar relacionados con el inquietante número de casos de perros previamente inmunizados y que adquieren la enfermedad. Si bien aún es una hipótesis que requiere ser confirmada, pone en tela de juicio la necesidad de actualizar nuestros datos nacionales con respecto al VDC, aumentar su vigilancia epidemiológica, tener una buena caracterización celular y molecular del virus, identificar si son nuevas variantes nacionales, y comprender así la dinámica epidemiológica del virus.

# ANEXO 1

Alineamiento de las secuencias obtenidas por Genytec® para la muestra

CDV/VSR12/Chile:

```
1_A      -TTTTTGGGCCGGAAGC-----GACGCGCGGAAGCACAGAGCGGGGGGAAGGAAG-TA 53
3_A      -ATTTTG---TGGAAGCTTGCAGTCGCGTGAAGGAACAGAG-GGGGGGGCGGGAAG-TA 54
2_A      TTTCTTGTGTCAGAATG----AGACGTGTGTAGGCACCGAACGGGCGAGGAGGGAGGATA 56
          * ***      ***      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

1_A      TGTA-GAATTGTTGAAAGAGGATATGGAGAAATCAGAGGC-CGTACAT-CACCAAGTCAT 110
3_A      TGTATGAAATGTTGAATGAGGATATGGAGAAATAGAGGCTCGTACATTACCAAGTCAT 114
2_A      TGTAT-ATTTGTTGAAAGAGGAAATGGAGAAATAGAGGCTCGTACATTACCAAGTTAT 115
          **** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **

1_A      AGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAAATTATTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACA 170
3_A      AGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAAATTATTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACA 174
2_A      AGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAAATTATTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACA 175
          *****

1_A      AAAACTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAG 230
3_A      AAAACTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAG 234
2_A      AAAACTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAG 235
          *****

1_A      GGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAA 290
3_A      GGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAA 294
2_A      GGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAA 295
          *****

1_A      TTTTACTAATTATTGCGATACAATTGGGATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCC 350
3_A      TTTTACTAATTATTGCGATACAATTGGGATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCC 354
2_A      TTTTACTAATTATTGCGATACAATTGGGATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCC 355
          *****

1_A      CATCCTTTTATCAGCACTCTCAGGAGGCAGAGGTGACATATCCCACCATAACAGATGCAG 410
3_A      CATCCTTTTATCAGCACTCTCAGGAGGCAGAGGTGACATATCCCACCATAACAGATGCAG 414
2_A      CATCCTTTTATCAGCACTCTCAGGAGGCAGAGGTGACATATCCCACCATAACAGATGCAG 415
          *****

1_A      TGGAGCTACTACTTCAGTGGGCAGAGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTT 470
3_A      TGGAGCTACTACTTCAGTGGGCAGAGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTT 474
2_A      TGGAGCTACTACTTCAGTGGGCAGAGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTT 475
          *****

1_A      GATCTCAAGAACATCAGAGATAACCAATA-TGCTAACTGCTATCCAAC-CGGGAG--TG- 525
3_A      GATCTCAAGAACATCAGAGATAACCAATA-TGCTAACTGCTATCTCAA-CAGGAA--TGG 530
2_A      GATCTCAAGAACATCAGAGATAACCAATAGTGCTAACTGCTATCTCAAACGGGAAGTTGT 535
          ***** * * *** **

1_A      -TAGGGAAAA----- 534
3_A      TTANAAAAAANN----- 542
2_A      TTAAGAAAAAAAACGCCAACCACTCCCGGTCCTAGA 572
          ** ****
```

**Cuadro 2:** Tabla de Puntaje según Clustal W 2.0.12 de las tres secuencias obtenidas de una muestra enviada a Genitek®.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	1_A	534	2	2_A	572	95.0
1	1_A	534	3	3_A	542	95.0
2	2_A	572	3	3_A	542	94.0

Secuencia consenso muestra CDV/VSR12/Chile:

ATGTATGAATTGTTGAAAGAGGATATGGAGAAATTAGAGGCTCGTACATTCAC  
 CAAGTCATAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAATTATTGGAGATGAGGTTGGG  
 TTACGGTTGCCACAAAACAACTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAAAGAC  
 AAATTCTTCAATCCGAACAGGGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCAT  
 TAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAATTTTACTAATTATTGCGATACAATTGG  
 GATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTTTTATCAGCACTCTC  
 AGGAGGCAGAGGTGACATATTCCCACCATACAGATGCAGTGGAGCTACTACTT  
 CAGTGGGCAGAGTTTTCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTTGATCTCAA  
 GAACATCAGAGATAACCAATA

## ANEXO 2

Alineamiento de las secuencias obtenidas por Genytec® para la muestra

CDV/VSR13/Chile:

```
1_B      ---ATCTAAAAGACAGGTGCTGGCGAGGAAAGGGAGGGTGGGGGGGGGGAGGGGAAAAG 57
3_B      GGAACAGCGGGAAAGGCGCGGGCGAGGAAAGGGAGGGAGGGGGGGGGGGGAAAA-- 58
2_B      ----TTTTGAGAGAAG----AAGAAGGAGAGGGAGGGCGGGGGGGGGGGAGGGGGAAGA 52
          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

1_B      AAAAGAAAAAGAAGTAGTAGTTATATTGTATTAGTAT-GGTGGGAATATGTCACCTCTG 116
3_B      AAAAGAAAAAGAAGAAGAGTTATATAGTATCT-GTAT-GGTGGGAATATGTCACCTCTG 116
2_B      AAGAGAAAAAGAAGAAGAGTTATATAGTATTTAGTATTGGAGGGAATAAGTCACCTCAG 112
          ** ***** * ***** ** * ** * ** ***** ***** *

1_B      CCTCCTGAGAGTGCTGATAAAAAGGATGGGATTGCTGCCGATGCAATAGATTTTCTGATC 176
3_B      CCTCCTGAGAGTGCTGATAAAAAGGATGGGATTGCTGCCGATGCAATAGATTTTCTGATC 176
2_B      CCTCCTGAGAGTGCTGATAAAAAGGATGGGATTGCTGCCGATGCAATAGATTTTCTGATC 172
          *****

1_B      CCAATTGTATCGCAATAATTAGTAAAATTCACCTTGATCTTACTAGGTGGATTAATGCAC 236
3_B      CCAATTGTATCGCAATAATTAGTAAAATTCACCTTGATCTTACTAGGTGGATTAATGCAC 236
2_B      CCAATTGTATCGCAATAATTAGTAAAATTCACCTTGATCTTACTAGGTGGATTAATGCAC 232
          *****

1_B      CAGTGGAGATCGCGGAAGTCGAATTCCTGTTCCGATTGAAGAAGTTGTCTTTTGAAGG 296
3_B      CAGTGGAGATCGCGGAAGTCGAATTCCTGTTCCGATTGAAGAAGTTGTCTTTTGAAGG 296
2_B      CAGTGGAGATCGCGGAAGTCGAATTCCTGTTCCGATTGAAGAAGTTGTCTTTTGAAGG 292
          *****

1_B      ATAAATTGTTTGTATCTCGTTTAGTTTTTGTGGCAACCGTAACCCAACCTCATCTCCAATA 356
3_B      ATAAATTGTTTGTATCTCGTTTAGTTTTTGTGGCAACCGTAACCCAACCTCATCTCCAATA 356
2_B      ATAAATTGTTTGTATCTCGTTTAGTTTTTGTGGCAACCGTAACCCAACCTCATCTCCATA 352
          *****

1_B      ATTTTGAAGAGCGGTGTCAGACATCTATGACTTGGTGATGTACGGCCTCTGATTTCTCC 416
3_B      ATTTTGAAGAGCGGTGTCAGACATCTATGACTTGGTGATGTACGGCCTCTGATTTCTCC 416
2_B      ATTTTGAAGAGCGGTGTCAGACATCTATGACTTGGTGATGTACGGCCTCTGATTTCTCC 412
          *****

1_B      ATATCCTCTTTAGCAATCTGCTAAAATCCATATTGCTAGTTGATACTTGGTGAAATCGA 476
3_B      ATATCCTCTTTAGCAATCTGCTAAAATCCATATTGCTAGTTGATACTTGGTGAAATCGA 476
2_B      ATATCCTCTTTAGCAATCTGCTAAAATCCATATTGCTAGTTGATACTTGGTGAAATCAA 472
          *****

1_B      ACTCCAGTGATAGCAAGCAAGGTGATGATTCCAACCGTAGGTGAGGAAGGGAAAAAAA 536
3_B      ACTCCAGTGATAGCAAGCAAGGTGATGATTCCAACCGTAGGAGA-----AAGAAGGA 529
2_B      ACTCCACTGATAGCAAGCAAGGTGATGATTCTTCCACTATATGA-----GGAAGGGA 525
          *****

1_B      CACTACACTCCGT 549
3_B      CACGNACN---- 538
2_B      CAGAACACCC--- 535
          ** ***
```

**Cuadro 3:** Tabla de Puntaje según Clustal W 2.0.12 de las tres secuencias obtenidas de una muestra enviada a Genitek®.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	1_B	549	2	2_B	535	92.0
1	1_B	549	3	3_B	538	95.0
2	2_B	535	3	3_B	538	92.0

Secuencia consenso muestra CDV/VSR13/Chile:

AAAAGAAAAGAAAGAAGAGTTATATAGTATTTAGTATTGGTGGGAATATGTC  
 ACCTCTGCCTCCTGAGAGTGCTGATAAAAGGATGGGATTTGCTGCCGATGCAAT  
 AGATTTTCTGATCCCAATTGTATCGCAATAATTAGTAAAATTCACCTTGATCTT  
 ACTAGGTGGATTAATGCACCAGTGGAGATCGCGGAAGTCGAATCCCTGTTTCG  
 GATTGAAGAAGTTTGTCTTTTGAAGGATAAATTGTTTGATCTCGTTTAGTTTTTG  
 TGGCAACCGTAACCCAACCTCATCTCCAATAATTTTGAAGAGCGGTGTCAAGA  
 CATCTATGACTTGGTGATGTACGGCCTCTGATTTCTCCATATCCTCTTTCAGCAA  
 TCTGCTAAATTCCATATTGCTAGTTGATACTTGGTGAAATCGAACTCCAGTGAT  
 AGCAAGCAAGGTCATGATTCCAACCAGTAGGTGA



## ANEXO 3

Porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias CDV/VSR12/Chile y CDV/VSR13/Chile con respecto a secuencias de VDC almacenadas en GenBank®. Se utilizó el programa BLAST.

### Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 265/02-3 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	782	782	98%	0.0	99%	<a href="#">DQ494318.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 746_Dog_TN_07 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	776	776	98%	0.0	98%	<a href="#">HM443723.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDVBR2 hemagglutinin gene, complete cds</a>	776	776	98%	0.0	98%	<a href="#">EU098103.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 111/03B hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	776	776	98%	0.0	98%	<a href="#">DQ494319.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus haemagglutinin gene</a>	776	776	98%	0.0	98%	<a href="#">Z77672.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDVBR3 hemagglutinin gene, complete cds</a>	774	774	98%	0.0	98%	<a href="#">EU098104.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Uy-128/09 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">JN215476.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Uy-111/08 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">JN215475.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain CDVBR4 hemagglutinin gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">EU098105.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 324/03 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">DQ494317.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate DK91 C haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478548.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate C haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478547.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate DK91 B haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478546.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate B haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478545.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate DK91 A haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478544.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate A haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478543.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus haemagglutinin gene</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">Z77673.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus haemagglutinin gene</a>	771	771	98%	0.0	98%	<a href="#">Z77671.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate DK91 D haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	769	769	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478550.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate D haemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	769	769	98%	0.0	98%	<a href="#">AF478549.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Uy-141/09 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">JN215477.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Uy-102/07 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">JN215478.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Lili hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">HM563059.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate SMLM75 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">HM563058.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate SMLM3 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">HM563057.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 5378_Dog_BZ_00 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">HM443718.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">GU001864.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">GU001863.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 4088-03 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	765	765	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214375.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 458/07 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	761	761	97%	0.0	98%	<a href="#">JN153025.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus strain 408/589/07 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	761	761	97%	0.0	98%	<a href="#">JN153024.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 2779-04 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	761	761	97%	0.0	98%	<a href="#">GQ214372.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate H04Bp1F hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	761	761	97%	0.0	98%	<a href="#">DQ889177.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate Uy-109/08 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">JN215474.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5825-02 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214384.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5417-02 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214380.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5253-02 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214378.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 4520-02 hemagglutinin (H) gene, complete cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214376.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5527-02 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214383.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5470-02 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214382.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5428-02 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214381.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Canine distemper virus isolate 5332-02 hemagglutinin (H) gene, partial cds</a>	760	760	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ214379.1</a>



**Cuadro 4:** Ejemplo de identidad nucleotídica de las secuencias CDV/VSR12/Chile y CDV/VSR13/Chile con respecto a una secuencia de VDC de GenBank®.

Canine distemper virus isolate 265/02-3 hemagglutinin (H) gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ494318.1](#) Length: 1824 Number of Matches: 1

Range 1: 216 to 655 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
782 bits(423)	0.0	436/442(99%)	2/442(0%)	Plus/Plus
Query 9	ATTGTTGAAAAGAGGATATGGAGAAATTAGAGGCTCGTACATTCACCAAGTCATAGATGTC	68		
Sbjct 216	ATTGTTGAAAAGAGGATATGGAGAAATCAGAGGC-CGTACA-TCACCAAGTCATAGATGTC	273		
Query 69	TTGACACCGCTCTTCAAAATTATTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACAAAACTA	128		
Sbjct 274	TTGACACCGCTCTTCAAAATTATTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACAAAACTA	333		
Query 129	AACGAGATCAAAACAATTTATCCTTCAAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAGGGAATTC	188		
Sbjct 334	AACGAGATCAAAACAATTTATCCTTCAAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAGGGAATTC	393		
Query 189	GACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAATTTTACT	248		
Sbjct 394	GACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAATTTTACT	453		
Query 249	AATTATTGCGATACAATTGGGATCAGAAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTT	308		
Sbjct 454	AATTACTGCGATACAATTGGGATCAGAAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTT	513		
Query 309	TTATCAGCACTCTCAGGAGGCAGAGGTGACATATTCACCACATACAGATGCAGTGGAGCT	368		
Sbjct 514	TTATCAGCACTCTCAGGAGGCAGAGGTGACATATTCACCACATACAGATGCAGTGGAGCT	573		
Query 369	ACTACTTCAGTGGGCAGAGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTTGATCTCA	428		
Sbjct 574	ACTACTTCAGTGGGCAGAGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTTGATCTCA	633		
Query 429	AGAACATCAGAGATAACCAATA	450		
Sbjct 634	AAAACATCAGAGATAACCAATA	655		

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA-JAMETT, G.; CHALMERS, W.S.; CUNNINGHAM, A.A.; CLEAVELAND, S.; HANDEL, I.G.; BRONSVOORT, B.M.** 2011. Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Vet. Microbiol.* 152: 247–257.
2. **APPEL, M.; SUMMERS, B.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* 44: 187–191.
3. **BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W.** 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine Distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127: 1-18.
4. **CESPEDES, PF.; CRUZ, P.; NAVARRO, C.** 2010. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Arch. Med. Vet.* 42: 15-28.
5. **FRISK, A.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W.** 1999. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *Journal of clinical microbiology* 37: 3634–3643.
6. **GAMIZ, C.; MARTELLA, V.; ULLOA, R.; FAJARDO, R.; QUIJANO-HERNANDEZ, I.; MARTINEZ, S.** 2011. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Vet Res Commun.* 35: 381-390.
7. **GREENE, C.** 2008. Canine distemper: What's new in treatment and prevention. 62<sup>nd</sup> SCIVAC International Congress, Rimini, Italia.
8. **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. Medicina Veterinaria. 18 p.
9. **KIMURA, 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. E.* 16: 111-120.
10. **KUMAR, S., TAMURA, K.; NEI, M.** 1994. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis software for microcomputers. *Comp. Appl. Biosci.* 10: 189-191.
11. **MACARTHY, A.; SHAW, M.; GOODMAN, S.** 2007. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc. R. Soc. B* 274: 3165-3174.

12. **MACLACHLAND, N.; DUBOVI, E.** 2011. *Paramyxoviridae*. **In:** Fenner's Veterinary Virology. 4th ed. Elsevier. China. pp. 299-325.
13. **MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine Distemper Virus. *Vet Clin Small Anim* 38: 787-797.
14. **MELI, M.L.; SIMMLER, P.; CATTORI, V.; MARTÍNEZ, F.; VARGAS, A.; PALOMARES, F.; LÓPEZ-BAO, J.V.; SIMON, M.A.; LÓPEZ, G.; LEÓN-VIZCAINO, L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.** 2010. Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes. *Lynx pardinus*. *Vet. Microbiol.* 146: 132-137.
15. **MOREIRA, R.; STUTZIN, M.** 2005. Estudio de la mortalidad de zorros en la cuarta región. *Boletín Veterinario Oficial* N°3. Servicio Agrícola Ganadero, División de Protección Pecuaria, Chile. pp. 1-8.
16. **MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M.** 1999. *Veterinary Virology*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier. California, USA. pp. 423-425.
17. **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: 5009-5017.
18. **THOMPSON, J.; HIGGINSS, D.; GIBSON, T.** 1994. Clustal W: Improving the sensitivity progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
19. **WOMA, T.Y.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A.M.; QUAN, M.; OOSTHUIZEN, M.** 2009. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. 2010. *Vet. Microbiol.* 143: 126-132.