



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

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA VARIABILIDAD GENÓMICA DE
LA REGIÓN F_{sp} DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL
VIRUS DISTEMPER CANINO**

**GENOMIC VARIABILITY IN F_{sp} REGION FROM FUSION
PROTEIN GENE OF CANINE DISTEMPER VIRUS: A
PRELIMINARY STUDY**

Carolina Alejandra Vera Yévenes

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
2014



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

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA VARIABILIDAD GENÓMICA DE
LA REGIÓN F_{sp} DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL
VIRUS DISTEMPER CANINO**

**GENOMIC VARIABILITY IN F_{sp} REGION FROM FUSION
PROTEIN GENE OF CANINE DISTEMPER VIRUS: A
PRELIMINARY STUDY**

Carolina Alejandra Vera Yévenes

NOTA FINAL:

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

FIRMA

PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS

PROFESOR CONSEJERO: JOSE PIZARRO LUCERO

PROFESOR CONSEJERO: CRISTOBAL BRICEÑO URZÚA

SANTIAGO, CHILE
2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en estas líneas mis más sinceros agradecimientos a las personas que han contribuido tanto en el inicio como en la culminación de esta etapa académica.

En primer lugar quiero agradecer a mis queridos abuelos María y Danton, por ser parte importante de este sueño que hoy se realiza, por apoyarme siempre y enseñarme a que puedo conseguir las cosas que me proponga.

Quiero agradecer también a mis padres Alfonso y Cecilia, quienes al igual que mis abuelos siempre creyeron en mí, agradecerles por el apoyo incondicional, por la paciencia y por brindarme las herramientas necesarias para poder sobrellevar estos años de carrera.

A mi padrino y mecenas William, por siempre estar dispuesto a apoyarme de forma económica en lo que necesitara, por los consejos a veces un poco torpes pero que siempre me ayudaron a seguir adelante.

A mi hermano Alejandro por ser parte importante de mi vida, a mis hermanos de la vida William, María, Lorna, por estar siempre ahí para mí en los momentos de debilidad. Mención especial a Catalina por ayudarme a terminar esta memoria de título que en algún momento me pareció interminable.

A Edson por corregir los errores de redacción y puntuación de este texto, y por todo el apoyo, paciencia y cariño entregados, sobre todo en los momentos difíciles.

Finalmente quiero agradecer a mis profesores Carlos Navarro, José Pizarro y Cristobal Briceño, por ayudarme con esta memoria.

RESUMEN

El Distemper Canino (DC) es una de las principales enfermedades infecciosas en canes domésticos. La introducción de vacunas de virus vivos modificados ha ayudado a mantener controlada la enfermedad. No obstante, en las últimas décadas se ha observado un aumento de la incidencia de esta patología en poblaciones de canes de todo el mundo, desarrollándose inclusive en animales vacunados.

Los linajes de virus distemper canino (VDC) circulantes en el mundo se han descrito en base al análisis de la hemaglutinina (H) debido a que posee un alto grado de variabilidad genética. Sin embargo, nuevos estudios han detectado mayores variaciones en la secuencia aminoacídica de una región de la proteína de fusión (F).

Para determinar la variabilidad de las cepas de campo en comparación con las vacunas y las cepas de otros linajes, en esta memoria de título se analizó la variabilidad genómica de la región Fsp del gen de la proteína de fusión de VDC.

Para esto se implementó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) capaz de amplificar esta región variable, la cual fue identificada mediante su secuencia nucleotídica. Estas secuencias se compararon con cepas vacunales y con cepas de campo de los linajes conocidos. Además, se construyó un árbol filogenético para esta región variable.

Los resultados de la comparación de nucleótidos arrojaron que las secuencias de las cepas de campo tienen mayor homología a la cepa vacunal Onderstepoort y según la filogenia pertenecerían al linaje América 1.

PALABRAS CLAVE: Virus Distemper Canino, Distemper Canino, proteína de fusión, proteína F, Fsp, RT-PCR.

ABSTRACT

The Canine Distemper (CD) is one of the main infectious diseases in domestic dogs. The introduction of live attenuated-viral vaccines has helped to maintain the disease under control. However, in the past few decades it has been observed worldwide a rising number of cases even in vaccinated animals.

The canine distemper virus (CDV) lineages circulating in the world have been described based on the hemagglutinin analyses, due to its high degree of genetic variability. Recently, new studies have reported greater variations in the amino acidic sequence of a region in the fusion protein (F).

In order to determine the variability of the field strains in comparison with the vaccines and strains from other lines, in this dissertation the genomic variability of the Fsp region from the CDV fusion protein gene is analyzed.

With this purpose, a chain-reaction of the polymerase with reverse transcription, capable of amplifying this variable region, was implemented and identified through its nucleotide sequence. These sequences were compared with vaccine strains and with field strains of known lineages. Additionally, a phylogenetic tree was built for this variable region.

The results of the nucleotides comparison shows that the field strains have more homology to the vaccine strain Onderstepoort and according to phylogeny, it would belong to the America 1 lineage.

KEYWORDS: Canine Distemper Virus, Canine Distemper, fusion protein, F protein, Fsp, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Distemper Canino (DC)

El Distemper Canino es una enfermedad multisistémica contagiosa, letal y de amplia distribución mundial, causada por el Virus Distemper Canino (VDC). Este virus afecta a los mamíferos del orden Carnívora miembros de las familias Canidae, Felidae, Mustelidae, Ailuridae, Mephitidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Hyaenidae y Phocidae (Deem *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2005; Lamb y Parks, 2007; Pinotti *et al.*, 2009), siendo los caninos domésticos los mayormente afectados por esta patología. Además, se ha observado la enfermedad en pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona (Appel *et al.*, 1991), y en algunos primates como el macaco japonés (*Macaca fuscata*) en Japón y monos Rhesus (*Macaca mulatta*) en China (Yoshikawa *et al.*, 1989; Qiu *et al.*, 2011).

Patogenia y signos clínicos de la enfermedad en canes domésticos

DC es una enfermedad que afecta a perros de todas las edades, siendo los cachorros de 3 a 6 meses de edad los más susceptibles debido a que han perdido los anticuerpos maternos y su sistema inmune aún es inmaduro para responder contra la infección (Martella *et al.*, 2008). Las principales vías de ingreso del virus son ocular, respiratoria y oral, a través de aerosoles y fómites, alcanzando superficies mucosas donde se establece la primera interacción con el sistema inmune del hospedero mediante la infección temprana de linfocitos locales y células mononucleares (von Messling *et al.*, 2005; Lamb y Parks, 2007). La primera viremia ocurre entre los días 4-6 post-infección (PI) y produce la infección de los tejidos linfáticos con aparición de fiebre y el comienzo de la linfopenia. La segunda viremia se acompaña de pirexia y determina la infección de las células epiteliales de todos los tejidos del cuerpo. Esta viremia se acompaña por la aparición de sarpullidos e hiperqueratosis, y determina el comienzo de la fase sintomática (Deem *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2008; Pinotti *et al.*, 2009).

Los signos clínicos asociados a la enfermedad dependen de la virulencia de la cepa viral, la edad, estado inmune y sanitario del animal. En especies susceptibles, los sistemas respiratorio, gastrointestinal y el sistema nervioso central (SNC) son los más comprometidos. El mayor porcentaje de las infecciones en canes domésticos es subclínico, presentándose la enfermedad de forma leve y con síntomas tales como languidez, anorexia,

fiebre e infección del tracto respiratorio superior. Por otro lado, la forma aguda de la enfermedad presenta una elevada mortalidad, manifestando signos asociados al sistema respiratorio y gastrointestinal, incluyendo conjuntivitis, descargas óculo-nasales, neumonía, vómitos, diarrea (muchas veces hemorrágica), caquexia y deshidratación severa. Dependiendo de la cepa viral, puede ocurrir encefalomiелitis aguda en asociación o inmediatamente después de la manifestación sistémica. Dentro de las numerosas manifestaciones neurológicas asociadas a la infección (rigidez cervical, convulsiones, síntomas vestibulares y cerebrales, y ataxia sensorial), la mioclonia es el único síntoma neurológico sugestivo de DC (Appel y Summers, 1999; Deem *et al.*, 2000; von Messling *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2008 Pinotti *et al.*, 2009). La inmunosupresión severa asociada a VDC potencia la susceptibilidad a infecciones secundarias, contribuyendo a las elevadas tasas de mortalidad de la enfermedad (von Messling *et al.*, 2005).

Prevención

Actualmente, la vacunación es la principal estrategia para controlar la enfermedad. Las vacunas con virus vivos atenuados (VVA) estimulan la respuesta inmune humoral y celular e inducen memoria inmunológica. El desarrollo y la utilización de estas vacunas han contribuido a una drástica reducción en la incidencia de DC en canes domésticos. A pesar de esto, en el último tiempo se han observado brotes de la enfermedad en poblaciones de perros inmunizados pertenecientes a diversas regiones geográficas. Aunque no se han determinado las causas, dichos brotes podrían explicarse ya sea por la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia, por la emergencia de nuevas cepas lo suficientemente variables como para evadir la respuesta inmune generada por las vacunas, por fallas en la administración de las vacunas, o bien, por el estado sanitario e inmunológico del animal (Bolt *et al.*, 1997; Pardo *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008; Pratelli, 2011; Panzera *et al.*, 2012; Sarute *et al.*, 2014).

Diagnóstico

En la actualidad, el diagnóstico de DC se basa en la sospecha clínica apoyada por la manifestación de los signos clínicos y en los antecedentes de riesgo predisponentes a la enfermedad. Sin embargo, la falta de especificidad en los síntomas asociados a la infección puede llevar a confusión con otras patologías en el diagnóstico final, por lo cual se han

desarrollado diversas metodologías de diagnóstico complementario, entre las que se incluyen técnicas serológicas, como ensayos de inmunohistoquímica y ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay); y técnicas moleculares, como el ensayo de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción reversa); (Deem *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2008; Pinotti *et al.*, 2009). Si bien la medición de anticuerpos séricos (Ac) IgM (contra las proteínas del núcleo viral N y P) y las IgG (contra los antígenos de la cápsula H y F) pueden ayudar en el diagnóstico del virus, los problemas de las pruebas serológicas radican en no ser capaces de diferenciar entre Ac maternos, vacunales o producto de la infección (Frisk *et al.*, 1999).

Debido a lo anterior, la detección de Ac no es suficiente para el diagnóstico definitivo, dado que perros infectados no vacunados con presentación aguda pueden morir sin aparición de Ac neutralizantes, mientras que los infectados en forma subaguda o crónica pueden tener niveles de Ac comparables con los perros vacunados. Es por esto que se han desarrollado metodologías moleculares basadas en RT-PCR, ya que permite, mediante la amplificación de fragmentos de ácido nucleico en forma exponencial, realizar un diagnóstico *ante-mortem* preciso en casos presuntivos de infección por VDC, pudiendo aplicarse al estudio de variaciones genómicas del virus mediante la caracterización molecular de secuencias relevantes del genoma (Frisk *et al.*, 1999; Calderón *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008).

Virus Distemper Canino

VDC está clasificado dentro del orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae* y género *Morbillivirus*. Se encuentra estrechamente relacionado con el virus del sarampión humano, los morbillivirus de los cetáceos, el virus de la peste bovina y de los pequeños rumiantes. Fue descrito por Edward Jenner en 1809, pero su etiología viral fue demostrada por Henri Carré en 1905 (Pardo *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2008; Pinotti *et al.*, 2009; Pratelli, 2011).

Es un virus envuelto de tamaño entre 150 a 300 nm de diámetro y su genoma es de aproximadamente 15,7 kilobases (kb) de longitud y está compuesto por ácido ribonucleico (RNA) no segmentado, de hebra simple, sentido de codificación negativo y codifica 6 proteínas virales: la proteína de la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la polimerasa mayor (L), la proteína de matriz (M), la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F); (Barret *et al.*, 1987; Sidhu *et al.*, 1993; von Messling y Cattaneo, 2002; Lee *et*

al, 2010). La envoltura lipídica contiene las dos glicoproteínas de superficie (F y H) que median el reconocimiento, la entrada y la salida del virus en la célula blanco, siendo ambas el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes generados por el sistema inmune del hospedero. La proteína N encapsula el RNA vírico y junto a las proteínas P y L constituyen el complejo ribonucleoproteína (RNP), el cual inicia la replicación y transcripción del genoma viral. La proteína M conecta las glicoproteínas de superficie y la nucleocápside durante la maduración viral (Appel y Summers, 1999; Pinotti *et al*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

Proteína F y región Fsp

La proteína F es una glicoproteína transmembrana que participa en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedero (Lamb y Parks, 2007). La proteína F es codificada por el gen F bajo la forma de un precursor inactivo denominado pre-F0, el cual, mediante el reconocimiento del péptido señal (Fsp), es procesado para formar las subunidades F1 y F2 que establecen un heterodímero para constituir la forma activa de la proteína F (Figura 1). El Fsp no se encuentra en las partículas virales maduras debido a que la maduración de la proteína F requiere su procesamiento proteolítico. A pesar de lo anterior, estaría involucrado indirectamente en la actividad de la proteína F, limitando su expresión a nivel intracelular y en la superficie, con la consecuente reducción de los niveles de fusión célula-célula. Esta región también contribuiría a la virulencia e, incluso, en la patogénesis viral (Barret *et al.*, 1987; Cherpillod, 1999; von Messling y Cattaneo, 2002; Plattet *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010).

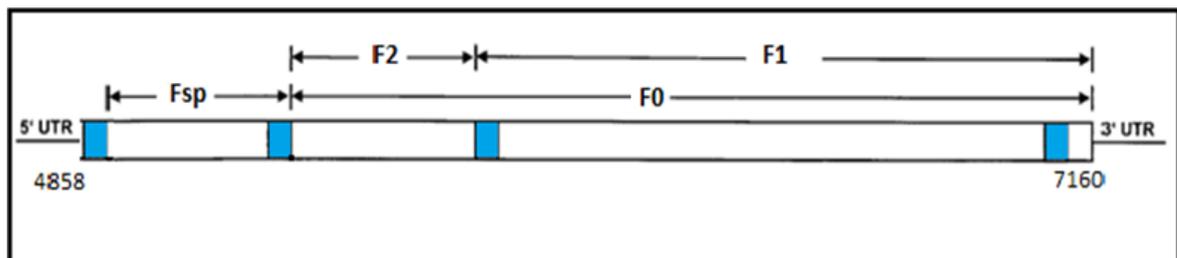


Figura 1: Esquema del gen F (nucleotídeos 4858-7160). Regiones que codifican para las subunidades de la proteína F (Modificado de von Messling y Cattaneo, 2002).

El gen F es el segundo segmento más variable dentro del genoma de VDC. A nivel de su secuencia aminoacídica la proteína F varía en torno al 4% entre aislamientos de campo,

siendo las subunidades F1 y F2 más conservadas, mientras que la región Fsp presenta variaciones de hasta un 27% (Sultán *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). En cuanto a las diferencias entre nucleótidos, en un estudio de Sarute (2012) se observó un rango de 65-69 sitios nucleotídicos variables al comparar secuencias de campo de Uruguay y Argentina con la cepa vacunal Onderstepoort (Sarute, 2012). Por lo tanto, los valores de variabilidad de la región Fsp son incluso superiores a los descritos para la proteína H (alrededor del 10%), razón por la cual esta región ha sido utilizada en estudios de caracterización y evolución de VDC (von Messling y Cattaneo, 2002; Sultán *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Sarute *et al.*, 2013). Para la región Fsp también se han realizado estudios de filogenia, encontrando concordancia con los linajes existentes para la proteína H, exceptuando el linaje África debido a que aún no ha sido caracterizado por esta región.

Linajes de VDC

Los linajes de VDC circulantes en el mundo se han descrito en base al análisis de la hemaglutinina debido a que posee un alto grado de heterogeneidad genética, permitiendo hasta la fecha, clasificar la mayoría de las cepas de campo en ocho linajes: África, América-1 (cepas vacunales), América-2, Asia-1, Asia-2, Europa-1, Europa-2 (Europe wild-life) y Europa-3 (Arctic-like); (Woma *et al.*, 2010). Sin embargo, nuevos estudios han detectado mayores variaciones en la secuencia aminoacídica de una región de la proteína de fusión (F) (Sultán *et al.*, 2009; Sarute *et al.*, 2013; Sarute *et al.*, 2014).

Estudios filogenéticos en Uruguay, tanto del gen H como de la región Fsp, han descrito dos linajes de campo co-circulando actualmente en Sudamérica: el denominado Europe 1/Sudamerica 1, que se extiende en Europa, Argentina, Brasil y Uruguay; y Sudamérica 2, que es exclusivo de Argentina (Panzera *et al.*, 2012; Sarute *et al.*, 2013). Sumado a esto, otros estudios realizados este año (2014), revelan la existencia de dos nuevas variantes del virus: una encontrada en muestras de Ecuador, clasificadas por Sarute *et al.* (2014) en el linaje Sudamérica 3 mediante análisis filogenético de la región Fsp; y otra perteneciente a Colombia, también clasificada en el linaje Sudamérica 3 por Espinal *et al.* (2014) mediante el análisis del gen H. Como ambas variantes fueron clasificadas por regiones distintas no se puede establecer si existe relación o no entre ellas (Espinal *et al.*, 2014; Sarute *et al.*, 2014).

En nuestro país, Salas (2013) determinó por medio del estudio de un segmento del gen H que existirían al menos dos linajes circulando: América 1 y Europa 1.

El objetivo del presente trabajo es realizar un análisis comparativo y filogenia de las secuencias nucleotídicas de algunas cepas de campo presentes en la región metropolitana y secuencias conocidas de la región variable del gen de la proteína F, para determinar preliminarmente la variación genómica de la región Fsp del gen de la proteína F de VDC.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Controles

Como control negativo se utilizó sangre con anticoagulante de perros que no presentaban signos clínicos de la enfermedad, sin vacunaciones y sin antecedentes de riesgo. Para los controles positivos se utilizaron vacunas polivalentes disponibles en el comercio con VVA del VDC, “Nobivac® Puppy DP” (cepa Onderstepoort), “Canigen MHA2PPi/L” (cepa Lederle) y “Vanguard® Plus 5/L” (cepa Snyder-Hill). Para el control de los reactivos, se empleó agua libre de nucleasas.

Muestras

Se utilizaron 22 aislados de RNA genómico de VDC previamente extraídos de sangre periférica, recolectados desde el Instituto Neurológico Veterinario en tubos con EDTA (2 mL), provenientes de perros domésticos que presentaron signos clínicos de la enfermedad, algunos con serología positiva a VDC y positivos a la detección del gen H y N de VDC. Estas muestras se encontraban almacenadas hace más de un año en los laboratorios de Virología y Microbiología a -20 °C (Jara, 2011; Muñoz, 2013; Salas, 2013) (Cuadro 1).

Canino	Raza	Sexo	Edad	Vacunación contra VDC	Canino	Raza	Sexo	Edad	Vacunación contra VDC
1 y 2	Poodle	M	6 años	Sin información	A	Mestizo	M	1,5 años	Si
3	Mestizo	H	2 años	Si	B	Mestizo	M	2 años	No
4	Mestizo	M	1 año	No	C	Mestizo	M	1,5 años	Si
5	Bull Terrier	H	2 años	Si	D	Bóxer	M	3 años	Si
6	Mestizo	H	1 año	Si	E	Labrador	M	1 año	Si
7	Mestizo	H	3 años	No	F	Bóxer	M	2 años	No
8	Mestizo	M	3,5 años	No	G	Mestizo	M	2,5 años	Si
9	Bóxer	M	2 años	Sin información	H	Mestizo	H	1 año	Si
10	Mestizo	H	9 meses	No	I	Labrador	M	1,5 años	Si
11	Mestizo	H	1,5 años	No	J	Mestizo	M	3 años	Si
12	Mestizo	M	1 año	Si					

Cuadro 1: Clasificación de muestras de RNA almacenadas a -20°C en el laboratorio. Estas muestras provienen de perros con signos clínicos sospechosos de DC, y se han clasificado según: raza, sexo, edad, estado de vacunación contra VDC (Modificado de Salas, 2013 y Muñoz, 2013).

Obtención del RNA viral (vacunas)

La extracción del genoma viral desde las vacunas comerciales se realizó mediante el uso del kit de extracción TRIzol® LS. Para esto se reconstituyó cada vacuna liofilizada con 750 µL de reactivo dejándose incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego, a cada tubo se le agregó 200 µL de cloroformo, se mezcló enérgicamente por 15 segundos y se incubó a TA por 5 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 7000xg por 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a tubos limpios. Para la precipitación del RNA, se agregó 0,5 mL de isopropanol a cada tubo, se dejaron 10 minutos a TA, se centrifugaron a 7000xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavaron 3 veces con etanol (1mL de etanol 75%), se agitaron 15 segundos en vórtex y se centrifugaron a 2000xg durante 5 minutos a TA. Una vez terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado de RNA al vacío durante 5 minutos y se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente, el

RNA fue incubado a 60 °C por 10 minutos y después se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

Diseño de partidores

Los partidores para la reacción se diseñaron mediante el uso del programa *online* de acceso libre OligoPerfect™ Designer de *Life Technologies™*, y fueron enviados a sintetizar a Bioscan®.

Para el diseño se ingresó en el programa la secuencia nucleotídica de la región que comprende a los nucleótidos 4858-7160, correspondiente al gen de la proteína F completo de la cepa de la vacuna Onderstepoort (AF378705) disponible en el GenBank® (Lee *et al.*, 2010). Luego se seleccionaron los parámetros deseados para estos partidores: tamaño de partididor entre 18-30 pares de bases (pb), temperatura de fusión 55-60 °C, % GC entre 40-60% (Abd-Elsalam, 2003). El tamaño del amplicón se fijó entre 490-510 pb para que abarcara la región *Fsp* completa de 405 pb del gen F (nucleótidos 4935-5340) (Figura 2).

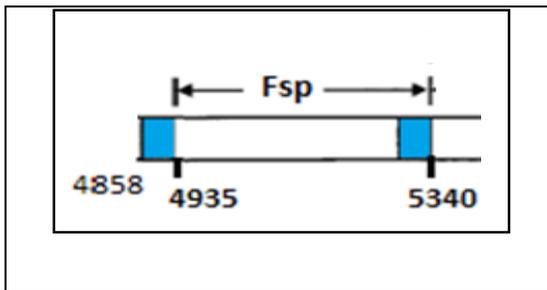


Figura 2: Esquema de la región *Fsp* (nucleótidos 4935-5340). Región a amplificar. (Cortado y modificado de von Messling y Cattaneo, 2002).

Una vez ingresados todos los datos al programa, este nos entregó el siguiente par de partidores, P1: 5'- GACAGGAACCCCCACAAAC - 3' (nucleótidos 4905-4923), P2: 5' – GATCTTGTAATGGACACTATCAGTCC - 3' (nucleótidos 5381-5406), los que permitieron amplificar un fragmento de alrededor de 500 pb.

RT-PCR

Para realizar el RT-PCR se utilizó el termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo con temperaturas, tiempos y ciclos adecuados para cada etapa.

Mezcla de la reacción

La reacción del RT-PCR se realizó usando el kit “MyTaq™ one step RT-PCR” (Bioline®) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada tubo se agregaron 16 µL de “2X Reaction Mix”, 0,5 µL de “RiboSafe” inhibidor de RNasa, 0,5 µL de transcriptasa reversa, 5 µL de cada partidor y 5 µL del templado de RNA consiguiendo un volumen final de 32 µL.

En el termociclador se utilizó el siguiente protocolo de ciclos y temperaturas para la reacción: 1 ciclo a 45 °C por 30 minutos y a 95 °C por 1 minuto para realizar la transcripción inversa y activar la polimerasa respectivamente; 30 ciclos para realizar la amplificación a 95 °C por 10 segundos (desnaturalización), 55 °C por 10 segundos (alineación), 72 °C por 30 segundos (elongación) y 1 ciclo a 72 °C por 5 min (extensión final). Una vez finalizado el proceso del termociclador los tubos de PCR se almacenaron a 4 °C.

Visualización de los productos amplificados

Para visualizar los productos del RT-PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer Tris HCl (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA). El producto de cada RT-PCR fue mezclado con un producto comercial de carga (Fermentas®) y cargado en los pocillos del gel, también se añadió a un pocillo, un marcador de tamaño molecular “O`Range Ruler™” (Fermentas®) que contiene fragmentos de DNA entre 50 y 1000 pb, lo que ayudó a determinar el tamaño del fragmento amplificado.

Una vez cargado el gel, se efectuó la electroforesis a 90V por 45 minutos. Posterior a esto, el gel se incubó en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 60 minutos, luego se dejó 10 minutos en agua para quitar el exceso del reactivo. Una vez terminado este tiempo, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y fue fotografiado.

Secuenciación de fragmentos amplificados

Se enviaron a secuenciar en triplicado al Centro de Secuenciación de la empresa Genytec Ltda. 4 de las muestras que resultaron positivas al método (Cuadro 2). Dentro de las muestras seleccionadas, 2 corresponden a aislados de RNA que anteriormente se utilizaron para realizar el análisis filogenético de la hemaglutinina (Salas, 2013).

Canino	Raza	Sexo	Edad	Vacunación	Sistema corporal afectado
7	Poodle	Macho	6 años	Sin información	Nervioso
A	Mestizo	Macho	1,5 años	Si	Respiratorio
F *	Bóxer	Macho	2 años	No	Nervioso
H *	Mestizo	Hembra	1 año	Si	Nervioso

*Muestras utilizadas en el análisis filogenético de la hemaglutinina, F corresponde a la muestra CDV13/VSR/Chile (linaje América 1) y H a la muestra CDV12/VSR/Chile (linaje Europa 1); (Salas, 2013).

Cuadro 2: Identificación de las muestras enviadas a secuenciar, clasificadas según raza, sexo, edad, estado de vacunación y sistema corporal afectado.

Determinación identidad nucleotídica

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa *online* de libre acceso Clustal W 2.0.12 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), consiguiéndose una secuencia consenso para cada muestra utilizada. Luego, estas secuencias consenso fueron ingresadas al programa informático *online* de libre acceso BLAST 2.2.28 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar el origen de los fragmentos de DNA amplificados en la RT-PCR.

Comparación de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias consenso de las 4 muestras fueron alineadas utilizando el programa Clustal W 2.0.12 y comparadas entre sí para determinar el porcentaje de variación genómica existente. Luego se compararon con las secuencias de las cepas vacunales Onderstepoort y Snyder Hill, y después con algunas secuencias conocidas de aislamientos pertenecientes a los distintos linajes.

Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se realizó por medio del programa MEGA 6.06 de análisis bioinformático. Para esto, se ingresaron al programa las 4 secuencias amplificadas y algunas secuencias de referencia de los linajes ya conocidas (Cuadro 3).

Por medio de los métodos de “*neighbor-joining*” y “*máximum likelihood*”, se construyeron dos árboles filogenéticos para cada método utilizando diferentes modelos evolutivos (cuatro en total). Después de analizar los datos, fue escogido el árbol que se elaboró a

través del método de “*neighbor-joining*” con el modelo evolutivo de “*p-distance*” para calcular las distancias genéticas existentes. La robustez del árbol se determinó mediante el análisis de “*bootstrap*” utilizando mil réplicas (Hall, 2011).

Cepas	Origen	N° acceso GenBank	Linaje
Onderstepoort	Vacuna/EEUU	AF378705	América 1
Snyder Hill	Vacuna/Canadá	GU138403	América 1
A75/17	Suiza	AF164967	América 2
164071	EEUU	EU716337	América 2
01-2689	EEUU	AY649446	América 2
5804P	EEUU	AY386316	Europa 1
Arg23	Argentina	KC257465	Europa 1
UY102	Uruguay	KC331150	Europa 1
19876	EEUU	AY964110	Europa 2
18133	EEUU	AY964108	Europa 3
HL	China	EF596901	Europa 3
21261	EEUU	AY964112	Europa 3
W729B	Japón	AB607904	Asia 1
GS0812-4	China	HQ850148	Asia 1
HeB(07)1	China	EU327874	Asia 1
Th12	Tailandia	AB509344	Asia 1
TW-KM2	Taiwan	EU192008	Asia1
007Lm	Japón	AB474397	Asia 2
007Lm-1vp	Japón	AB462810	Asia 2
M25CR	Japón	AB475097	Asia 2
011C	Japón	AB476401	Asia 2
50Con	Japón	AB476402	Asia 2
Arg24	Argentina	KC257466	Sudamérica
Arg25	Argentina	KC257467	Sudamérica
Arg26	Argentina	KC257468	Sudamérica
Edmonston-Zagreb	Vacuna/EEUU	U03760	-

Cuadro 3. Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis comparativos y filogenéticos.

Análisis de resultados

Se consideraron positivas aquellas muestras que luego del RT-PCR originaron un fragmento de DNA de alrededor de 500 pb y se confirmó su identidad nucleotídica con VDC al ingresarlas en el programa BLAST.

Los resultados de la comparación de nucleótidos se analizaron según los datos de los pacientes (sexo, edad, raza, estado de vacunación, signos clínicos) para determinar si existían variaciones que se pudiesen asociar con estos parámetros. Además, mediante la

comparación de las cepas de campo con las vacunas comerciales se evaluó si las diferencias existentes podrían explicar la ineficacia de estas últimas en la inmunidad de los canes.

La construcción del árbol filogenético nos permitió conocer el linaje de las 4 muestras secuenciadas, según la región Fsp del gen F. Paralelamente, se comparó los resultados de filogenia obtenidos en el análisis filogenético del gen de la proteína H (Salas, 2013), con los logrados para la región Fsp.

Medidas de bioseguridad

Para la realización del trabajo de laboratorio, se implementaron las medidas de seguridad acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de Microbiología y Virología animal, consistentes en el uso de material limpio, utilización de delantal blanco y guantes. Además, para la visualización de los productos amplificados, debido a la manipulación de bromuro de etidio y el transiluminador de luz UV, se requirió del uso de una placa de acrílico y gafas con filtro UV, esta última con el fin de proteger la visión del observador. Por otra parte, tanto el gel que fue sumergido en bromuro de etidio como los guantes utilizados fueron incinerados ya que este compuesto tiene propiedades mutagénicas.

RESULTADOS

Implementación de la técnica de RT-PCR para la región Fsp del gen de la proteína F del VDC

Una vez sintetizados los partidores diseñados y establecido el protocolo de la RT-PCR en 30 ciclos y temperatura de alineamiento a 55 °C, se sometieron a la reacción: 2 controles negativos, 4 controles positivos, 22 aislados de RNA y el control de reactivos.

Para visualizar los resultados, las muestras fueron separadas en 2 geles. En el primero se cargaron los controles negativos; los controles positivos correspondientes a las vacunas comerciales de las cepas Onderstepoort, Lederle y Snyder Hill que generaron bandas de mediana intensidad de alrededor de 500 pb; y 12 aislados de RNA, de los cuales uno originó banda visible (Figura 3). Es importante señalar que al canino que resultó positivo a este método se le habían extraído dos muestras de sangre, ambas positivas a VDC mediante RT-

PCR del gen N. La que produjo banda fue procesada el mismo día de la extracción de la sangre; la que no produjo banda fue procesada tres días después.

En el segundo gel se cargaron los controles negativos, 10 aislados de RNA positivos a los métodos de RT-PCR para genes H y N que originaron bandas de alrededor de 500 pb correspondientes al fragmento de DNA esperado, y el control de reactivos (Figura 4).

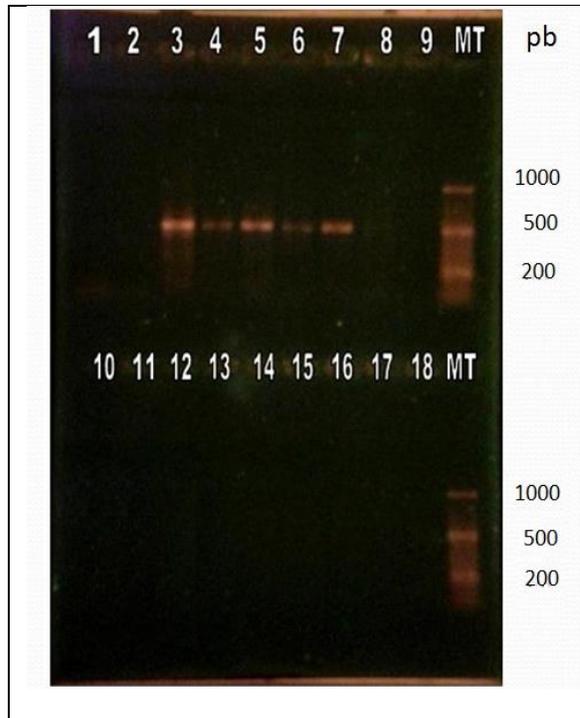


Figura 3: Visualización productos amplificados por RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con posterior incubación en bromuro de etidio. Los carriles 1 y 2 corresponden a los controles negativos, perro sano vacunado y perro sano sin vacunación respectivamente. Los carriles 3, 4, 5 y 6 corresponden a los controles positivos, vacunas cepas Onderstepoort, Lederle (4 y 5) y SnyderHill respectivamente. Los carriles 7 y 8 corresponden a una muestra de un perro positivo a VDC por RT-PCR del gen N, la primera procesada el mismo día de la extracción de la muestra y la segunda procesada 3 días después de la extracción. Los carriles del 9 al 18 corresponden a muestras de RNA positivas a VDC por el método de RT-PCR para el gen N y negativas para el del gen H (Cuadro 1). MT corresponde al marcador de tamaño molecular (50 - 1000 pb).

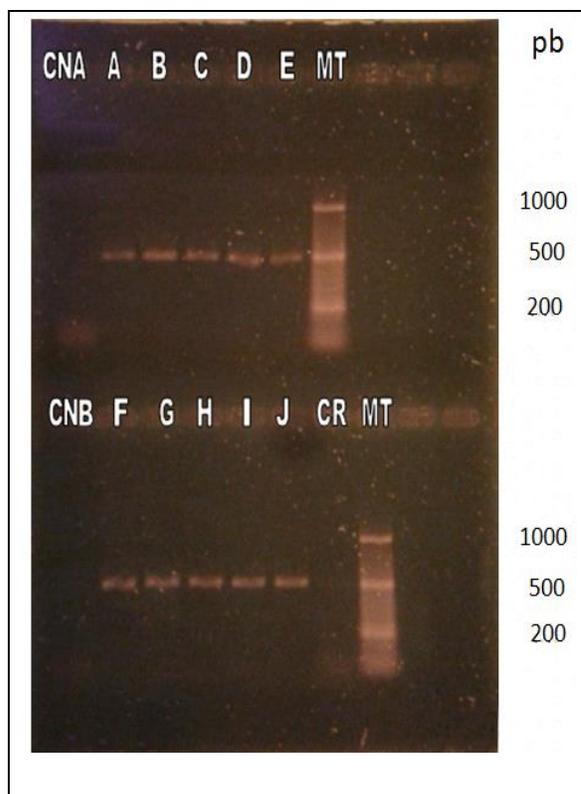


Figura 4: Visualización de productos amplificados por RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con posterior incubación en bromuro de etidio. CNA y CNB corresponden a los controles negativos (perro sano vacunado y perro sano sin vacunar, respectivamente). Los carriles con las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J corresponden a muestras de RNA positivas a VDC por los métodos de RT-PCR para los genes H y N (Cuadro 1). Los carriles con MT corresponden al marcador de tamaño molecular (50 - 1000 pb). CR corresponde al control de reactivos.

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

El alineamiento nucleotídico para cada muestra (Anexo 1) permitió obtener cuatro secuencias consenso: CDV/CVY1 (canino 7), CDV/CVY2 (canino A), CDV/CVY3 (canino F) y CDV/CVY4 (canino H); (Cuadro 4).

Posteriormente, con el fin de identificar el origen de los fragmentos de DNA amplificados en la RT-PCR, las secuencias consenso se ingresaron al programa BLAST y se comprobó que las cuatro secuencias corresponden a VDC (Anexo 2), corroborado por los altos porcentajes de identidad nucleotídica obtenidos respecto de las secuencias oficiales almacenadas en el GenBank®.

> CDV/CVY1

```
ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACATACACCCAACAAGACCGCCCCCACAACCCAGCA
CCGAACCCGAAGAGACCAGGAGTCCCGAGCAGCACAGTACAATACCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGA
TGGTCGAATACCGGACAGACGGTGC TGGTACACTACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAAC TAGCCACAGA
TTGAAGAATACGGTACGTCACGGAACCACGAGGCTATTTATCCAGCATACACCAGAGACGAGCTCAAAGGAG
CGAGATCCCAGATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCTGTG
GTGCCCTCGGAATAGCCACGTTCTTTCTTGTGTCCAAGGCT
```

> CDV/CVY2

```
ATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGAACCAGACACATGACCAACAAGACCGCCCCCACAACCCAGCA
CCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCACAGCATAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGA
TCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCTGAACCATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAGACTAGCCACAGA
TTGAAGAACAATCCAGTTCACGGAGACCAGAAATGTAATTTATCCAGCACATGACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAG
CGAGATCCCAGATCGAGAATGATGAACCCAATGCAATCAACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCTGTG
GTGCCCTCGGAATAGCCAGTCTATGTCTGTGTTCCAAATGT
```

> CDV/CVY3

```
ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCCCACAACCCAGCA
CCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCACAGCAATACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGA
TCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCATCACCATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACATGCCATGGT
TTGAAGAACAATCCAGTTCACGGTTTCCACGAGGCTATTTATCCAGCACAAATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAG
CGAGATCCCAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCTGTG
GTGCCCTCGGAATGCCAGTCTCTTTCTGTCCCCCAAGGCT
```

> CDV/CVY4

```
ATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAAGAGAGACCCAACAAGACCGCCCCGATAACCCAGCA
CCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGGATAGCATAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGA
TCCTCGAACATCGGAGATACCCGTCTCCTACACCATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAAC TAGCGATAGA
TTGAAGAACAATCCAGTTCACGGAAACCACGAGGCTATTTATCCAGGAGAGACGATAGAGTGTCTCAAAGGAG
CGAGATCCGATATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCTGTG
GTGCCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT
```

Cuadro 4: Secuencias consenso para las 4 muestras amplificadas alineadas por medio del programa ClustalW. Estas secuencias fueron editadas de los resultados obtenidos del fragmento amplificado de alrededor de 500 pb (Anexo 1), conservando solo las 405 pb correspondientes a la región Fsp del gen F del VDC.

Análisis comparativo de secuencias

Las secuencias consenso señaladas en el Cuadro 4 fueron ingresadas nuevamente al programa ClustalW para realizar los análisis comparativos.

a.- Entre cepas de campo

Las cepas de campo presentaron 107 sitios nucleotídicos variables entre ellas (Anexo 3), encontrándose que sus identidades nucleotídicas van desde 83% a 89% (Tabla 1).

b.- Entre cepas de campo y vacunas comerciales Onderstepoort y Snyder Hill

Al compararse las secuencias de las cepas de campo con las secuencias de las vacunas Onderstepoort y Snyder Hill se observó un rango de 20-40/ 39-59 sitios nucleotídicos

variables para cada vacuna (Anexo 4), y sus identidades nucleotídicas fueron entre 90% a 95% para Onderstepoort y 85% a 90% para Snyder Hill (Tabla 2). Las secuencias de campo muestran mayor homología a la cepa vacunal Onderstepoort.

c.- Entre cepas de campo y cepas de referencia de los linajes conocidos

Al realizar la comparación de las secuencias de las cepas de referencia de los distintos linajes se observó que la identidad nucleotídica de las cepas de cada linaje va en un rango entre el 92% al 100% (Anexos 5 al 12), en cambio, entre los linajes se observaron identidades nucleotídicas entre un 82% a 90% (Tabla 3). La identidad nucleotídica de las secuencias de las cepas de campo varía de las secuencias representantes de cada linaje en un rango que va entre 75% a 95%, siendo el mayor porcentaje de similitud con la cepa representante del linaje América 1, observándose valores desde 75% a 81% con respecto a los otros linajes (Tabla 3/Anexo 13).

Tabla 1: Porcentaje de identidad de las secuencias de campo.

Cepas	% de identidad			
	CDV/CVY1	CDV/CVY2	CDV/CVY3	CDV/CVY4
CDV/CVY1	100			
CDV/CVY2	83	100		
CDV/CVY3	86	88	100	
CDV/CVY4	84	87	89	100

Tabla 2: Porcentaje de identidad de las secuencias de campo con las vacunas comerciales cepas Onderstepoort y Snyder Hill.

Cepas	% de identidad	
	Onderstepoort	Snyder Hill
CDV/CVY1	90	85
CDV/CVY2	93	88
CDV/CVY3	94	89
CDV/CVY4	95	90

Tabla 3: Porcentaje de identidad de las secuencias de campo con una cepa representante de cada linaje.

% de identidad												
Linaje / Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1: As2 / M25CR	100											
2: E3 / HL	87	100										
3: As1 / TW-KM2	86	84	100									
4: Am2 / A75/17	89	86	88	100								
5: E1 / 5804P	88	86	88	90	100							
6: S / ARG24	88	86	88	90	90	100						
7: E2 / 19876	87	87	87	89	89	90	100					
8: Am1 / Onders	85	84	82	86	84	84	84	100				
9: CVY4	81	80	79	81	80	80	80	95	100			
10: CVY2	80	79	77	80	78	79	79	93	88	100		
11: CVY3	79	79	77	81	79	79	80	94	89	87	100	
12: CVY1	77	75	75	78	76	78	77	90	86	83	84	100

As1: Asia 1; As2: Asia 2; Am1: América 1; Am2: América 2; E1: Europa 1; E2: Europa 2; E3: Europa 3; S: Sudamérica. La línea separa a las cepas representantes de los distintos linajes de las cepas de campo.

Análisis filogenético

Este análisis se realizó en base al alineamiento de 30 secuencias nucleotídicas de la región Fsp, en el cual se incluyeron las cuatro secuencias de los aislados de esta memoria de título correspondientes a Chile, 25 secuencias de aislamientos de diferentes regiones geográficas (América, Asia y Europa) y 1 secuencia del Fsp del virus Sarampión como grupo externo (Cuadro 3).

El árbol construido segregó a las cuatro muestras en el linaje América 1, incluyendo a la secuencia CDV/CVY4, que anteriormente en el análisis de Salas (2013), se identificó como parte del linaje Europa 1 (Figura 5).

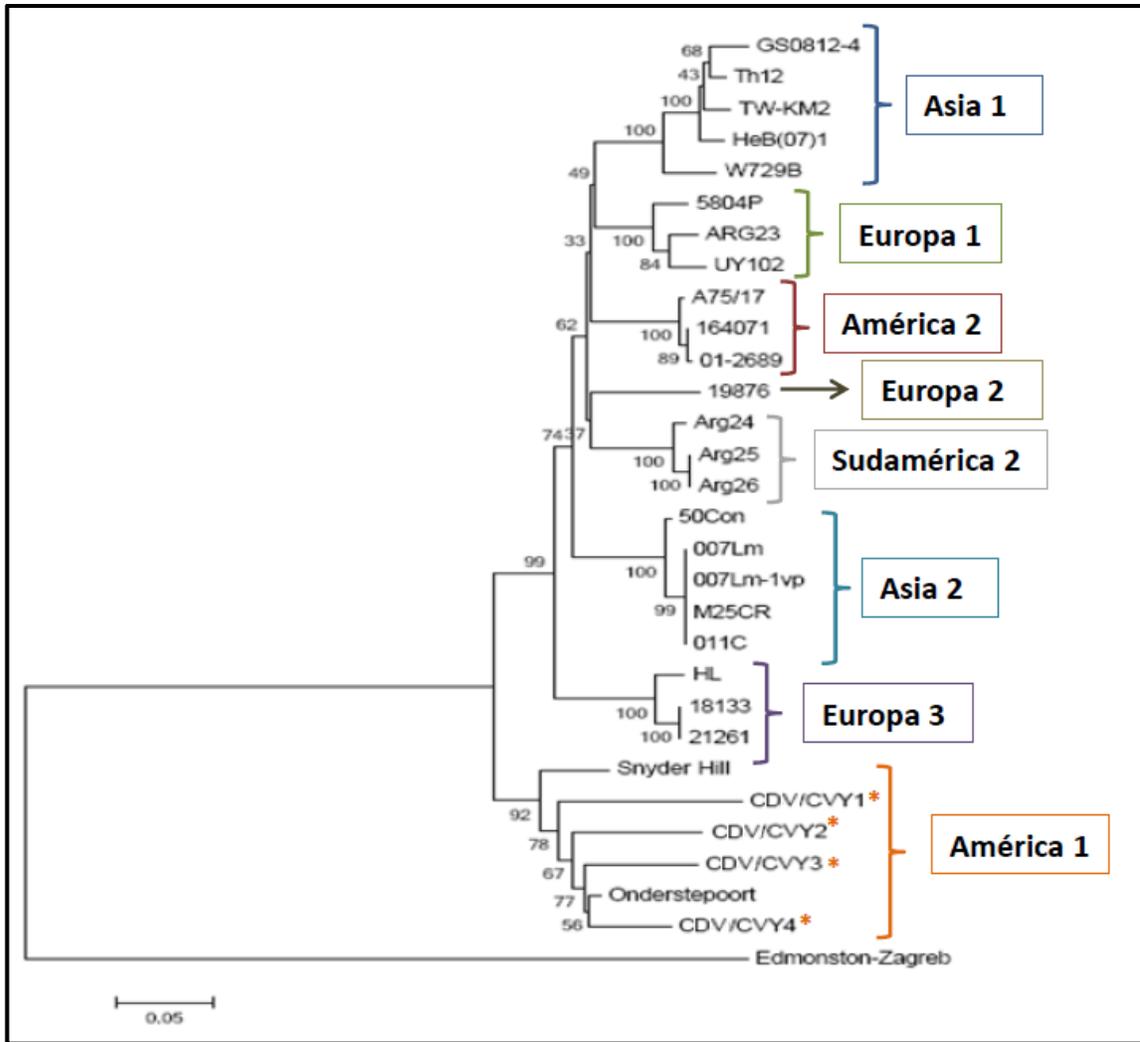


Figura 5: Relaciones evolutivas de la región Fsp. Análisis evolutivo realizado en el programa MEGA6 utilizando el método de *neighbor joining*. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de *p-distances*. Para determinar la robustez del árbol se usó un *bootstrap* de mil réplicas. El análisis incluyó 30 secuencias nucleotídicas. Se marcan con (*) las secuencias analizadas en esta memoria.

DISCUSIÓN

DC es una de las enfermedades virales con mayor incidencia y relevancia a nivel mundial en cánidos domésticos y silvestres. Desde hace algunas décadas se registran continuamente brotes de la enfermedad en el mundo, así como una preocupante expansión en el rango de hospederos (Appel y Summers, 1999; Goller *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2006).

La introducción en los años cincuenta de vacunas a VVA contra este virus y su extensivo uso han ayudado a mantener la enfermedad controlada (Martella *et al.*, 2008). Sin embargo,

en las últimas décadas, pareciera observarse un aumento en la incidencia de esta enfermedad en las poblaciones caninas de todo el mundo, observándose también varios episodios de la enfermedad en animales vacunados (Decaro *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2008). Las vacunas desarrolladas para combatir esta enfermedad están preparadas con virus de las cepas pertenecientes al linaje América 1 (Onderstepoort, Snyder Hill, Lederle, entre otras).

De acuerdo al estudio de Salas (2013), en nuestro país circularían al menos dos de los ocho linajes descritos para VDC según el análisis del gen H: América 1 y Europa 1. En este estudio se buscó conocer la variación genómica del virus mediante el análisis de la región variable del gen de la proteína F de VDC, utilizando RT-PCR para amplificar un fragmento que la contenga. Esto, debido a que se ha establecido que la región Fsp presenta una variabilidad genómica mayor a la detectada en la proteína H (hasta 27% a nivel aminoacídico entre aislamientos de campo) y consta solamente de 405 pb, lo cual facilita su amplificación (von Messling y Cattaneo, 2002). Por otra parte, se han analizado las posibles implicancias del Fsp sobre la función de la proteína F madura y en la patogénesis viral. Estudios realizados con cepas mutantes en la región Fsp mostraron que la presencia de mutaciones específicas tiene efectos drásticos sobre la actividad de fusión de la proteína F. De este modo, Von Messling y Cattaneo (2002) generaron mutantes con cambios en uno de los dos codones de inicio presentes en el Fsp, detectándose una actividad de fusión 20 veces superior en los mutantes respecto a los virus parentales. Del mismo modo, se estableció que la longitud del Fsp influye sobre los niveles de actividad de la proteína F a través del análisis de mutantes con Fsp de longitud variable, lo que reveló que la variante con el Fsp más corto (28 aa) presentó una actividad de fusión 70 veces mayor que la proteína parental, por lo que proponen que esta región podría modular la función de la proteína F, ya que las proteínas con mutaciones específicas o un Fsp de menor longitud presentaron mayor actividad fusogénica *in vitro* (von Messling y Cattaneo, 2002).

La técnica de RT-PCR implementada para esta memoria de título logró amplificar un fragmento de alrededor de 500 pb, en los 4 controles positivos y en 11 de las 22 muestras analizadas (50%) y no se amplificó en los controles negativos. Si bien estos resultados indican que la técnica está en funcionamiento y es útil para este estudio, no se recomienda su uso como método diagnóstico debido a que amplifica una región que presenta gran

variabilidad genómica, siendo más propicio, al momento de implementar un método diagnóstico, seleccionar una secuencia conservada del genoma para realizar la amplificación (Frisk *et al.*, 1999).

Las posibles explicaciones del por qué la mitad de las muestras resultaron ser falsos-negativos pueden estar relacionadas con la cantidad de RNA insuficiente en esas muestras para realizar la reacción con estos partidores específicamente, debido a que la extracción del RNA no se realizó inmediatamente después de extraída la muestra (Salas, 2013). Como se pudo observar en los resultados con las muestras 7 y 8, para este protocolo de RT-PCR sería importante extraer el RNA viral inmediatamente después de tomada la sangre del paciente. Además, al comparar estos resultados con los obtenidos por Muñoz (2013) se observa, según sus resultados, que las muestras que generaron bandas más intensas son positivas al protocolo desarrollado en esta memoria de título, en cambio las que generan bandas más tenues resultan negativas. Cabe destacar que uno de los controles negativos, tanto para este método como para el realizado para el gen N, correspondía a un perro adulto con todas sus vacunas al día, siendo su última vacunación diez meses antes de la toma de muestra sanguínea. Este resultado aislado corroboraría la idea de que vacunaciones anteriores no causarían falsos-positivos (Frisk *et al.*, 1999; Muñoz, 2013).

Es sabido que el RNA viral luego de su extracción puede ser muy lábil, resultando complejo trabajar con él debido a que puede ser fácilmente degradado por RNAsas de la piel y por temperaturas superiores a 4 °C. En almacenamiento puede permanecer indefinidamente activo a -70 °C, -192 °C (nitrógeno líquido) o liofilizado, y permanece activo alrededor de un mes a -10 °C (Pérez *et al.*, 1993). Considerando que los aislados de RNA utilizados para esta memoria de título se extrajeron hace más de un año y han permanecido almacenados a -20 °C en el laboratorio podría pensarse que la integridad del material genético se perdería por el excesivo tiempo de almacenamiento a una temperatura no apta. A pesar de ello, los resultados muestran que este factor no causó degradación del RNA.

De las 11 muestras positivas al RT-PCR se secuenciaron cuatro que cumplieran con distintos parámetros: 1.- la muestra de un perro adulto de seis años que presentaba signos neurológicos de la enfermedad, edad coincidente en la mayor frecuencia de presentación de

encefalitis crónica por infección con VDC (Frisk *et al.*, 1999); 2.- una muestra seleccionada por presentar un cuadro agudo con signos respiratorios a pesar de estar inmunizado contra el virus; 3.- la muestra de un perro vacunado que presentó la enfermedad; y 4.- muestra de un perro enfermo sin vacunar. El linaje de estas dos últimas fue identificado en el estudio del análisis filogenético del gen H (Salas, 2013). Hubiese sido deseable agregar a esta selección cachorros de 3 a 6 meses de edad con presentación aguda del cuadro gastrointestinal, con y sin calendario de vacunación al día, pero no fue posible contar con muestras con las características mencionadas.

Utilizando el programa BLAST se confirmó que estas secuencias pertenecen a VDC (Anexo 2) debido a que todas las secuencias entregadas por el programa correspondían al virus. Las secuencias amplificadas presentaron entre 80 a 89% de identidad nucleotídica respecto a los primeros 100 resultados entregados por el programa. Con esto, se comprueba que el método implementado es específico para la detección de VDC, y que con estos resultados de identidad nucleotídica se puede evidenciar lo variable de la región escogida para la amplificación.

Al realizar el alineamiento de las secuencias de campo (CDV/CVY1, CDV/CVY2, CDV/CVY3 y CDV/CVY4) se observaron 107 sitios nucleotídicos variables entre sí (Anexo 3), con valores de identidad nucleotídica entre 89 y 83% (Tabla 1). Estas diferencias parecen ser independientes de las características de los caninos, ya que no se observa mayor homología entre las secuencias de pacientes que presentan los mismos signos clínicos ni en los que están vacunados. Tampoco se observa mayor variación en la secuencia del paciente con signos respiratorios, ni en la secuencia del paciente de mayor edad.

En cuanto a la comparación de las secuencias de las muestras de campo respecto de las vacunas, se debe mencionar que la mayor identidad se logra con la cepa Onderstepoort. Lo anterior sugiere que una alternativa de vacunación exitosa sería con la vacuna Nobivac®, que contiene esta cepa. Al desconocerse la procedencia de las vacunas aplicadas a los perros que sí estaban inmunizados, no se puede descartar que una vacuna que contenga la cepa Onderstepoort pueda ser más o menos efectiva contra DC, considerando además el estudio de Salas (2013), el cual detectó el linaje Europa 1, y, al ser un linaje distinto al de la

cepa vacunal, podría constituir parte de las razones del por qué perros vacunados adquieren esta enfermedad.

En la comparación realizada entre las secuencias de las cepas de referencia de los linajes conocidos (Anexo 12), se observó que las secuencias del mismo linaje tienen porcentajes de identidad bastante altos entre sí (92 - 100%), mientras que entre los distintos linajes se distancian un poco más (82- 90%); (Tabla 3).

Para la elaboración de los árboles filogenéticos se probaron dos métodos: “*neighbor-joining*” y “*máximum likelihood*”. Se construyeron dos árboles para cada método con modelos evolutivos diferentes y, finalmente, se decidió dejar el árbol construido por el método de “*neighbor-joining*” con el modelo de “*p-distances*” debido a que este entregaba los mejores valores de “*bootstrap*”.

El análisis filogenético reveló que las cuatro muestras amplificadas pertenecen al linaje América 1, relacionándose mayormente con la cepa vacunal Onderstepoort. Este resultado concuerda con el análisis comparativo realizado a las secuencias. Si bien, en el estudio de Salas (2013) la muestra del canino H correspondía al linaje Europa 1, en este estudio la secuencia segregó, al igual que las otras tres, en el linaje América 1. Este resultado podría sugerir que ambas regiones están experimentando mutaciones de forma independiente en sus secuencias nucleotídicas, variando el gen H hacia el linaje europeo y la región Fsp hacia el americano; o que al estudiarse una sección acotada del gen H, como es el caso de Salas (2013), pudo generar segregación diferente, ya que se analiza solo una parte del gen y no el gen completo. Para dilucidar esto, sería recomendable analizar la muestra con ambas técnicas para estar absolutamente seguros de que corresponde a la muestra señalada y descartar una posible confusión entre las muestras debido al largo tiempo de almacenaje.

Al presentarse el linaje América 1 tanto en perros inmunizados como en no inmunizados, y sumado al grado de la variación existente entre las secuencias de las muestras recolectadas respecto a la cepa vacunal, se podría inferir que las secuencias analizadas corresponden a cepas de campo pertenecientes a este linaje, aunque no es posible descartar completamente que en el caso del canino H se trate de una reversión de la cepa atenuada, debido al alto porcentaje de identidad observado (95%). Para dilucidar esto, sería necesario conocer la cepa con la que los canes fueron inmunizados.

Se observa que el proceso evolutivo de los genes H y Fsp es equivalente, puesto que las secuencias se agrupan de igual forma en los árboles filogenéticos, agrupándose en los mismos linajes (Asia 1, Europa 1, América 2, Europa 2, Sudamérica, Asia 2, Europa 3 y América 1). Esto concuerda con estudios anteriores realizados en Asia (Sultán *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) y en Uruguay (Sarute *et al.*, 2013), estableciendo que ambas regiones genómicas ofrecerían la misma información debido a que se observan las mismas relaciones filogenéticas. Además, en Sarute *et al.* (2013) se menciona que las relaciones filogenéticas y los valores de variabilidad detectados en el Fsp, permitirían proponer un nuevo criterio para definir linajes de VDC en base a esta región: dos aislamientos pertenecerían a un mismo linaje si se agrupan en un mismo clado y presentan valores de divergencia aminoacídica menores a 19%, mientras que pertenecen a linajes distintos si dichos valores son superiores a 19% y se agrupan en clados diferentes.

Si bien los linajes reconocidos hasta ahora son los ocho mencionados por Woma *et al.* (2010) para el gen H, en el estudio realizado por Sarute *et al.* (2013) se menciona un linaje Sudamericano que agrupa tres muestras pertenecientes a Argentina y que estarían genéticamente relacionadas con el linaje Europa 2 (Wild-life) característico de carnívoros silvestres, que agrupa cepas aisladas de hurones, visones y zorros rojos (Martella *et al.*, 2006). Esta relación podría sugerir que este nuevo linaje podría provenir desde la fauna silvestre de Sudamérica y estaría infectando perros domésticos (Sarute *et al.*, 2013). En este trabajo, las secuencias pertenecientes al linaje Sudamericano también segregaron en un clado apartado, corroborando la idea de la existencia de un nuevo linaje.

En cuanto al resto de las investigaciones sobre filogenia del virus realizadas en Sudamérica, en Uruguay y Brasil estaría presente el linaje Europa 1 (Calderón *et al.*, 2007; Panzera *et al.*, 2012; Sarute *et al.*, 2013), al igual que en Chile según el estudio realizado por Salas (2013), y se postula que la existencia de este linaje en la región puede estar relacionado con la importación de animales desde el continente Europeo, facilitando la dispersión del virus a nuestro continente. Por otro lado, en Ecuador y Colombia, estudios recientes han demostrado la existencia de un nuevo linaje, denominado Sudamérica 3 en ambas regiones, mediante estudios independientes, falta aún establecer si estas cepas pertenecen al mismo linaje o corresponden a linajes distintos (Espinal *et al.*, 2014; Sarute *et al.*, 2014). Estos resultados muestran la existencia de una gran variedad de linajes presentes en nuestro

continente, razón por la cual las vacunas no resultarían complemente efectivas para controlar la enfermedad.

En conclusión, la región Fsp es un buen indicador para realizar filogenia del VDC ya que, al ser una región más acotada que el gen H, nos permitiría realizar una clasificación más rápida y certera de las cepas circulantes de VDC en cada región geográfica.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABD-ELSALAM, K.** 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. Biotechnol.* 2 (5): 91-95.
- **APPEL, M.; REGGIARDO, C.; SUMMERS, B.; PEARCE-KELLING, S.; MARÉ, C.; NOON, T.; REED, R.; SHIVELY, J.; ORVELL, C.** 1991. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch Virol.* 119 (1-2): 147-152.
- **APPEL, M.; SUMMERS, J.** 1999. Distemper canino: estado actual. Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. 5p.
- **BARRET, T.; CLARKE, D.; EVANS, S.; RIMA, B.** 1987. The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of canine distemper virus: a comparison of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. *Virus Res.* 8: 373-386.
- **BOLT, G.; JENSEN, T.; GOTTSCHALCK, E.; ARCTANDER, P.; APPEL, M.; BUCKLAND, R.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.** 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolated of canine distemper virus. *J. Gen. Virology.* 78: 367-372.
- **CALDERÓN, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J.** 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125: 341-349.
- **CHERPILLOD, P.; BECK, K.; ZURBRIGGEN, A.; WITTEK, R.** 1999. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus wild-type strain A75/17. *J. Virol.* 73 (3): 2263-2269.
- **DECARO, N.; CAMERO, M.; GRECO, G.; ZIZZO, N.; TINELLI, A.; CAMPOLO, M.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, C.** 2004. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 27: 177-181.
- **DEEM, S.; SPELMAN, L.; YATES, R.; MONTALI, R.** 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo. Wildl. Med.* 31 (4): 441-451.
- **ESPINAL, M; DÍAZ, F; RUIZ-SAENZ, J.** 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol.* 172: 168-176.
- **FRISK, A.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W.** 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11): 3634-3643.

- **GOLLER, K.; FYUMAGWA, R.; NIKOLIN, V.; EAST, M.; KILEWO, M.; SPECK, S.; MÜLLER, T.; MATZKE, M.; WIBBELT, G.** 2009. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Vet Microbiol.* 146: 245-252.
- **HALL, B.** 2011. *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual.* 4th ed. Sinauer Associated, Inc. Massachusetts, USA. 282 p.
- **JARA, P.** 2011. Detección del gen de la hemoaglutinina del Virus Distemper Canino mediante reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.
- **LAMB, R.; PARKS, G.** 2007. Paramixoviridae: the viruses and their replication. **In:** Knipe, D.; Howley, P. *Fields Virology* 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. pp 1449-1496.
- **LAN, N.; YAMAGUCHI, R.; INOMATA, A.; FURUYA, Y.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S.** 2006. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet Microbiol.* 115: 32-42.
- **LEE, M.; TSAI, K.; CHEN, L.; CHEN, C.; LIU, Y.; CHANG, C.; LEE, S.; HSU, W.** 2010. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Vet. J.* 183: 184-190.
- **MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol.* 116: 301-309.
- **MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine distemper virus. *Vet. Clin. Small Anim.* 38: 787-797.
- **MUÑOZ, C.** 2013. Diagnóstico molecular del virus distemper canino mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa del gen de la proteína de la nucleocápside viral. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 27 p.
- **PANZERA, Y; GALLO, M; SARUTE, N; GUASCO, S; CARDEILLAC, A; BONILLA, B; HERNÁNDEZ, M; FRANCIA, L; BEDÓ, G; LA TORRE, J; PERÉZ, R.** 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res.* 163: 401-404.
- **PARDO, I.; JOHNSON, G.; KLEIBOEKER, S.** 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43(10): 5009-5017.

- **PÉREZ, S.; ITURBE, R.; SALDÍVAR, E.** 1993. Caracterización del virus del distemper (moquillo canino) en cultivos celulares, aislado de animales clínicamente enfermos. *Veterinaria México*. 24 (1): 15-19.
- **PINOTTI, M.; GOLLAN, A.; DELGADO, A.; PASSEGGI, C.; OCCHI, H.; BLAINQ, L.; CANAVESIO, M.** 2009. Distemper canino. *Revista FAVE- Cs Veterinarias*. 8(2): 29-45.
- **PLATTET, P.; CHERPILLOD, P.; WIENER, D.; ZIPPERLE, L.; VANDELDELDE, M.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A.** 2007. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J. Virol.* 81 (20): 11413-11425.
- **PRATELLI, A.** 2011. Canine distemper virus: the emergence of new variants. *Vet. J.* 187 (3): 290-291.
- **QIU, W.; ZHENG, Y.; ZHANG, S.; FAN, Q.; LIU, H.; ZHANG, F.; WANG, W.; LIAO, G.; HU, R.** 2011. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerg Infect Dis.* 17 (8): 1541-1543.
- **SALAS, V.** 2013. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en perros infectados naturalmente en Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 23 p.
- **SARUTE, N.** 2012. Detección del virus distemper canino por RT-PCR en tiempo real y caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata mediante el análisis de los genes de la hemaglutinina y la proteína de fusión. Tesis de Maestría en Genética Evolutiva. Montevideo, Uruguay. U. de la República de Uruguay, Fac. de Ciencias. 89 p.
- **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): 1-6.
- **SARUTE, N; PÉREZ, R; ALDAZ, J; ALFIERI, A. A; ALFIERI, A. F; NAME, D; LLANES, J; HERNÁNDEZ, M; FRANCIA, L; PANZERA, Y.** 2014. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes.* 48: 474-478.
- **SIDHU, M.; HUSAR, W.; COOK, S.; DOWLING, P.; UDEM, S.** 1993. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology.* 193: 66-72.
- **SULTAN, S; CHAROENVISAL, N; LAN, N; YAMAGUCHI, R; MAEDA, K; KAI, K.** 2009. The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper virus. *Virol J.* 6(157): 1-9.

- **VON MESSLING, V.; CATTANEO, R.** 2002. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J. Virol.* 76 (9): 4172-4180.
- **VON MESSLING, V.; SPRINGFELD, C.; DEVAUX, P.; CATTANEO, R.** 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. Virol.* 77(23): 12579-125791.
- **VON MESSLING, V.; OEZGUEN, N.; ZHENG, Q.; VONGPUNSAWAD, S.; BRAUN, W.; CATTANEO, R.** 2005. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 79 (9): 5857-5862.
- **WOMA, T.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A.; QUAN, M.; OOSTHUIZEN, M.** 2010. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143: 126-132.
- **YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MARSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; YAMANOUCHI, K.** 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol.* 20 (3): 193-205.

ANEXO 1

Alineamiento secuencias obtenidas desde Genytec Ltda (ClustalW 2.1).

CDV/CVY1	
M7_1	CACAGGAACCCCCACAAACTGCCGTGCTCCATGCACAAGGGAATCCCCAGCTGCTCCAAA 60
M7_2	GACAGGAACCCCCACAAACAGCCGAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA 60
M7_3	TACAGGAACCCCCACAAACAGCCGTTCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA 60
	***** * *****
M7_1	ACCCAAACATACACCCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
M7_2	ACCCAAACATACACCCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
M7_3	ACCCAAACATACACCCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120

M7_1	AGGAGGTCCCGAGCAGCACAGTACAATACCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATGGT 180
M7_2	AGGAGGTCCCGAGCAGCACAGTACAATACCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATGGT 180
M7_3	AGGAGGTCCCGAGCAGCACAGTACAATACCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATGGT 180

M7_1	CGAATACCGGACAGACGGTGTGGTACACTACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAAC 240
M7_2	CGAATACCGGACAGACGGTGTGGTACACTACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAAC 240
M7_3	CGAATACCGGACAGACGGTGTGGTACACTACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAAC 240

M7_1	AGCCACAGATTGAAGAATACGGTACGTCACGGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACA 300
M7_2	AGCCACAGATTCTTGAATAACGGTACAAATACGGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACA 300
M7_3	AGCCACAGATTGAAGAATACGGTACGTCACGGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACA 300

M7_1	CCAGAGACAAGCTCAAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATC 360
M7_2	CCAGAGATGTGCTCAAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATC 360
M7_3	CCAGAGAGGCGCTCAAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATC 360

M7_1	AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCCGTGGTGCCTCGGAATAGCCA-GTTCCTTT 419
M7_2	AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCCGTGGTGCCTCGGAATAGCCA-GTTCCTTT 419
M7_3	ATCGCAGGCTCTCAGTACGGCAGGTGTGTATGGTGGTGCG-CGGAATAGCTACGCTCTTT 419
	* * ***** * * * * * ***** * * * * *
M7_1	CTTGTGTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 479
M7_2	CTTGTGTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 479
M7_3	CTTGTGTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 479

M7_1	GATAGTGTCATTACAT- 496
M7_2	GATAGTGTCATTACA-- 495
M7_3	GATAGTGTCATTACACT 497

CDV/CVY2	
MA_1	CACAGGAACCCCCACAAACAGCTTAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGA 60
MA_2	GACAGGAACCCCCACAAACAGCTTAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGA 60
MA_3	TACAGGAACCCCCACAAACAGCTCAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCATTTGCTCCAGA 60

MA_1	ACCCAGACACATGACCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
MA_2	ACCCAGACACATGACCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
MA_3	ACCCAGACACATGACCAACAGACCGCCCCCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120

MA_1	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCATAAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCT	180
MA_2	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCATAAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCT	180
MA_3	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCATAAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCT	180

MA_1	CGAACATCGGACAGACCCGCTCTCCTGAACCATGGACAGGATCAGGTCCCAGCAAGCAGACT	240
MA_2	CGTACATCGGACAGACCCGCTCTCCTGAACCATGGACAGGATCAGGTCCCAGCAAGCAGACT	240
MA_3	CGAACATCGGACAGACCCGCTCTCCTGAACCATGGACAGCAGCCCAAGCAAGCAGACT	240
	** *****	
MA_1	AGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCACGGAGACCAGAAATGTTATATCCAGCACATG	300
MA_2	AGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCACGGAGACCAGAAATGTTATATCCAGCACATG	300
MA_3	AGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCACGGAGACCAGAAATGTTATATCCAGCACATG	300

MA_1	ACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAGAATGATGAACCCAAATGCAATC	360
MA_2	ACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAGAATGATGAACCCAAATGCAATC	360
MA_3	ACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATCCCAGATCGAGAATGATGAACCCAAATGCAATC	360

MA_1	AACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCCGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTATGT	420
MA_2	AACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCCGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTATGT	420
MA_3	AACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTCCGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTATGT	420

MA_1	CTGTGTTCCAAATGTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT	480
MA_2	CTGTGTTCCAAATGTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT	480
MA_3	CTGTGTTCCAAATGTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT	480

MA_1	GATAGTG	487
MA_2	GATAGTG	487
MA_3	GAT---	483

CDV/CVY3

MF_2	GAGAGGAAGTCCCAAAAAGCCGAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA	60
MF_3	TACAGGAACCCCAACATTCAGCCGAGCCCCATGCACAAGGGAATGAGAAAAAGCTCCAAA	60
MF_1	CACAGGGGCCCCCAAAAAGCCGAGCCCCATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA	60
	* ** * *****	
MF_2	ACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCCCAACCCAGCACCGAACCCGAAAGAGACC	120
MF_3	ACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCCCAACCCAGCACCGAACCCGAAAGAGACC	120
MF_1	ACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCCCAACCCAGCACCGAACCCGAAAGAGACC	120

MF_2	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCAATACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATTGATCCT	180
MF_3	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCAATACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATTGATCCT	180
MF_1	AGGACCTCCCGAGCACGCACAGCAATACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATTGATCCT	180

MF_2	CGAACATCGGACAGACCCGCTCTCCATCACCATGGACAGGATCAGGTCCCAGCAAGCAACA	240
MF_3	CGAACATCGGACAGACCCGCTCTCCATCACCATGGACAGGATCAGGTCCCAGCAAGCAACA	240
MF_1	CGAACATCGGACAGACCCGCTCTCCATCACCATGGACAGGATCAGGTCCCAGCAAGCAACA	240

MF_2	TGCCATGGTTTGAAGAACATCCCAGTTCACGGTTTCCAGGGCTATTATCCAGCACAAAT	300
MF_3	TGCCATGGTTTGAAGAACATCCCAGTTCACGGTTTCCAGGGCTATTATCCAGCACAAAT	300
MF_1	TGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCACGGAAACCAGGGCTATTATCCAGCACAAAT	300
	***** * ***** * ** *****	

```

MF_2      CCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
MF_3      CCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
MF_1      CCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
          *****

MF_2      AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTTT 420
MF_3      AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTTT 420
MF_1      AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTTT 420
          *****

MF_2      CTGTCCCCCAAGGCTCAGAATCATTGGAATAATTTGTCAACATTTGGGATCATCGGGACT 480
MF_3      CATCCCCCAAGGCTCAGAATCATTGGAATAATTTGTCAACATTTGGGATCATCGGGACT 480
MF_1      CTGTGTTCCAAGGCTCAGAATCATTGGAATAATTTGTCAACATTTGGGATCATCGGGACT 480
          *          *****

MF_2      GAATGTGTCCATAT- 494
MF_3      GAATGTGTCCATATC 495
MF_1      GAATGTGTCCATA-- 493
          *****

```

CDV/CVY4

```

MH_1      GACAGGAACCCCCAACAACAGCCGAGCTTCATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA 60
MH_2      CACAGGAACCCCCAACAACAGCCGAGACGCATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA 60
MH_3      TATTGGAAACCCCCAACAACAGCCGAGCCCCATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAA 60
          *          *****

MH_1      ACCCAAAGAGAGACCCAACAAGACCCGCCCCCGATAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
MH_2      ACCCAAAGAGAGACCCAACAAGACCCGCCCCCGATAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACC 120
MH_3      ACCCAAAGAGAGACCCAACCAACCCGCCCCCGATAACCCAGCACCGAACCCGAATTGACC 120
          *****

MH_1      AGGACCTCCCGAGCAGGATAGCATAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATCCT 180
MH_2      AGGACCTCCCGAGCAGGATAGCATAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATCCT 180
MH_3      AGGACCTCCCGAGCAGGATAGCATAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACATATGATCCT 180
          *****

MH_1      CGAACATCGGAGATACCCGCTCCTACACCATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAAC 240
MH_2      CGAACATCGGAGATACCCGCTCCTACATTATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAAC 240
MH_3      CGAACATCGGAGATACCCGCTCCTACACCATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAAC 240
          *****

MH_1      AGCGATAGATTGAAGAACAATCCAGTTCACGGAAACCACGAGGCTATTATCCAGGAGAGA 300
MH_2      AGCGTATAGATTGAAGAACAATCCAGTTCACGGAAACCACGAGGCTATTATCCAGGAGAGA 300
MH_3      AGCGATAGATTGAAGAACAATCCAGTTCACGGACCAACGAGGCTATTATCCAGCACAGA 300
          ****          *****          *

MH_1      CGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCGATATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
MH_2      CGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCGATATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
MH_3      CGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCCGATATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATC 360
          *****

MH_1      AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTTT 420
MH_2      AACTCAGTCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTAT 420
MH_3      AACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTCCGTGGTGCCTCGGAAATGCCAGTCTCTTT 420
          *****

MH_1      CTGTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 480
MH_2      CTGTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 480
MH_3      CTGTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATCATCGGGACT 480
          *****

MH_1      G---- 481
MH_2      GATAG 485
MH_3      GAT-- 483
          *

```

ANEXO 2

Porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias consenso respecto de secuencias oficiales del GenBank®, BLAST.

CDV/CVY1

Description	max score	total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus strain Onderstepoort complete genome	544	544	100%	3e-151	91%	AF378705.1
Canine distemper virus strain Vacc-O matrix protein (M) and fusion protein (F) genes partial cds	507	507	96%	4e-140	90%	FJ694851.1
Canine distemper virus strain Vacc-N matrix protein (M) and fusion protein (F) genes partial cds	501	501	96%	2e-138	90%	FJ694849.1
Canine distemper virus complete genome	499	499	100%	7e-138	89%	AF014953.1
Canine distemper virus RNA for fusion protein	494	494	100%	3e-136	89%	X65509.1
Canine distemper virus isolate Onderstepoort complete genome	488	488	100%	2e-134	89%	AF305419.1
Canine distemper virus fusion protein (F) mRNA complete cds	488	488	100%	2e-134	89%	M21849.1
Canine distemper virus strain Shuskiv complete genome	449	449	100%	8e-123	87%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007 complete genome	449	449	100%	8e-123	87%	HM046486.1
Canine distemper virus strain CDV3 complete genome	449	449	100%	8e-123	87%	EU726268.1
Canine distemper virus strain CDV3 fusion protein (F) gene complete cds	449	449	100%	8e-123	87%	EU263644.1
Canine distemper virus fusion protein gene complete cds	444	444	100%	4e-121	87%	KC771418.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC VR-1587 complete genome	444	444	100%	4e-121	87%	JN896987.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill complete genome	444	444	100%	4e-121	87%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 fusion protein (F) gene complete cds	427	427	100%	4e-116	86%	JF915710.1
Canine distemper virus isolate 98-2646 complete genome	355	355	100%	2e-94	83%	AY542312.2
Canine distemper virus isolate 98-2654 complete genome	355	355	100%	2e-94	83%	AY466011.2
Canine distemper virus isolate 98-2645 complete genome	355	355	100%	2e-94	83%	AY445077.2
Canine distemper virus Dog Rockborn fusion protein (F) gene partial cds	333	333	100%	8e-88	82%	AF026244.1
Canine distemper virus strain vaccine X fusion protein (F) gene complete cds	327	327	100%	4e-86	82%	EU072198.1
Canine distemper virus isolate 25259 fusion protein and hemagglutinin genes complete cds	322	322	100%	2e-84	81%	AY964114.1

CDV/CVY2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus strain Onderstepoort complete genome	603	603	99%	6e-169	94%	AF378705.1
Canine distemper virus strain Vacc-O matrix protein (M) and fusion protein (F) genes partial cds	564	564	95%	3e-157	93%	FJ694851.1
Canine distemper virus strain Vacc-N matrix protein (M) and fusion protein (F) genes partial cds	564	564	95%	3e-157	93%	FJ694849.1
Canine distemper virus complete genome	542	542	99%	1e-150	91%	AF014953.1
Canine distemper virus RNA for fusion protein	536	536	99%	6e-149	91%	X65509.1
Canine distemper virus isolate Onderstepoort complete genome	531	531	99%	3e-147	91%	AF305419.1
Canine distemper virus fusion protein (F) mRNA complete cds	531	531	99%	3e-147	91%	M21849.1
Canine distemper virus strain Shuskiv complete genome	514	514	99%	3e-142	90%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007 complete genome	514	514	99%	3e-142	90%	HM046486.1
Canine distemper virus strain CDV3 complete genome	514	514	99%	3e-142	90%	EU726268.1
Canine distemper virus strain CDV3 fusion protein (F) gene complete cds	514	514	99%	3e-142	90%	EU263644.1
Canine distemper virus fusion protein gene complete cds	508	508	99%	1e-140	90%	KC771418.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC VR-1587 complete genome	508	508	99%	1e-140	90%	JN896987.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill complete genome	508	508	99%	1e-140	90%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 fusion protein (F) gene complete cds	492	492	99%	1e-135	89%	JF915710.1
Canine distemper virus Dog Rockborn fusion protein (F) gene partial cds	381	381	98%	3e-102	84%	AF026244.1
Canine distemper virus strain vaccine X fusion protein (F) gene complete cds	370	370	98%	6e-99	83%	EU072198.1
Canine distemper virus strain Vacc-P matrix protein (M) and fusion protein (F) genes partial cds	364	364	95%	3e-97	84%	FJ694850.1
Canine distemper virus isolate 25259 fusion protein and hemagglutinin genes complete cds	364	364	98%	3e-97	83%	AY964114.1
Canine distemper virus isolate 00-2601 complete genome	355	355	88%	2e-94	85%	AY443350.1
Canine distemper virus 00-2601 fusion protein (F) gene complete cds	355	355	88%	2e-94	85%	AY395984.1
Canine distemper virus genomic RNA complete sequence strain 50CnH	331	331	98%	3e-87	82%	AR490678.1
Canine distemper virus genomic RNA complete sequence strain 50ConH	331	331	98%	3e-87	82%	AR490676.1

CDV/CVY3

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome	604	604	100%	2e-169	94%	AF378705.1
Canine distemper virus strain Vacc-Q matrix protein (M) and fusion protein (F) genes, partial cds	573	573	96%	4e-160	93%	FJ694851.1
Canine distemper virus strain Vacc-N matrix protein (M) and fusion protein (F) genes, partial cds	573	573	96%	4e-160	93%	FJ694849.1
Canine distemper virus, complete genome	560	560	100%	3e-156	92%	AF014953.1
Canine distemper virus RNA for fusion protein	555	555	100%	2e-154	91%	X65509.1
Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome	549	549	100%	7e-153	91%	AF305419.1
Canine distemper virus fusion protein (F) mRNA, complete cds	549	549	100%	7e-153	91%	M21849.1
Canine distemper virus strain Shuskiv, complete genome	510	510	100%	3e-141	89%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome	510	510	100%	3e-141	89%	HM046486.1
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	510	510	100%	3e-141	89%	EU726268.1
Canine distemper virus strain CDV3 fusion protein (F) gene, complete cds	510	510	100%	3e-141	89%	EU263644.1
Canine distemper virus fusion protein gene, complete cds	505	505	100%	2e-139	89%	KC771418.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome	505	505	100%	2e-139	89%	JN896987.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome	505	505	100%	2e-139	89%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 fusion protein (F) gene, complete cds	494	494	100%	3e-136	89%	JF915710.1
Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome	392	392	96%	1e-105	85%	AY542312.2
Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome	392	392	96%	1e-105	85%	AY466011.2
Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome	392	392	96%	1e-105	85%	AY445077.2
Canine distemper virus isolate 00-2601, complete genome	350	350	100%	8e-93	82%	AY443350.1
Canine distemper virus 00-2601 fusion protein (F) gene, complete cds	350	350	100%	8e-93	82%	AY395984.1

CDV/CVY4

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome	638	638	98%	2e-179	95%	AF378705.1
Canine distemper virus strain Vacc-Q matrix protein (M) and fusion protein (F) genes, partial cds	595	595	95%	9e-167	95%	FJ694851.1
Canine distemper virus strain Vacc-N matrix protein (M) and fusion protein (F) genes, partial cds	579	579	95%	9e-162	94%	FJ694849.1
Canine distemper virus, complete genome	577	577	98%	3e-161	93%	AF014953.1
Canine distemper virus RNA for fusion protein	571	571	98%	2e-159	92%	X65509.1
Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome	568	568	98%	2e-158	92%	AF305419.1
Canine distemper virus fusion protein (F) mRNA, complete cds	568	568	98%	2e-158	92%	M21849.1
Canine distemper virus strain Shuskiv, complete genome	538	538	98%	2e-149	91%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspian/2007, complete genome	538	538	98%	2e-149	91%	HM046486.1
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	538	538	98%	2e-149	91%	EU726268.1
Canine distemper virus strain CDV3 fusion protein (F) gene, complete cds	538	538	98%	2e-149	91%	EU263644.1
Canine distemper virus fusion protein gene, complete cds	532	532	98%	7e-148	91%	KC771418.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1587, complete genome	532	532	98%	7e-148	91%	JN896987.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome	532	532	98%	7e-148	91%	GU138403.1
Canine distemper virus isolate CDV-GZ1 fusion protein (F) gene, complete cds	516	516	98%	7e-143	90%	JF915710.1
Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome	418	418	97%	2e-113	86%	AY542312.2
Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome	418	418	97%	2e-113	86%	AY466011.2
Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome	418	418	97%	2e-113	86%	AY445077.2
Canine distemper virus Dog Rockborn fusion protein (F) gene, partial cds	418	418	97%	2e-113	86%	AF026244.1
Canine distemper virus strain vaccine X fusion protein (F) gene, complete cds	407	407	97%	5e-110	85%	EU072198.1
Canine distemper virus isolate 25259 fusion protein and hemagglutinin genes, complete cds	396	396	97%	1e-106	85%	AY964114.1

ANEXO 3

Alineamiento de las secuencias de campo. ClustalW 2.1 (Región Fsp).

CDV/CVY2	ATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGAACCAGACACATGACCAACAAGACCGCCCC	60
CDV/CVY4	ATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAGAGAGACCCAACAAGACCGCCCC	60
CDV/CVY3	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAACACTTACCCAACAAGACCGCCCC	60
CDV/CVY1	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAACAATACACCCAACAAGACCGCCCC	60
	*** * ***** * ***** * ***** * * *****	
CDV/CVY2	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCATAACA	120
CDV/CVY4	CGATAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGAGATAGCATAACA	120
CDV/CVY3	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCAATACA	120
CDV/CVY1	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGAGGTCCCGAGCACGACACAGTACAATA	120
	* * ***** * ***** * * * * *	
CDV/CVY2	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTGAACC	180
CDV/CVY4	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGAGATACCCGCTCCTACACC	180
CDV/CVY3	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTATCAC	180
CDV/CVY1	CCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATGTTTGGTTCGAATACCGGACAGACGGTGTGGTACACT	180
	***** *	
CDV/CVY2	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAGACTAGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCAC	240
CDV/CVY4	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCGATAGATTGAAGAACATCCCAGTTCAC	240
CDV/CVY3	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCCATGCCATGGTTGAAGAACATCCCAGTTCAC	240
CDV/CVY1	ACGGACAGGATCAGTCCCCAAGCAAACTAGCCACAGATTGAAGAATACGGTACGTCAC	240
	* ***** * * * * * * * * * * * * * * * *	
CDV/CVY2	GGAGACCAGGAATGTATTATCCAGCACATGACAG-AGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATC	299
CDV/CVY4	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGGAGA-GACGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATC	299
CDV/CVY3	GGTTTCCAGGAGCTATTATCCAGCACAAATCCAG-AGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATC	299
CDV/CVY1	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACACCAG-AGACGAGCTCAAAGGAGCGAGATC	299
	** ***** *	
CDV/CVY2	CCAGATCGAGAATGATGAACCCAATGCAATCAACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGT	359
CDV/CVY4	CGATAATCGAAAGCGGCAACCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGT	359
CDV/CVY3	CCAGATCGAAAGCGGCAAGGCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGT	359
CDV/CVY1	CCAGATCGAAAGCGGCAACCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGT	359
	* * ***** * * ***** * ***** * ***** * * * *	
CDV/CVY2	CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCA-GTCTATGTCTGTGTTCCAAATGT	405
CDV/CVY4	CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCA-GTCTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT	405
CDV/CVY3	CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCA-GTCTCTTTCTGTCCCCAAGGCT	405
CDV/CVY1	CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCACGTTCTTTCTTGTGT-CCAAGGCT	405
	***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

ANEXO 4

Alineamiento secuencias CDV/CVY1, CDV/CVY2, CDV/CVY3 y CDV/CVY4 versus Onderstepoort (OND) y Snyder Hill.

CDV/CVY1	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACATACACCCAAACAAGACCGCCCC	60
OND	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAAACAAGACCGCCCC	60
	***** * *****	
CDV/CVY1	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGAGGTCCCGAGCAGCACAGTACAATA	120
OND	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCACAGCATAACA	120
	***** ***** * ** *	
CDV/CVY1	CCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGATGGTCGAAATACCGGACAGACGGTGTGTTACACT	180
OND	TCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCGTCTCCTACACC	180
	***** * ***** ** *****	
CDV/CVY1	ACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAACCTAGCCACAGATTGAAGAATACGGTACGTCAC	240
OND	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACCTAGCCACAGATTGAAGAATACCCAGTTCAC	240
	* ***** * ***** * * ****	
CDV/CVY1	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACACCAGAGACGAGCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
OND	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACATACCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
	***** * ***** *****	
CDV/CVY1	CAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
OND	CAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360

CDV/CVY1	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCACGTTCTTTCT-TGTGTCCAAGGCT	405
OND	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTGTGT-TCCAAGGCT	405
	***** ***** ** *****	
<hr/>		
CDV/CVY1	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACATACACCCAAACAAGACCGCCCC	60
SnyderHill	ATGCACAAGGCAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCACACACATACCCAAACAAGACCGCCCC	60
	***** ***** ** * ***** *****	
CDV/CVY1	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGAGGTCCCGAGCAGCACAGTACAATA	120
SnyderHill	TCACAACCCAGCACCGAACCCGACGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCACAGCATAACG	120
	***** ***** ***** ***** ***** * **	
CDV/CVY1	CCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGATGGTCGAAATACCGGACAGACGGTGTGTTACACT	180
SnyderHill	TCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGATCCTCGAACATTGGACAGACCGTCTCCTACACC	180
	***** ***** * ***** ** *****	
CDV/CVY1	ACGGACAGGATCAGTGCCCGCAAGCAAACCTAGCCACAGATTGAAGAATACGGTACGTCAC	240
SnyderHill	ATGAACAGGACCAGGTCTCGCAAGCAAACCGACTACAGATTGGAGAACATCTCAGTTCAC	240
	* * ***** ** * ***** ** ***** ***** * * ****	
CDV/CVY1	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCATACACCAGAGACGAGCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
SnyderHill	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACATGCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
	***** * ***** *** *****	
CDV/CVY1	CAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
SnyderHill	CAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
	***** ***** ***** ***** *****	
CDV/CVY1	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCACGTTCTTTCTTTGTGTCCAAGGCT	405
SnyderHill	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTGTCCAAGGCT	405
	***** ***** *****	

CDV/CVY2 OND	ATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGAAGCCAGACACATGACCAACAAGACCGCCCC 60 ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAACAAGACCGCCCC 60 *****
CDV/CVY2 OND	CCACAACCCAGCACCGAAGCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCATAACA 120 CCACAACCCAGCACCGAAGCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCAGCATAACA 120 *****
CDV/CVY2 OND	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTGAACC 180 TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTTACACC 180 *****
CDV/CVY2 OND	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAGACTAGCCACAGATTGAAGAACATCCAGTTCAC 240 ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACAGCCACAGATTGAAGAACATCCAGTTCAC 240 *****
CDV/CVY2 OND	GGAGACCACGAATGTATTATCCAGCAGATGACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATCC 300 GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCAGATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300 *** *****
CDV/CVY2 OND	CAGATCGAGAAATGATGAACCAATGCAATCAACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC 360 CAGATCGAAAGGCGGCAACCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC 360 ***** *
CDV/CVY2 OND	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTATGTCTGTGTTCCAAATGT 405 CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT 405 ***** * ***** *
CDV/CVY2 SnyderHill	ATGCACAAGGGAATCCCCAGAAGCTCCAGAAGCCAGACACATGACCAACAAGACCGCCCC 60 ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCACACACATACCCAACAAGACCGCCCC 60 *****
CDV/CVY2 SnyderHill	CCACAACCCAGCACCGAAGCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCATAACA 120 TCACAACCCAGCACCGGACCCGACGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCAGCATAACG 120 *****
CDV/CVY2 SnyderHill	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTGAACC 180 TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTTACACC 180 *****
CDV/CVY2 SnyderHill	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAGACTAGCCACAGATTGAAGAACATCCAGTTCAC 240 ATGAACAGGACCAAGTCTCGCAAGCAAACAGCTACAGATTGGAGAACATCTCAGTTCAC 240 *** *****
CDV/CVY2 SnyderHill	GGAGACCACGAATGTATTATCCAGCAGATGACAGAGAGTGTCTCAGAAGGAGCGAGATCC 300 GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCAGATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300 *** *****
CDV/CVY2 SnyderHill	CAGATCGAGAA-TGATGAACCAATGCAATCAACTCAATGTCTCAGTGCACCTGGTTAGT 359 CAGATCGAAAGGCGGCGA-CCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCCTGGTTAGT 359 ***** * * *****
CDV/CVY2 SnyderHill	CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTATGTCTGTGTTCCAAATGT 405 CCTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT 405 ***** * ***** *

CDV/CVY3 ATGCAACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCC 60
OND ATGCAACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAACAAGACCGCCCC 60

CDV/CVY3 CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCAATACA 120
OND CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCATAACA 120

CDV/CVY3 TCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCATCACC 180
OND TCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCATCACC 180

CDV/CVY3 ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTGCCATGGTTTGAAGAACATCCAGTTTAC 240
OND ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTGCCACAGATTGAAGAACATCCAGTTTAC 240

CDV/CVY3 GGTTTCCACGAGGCTATTATCCAGCACAAATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
OND GGAAACCCAGGCTATTATCCAGCACATAACCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
** *****

CDV/CVY3 CAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTC 360
OND CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTC 360

CDV/CVY3 CTGTGGTGCCTCGGAATGCCAGTCTCTTCTGTCCCCAAGGCT 405
OND CTGTGGTGCCTCGGAATGCCAGTCTCTTCTGTGTTCGAAGGCT 405

CDV/CVY3 ATGCAACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACTTACCCAACAAGACCGCCCC 60
SnyderHill ATGCAACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAACAAGACCGCCCC 60

CDV/CVY3 CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCAATACA 120
SnyderHill TCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCATAACG 120

CDV/CVY3 TCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCATCACC 180
SnyderHill TCAGCTCAGCGATCCACGCACATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCATCACC 180

CDV/CVY3 ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTGCCATGGTTTGAAGAACATCCAGTTTAC 240
SnyderHill ATGAACAGGACAGGTCTCGCAAGCAAACTGCCATGGTTTGAAGAACATCCAGTTTAC 240
*** *****

CDV/CVY3 GGTTTCCACGAGGCTATTATCCAGCACAAATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
SnyderHill GGAAACCCAGGCTATTATCCAGCACATAACCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
** *****

CDV/CVY3 CAGATCGAAAGGCGGCAAGGCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTC 360
SnyderHill CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTATGTC 360

CDV/CVY3 CTGTGGTGCCTCGGAATGCCAGTCTCTTCTGTCCCCAAGGCT 405
SnyderHill CTGTGGTGCCTCGGAATGCCAGTCTCTTCTGTGTTCGAAGGCT 405

CDV/CVY4 ATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGTCCAAAACCCAAAGAGAGACCCAAACAAGACCGCCCC 60
OND ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGTCCAAAACCCAAACACATACCCAAACAAGACCGCCCC 60
*** * ***** * * *****

CDV/CVY4 CGATAAACCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGAGATAGCATAACA 120
OND CCACAACCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCATAACA 120
* * *****

CDV/CVY4 TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGAGATACCCGTCTCCTACACC 180
OND TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCTACACC 180
***** * *****

CDV/CVY4 ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCGATAGATTGAAGAATCCCAAGTTCAC 240
OND ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCCACAGATTGAAGAATCCCAAGTTCAC 240
***** * *****

CDV/CVY4 GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGGAGAGACGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
OND GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACAATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
***** * * * *****

CDV/CVY4 GATATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC 360
OND CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC 360
* *****

CDV/CVY4 CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCGTGTTCCAAGGCT 405
OND CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCGTGTTCCAAGGCT 405

CDV/CVY4 ATGGATAAGGGAATCCCCAAAAGTCCAAAACCCAAAGAGAGACCCAAACAAGACCGCCCC 60
SnyderHill ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGTCCAAAACCCAAACACATACCCAAACAAGACCGCCCC 60
*** * *****

CDV/CVY4 CGATAAACCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGAGATAGCATAACA 120
SnyderHill TCACAACCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGACACAGCATAACG 120
* *****

CDV/CVY4 TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGAGATACCCGTCTCCTACACC 180
SnyderHill TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCTACACC 180
***** * *****

CDV/CVY4 ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCGATAGATTGAAGAATCCCAAGTTCAC 240
SnyderHill ATGAACAGGACCAAGTCTCGCAAGCAAAACAGCTACAGATTGGAGAATCTCAGTTCAC 240
*** ***** * * *****

CDV/CVY4 GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGGAGAGACGATAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
SnyderHill GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACAATCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC 300
***** * * * *****

CDV/CVY4 GATATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC 360
SnyderHill CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCCTCCTGGTTAGTC 360
* *****

CDV/CVY4 CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCGTGTTCCAAGGCT 405
SnyderHill CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCGTGTTCCAAGGCT 405

ANEXO 5

Alineamiento de las secuencias del linaje América 1

OND	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAACAAGACCGCCCC	60
SnyderHill	ATGCACAAGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCACACACATACCCAACAAGACCGCCCC	60

OND	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGCACAGCATAACA	120
SnyderHill	TCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAGCACGCACAGCATAACG	120

OND	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGCTCCTACACC	180
SnyderHill	TCAGCTCAGCGATCCACGCACTATGATCCTCGAACATTGGACAGACCCGCTCCTACACC	180

OND	ATGGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAAGCTAGCCACAGATTGAAGAATCCCAAGTTCAC	240
SnyderHill	ATGAACAGGACCAGGTCTCGCAAGCAAAGCTAGCCACAGATTGAAGAATCCCAAGTTCAC	240
	*** *****	
OND	GGAAACCAGAGGCTATTATCCAGCACATACCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
SnyderHill	GGAAACCAGAGGCTATTATCCAGCACATGCCAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC	300

OND	CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
SnyderHill	CAGATCGAAAGGCGGCAACCCAAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360

OND	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT	405
SnyderHill	CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT	405

ANEXO 6

Alineamiento de las secuencias del linaje América 2

164071	ATGCACAACAAAATCCCCAAAAGGTCCAACACCCGAAAACACACCCAACAAGATCTCCCC	60
01-2689	ATGCACAACAAAATCCCCAAAAGGTCCAACACCCGAAAACACACCCAACAAGATCTCCCC	60
A75/17	ATGCACAACAAAATCCCCAAAAGGTCCAACACCCGAAAACACACCCAACAAGACCTCCCC	60

164071	CCACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAGCACGACACAGCACAACA	120
01-2689	CCACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAGCACGACACAGCACAACA	120
A75/17	CCACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAGCACGACACAGCACAACA	120

164071	TCGGCTCGGCGATCCACGCATCATGGTCCTCTAACATCGGACAGGCCCATCCACTACATC	180
01-2689	TCGGCTCGGCGATCCACGCATCATGGTCCTCTAACATCGGACAGGCCCATCCACTACATC	180
A75/17	TCGGCTCGGCGATCCACGCATCATGGTCCTCTAACATCGGACAGGCCCATCCACTACATC	180

164071	ATGAACAGGATCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCCACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
01-2689	ATGAACAGGATCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCCACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
A75/17	ATGAACAGGATCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCCACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240

164071	GGAGACCATGAGGGCACCATCCATCACACACAGGGAGTGTCTCCCAAGGAGCGGGATCC	300
01-2689	GGAGACCATGAGGGCACCATCCATCACACACAGGGAGTGTCTCCCAAGGAGCGGGATCC	300
A75/17	GGAGACCATGAGGGCACCATCCATCACACACAGGGAGTGTCTCCCAAGGAGCGGGATCC	300

164071	CGGCTCAAAAGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
01-2689	CGGCTCAAAAGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
A75/17	CGGCTCAAAAGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360

164071	CTATGGTGCA TTGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
01-2689	CTATGGTGCA TTGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
A75/17	CTATGGTGCA TTGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405

ANEXO 7

Alineamiento de las secuencias del linaje Europa 1

ARG23	ATGCACAACAAAATCCCCAAAGGATCCAAAACCCCAACACCCACCCCAACAAGACCTCCCC	60
UY102	ATGCACAACAAAATCCCCAAAGGATCTAAAACCCTAACACCCACCCCAACAAGACCTCCCC	60
5804P	ATGCACAACAAAATCCCCAAAGGATCCAAAACCCCAACACCCACCCCAACAAGACCCCCCC	60

ARG23	CCACGACACAGCATCAAATCCGCGGAGACCCAGACCTCCCCAAGCAGCAGCAGCATAACA	120
UY102	CAACGACATAACATCAAATCCGCGGAGACCCAGACCTCCCCAAGCAGCAGCAGCATAACA	120
5804P	CCACAACATAGTATCAAATCCGCGGAGACCCAGACCTCCCCAAGCAGCAGCAGCATAACA	120
	* * * * *	
ARG23	TCGGCTCAGCAATCCACACGCCATGGTCCTCGAACATCGGATAGGCCAGTTCACCTACATC	180
UY102	TCGGCTCGGGCATCCACACGCCATGGTCCTCGAACATCGGATAGGCCAGTTCACCTACATC	180
5804P	TCGGCTCAGCAATCCACACGCCATGGTCCTCGAACATCGGATAGGCCAGTTCACCTACATC	180

ARG23	ACGAACAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCAGATAACATCCCGGCTCAC	240
UY102	ATGAACAGGACCAGATCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCAGATAACATCCCGGCTCAC	240
5804P	ATGAACAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCAGATAACATCCCGGCTCAC	240
	* *****	
ARG23	GGAGACCAGAGGGTATTATCCATCACACCCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAATGAGATCC	300
UY102	GGAGACCAGAGGGTATTATCCATCACACCCAGAGAGTGTCTCTCAAGGAATGAGATCC	300
5804P	GGAGACCAGAGGGTATTATCCATCACACCCAGAGAGTGTCTCCCAAGGGGTGAGATCC	300

ARG23	CGGTTCAAGAGGGCGCAATCCAGTGCACCAGCTCAGGCTCCAGTGCACCTGGCTAGTC	360
UY102	CGGTTCAAAAAGGCGCAATCCAGTGCACCAGCTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGCTAGTC	360
5804P	CGGTTCAAAAAGGCGCAATCCAGTGCACCAGCTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360

ARG23	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTCTTTGTTCCAAGGCT	405
UY102	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTCTTTGTTCCAAGGCT	405
5804P	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTCTTTGTTCCAAGGCT	405

ANEXO 8

Alineamiento de las secuencias del linaje Europa 3

18133	ATGCACAAGAAAATCCCCGAAAGATCCAGAACCACAAACACACACCCCAACAAGACCTCCCC	60
21261	ATGCACAAGAAAATCCCCGAAAGATCCAGAACCACAAACACACACCCCAACAAGACCTCCCC	60
HL	ATGCACAAGAAAATCCCCGAAAGATCCAGAACCACAAACACACACCCCAACAAGACCTCCCC	60

18133	CAACAAGAAGGCACCGAATACACCGAGATCAAGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCGGCATAACG	120
21261	CAACAAGAAGGCACCGAATACACCGAGATCAAGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCGGCATAACG	120
HL	CAACAAGAAGGCACCGAATACACCGAGATCAAGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCGGCATAACG	120

18133	TCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGGTCCTCGAACATTGGACAGGCTCGTCTGCTACATT	180
21261	TCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGGTCCTCGAACATTGGACAGGCTCGTCTGCTACATT	180
HL	TCAGCTCAGCGATCCACGCCTATGGTCCTCGAACATTGGACAGGCTCGTCTACTACATT	180

18133	ATGAACAGAGCCATGTTTTGCAAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
21261	ATGAACAGAGCCATGTTTTGCAAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
HL	ATGAACAGAGCCATGTTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240

18133	GGAGACCACGAGGGTGTAGTCCATCACACACCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAGCGAGATCC	300
21261	GGAGACCACGAGGGTGTAGTCCATCACACACCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAGCGAGATCC	300
HL	GGAGACCACGAGAGTGTGTCCATCACACACCAGAGAGTGTCTCCCAAGTAGCGAGATCC	300

18133	CAGCTCAAGAGGGCGGCATCCAATGCAATCAACTCAGGATTTAGTACATCTGGTTAGTC	360
21261	CAGCTCAAGAGGGCGGCATCCAATGCAATCAACTCAGGATTTAGTACATCTGGTTAGTC	360
HL	CAGCCCAAGAGGGCGCAATCCAATGCAATCAACTCAGGATTTGGTATATCTGGTTAGTC	360

18133	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
21261	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
HL	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405

ANEXO 10
Alineamiento de las secuencias del linaje Asia 2

007Lm	ATGCACGAGAAAAATCCCAAAAAGATCCAAAAACCAAAACACACACCCCAACAAGATCTCCCC	60
007Lm-1vp	ATGCACGAGAAAAATCCCAAAAAGATCCAAAAACCAAAACACACACCCCAACAAGATCTCCCC	60
M25CR	ATGCACGAGAAAAATCCCAAAAAGATCCAAAAACCAAAACACACACCCCAACAAGATCTCCCC	60
011C	ATGCACGAGAAAAATCCCAAAAAGATCCAAAAACCAAAACACACACCCCAACAAGATCTCCCC	60
50Con	ATGCACAAGAAAAATCCCAAAAAGATCCAAAAACCAAAACACACACCCCAACAAGATCTCCCC	60

007Lm	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAAGACCTCCCGGGCTCGACACAGCATAACA	120
007Lm-1vp	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAAGACCTCCCGGGCTCGACACAGCATAACA	120
M25CR	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAAGACCTCCCGGGCTCGACACAGCATAACA	120
011C	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAAGACCTCCCGGGCTCGACACAGCATAACA	120
50Con	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAAGACCTCCCGAGCAGCAGCAGCATAACA	120
	***** **	
007Lm	TCGGCTCAGCGGTCCACGCATATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180
007Lm-1vp	TCGGCTCAGCGGTCCACGCATATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180
M25CR	TCGGCTCAGCGGTCCACGCATATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180
011C	TCGGCTCAGCGGTCCACGCATATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180
50Con	TCGGCTCAGCGATCCACGCATATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180

007Lm	ATGAAAAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
007Lm-1vp	ATGAAAAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
M25CR	ATGAAAAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
011C	ATGAAAAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
50Con	ATGAAAAGGACCAGGTCTTGCAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240

007Lm	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300
007Lm-1vp	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300
M25CR	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300
011C	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300
50Con	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300

007Lm	CGGCTCAAAATGGGCCAATCCAATGCAGTCAAATCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
007Lm-1vp	CGGCTCAAAATGGGCCAATCCAATGCAGTCAAATCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
M25CR	CGGCTCAAAATGGGCCAATCCAATGCAGTCAAATCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
011C	CGGCTCAAAATGGGCCAATCCAATGCAGTCAAATCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
50Con	CGGCTCAAAATGGGCCAATCCAATGCAGTCAAATCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360

007Lm	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
007Lm-1vp	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
M25CR	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
011C	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
50Con	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405

ANEXO 11

Alineamiento de las secuencias del linaje Sudamérica

ARG25	ATGCACAACAAAACCCCAAAGGGTCCAAAACCCAAAACACACCCAACGATACCTCCCC	60
ARG26	ATGCACAACAAAACCCCAAAGGGTCCAAAACCCAAAACACACCCAACGATACCTCCCC	60
ARG24	ATGCACAACAAAACCCCAAAGGATCCAAAACCCAAAACACACCCAACGATACCTCCCC	60

ARG25	CAACAGCACAGCACCAAAACCCGCGGAGACCAAGACCTTCCAAGTACGACACAGCATAACA	120
ARG26	CAACAGCACAGCACCAAAACCCGCGGAGACCAAGACCTTCCAAGTACGACACAGCATAACA	120
ARG24	CAACAGCACAGCACCAAAACCTGCCGAGACCAAGACCTCCAAGTACGACACAGCATAACA	120

ARG25	TCGGCTCAGCGATCCACGCACCATGGTCCTCGAACATCAGACAGGCCCGTCCACTACATC	180
ARG26	TCGGCTCAGCGATCCACGCACCATGGTCCTCGAACATCAGACAGGCCCGTCCACTACATC	180
ARG24	TCGGCTCAGCGATCTACGCACCATGGTCCTCGAACATCAGACAGGCCCGTCCACTACATC	180

ARG25	ATGAACAGGACCGAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTGCAGATCGGATAACACCGTGCCTCAC	240
ARG26	ATGAACAGGACCGAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTGCAGATCGGATAACACCGTGCCTCAC	240
ARG24	ATGAACAGGACCGAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTGCAGATCGGATAACACCGTGCCTCAC	240

ARG25	AGAGACCACGAGGGTATTATCCATCGCACATCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAGCGAGATCC	300
ARG26	AGAGACCACGAGGGTATTATCCATCGCACATCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAGCGAGATCC	300
ARG24	AGAGACCACGAGGGTATTATCCATCGCACATCAGAGAGTGTCTCCCAAGGAGCGAGATCC	300

ARG25	CGGGTCAAAAAGCGGGCAATCCAATGCAATCAACTCAAGGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
ARG26	CGGGTCAAAAAGCGGGCAATCCAATGCAATCAACTCAAGGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
ARG24	CGGTTCAAAAAGCGGGCAATCCAATGCAATCAACTCAGGGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
	*** *****	
ARG25	CTGTGGTGATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
ARG26	CTGTGGTGATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
ARG24	CTGTGGTGATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405

ANEXO 12

Porcentajes de identidad nucleotídica de las cepas de los linajes conocidos

América 1	
Cepas	Snyder Hill
Onderstepoort	95

América 2				Europa 1					
Cepas	164071	01-2689		Cepas	Arg23	UY102			
164071	100			Arg23	100				
01-2689	99	100		UY102	97	100			
A75/17	99	99		5804P	96	95			
Europa 3				Sudamérica					
Cepas	18133	21261		Cepas	Arg24	Arg25			
18133	100	100		Arg24	100				
21261	100	97		Arg25	98	100			
HL	97			Arg26	98	100			
Asia 1				Asia 2					
Cepas	GS0812-4	Th12	TW-KM2	W729B	Cepas	007Lm	M25CR	011C	50Con
GS0812-4	100				007Lm	100			
Th12	97	100			M25CR	100	100		
TW-KM2	96	98	100		011C	100	100	100	
W729B	92	95	94	100	50Con	99	99	99	100
HeB(07)1	96	98	98	94	007Lm-1vp	100	100	100	99

ANEXO 13

Alineamiento secuencias representantes de cada linaje

ARG24	ATGCACAACAAAACCCCAAGGATCCAAAACCCAAAACACACCCCAACGATACCTCCCC	60
19876	ATGCACAACAGAAATCCCAAAAAGATCCAAAACCCAAAACACACCCCAACAGACCTCCCC	60
TW-KM2	ATGCACAACAAAATCCCAAAAATCCAAAACCCCTGCCATACACCCGACAAGATCCCCTC	60
A75/17	ATGCACAACAAAATCCCAAAAAGGTCCAACACCCGAAAACACACCCCAACAGACCTCCCC	60
5804P	ATGCACAACAAAATCCCAAAAAGGATCCAAAACCCCAACACCCCAACCAAGACCCCCCC	60
M25CR	ATGCACGAGAAAATCCCAAAAAGATCCAAAACCCAAAACACACCCCAACAGATCTCCCC	60
HL	ATGCACAAGAAAATCCCAAAAAGATCCAGAACCCAAAACACACCCCAACAGACCTCCCC	60
Onderstepoort	ATGCACAAGGGAATCCCAAAAAGTCCAAAACCCAAAACATACCCCAACAGACCGCCCC	60
	***** * ** *** ** ***** ** * ***** ** * * * * *	
ARG24	CAACAGCACAGCACCAAACTGCCGAGACCAAGACCTCCCAAGTACGACACAGCATAACA	120
19876	AAACAACACAGCACTGAAATCCGCCGGGACCAAGACCTTCCAAGCAGCACACAACAACA	120
TW-KM2	CAACAACACAGCACCAAGATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAAGCAGATATAGCATAACA	120
A75/17	CCACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAAGCAGCACAGCACAACA	120
5804P	CCACAACATAGTATCAAATCCGCCGAGACCAAGACCTCCCAAGCAGCATAACAACAACA	120
M25CR	CAACAACACAGCACCAAAATCCGCCGAGTCCAAGACCTCCCGGGCTCGACACAGCATAACA	120
HL	CAACAAGAAAACACCGAATACACCGAGATCAGGACCTCCCGAGCAGCACGGCATAACG	120
Onderstepoort	CCACAACCCAGCACCGAACCCGAAGAGACCAAGACCTCCCGAGCAGCACAGCATAACA	120
	*** ** * * * * * ** * * * * *	
ARG24	TCGGCTCAGCGATCTACGCACCATGGTCCTCGAACATCAGACAGGCCCGTCCACTACATC	180
19876	TCGGCTCAGCGATCTACGCACCATGGTCTTCGAACATCAGACAGGCCCGTCCACCCACA	180
TW-KM2	TCGGCTCAGAGATCCACGTAACATGGTCCTCGAACATCAGACAGGTCCTCCACTACATA	180
A75/17	TCGGCTCGGCGATCCACGCACCATGGTCCCTAACATCAGACAGGCCCGTCCACTACATC	180
5804P	TCGGCTCAGCAATCCACACGCCATGGTCCCTCGAACATCAGGATAGGCCGTTACTACATC	180
M25CR	TCGGCTCAGCGGTCCACGCACCTATGATCCTCGAACAGCGGACTGGCCCGACTACTACATC	180
HL	TCAGCTCAGCGATCCACGCACCTATGGTCCTCGAACATCAGACAGGCTCGTCTACTACATT	180
Onderstepoort	TCAGCTCAGCGATCCACGCACCTATGATCCTCGAACATCAGACAGACCCGTCCTACACC	180
	** ***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
ARG24	ATGAACAGGACCCAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTGCAGATCGGATAAACCCGTGCCAC	240
19876	ATGAACAGAGCCAGGTCTTGCAAGCAATCCATCTACAGATCAGATAACATCTGGCTCAC	240
TW-KM2	ATGAACAGGACCCAGGTCTTGCAAGCAAACTAGCCACAGATCGGATAACATCCCGCCTCAC	240
A75/17	ATGAACAGGATCAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCCACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
5804P	ATGAACAGGACCCAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTACAGATCAGATAACATCCCGGCTCAC	240
M25CR	ATGAAAAGGACCCAGGTCTTGCAAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
HL	ATGAACAGAGCCATGTCCTTGCAAGCAAGCCAGCTACAGATCGGATAACATCCCGGCTCAC	240
Onderstepoort	ATGACAGGATCAGGTCCCGCAAGCAAACTAGCCACAGATTGAAGAATCCAGTTTAC	240
	*** * ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
ARG24	AGAGACCACGAGGGTATTATCCATCGCACATCAGAGAGTGTCTCCAAGGAGCGAGATCC	300
19876	GGAGACCACGAGGGTATTATCCATCACACATCAGAGAGTGTCTCCAAGGAGCGAGATCC	300
TW-KM2	AGAGACCACGAGGGTATCATCCATCACACACAGAGAGTGTCTCCAAGGAGCGGATCC	300
A75/17	GGAGACCATGAGGGCACCATCCATCACACACAGGGAGTGTCTCCAAGGAGCGGGATCC	300
5804P	GGAGACCACGAGGGTATTATCCATCACACACAGAGAGTGTCTCCAAGGAGCGGATCC	300
M25CR	GGAGACCATGACGGTATTATCCATCACACACAGAGAGCGTCTCCAAGGAGCGAAATCC	300
HL	GGAGACCACGAGAGTGTGTCCATCACACACAGAGAGTGTCTCCAAGTACGGAGATCC	300
Onderstepoort	GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACATACAGAGAGTGTCTCAAAGGAGCGAGATCC	300
	** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
ARG24	CGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCAATCAACTCAGGGTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
19876	CGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCCGTGCACCTGGTTAGTC	360
TW-KM2	TGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCTACCACGCAGGCTCTCAATGCACCTGGTTAGTC	360
A75/17	CGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
5804P	CGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCAACCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
M25CR	CGGTTCAAAGGGCGGCAATCCAATGCAAGTCAAGTCAAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
HL	CAGCCCAAGAGGGCGGCAATCCAATGCAATCAACTCAGGATTTCCGTTATATCTGGTTAGTC	360
Onderstepoort	CAGATCGAAAAGGGCGGCAACCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCACCTGGTTAGTC	360
	* *	

ARG24	CTGTGGTGTATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
19876	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
TW-KM2	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
A75/17	CTATGGTGCAATGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
5804P	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCCAAGGCT	405
M25CR	CTGTGGTGCAATCGGAGTAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
HL	CTGTGGTGCAATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCTAAGGCT	405
Onderstepoort	CTGTGGTGCCATCGGAATAGCCAGTCTCTTTCTGTGTTCCAAGGCT	405
	** ***** * *** ***** ***** ***** *****	