



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

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN M
DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**MOLECULAR DETECTION OF CANINE
DISTEMPER VIRUS M GENE**

MARCELA JUDITH GALLEGOS ZAMORANO

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

PROFESOR GUÍA: CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2018



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

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN M
DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**MOLECULAR DETECTION OF CANINE
DISTEMPER VIRUS M GENE**

MARCELA JUDITH GALLEGOS ZAMORANO

NOTA FINAL:

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

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: VICTOR NEIRA RAMÍREZ

SANTIAGO, CHILE

2018

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	29

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Secuencias nucleotídicas del gen M de Virus Distemper Canino (Genbank)	29
Anexo 2: Alineamiento nucleotídico según CLUSTAL OMEGA	31
Anexo 3: Secuencia de consenso a partir de alineación mediante programa Clustal OMEGA, utilizada para el diseño de partidores	33
Anexo 4: Diseño de partidores según OligoPerfect™ Designer de LifeTechnologies™	33
Anexo 5: Alineamiento nucleotídico (Clustal Omega) y obtención de secuencia consenso MG1	34
Anexo 6: Alineamiento nucleotídico (Clustal Omega) y obtención de secuencia consenso MG2	36
Anexo 7: Porcentaje de identidad nucleotídica de MG1, según BLAST	38
Anexo 8: Porcentaje de identidad nucleotídica de MG2, según BLAST	39

INDICE DE CUADROS Y FIGURA

Cuadro 1: Muestras de RNA positivas a VDC provenientes de perros de distintas razas, sexo, edad y estado de vacunación contra VDC (S/I:sin información)	13
Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2%	16
Cuadro 2: Muestras de RNA positivas y negativas a VDC (gen M) provenientes de perros de distintas razas, sexo, edad y estado de vacunación contra VDC (S/I: sin información)	17

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su cariño y confianza más que la mía propia en que lo podía lograr, con palabras de aliento cuando flaqueaba y motivándome siempre para que obtuviera el título de Médico Veterinario, mi mamita Bertita, que la sufrió hasta el final y Juanito ogrito, que, aunque ya no está, sé que me acompañó el día de mi examen de grado y que estaba feliz.

A mis hermanas Pamela, Carolina y Andrea que siempre estuvieron animándome y ayudándome para que siguiera adelante, escuchando mis miedos cada vez que fue necesario. A mis sobrinas grandes Gabriela, Catalina, Valentina, y pequeñas Florencia y Amanda, que esperaban que la tía por fin fuera su doctora de perritos, gatitos y erizo de tierra. A mi tía Amalia por su cariño y consejos, mi cuñado Néstor, que tenía fe en mí y me animaba, como Goyito, mi abuelo postizo, tía Ani Carrasco, tía Bernarda y tía Lucy.

A Fabiola López y Anita Fuentes, grandes amigas de vida por su apoyo, motivación, paciencia y cariño; Emilio por sus consejos y retos; Andrea Pérez, Isa, Fabiola Núñez, Marcela (desde Holanda) por su preocupación y preguntando sobre mis avances en la memoria para que terminara, igual que Jana, Vero; Pepe Herrera por recibirme en el SAG.

A la Sra. Paula y Marce por la gran ayuda que me brindaron en escucharme y búsqueda de material. Mi jefe César y compañeros de trabajo Paty, Caro, Vero, Pao, Rocío, Juan Antonio, Roberto, Reinaldo, Jaime, Luis, Eduardo por brindarme su apoyo, ayuda y ánimo.

A la Dra. Pilar Oviedo por recibirme en mis primeros intentos de titulación, a la Dra. Alicia Valdés por su comprensión y buena disposición para que pudiera cumplir con los turnos y al Dr. José Pizarro por su aporte en la memoria.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Carlos Navarro, por su infinita paciencia, guía, buena voluntad y disposición, así como su apoyo constante que hizo posible lograr este título de Médico Veterinario tan esperado por años.

RESUMEN

La importancia que reviste el Distemper Canino -una de las principales enfermedades infecciosas que afectan tanto a los caninos domésticos y silvestres como también a varios otros mamíferos terrestres y marinos- junto a la dificultad de su diagnóstico -basado en los signos clínicos- ha motivado que a la fecha se hayan realizado diversos estudios en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para la detección óptima del agente etiológico: el Virus Distemper Canino.

La técnica molecular utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a transcripción reversa, utilizando como blanco de detección los diferentes genes que componen su genoma: N, P, F, M, H y L, con el fin de encontrar el método que permita el diagnóstico de la enfermedad *ante-mortem* de manera precoz.

Así, en esta Memoria de Título, se utiliza el gen M que codifica la proteína de la Matriz viral y se implementó un protocolo de detección molecular que completa la información respecto a cuál sería el gen óptimo a utilizar en el diagnóstico de la enfermedad.

Para ello se utilizaron 20 muestras de RNA total, obtenido desde sangre periférica de perros de distintas razas, edades y estado de vacunación contra Virus Distemper Canino, que presentaron signos clínicos y que ya eran positivos a la RT-PCR que detecta el gen N del virus. La técnica detectó el genoma viral en el 70% de aquellas analizadas, observándose una banda cercana a los 500 pb, cuyos productos amplificados presentaron intensidad y nitidez evidentes a la visualización.

El porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) respecto de las dos secuencias consenso obtenidas del total de muestras (mediante el programa *online* Clustal Omega), arrojó un 99% para ambas secuencias, comparadas con las secuencias de Virus Distemper Canino que entrega el programa informático de alineamiento de secuencias *online* de libre acceso BLAST.

Los resultados permiten concluir que, si bien la elección del gen M como blanco de detección permite detectar VDC, no resulta de elección para la detección certera del virus, y por ende, para ser utilizada en el diagnóstico de la enfermedad causada por este.

ABSTRACT

The importance of the Canine Distemper -one of the main infectious diseases affecting domestic and wild canines as well as several other mammals both terrestrial and marine- and the difficulty of its diagnosis -based on clinical signs- has motivated to the date several studies that have been carried out in the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile to detect the etiological agent: the Canine Distemper Virus.

The molecular technique used is the Polymerase Chain Reaction associated with reverse transcription and the different genes that make up its genome have been used as a detection target: N, P, F, M, H and L, in order to find an method that allows the early diagnosis of ante-mortem disease.

Thus, in this Title Memory, the M gene that encodes the protein of the virus Matrix is used and a molecular detection protocol was implemented that completes the information regarding which would be the optimal gene to be used in the diagnosis of the disease.

For this, 20 samples of total RNA were used, obtained from peripheral blood of dogs of different breeds, ages and vaccination status against Canine Distemper Virus, which showed clinical signs and which were already positive to the RT-PCR that detects the N gene of virus. The technique detected the viral genome in 70% of those analyzed, generating a band close to 500 bp, whose amplified products presented clear intensity and sharpness to the visualization.

The percentage of nucleotide identity (PIN) with respect to the two consensus sequences obtained from the total samples (using the Clustal Omega online program) yielded 99% for both sequences compared to the Canine Distemper Virus sequences delivered by the alignment software of free access online sequences BLAST.

The results allow us to conclude that although the choice of the M gene as a detection target allows to detect VDC, it is not of choice for the accurate detection of the virus, and therefore, to be used in the diagnosis of the disease caused by it.

INTRODUCCIÓN

El Virus Distemper Canino (VDC) es el agente etiológico de la enfermedad infecciosa denominada Distemper Canino (DC), una de las patologías víricas más graves que afectan a los perros domésticos. Esta enfermedad fue descrita en detalle por primera vez por Edward Jenner en 1809, pero el agente causal fue descubierto en 1905 por Henri Carré, fecha en que aisló el virus, de ahí que la enfermedad también reciba el nombre de “Enfermedad de Carré”. Además de la familia *Canidae*, hay otras que son hospederos naturales a quienes también afecta el virus, como las familias *Procyonidae* y *Mustelidae*, incluso la familia *Felidae*.

Este virus posee un genoma RNA de hebra simple de polaridad negativa, de 15,7 kb aproximadamente que incluye seis genes: N, P/V/C, F, M, H y L, que codifican para las proteínas estructurales del virión: la proteína de la nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina (H) y proteína grande (L), con la salvedad del gen P/V/C, que codifica la fosfoproteína estructural P y las no estructurales V y C. Los genes o regiones genómicas que presentan un alto grado de conservación entre los genotipos son los que se prefieren como blancos para los estudios diagnósticos de la enfermedad, como ocurre en el caso de los genes N, P y M.

Considerando que el diagnóstico del DC en base sólo a los signos clínicos presenta problemas por la diversidad sintomatológica, que dificulta el diagnóstico clínico *ante-mortem*, es que cobra relevancia contar con una técnica efectiva que permita realizar un diagnóstico cierto en casos presuntivos de infección por VDC.

Así, siguiendo la línea de trabajos anteriores que se han realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), en la búsqueda del método alternativo óptimo que permita un diagnóstico eficaz del VDC, el presente trabajo pretende lograr la detección del gen M del VDC, usando la técnica RT-PCR, diseñando para ello los partidores que permitan lograr la amplificación de un fragmento de DNA que lleve a la detección del gen M y posterior establecimiento de la identidad nucleotídica de dicho fragmento.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El virus

El VDC pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus* y se relaciona taxonómicamente con otros *Morbillivirus* de este género como el Virus del Sarampión en Humanos (VS), Virus de la Peste Bovina, Virus de la Peste de los Pequeños Rumiantes (Rinderpest), Virus Distemper de la Foca y Virus Distemper del Delfín (Pringue, 1999; Lamb y Kolakofsky, 2001; Martella *et al.*, 2008). Es el agente causal de la enfermedad Distemper Canino (DC), que es una de las principales patologías infecciosas de canes jóvenes y adultos, siendo considerada la patología vírica más seria e importante que afecta a la especie, tanto cánidos salvajes como domésticos (Appel, 1987). Su etiología viral fue demostrada por el científico francés Henri Carré, en 1905, quien demostró que la infección podía transmitirse con un agente filtrable. Antes de esa fecha, en 1809, Edward Jenner había descrito al virus (Pardo *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2008; Pinotti *et al.*, 2009; Pratelli, 2011).

El VDC es un virus envuelto, de tamaño entre 150 a 300 nm de diámetro, cuyo genoma está compuesto por ácido ribonucleico (RNA), no segmentado, de cadena simple y polaridad negativa, constituido por alrededor de 15.700 nucleótidos, con una nucleocápside de simetría helicoidal (Örvell, 1980; Diallo, 1990; Sidhu *et al.*, 1993; Summers y Appel, 1994; Elia, *et al.*, 2006). Presenta seis genes, cuya función es codificar las seis proteínas estructurales del virión, estos genes son N, P/V/C, M, F, H, L, donde cada uno de ellos codifica una única proteína, siendo la excepción el gen P/V/C que codifica la proteína estructural P (fosfoproteína) y proteínas no estructurales V y C (Lamb y Parks, 2007). Los genes o regiones génicas están organizadas en unidades transcripcionales separadas y no superpuestas, que se organizan de 3'-N-P- F-M-H-L-5', (Lamb y Kolakofsky, 1996; Harder y Osterhaus, 1997; Barret, 1999). Las proteínas estructurales son: proteína de la nucleocápside, codificada por el gen N (1,5 kb); fosfoproteína, codificada por el gen P (1,5 kb); polimerasa mayor, codificada por el gen L (6,5 kb); proteína de matriz, codificada por el gen M (1 kb) y, dos glicoproteínas de superficie de la envoltura lipídica, proteína de

fusión, codificada por el gen F (1,9 kb), y hemaglutinina, codificada por el gen H (1,8 kb), ambas encargadas del reconocimiento e ingreso del virus a la célula del hospedero, constituyendo los objetivos principales de los anticuerpos generados por este (Sidhu *et al.*, 1993; Summers y Appel, 1994; Shin *et al.*, 2004).

El virus permanece viable entre valores de pH de 4,5 a 9, es sensible a la luz ultravioleta, al calor, a la desecación y se destruye cuando es expuesto a temperaturas de 50 a 60 °C durante 30 minutos; sin embargo, puede sobrevivir durante una hora a 37°C. El tiempo de sobrevivencia se prolonga en temperaturas frías, pudiendo mantenerse viable entre 0 y 4 °C por 2 ó 3 semanas. Almacenado a -65°C puede conservarse por más de siete años. Al ser un virus envuelto, es sensible al éter, cloroformo y desinfectantes tales como formol (0,5%), fenol (0,75%) y amonios cuaternarios (0,3%), por lo que los procedimientos de desinfección de rutina son efectivos para destruirlo (Appel, 1977). El RNA viral extraído puede ser muy lábil, pudiendo degradarse fácilmente por RNAsas de la piel y por temperaturas superiores a 4 °C. El VDC almacenado a -10 °C se mantiene activo sólo por alrededor de un mes y en congeladores a -70 °C ó -192 °C (nitrógeno líquido) o liofilizado, puede permanecer activo indefinidamente (Pérez *et al.*, 1993).

La enfermedad

Corresponde a una enfermedad viral multisistémica, de distribución mundial, contagiosa y en muchos casos fatal, siendo la mayoría de los carnívoros terrestres, los más susceptibles a la infección natural por VDC (Appel y Summers, 1995). Las familias de mamíferos que afecta el virus además de la familia *Canidae* (perros, zorros, lobos, coyotes y chacales), y que son susceptibles también a la infección natural por este, son diversos carnívoros terrestres como miembros de la familia *Mustelidae* (nutrias, hurones, visón y tejón), *Procyonidae* (coatí, mapache) (Appel y Summers, 1999), *Felidae* (félidos salvajes como leones, tigres, leopardos en cautiverio) (Appel *et al.*, 1994), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (osos, panda gigante), *Viverridae* (civeta y gineta), *Ailuridae* (panda rojo) (Appel y Summers, 1995), en los que ha sido detectado el virus. También afecta a carnívoros marinos como las focas, que además de que tienen su virus de distemper específico, pueden

llegar a infectarse con el VDC, y a cetáceos como el delfín (Appel y Summers, 1999; Pardo *et al.*, 2005; Beineke *et al.*, 2009).

El VDC es considerado altamente contagioso y catalogado como la causa de enfermedades de fuerte preocupación económica, de conservación y de salud pública (Harder y Osterhaus, 1997; Deem *et al.*, 2000). Puede igualmente comprometer drásticamente la conservación de las especies amenazadas debido a su alta letalidad (Pardo *et al.*, 2005). Por ello es que sigue siendo uno de los principales problemas para los veterinarios y los dueños de mascotas debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad (Patel *et al.*, 2012).

La liberación del virus ocurre mayoritariamente por vía oro-nasal, aunque se puede encontrar en cualquier descarga y secreción, y sus principales vías de ingreso al organismo, son ocular, respiratoria y oral, por contacto directo a través de la inhalación del VDC transportado por el aire o por gotitas (Krakowka *et al.*, 1980), 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), lo que es importante ya que el virus no es estable en el ambiente y se inactiva rápidamente en el entorno (Greene y Appel, 1998; Elia *et al.*, 2006), de ahí que la inhalación de aerosoles de secreciones respiratorias que contienen virus, es la ruta más importante de transmisión del DC (Appel y Summers, 1995). Luego de que ingresa, afecta membranas mucosas y tejidos linfoides, replicando principalmente en los tejidos linfáticos del tracto respiratorio donde los macrófagos y monocitos localizados en tonsilas y epitelio respiratorio son el primer tipo de célula en replicar y propagar virus (Appel, 1970). Luego de esta replicación local, se produce la primer fase de viremia que conduce a una infección generalizada de todos los tejidos linfoides incluyendo bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea, tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT, por sus siglas en inglés) y macrófagos en la lámina propia del tracto gastrointestinal, así como células de Kupffer; esta amplia proliferación en órganos linfoides, se corresponde con el aumento inicial de la temperatura corporal y aparece fiebre e inicia la linfopenia y leucopenia, provocada principalmente por daño viral a las células linfoides (Appel, 1969; Appel, 1970; Krakowka *et al.*, 1985). Días más tarde ocurre la segunda viremia, que conduce a la

infección de células de tejidos parenquimatosos de todo el organismo (Appel, 1969; Okita *et al.*, 1997) y en perros que no se recuperan temprano, los linfocitos y macrófagos infectados transportan el virus a la superficie de los epitelios de los tractos digestivo, respiratorio, urogenital y al Sistema Nervioso Central (SNC) (Appel y Summers, 1999).

La excreción del virus comienza antes de que se manifiesten los signos clínicos, a partir del quinto día post infección, y continúa excretándose incluso durante semanas (Maclachland y Dubovi, 2011). Perros con infección aguda comienzan a eliminar el virus por todas las secreciones corporales, pudiendo ser excretado de 60 a 90 días después de la exposición, (Greene y Appel, 1998; Pardo, 2006).

La diversidad en la sintomatología, asociada al ciclo impredecible y variable del virus en el hospedero, dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso en la mayoría de los animales afectados (Frisk *et al.*, 1999). Los síntomas clínicos de DC son similares a los de otras patologías, provocando frecuentemente confusión en el diagnóstico clínico (Demeter *et al.*, 2007). En aquellos casos que un animal, especialmente cachorro, presente cuadros febriles y síntomas multisistémicos, se debe considerar como uno de los prediagnósticos al DC (Martella *et al.*, 2008).

Como primeros signos, en general, se puede encontrar letargia, deshidratación, anorexia y pérdida de peso, con manifestación clínica marcada dependiendo predominantemente del órgano afectado, y en el caso de que aparezca fiebre, esta es una fiebre bifásica (Wright *et al.*, 1974).

En la fase aguda, los signos clínicos que se pueden encontrar son erupciones cutáneas leves (sarpullido), descarga serosa o mucosa nasal y ocular, conjuntivitis y anorexia, seguidos por signos gastrointestinales y respiratorios, que a menudo se complican por infecciones bacterianas secundarias y problemas neurológicos (Krakowka *et al.*, 1985). Los signos nerviosos son diversos y progresivos e incluyen mioclonias, nistagmo, ataxia, déficit postural y tetraparesis o parálisis (Greene y Appel, 1998; Koutinas *et al.*, 2002; Vandeveldel y Zurbriggen, 2005; Amude *et al.*, 2007).

La enfermedad en perros domésticos es una enfermedad que afecta a aquellos 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 a la infección (Martella *et al.*, 2008).

En nuestro país, la presencia de VDC fue sugerida en 1994, cuando se informa el primer aislamiento desde cultivos celulares de riñón de perro (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) inoculados con secreciones nasal, ocular y traqueal obtenidas de un canino que manifestaba signos clínicos de DC; era un cachorro con disnea respiratoria, estertores bronquiales y signos nerviosos, con mioclonía unilateral, movimientos masticatorios involuntarios y paresia ascendente del tren posterior. El diagnóstico fue corroborado por microscopía electrónica y estudios histopatológicos que demostraron la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos acidófilos (Cerdeña *et al.*, 1994). Posteriormente se informó de un aislamiento de una cepa viral diagnosticada como VDC por inmunofluorescencia por Navarro *et al.*, en el año 2002, en este caso, la muestra había sido obtenida desde tejido nervioso de un perro adulto con sintomatología nerviosa.

El Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por VDC se dificulta por la gran variedad de signos clínicos y por las pocas pruebas fiables para detectar la enfermedad en las etapas iniciales, pudiendo confundirse sus signos con los de otras enfermedades, ya que los signos clínicos principales que se presentan, incluyendo la secreción nasal y la diarrea, son comunes a otras enfermedades respiratorias y entéricas (Choi, 1990; Jones *et al.*, 1997). No obstante, aunque la enfermedad multisistémica es fácil de reconocer, no siempre es esta la presentación, existiendo incluso manifestaciones neurológicas no clásicas que dificultan el diagnóstico. Pese a lo anterior, se debe tener siempre al Distemper Canino dentro de los prediagnósticos, sobre todo en el caso de un cachorro que presente condiciones febriles y síntomas multisistémicos (Martella, *et al.*, 2008). Por ello la confirmación del diagnóstico es por exámenes de laboratorio que permiten excluir otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006; Maclachland y Dubovi, 2011).

Dentro de las técnicas diagnósticas más usadas está la histología, que pesquisa la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos en numerosos tejidos. También se recurre como estudio indirecto de diagnóstico a la prueba inmunoenzimática (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) y a ensayos de seroneutralización que detectan anticuerpos específicos para VDC y las técnicas moleculares como el ensayo de RT-PCR (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006; Martella *et al.*, 2008; Sarute *et al.*, 2014).

En histología se pesquisa la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos, no obstante, estos sólo se pueden visualizar en ciertos periodos de la enfermedad y generalmente están ausentes cuando se generan los signos clínicos (Summers y Appel, 1994; Martella *et al.*, 2008).

En el caso de ELISA, se apunta a la detección de IgM específica contra VDC, la que persiste en perros infectados con el virus desde cinco semanas a tres meses, dependiendo de la cepa y la respuesta del hospedero; en perros vacunados, la IgM persiste por aproximadamente 3 semanas (Bernard *et al.*, 1982). Falsos negativos pueden observarse en perros que mueren en forma aguda sin presencia de respuesta inmunitaria, y puede darse además, en presentaciones subagudas o crónicas. Títulos de IgM altos, son específicos para diagnosticar infecciones recientes del VDC, sin embargo, la vacunación reciente con virus vivo modificado, puede dar resultados falsos positivos. ELISA ha mostrado tener alta especificidad y sensibilidad en comparación con la prueba de neutralización (Waner *et al.*, 2006).

La desventaja de las pruebas serológicas radica en la incapacidad de diferenciar entre Ac maternos, vacunales o producto de la infección (Frisk *et al.*, 1999), si bien las pruebas son confiables, el problema se produce al interpretar los resultados, constituyendo una desventaja por los falsos positivos que se presenten si se realizan post inmunización con vacuna (Elia *et al.*, 2006).

En el líquido cefalorraquídeo (LCR), la serología apunta a encontrar aumento de los títulos de inmunoglobulina anti-VDC (IgG e IgM) sugestivas de infección por VDC, y si además se observa un incremento en la concentración de proteína (> 25 mg / dL) y recuento de células (10 células / mL con un predominio de linfocitos) se estaría frente a signos

inflamatorios de VDC, como ocurre en una encefalomiелitis (Elia *et al.*, 2006; Pardo, 2006). Esto es patognomónico en perros con barrera hematoencefálica intacta, pero su ausencia, no excluye la infección por VDC (Appel y Summers, 1999).

Otro de los métodos diagnóstico de DC, es el aislamiento del virus, pero este es un método muy lento de realizar (Elia *et al.*, 2006), pudiendo demorar unas 3 semanas. Se puede aislar VDC en el laboratorio, aislamiento que presenta una sensibilidad y especificidad muy alta, sin embargo, es un proceso laborioso y lento por lo que no se realiza de manera rutinaria (Reutemann *et al.*, 2006; Martella *et al.*, 2008).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a transcripción reversa (RT-PCR).

La RT-PCR consiste en una amplificación exponencial de fragmentos de DNA, previa transcripción inversa de RNA a DNA complementario, permitiendo detectar la presencia del virus tempranamente. A diferencia de las otras técnicas mencionadas, resulta ser una prueba sensible, específica y rápida para el diagnóstico de VDC, resultando positiva aun cuando otras pruebas no logran detectar al virus (Appel y Summers, 1999; Frisk *et al.*, 1999; Martella *et al.*, 2008). En las últimas décadas, se han desarrollado diversos métodos basados en la RT-PCR para el diagnóstico de VDC, siendo los principales blancos para la amplificación, regiones genómicas que presentan un alto grado de conservación entre los aislamientos del virus. Así, Frisk *et al.*, en 1999, desarrollaron un método basado en la amplificación por RT-PCR de un fragmento conservado de 287 pb del gen N del VDC, el cual fue utilizado posteriormente por diversos autores, demostrando ser una técnica muy eficaz para la detección del genoma del virus (Frisk *et al.*, 1999; Gallo Calderón *et al.*, 2007).

En la FAVE se han llevado a cabo memorias de título que utilizan la RT-PCR para dicho objetivo, utilizando como blanco los distintos genes del virus donde, por ejemplo, Jara (2011) y Salas (2013), se enfocaron en el gen de la hemaglutinina (gen H). Se desarrolló también otra RT-PCR basada en la detección del gen de la proteína de la nucleocápside (gen N) por Muñoz (2013). Finalmente, Mateo (2015) se enfoca en el gen de la fosfoproteína viral (gen P) como blanco y Pincheira (2015) en el gen de la polimerasa

grande (L). Los resultados de Pincheira (2015) fueron positivos en un 100% a diferencia de aquellos que usaron como blanco el gen H, donde sus resultados arrojaron valores positivos de 7% (Salas, 2013) y 19% (Jara, 2011), y en el caso en que se utilizó la prueba en el gen N, se obtuvo 90% (Muñoz, 2013) de resultados positivos en la detección de VDC.

Considerando lo ya mencionado y no existiendo -aparentemente- trabajos que usen como blanco el gen M del VDC, en este trabajo se estableció un método de diagnóstico molecular mediante la técnica de RT-PCR utilizando al gen M del VDC como blanco para la detección, un gen altamente conservado, de 1 kb, encargado de codificar la proteína de la matriz (M), una proteína estructural del virión constituida por 335 aminoácidos. Esta proteína, posicionada bajo la envoltura, tiene un papel fundamental en la organización de la morfogénesis del virus y en el ensamblaje del virión debido a las interacciones que establece con las proteínas integrales de membrana, la bicapa lipídica y la nucleocápside (Sidhu *et al.*, 1993; Summers y Appel, 1994; Lamb y Parks, 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan otro antecedente más a la información de que ya se dispone referente a la detección del virus por esta técnica molecular, RT-PCR, utilizando como blanco los genes que componen el genoma y así poder llegar a dilucidar en conjunto con trabajos previos, cuál de los métodos realizados resulta en una mejor técnica que permita obtener un diagnóstico más certero y efectivo de enfermedad y así adoptar las medidas necesarias que eviten el contagio.

OBJETIVO GENERAL

Detectar el gen M del Virus Distemper Canino mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a transcripción reversa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar el gen M del Virus Distemper Canino usando partidores diseñados *in silico*.
2. Establecer la identidad nucleotídica del fragmento de DNA amplificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Microbiología y Virología Animal, pertenecientes al Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET.

Muestras. Se utilizaron veinte muestras de RNA total, obtenidos desde sangre periférica de perros de distintas razas, edades y estado de vacunación contra VDC, que presentaron signos clínicos de DC y que fueron positivos al RT-PCR que detecta el gen N (Cuadro 1).

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

Cuadro 1

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

Como controles positivos se utilizaron dos cepas de VDC provenientes de vacunas comerciales (Lederle y Onderstepoort). Como controles negativos se usaron dos muestras de RNA total extraídos de muestras de sangre de perros sin signología de DC y negativas a RT-PCR (gen N). Para el control de reactivos se ocupó agua libre de nucleasas.

Diseño de partidores. Se consideraron cuatro secuencias del gen M de VDC almacenadas en el Genbank (anexo 1) cuya secuencia estuviese contemplada y tamaño mayor a 1000 bases debido que el diseño contempla obtener un fragmento de al menos 500 pares de bases (pb) para secuenciar y al considerarlo un gen altamente conservado se escogieron solo cuatro secuencias: dos del gen M y dos del gen M a partir de la secuencia completa del genoma del VDC. Con el alineamiento de las secuencias (programa *online* Clustal Omega (Anexo 2)) se obtuvo la secuencia consenso (Anexo 3) que se ingresó en el programa *online* OligoPerfect™ Designer, que proporcionó los partidores que generaron un fragmento de DNA de alrededor de 500 pb y la temperatura de fusión (T_m: base para la determinación de la temperatura de alineamiento en un termociclador de gradiente de temperatura (Anexo 4)). Los partidores: (P1:CAATAACACCCCATTGCACA y P2:ATCTCCATGAGCGGGTAACA) fueron sintetizados por IDT (Fermelo, Chile).

Implementación de la técnica RT-PCR. Se empleó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL. El protocolo de RT-PCR contempló la indicación del proveedor del kit comercial (Super Script onestep RT-PCR with platinumTaq, de Invitrogen®): incubación inicial a 50°C durante 40 minutos y luego a 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de PCR (desnaturación a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 55°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos).

La mezcla de reacción contempló 15 µL del kit comercial señalado (que incluye las enzimas RT y Taq DNA polimerasa, MgCl₂ y los desoxiribonucleótidos trifostatos), 5 µL de muestra y 5 µL de cada partidador específico (denominados P1 y P2 respectivamente), llegando a un volumen final de 30 µL.

Detección de los productos amplificados. Se realizó electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®). Se tomaron 5 µL del producto de la PCR, y se mezclaron con 1 µL de un producto comercial de carga 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®) que contiene azul de bromofenol para observar el progreso en la migración de las bandas de DNA. La electroforesis se llevó a cabo a 90V por 90 minutos. Finalizada la electroforesis, el gel fue sometido a incubación en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Sigma®) durante 35 minutos. Luego se visualizaron las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Transiluminator UVP®). Como marcador de tamaño molecular se utilizó Maestrogen®, con fragmentos de DNA entre 100 y 3000 pb. Finalmente, se fotografió el resultado observado con cámara digital y filtro adecuado.

Determinación de la identidad nucleotídica del fragmento amplificado. Se realizó mediante la secuenciación de 2 muestras positivas al RT-PCR que fueron enviadas en triplicado al Centro de Secuenciación de la empresa Genytec Ltda. El porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) de las secuencias entregadas por Genytec Ltda., se obtuvo luego de que se alinearon con la finalidad de obtener una secuencia consenso a través del programa *online* de libre acceso Clustal Ω, la que se ingresó al programa informático de alineamiento de secuencias *online* de libre acceso BLAST, a modo de conocer su identidad nucleotídica respecto de los primeros 15 resultados que entrega el GenBank®.

Para el análisis de los resultados, se consideró como muestra positiva, aquella que originó un fragmento de DNA de aproximadamente 500 pb y un PIN mayor a 90% respecto de las secuencias completas del genoma de VDC entregadas por el programa BLAST.

Bioseguridad. Las medidas de bioseguridad consistieron en el uso de delantal manga larga y cerrado, guantes de látex para la manipulación de los productos potencialmente nocivos o tóxicos, uso de placa de acrílico como filtro protector cuando se utilizó el transiluminador de luz ultravioleta y, los geles utilizados, fueron envueltos en los guantes de látex, depositados en un contenedor especialmente destinado para ello, siendo posteriormente incinerados, en tanto, el material contaminado con virus se esterilizó en el autoclave.

RESULTADOS

OBJETIVO 1:

Detectar el gen M del Virus Distemper Canino usando partidores diseñados *in silico*.

Con los partidores diseñados se realizó una RT-PCR con las 20 muestras de RNA positivas a VDC (Cuadro 1) y los controles respectivos. La visualización evidenció la presencia de bandas fluorescentes únicas y nítidas de alrededor de 500 pb solo en 14 de las 20 muestras analizadas y en los 2 controles positivos (Cuadro 2). En la Figura 1, a modo de ejemplo, se presentan 12 muestras positivas, 2 muestras negativas, 2 controles positivos, 1 control negativo, 1 control de reactivo y el marcador de tamaño molecular (MTM).

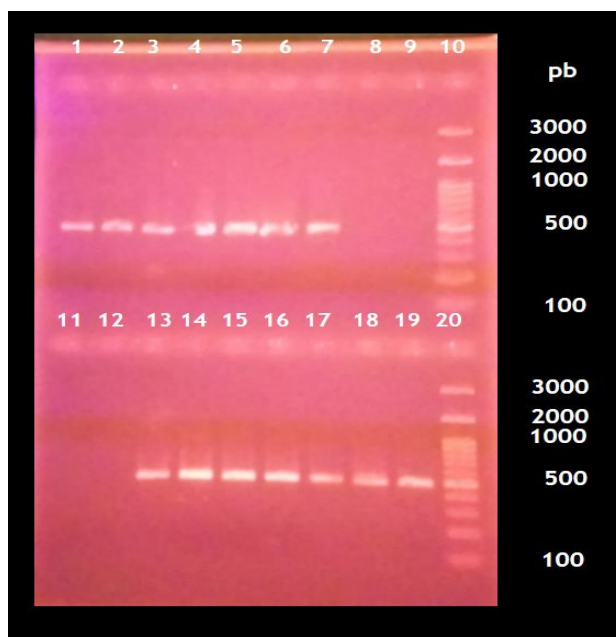


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Carriles 1-5: muestras positivas; carriles 6 y 7: controles positivos (vacunales); carril 8: control negativo; carril 9: control de reactivos; carriles 11 y 12: muestras negativas; carriles 13-19: muestras positivas; carriles 10 y 20: MTM: Maestrogen® (100-3000 pb).

RT-PCR	CANINO	RAZA	SEXO	EDAD (años)	VACUNA
1 (+)	1	Poodle	Macho	6	S/I
2 (+)	2	Poodle	Macho	6	S/I
3 (+)	3	Mestizo	Hembra	2	SÍ
4 (+)	4	Mestizo	Macho	1	NO
5 (+)	5	Bulterrier	Hembra	2	SÍ
6 (+)	6	Mestizo	Hembra	1	SÍ
7 (+)	7	Mestizo	Hembra	3	NO
8 (+)	8	Mestizo	Macho	3,5	NO
9 (+)	9	Bóxer	Macho	2	S/I
10(+)	10	Mestizo	Hembra	0,75	NO
11(+)	11	Mestizo	Hembra	1,5	NO
12(+)	12	Mestizo	Macho	1	SÍ
13(+)	A	Mestizo	Macho	1,5	SÍ
14(+)	B	Mestizo	Macho	2	NO
15 (-)	C	Mestizo	Macho	1,5	SÍ
16 (-)	D	Bóxer	Macho	3	SÍ
17 (-)	E	Labrador	Macho	1	SÍ
18 (-)	F	Bóxer	Macho	2	NO
19 (-)	G	Mestizo	Macho	2,5	SÍ
20 (-)	H	Mestizo	Hembra	1	SÍ

Cuadro 2

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

OBJETIVO 2:

Establecer la identidad nucleotídica del fragmento de DNA amplificado.

Debido al costo involucrado, solo dos amplificados de las 14 muestras positivas se enviaron a secuenciar (en triplicado). Las secuencias recibidas desde Genytec Ltda. se alinearon utilizando el programa *on line* Clustal Ω , obteniéndose para cada trío de secuencias, una secuencia consenso: MG1 y MG2 (anexo 5 y 6).

>MG1

ACACCCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCAATGC
AAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTA
TACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCCTCGCGGGATGTTTGAAT
TCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTG
TTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCTTGGTGCATATCGGC
AACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGA
TGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAA
GATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCC

>MG2

CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCAAGTTCAAAT
CAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACA
TGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCCTCGCGGGATATTTGAATCCG
CTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCA
AGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACT
TTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGG
ATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATG
AGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAACCCT

Los Anexos 7 y 8 indican un porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) de alrededor de 99% a VDC para ambas secuencias de consenso al ser ingresadas al programa *online* BLAST.

DISCUSIÓN

El DC es una enfermedad mundialmente distribuida, contagiosa y fatal, que principalmente afecta a carnívoros (Appel y Summers, 1999) incluyendo no solo animales domésticos, por lo cual también constituye una de las principales amenazas para la conservación de especies silvestres (Macarthy *et al.*, 2007) tal como ocurre en Chile con el zorro chilote (*Pseudalopex fulvipes*), que puede ser inexorablemente amenazado por la rápida infectividad y letalidad características de la enfermedad (Céspedes *et al.*, 2010).

El DC es producido por el VDC y dada la diversidad en la sintomatología, asociada al ciclo impredecible y variable del virus en el hospedero, hace difícil establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso en la mayoría de los animales afectados (Frisk *et al.*, 1999) y si además los síntomas clínicos de DC son similares a los de otras patologías, puede llevar frecuentemente a confusión en el diagnóstico clínico (Demeter *et al.*, 2007).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa antecedida por retrotranscripción (RT-PCR) del RNA genómico, es una metodología molecular que permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Frisk *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Gebara *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2006).

En razón a que el genoma del VDC posee 6 genes, establecer cuál de ellos resulta ser el mejor blanco para su detección mediante la RT-PCR resulta interesante; toda vez que en los estudios diagnósticos se prefiere como blancos para amplificación a los genes o regiones genómicas que presenten un alto grado de conservación, como los genes N, P y M (Frisk *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Goller *et al.*, 2010; Si *et al.*, 2010), en contraposición al gen H que al presentar mayor variabilidad, no resulta ser de elección como método diagnóstico (Jara, 2011), sino más bien para conocer el linaje del virus circulante (Salas, 2013).

En general, se ha utilizado el gen N para la detección de VDC por RT-PCR como blanco para la amplificación, por ser una región conservada dentro del genoma viral (Frisk *et al.*, 1999; López, 2012), lo que se corrobora en estudios que consideraron la secuenciación nucleotídica completa de una cepa viral de VDC en China (Jiang *et al.*, 2013) o en estudios sobre detección molecular de VDC y otros virus (Silva *et al.*, 2014).

En FAVET se han efectuado varios trabajos que involucran los genes que componen el genoma del virus. Así, inicialmente Jara (2011) y Salas (2013) tuvieron como blanco el gen H, obteniendo un 19% y 7% de detección positiva del virus respectivamente. Ambos trabajos, resultarían menos sensibles a la que utilizó Muñoz en 2013 (90%), que implementó una RT-PCR para el gen N. Posteriormente, Mateo (2015) usando el gen P y Pincheira (2015) usando el gen L, lograron -para las condiciones establecidas de sus trabajos- un 100% de detección positiva del VDC en las muestras analizadas, resultando efectiva la RT-PCR implementada como método diagnóstico y en el caso de Pincheira (2015) cobra relevancia debido a que en la detección del virus, se prefiere genes más conservados como los genes N, P y M.

En el presente estudio, el diseño de los partidores resultó ser efectivo para detectar el VDC, pues la RT-PCR implementada logró detectar el gen M del virus en 14 de las 20 muestras de RNA viral analizadas (70%) y en el 100% de los controles vacunales (Cuadro 2). No se observaron bandas fluorescentes de DNA inespecíficas, así como tampoco se encontraron bandas en los controles negativos ni en el control de reactivos en la visualización del gel de agarosa.

Teniendo en cuenta los resultados de los trabajos antes mencionados en que se usó la RT-PCR convencional al igual que en este trabajo, el método implementado en esta memoria apunta a que es más sensible que los implementados por Jara (2011) y Salas (2013), pero no en relación con aquellos implementados por Muñoz (2013) y Pincheira (2015); no obstante, para corroborar la sensibilidad del método, se requieren estudios adicionales.

Las posibles explicaciones de los resultados, teniendo en cuenta que el gen M es considerado conservado, podrían ser por un cambio en la integridad del gen M, pudiendo su secuencia encontrarse incompleta (degradada) o bien que la secuencia blanco (gen M) de las seis muestras negativas podrían ser distintas de las consideradas como oficiales (Genbank), haciendo imposible el alineamiento de los partidores y por ende, la amplificación del fragmento esperado de 500 pb. A la luz de los resultados anteriores (Muñoz (2013); Mateo (2015); Pincheira (2015)) podría ello implicar que el gen M es un gen más variable de lo descrito.

Otra posibilidad considera el número de ciclos de PCR establecido en esta memoria, los que podrían haber resultado insuficientes para la observación en el gel de agarosa, al tener en cuenta que en el caso de Muñoz (2013) se usaron 42 ciclos, y en Mateo (2015) y Pincheira (2015) 35 ciclos respectivamente.

Finalmente, la determinación de identidad nucleotídica señala que el fragmento obtenido en las muestras positivas es compatible con la detección del gen M en un valor de PIN=99%, lo cual corrobora la especificidad de los partidores utilizados.

Si bien estos resultados no son óptimos, permiten completar el estudio de los genes del VDC utilizados como blanco para su detección usando la técnica molecular RT-PCR y desafortunadamente -al parecer- no existen en la literatura consultada trabajos anteriores que utilicen el gen M para poder contrastar nuestros resultados.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados, todo sugiere que la detección mediante la RT-PCR debe involucrar necesariamente a los genes N, L o P (Muñoz, 2013; Pincheira, 2015; Mateo, 2015). Sin embargo, lo anterior deberá ser demostrado aún, considerando alguna prueba de sensibilidad como realizar diluciones en base 10 (por ejemplo) y determinar el límite de detección, o bien estandarizando el método utilizado, pues uno de ellos (Mateo, 2015) considera una PCR anidada.

Se propone así, el diseño de nuevos partidores que amplifique casi la totalidad del gen M y enviar a secuenciar el fragmento determinado a fin de dilucidar si las secuencias de las muestras negativas de este trabajo pudieran ser diferentes a las disponibles en el Genbank.

CONCLUSIONES

Los partidores diseñados para la prueba de RT-PCR utilizando como blanco el gen M, detectaron el VDC con un 70% de efectividad, pues originaron bandas únicas y nítidas que permiten detectar el virus en 14/20 muestras positivas a VDC.

Con los resultados obtenidos, la determinación del protocolo óptimo de detección viral del VDC mediante RT-PCR, involucraría a los genes N, P o L, que superan el 90% de detección según las muestras analizadas. Con esto, se podría tomar las medidas necesarias para la prevención, tratamiento y control de la enfermedad en forma oportuna.

BIBLIOGRAFÍA

- APPEL, M. 1969.** Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30(7):1167-1182.
- APPEL, M. 1970.** Distemper pathogenesis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156(12):1681-1684.
- APPEL, M. 1977.** Canine distemper. **In:** Kirk, Current Veterinary Therapy. (Eds). By Saunders. Philadelphia, USA. pp. 1308-1313.
- APPEL, M. 1987.** Canine Distemper Virus. **In:** Appel, M. (Eds.), Virus Infections of Carnivore. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp. 133-159.
- APPEL, M.; YATES, R.; FOLEY, G.; BERNSTEIN, J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L.; MILLER, L.; ARP, L.; ANDERSON, M.; BARR, M. 1994.** Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 277-288.
- APPEL, M.; SUMMERS, B. 1995.** Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivore. *Vet. Microbiol.* 44:187-191.
- APPEL, M.; SUMMERS, B. 1999.** Distemper Canino: Estado actual. [en línea] International Veterinary Information Service http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf [consulta: 15-03-2017].
- AMUDE, A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. 2007.** Clinical pathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sci.* 82(3):416-422.
- BARRET, T. 1999.** Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet. Microbiol.* 69(1-2):3-13.
- BEINEKE, A., PUFF, C., SEEHUSEN, F., BAUMGÄRTNER, W. 2009.** Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous Canine Distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127(1-2):1-18.
- BERNARD, S.; SHEN, D.; GORHAM, J. 1982.** Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 43:2266-2269.
- CERDA, L.; MATHIEU, C.; QUINTEROS, G. 1994.** Primer aislamiento de Virus Distemper Canino en Chile. **In:** XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México. 9-15 octubre 1994.

CESPEDES, P.; CRUZ, P.; NAVARRO, C. 2010. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Arch. Med. Vet.* 42:15-28.

CHOI, J. 1990. Canine Distemper. *J. Kor Vet. Med. Assoc.* 26:518-523.

DIALLO, A. 1990. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.* 23(1-4):155-63.

DEEM SL, SPELMAN L, YATES RA, MONTALI RJ. 2000. Canine distemper in terrestrial carnivore: A Review. *J. of Zoo and Wildl Med.* 31: 441-451.

DEMETER, Z.; LAKATOS, B.; PALADE, E. 2007. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122(3-4):258-69.

ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.; LORUSSO, E.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 136(1-2):171-176.

FRISK, A.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. 1999. Detection of canine Distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37(11):3634–3643.

GALLO 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(3-4):341-349.

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRAO, F.J.; DE OLIVEIRA, D.B.; BELONI, S.N.E.; ALFIERI, A.A.; Alfieri, A.F. 2004. Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56:480-487.

GOLLER, K.V.; FYUMAGWA, R.D.; NIKOLIN, V.; EAST, M.L.; KILEWO, M.; SPECK, S.; MÜLLER, T.; MATZKE, M.; WIBBELT, G. 2010. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Vet. Microbiol.* 146(3-4):245-252.

GREENE, C.; APPEL, M. 1998. Canine distemper. **In:** *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Greene, C. (Eds.). Infectious Diseases of the Dog and Cat. WB Saunders Company. Philadelphia, USA. pp. 9-22.

HARDER, T.; OSTERHAUS, A. 1997. Canine distemper virus a morbillivirus in search of new host. *Trends. Microbiol.* 5:120-124.

JARA, P. 2011. Detección del gen de la hemoaglutinina del virus Distemper canino mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa. Memoria de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 16 p.

JIANG, Q.; HU, X.; GE, Y.; LIN, H.; JIANG, Y.; LIU, J.; GUO, D.; SI, C.; QU, L. 2013. Complete Nucleotide Sequence of Canine Distemper Virus HLJ1-06, Isolated from Foxes in China. *Genome A.* 1(1):e00065-12.

JONES, T.; HUNT, R.; KING, N. 1997. Canine distemper. In: Jones, T., Hunt, R., King, N. (Eds.). *Veterinary Pathology*, 6th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 311-315.

KIM, Y.H.; CHO, K.W.; YOUN, H.Y.; YOO, H.S.; HAN, H.R. 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2(1):59-63.

KOUTINAS, A.; POLIZOPOLOU, Z.; BAUMGAERTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, V. 2002. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J. Comp. Pathol.* 126(1):4756.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.; KOESTNER, A. 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41(2):284-292.

KRAKOWKA, S.; AXTHEL, M.; JOHNSON, G. 1985. Canine distemper virus. In: Olsen, R., Krakowka, S., Blakeslee, J. *Comparative Pathobiology of Viral Diseases.* (Eds.). Vol 2. CRC Press. Boca Raton. Florida, USA. pp. 137-164.

LAMB, R.; KOLAKOFSKY, D. 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B., Knipe, D., Howley, P., Chanock, R., Monath, T., Melnick, J., Roizman, B., Straus, S. (Eds.), *Fields Virology*, third ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. pp. 1177-1204.

LAMB, R.; KOLAKOFSKY, D. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D., Howley, P. (Eds.). *Fields of Virology*. 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. pp. 1305-1443.

LAMB, R.; PARKS, G. 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.; Howley, P. *Fields Virology* 5th ed., Lippincott Williams & Willkins. Philadelphia, USA. pp 1449-1496.

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

MACARTHY, A.; SHAW, M.; GOODMAN, S. 2007. Pathogen evolution and disease emergence in carnivore. *Proc. Biol. Sci.* 274:3165-3174.

MACLACHLAND, N.; DUBOVI, E. 2011. Paramyxoviridae. **In:** Maclachland, N.; Dubovi, E. *Fenner's Veterinary Virology*. 4th ed. Elsevier. pp. 299-325.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. 2008. Canine Distemper Virus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38(4):787-797.

MATEO, F. 2015. Detección molecular del gen de la fosfoproteína del Virus Distemper Canino en muestras de sangre de perros. Memoria de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 30 p.

MUÑOZ, C. 2013. Diagnóstico molecular del Virus Distemper Canino mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Transcripción inversa del Gen de la Proteína de la Nucleocápside viral. Memoria de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 32 p.

NAVARRO, C.; PIZARRO J.; CELEDÓN M. 2002. Virus distemper canino en Chile. XII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile.

OKITA, M.; YANAI, T.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; MORI, T.; MASEKI, T.; YAMANOUCHI, K.; MIKAMI, T.; KAI, C. 1997. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J. Comp. Pathol.* 116(4):403-408.

ORVELL, C., 1980. Structural polypeptides of canine distemper virus. *Arch. Virol.* 66: 193-206.

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

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

PATEL, J.; HELDENS, J.; BAKONYI, T.; RUSVAI, M. 2012. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine.* 30(10):1767-81.

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.

PINCHEIRA, D. 2015. Detección molecular del gen de la polimerasa grande (L) del Virus Distemper Canino. Memoria de título (Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 25 p.

PINOTTI, M.; GOLLAN, A.; DELGADO, A.; PASSEGGI, C.; OCCHI, H.; BLAINQ, L.; CANAVESIO, M. 2009. Distemper Canino. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*. 8(2):29-45.

PRATELLI, A. 2011. Canine distemper virus: the emergence of new variants. *Vet. J.* 187 (3):290-291.

PRINGUE, C. R. 1999. Virus Taxonomy at the XI International Congress of Virology. Australia. *Arch. Virol.* 144:2065-2070.

REUTEMANN, S.; GOLLÁN, A.; PINOTTI, M.; OCCHI, H. 2006. Distemper canino: Detección por inmunofluorescencia directa (IFD) y recuperación de cepas circulantes. Encuentro de Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; NEGRAO, F.J.; MORAIS, H.S.A.; ALFIERI, A.F. 2006. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80:116-119.

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

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.

SI, W.; ZHOU, S.; WANG, Z.; CUI, S. J. 2010. A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. *Virol. J.* 7(86):1-6.

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(1):66-72.

SHIN Y, K CHO, H CHO, S KANG, H KIM, Y KIM, H PARK, N PARK. 2004. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust. Vet. J.* 82:83-86.

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

SUMMERS, B.; APPEL, M. 1994. Aspects of canine Distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20(6):525-534.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. 2005. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol.* 109(1):56-68.

VON MESSLING V, N OEZGUEN, Q ZHENG, S VONGPUNSAWAD, W BRAUN, R CATTANEO. 2005. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 79: 5857-5862.

WANER T, MAZAR S, KEREN-KORNBLATT E. 2006. Application of a dot enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of the immune status to canine parvovirus and distemper virus in adult dogs before revaccination. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8(3):267-70.

WRIGHT, N.; CORNWELL, A.; THOMPSON, H.; LAUDER, I. 1974. Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet. Rec.* 94(5):86-92.

Anexo 1: Secuencias nucleotídicas del gen M de Virus Distemper Canino (Genbank).

>LC011104.1 Canine distemper virus M gene for matrix protein, strain: Ludhiana

```
ACATGCTTGAGCTGTGCGATTCACTGATCCACTAAAGGGCGCAGAACTGCCTTCGCCATCGCTTTAAAGTAATTAT
AAAAAAGCTTAGGACACAAGAGCTTAAGTCCCTCTCTAAAAAATGACTGAGGTGTACGACTTCGACCAGTCTTCGTG
GGACACCAAAGGCTCGTTGGCCCCATCTTGCCCACCACCTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCCCAAGTCAGAGTG
ATAGATCCAGGACTCGGCGATAGAAAAGATGAATGTTTCATGTATATTTTTTTACTGGGTATAATAGAAGACAATG
ATGGCCTCGGACCCCCGATCGGAAGAACATTCCGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCTAGACCTGA
AGAATTATTGAAGGAAGCCACCCTGTTGGACATTGTGGTAAGGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTC
TACAATAACACCCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAATGGGAGTGTGTTTCAAGTCAAAATC
AAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGATATAGCACAGAGATTTAGGGTGGTATATATGAGCATAACTCG
ACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTCAAGTCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAAT
ATTTTAGTTACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAG
TGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTCAGCCGTAAGAAAAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAA
AATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGGAACCAGTCTTCACATACGGTGTACTGGTAAG
ATGAGCAAGACTTTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAAATCCTGTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATT
TGAATCGATTTCTATGGAGATTAGAGTGCAGAATAGTAAGAATCCAAGCAGTCTTGCAGCCATCAGTCCCACAAGA
TTTCAGAGTTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAAAATTCTCTAAATCAT
```

>EU072199.1 Canine distemper virus strain vaccine X matrix protein (M) gene

```
ATGACTGAGGTGTACGACTTTGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAAGGCTCATTGGCCCCCATTGTTGCCACCACCT
ATCCCGATGGTAGGCTAGTACCCCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGACTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCAT
GTATATTTTTTCTACTGGGTATAATAGGAGACAACGATGGCCTCGGACCCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTG
CCTTTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCCAGACCTGAAGAATTATTGAAGGAAGCCACCCTGTTGGACATTGTGGTAA
GGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAA
GGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCA
CAGAGATTTAGGGTGGTATATATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGT
TTGAATCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCAAG
CAGAGGTAATTTGAGTATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTCAGCCGTAAGAAG
AACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAG
GGGAACCAAGTCTTACATAGGATGTACTGGTAAGATGACCAAGGCTTTGAATGCTCAGTAGGGTTCAAGAAAAT
CCTGTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATTTGAATCGATTTCTATGGAGATTAGAGTGCAAAATAGTAAGA
ATCCAAGCAGTCTTGCAACCATCAGTCCCAAAAGATTTCAGAATTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGG
GTCTTTTCAAAAATTCTCTAA
```

>AB476403.1 Canine distemper virus, gen for matrix protein. strain: 50Cb1

```
ATGACTGAGGTGTACGACTTCGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCATTGGCCCCCATTGTTACCCACCCTT
ATCCCGATGGTAGGCTAGTACCTCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGACTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCAT
GTATATTTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGACAACGATGGCCTCGGACCCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTG
CCTTTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCCAGACCTGAAGAATATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTGGTAA
GGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAA
GGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCA
CAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGT
TTGAATCCGCTCCAAGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCAAG
CCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAG
AACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAG
GGGGAACCAAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAAT
CCTGTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGG
GTCTTTTCAAAAATTCTCTAAATCATCAGTTCATGAACCTCAAATGCTTCGGTGGCGTGTGCCAGGATCCCT
TAATCCCTCAAACAAGGATTGAGGCTACAAGTATCGACTATCTCGATGTTGCTCCTGCATTTTAAGCATGTTCTA
```

TAGGTTTCTAAACTGCTCATTTCGTGCTTACTATTCTAGTGACTCCGCGATATGAAGACAGCTGAATCAAACCGAAT
CATGCCTGAGAGTAGGTTGATCATTATTGGTCCAATAACTGTATGGATGCTTGGGGGTTTGAACCTTCGCTTCTGGG
AATCTCACTTTAACAATTATACCTCCCTGCACTTGCCC

>AB475101.1 Canine distemper virus, gene for matrix protein, strain: 009L

ATGACTGAGGTGTACGACTTCGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCATTGTCCCCATTTTACCCACCACTT
ATCCCGATGGTAGGCTAGTACCTCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGACTCGGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCAT
GTATATTTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGACAACGATGGCCTCGGACCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTG
CCTTTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCCAGACCTGAAGAACTATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTGGTAA
GACGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAA
GGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCA
CAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGT
TTGAATTTTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCAAG
CCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGTAAGAAG
AACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAG
GGGGAACCAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAAT
CCTGTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTTATGGAGATTAGAGTGCAAAAATAGTAAGA
ATCCAAGCAGTTTTGCAACCCTCAGTCCCGCAAGACTTCAGAATTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGG
GTCTTTTCAAATTTCTCTAA

Anexo 2: Alineamiento nucleotídico según CLUSTAL OMEGA.

AB476403.1	ACTGAGGTGTACGACTTCGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCATTGGCCCCATT
AB475101.1	ACTGAGGTGTACGACTTCGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCATTGTCCCCATT
LC011104.1	ACTGAGGTGTACGACTTCGACCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCGTTGGCCCCATC
EU072199.1	ACTGAGGTGTACGACTTTGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAGGGCTCATTGGCCCCATT ***** ** *****
AB476403.1	TTACCCACCACTTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCTCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGA
AB475101.1	TTACCCACCACTTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCTCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGA
LC011104.1	TTGCCCACCACCTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCCCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGA
EU072199.1	TTGCCCACCACCTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCCCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGA ** *****
AB476403.1	CTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCATGTATATTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGAC
AB475101.1	CTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCATGTATATTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGAC
LC011104.1	CTCGGCGATAGAAAAGATGAATGTTTCATGTATATTTTTTACTGGGTATAATAGAAGAC
EU072199.1	CTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCATGTATATTTTTCTACTGGGTATAATAGGAGAC ***** *****
AB476403.1	AACGATGGCCTCGGACCCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGG
AB475101.1	AACGATGGCCTCGGACCCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGG
LC011104.1	AATGATGGCCTCGGACCCCCGATCGGAAGAACATTCGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGG
EU072199.1	AACGATGGCCTCGGACCCCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGG ** *****
AB476403.1	CGCACTACAGCCAGACCTGAAGAACTATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTGGTA
AB475101.1	CGCACTACAGCCAGACCTGAAGAACTATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTGGTA
LC011104.1	CGCACTACAGCTAGACCTGAAGAATTATTGAAGGAAGCCACCCTGTTGGACATTGTGGTA
EU072199.1	CGCACTACAGCCAGACCTGAAGAATTATTGAAGGAAGCCACCCTGTTGGACATTGTGGTA ***** *****
AB476403.1	AGGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTGCACATC
AB475101.1	AGACGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTGCACATC
LC011104.1	AGGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTGCACATC
EU072199.1	AGGCGAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCATTGCACATC ** *****
AB476403.1	TTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGT
AB475101.1	TTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGT
LC011104.1	TTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAATGGGAGTGTGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGT
EU072199.1	TTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGT ***** *****
AB476403.1	AACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGC
AB475101.1	AACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGC
LC011104.1	AACGCAGTCAATTTAATACCATTAGATATAGCACAGAGATTTAGGGTGGTATATATGAGC
EU072199.1	AACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTGGTATATATGAGC ***** *****
AB476403.1	ATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCCGC
AB475101.1	ATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCCGC
LC011104.1	ATAACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCCGC

EU072199.1	ATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCGGC ** ***** **
AB476403.1	TCCAAGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGT
AB475101.1	TCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGT
LC011104.1	TCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTTACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGT
EU072199.1	TCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGT *****
AB476403.1	TCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATC
AB475101.1	TCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATC
LC011104.1	TCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATC
EU072199.1	TCAAGCAGAGGTAATTTGAGTATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATC *****
AB476403.1	GGCAACTTTAGCCGTAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAACTGAAAATT
AB475101.1	GGCAACTTTAGCCGTAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAACTGAAAATT
LC011104.1	GGCAACTTCAGCCGTAAGAAAAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAACTGAAAATT
EU072199.1	GGCAACTTCAGCCGTAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAACTGAAAATT *****
AB476403.1	GAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATACGA
AB475101.1	GAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATACGA
LC011104.1	GAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATACGG
EU072199.1	GAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAGTCTTCACATAGGA ***** *
AB476403.1	TGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCTGTGT
AB475101.1	TGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCTGTGT
LC011104.1	TGTACTGGTAAGATGAGCAAGACTTTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCTGTGT
EU072199.1	TGTACTGGTAAGATGACCAAGGCTTTGAATGCTCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCTGTGT *****
AB476403.1	TACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTATGGAGATTAGAGTGCAA
AB475101.1	TACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTATGGAGATTAGAGTGCAA
LC011104.1	TACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATTTGAATCGATTTCTATGGAGATTAGAGTGCA
EU072199.1	TACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATTTGAATCGATTTCTATGGAGATTAGAGTGCAA ***** *
AB476403.1	ATAGTAAGAATCCAAGCAGTTTTACAACCTCAGTCCCACAAGACTTCAGAATTTATAAT
AB475101.1	ATAGTAAGAATCCAAGCAGTTTTGCAACCTCAGTCCCACAAGACTTCAGAATTTATAAT
LC011104.1	ATAGTAAGAATCCAAGCAGTCTTGCAACCATCAGTCCCACAAGATTTTATGGAGATTAGAGTGCAA
EU072199.1	ATAGTAAGAATCCAAGCAGTCTTGCAACCATCAGTCCCACAAGATTTTATGGAGATTAGAGTGCAA *****
AB476403.1	GATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAATTTCTCTAAATCATCAGTTCATGA
AB475101.1	GATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAATTTCTCTAAATCATCAGTTCATGA
LC011104.1	GATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAATTTCTCTAAATCAT-----
EU072199.1	GATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAATTTCTCTAA----- *****

Anexo 3: Secuencia de consenso a partir de alineación mediante programa Clustal OMEGA, utilizada para el diseño de partidores.

ACTGAGGTGTACGACTTTGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAAGGCTCATTGGCCCCATTTTACCCACCACCTTATC
 CCGATGGTAGGCTAGTACCTCAAGTCAGAGTGATAGATCCAGGACTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCATGTA
 TATTTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGACAACGATGGCCTCGGACCCCCGATTTGGAAGAACATTTGGATCGCTGCCT
 TTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCCAGACCTGAAGAACTATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTGGTAAGGC
 GAACTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTACAATAACACCCCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGT
 CCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGCAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAG
 AGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTG
 AATTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTGTGACACCATTCAAGTTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCG
 AGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAAGAAC
 CAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAGTGAAGTGAAGATGGGATTAGTGTGCTCTAGGAGGGATAGGGG
 GAACCAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCT
 GTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTATGGAGATTAGAGTGCAAAATAGTAAGAATC
 CAAGCAGTTTGGCAACCCTCAGTCCCAGCAAGACTTCAGAATTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTC
 TTTTCAAATCTCTAAATCAT

Anexo 4: Diseño de partidores según OligoPerfect™ Designer de LifeTechnologies™.

ThermoFisher
 SCIENTIFIC

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90

1 ATGACTGAGGTGTACGACTTTGATCAGTCTTCGTGGGACACCAAAGGCTCATTGGCCCCATTTTACCCACCACCTTATCCCGATGGTAGGCTAGTACCTC
 101 AAGTCAGAGTGATAGATCCAGGACTCGGCGATCGAAAAGATGAATGTTTCATGATATTTTTCTACTGGGTATAATAGAAGACAACGATGGCCTCGGACC
 201 CCCGATTGGAAGAACATTTGGATCGCTGCCTTTAGGTGTTGGGCGCACTACAGCCAGACCTGAAGAAGTATTGAAAGAAGCCACTCTGTTGGATATTGTG
 301 GTAAGGCCAAGTGCAGGTGTCAAGGAACAACCTGGTATTTTCAATAACACCCCATTTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCTTACGAGTGGGAGTG
 401 TGTTTCAGTGCAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGA
 501 CGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAGTTGAGGGAGATGTC
 601 TGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTG
 701 CTGATTACTGTAAGTGAAGTGAAGATGGGATTAGTGTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAACCAAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAG
 801 CAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGAAAATCCTGTGTTACCCGCTCATGGAGATCAATGAAGATCTAAATCGATTTTATGGAGATTAGAGTGC
 901 AAAATAGTAAGAATCCAAGCAGTTTGGCAACCCTCAGTCCCAGCAAGACTTCAGAATTTATAATGATGTTATCATCAGCGATGATCAGGGTCTTTTCAAAA
 1001 TTCTCTAAATCAT

Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
cc 1 F	45.00	FWD	20	60.23
cc 1 R	50.00	REV	20	60.48

5' Addition Primer Sequence

CAATAACACCCCATTTGCACA

ATCTCCATGAGCGGGTAACA

P1: CAATAACACCCCATTTGCACA
 P2: ATCTCCATGAGCGGGTAACA

Anexo 5: Alineamiento nucleotídico (Clustal Omega) y obtención de secuencia consenso MG1.

>MG1.1
 ACACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCAATGCAAATCAAGTCTGTAACG
 CAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGTTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAA
 GTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG
 AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCTTGGTGCATATCGGCAACT
 TTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTCCTCTAG
 GAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGGAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGA
 AAATCCTGTGTAC

>MG1.2
 CCACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCAATGCAAATCAAGTCTGTAACG
 CAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGTTAGTATACATGAGCATCTCTCGACTATCAGACGATGGAA
 GTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG
 AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCTTGGTGCATATCGGCAACT
 TTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTCCTCTAG
 GAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGTGCAAGGCTCTGAAAGCCAGCTAGGGTTCAAGA
 AAATCCTGTGT

>MG1.3
 ACACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCAATGCAAATCAAGTCTGTAACG
 CAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGTTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAA
 GTTACAGAATTCCTCGCGGGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG
 AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCTTGGTGCATATCGGCAACT
 TTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTCCTCTAG
 GAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTCACATACGATGTACTGGAAAGATGAGCAAGGCGCTGAATGCCAGCTAGGGTTCAAGA
 AAATCCT

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MG1.2	CCACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCA	60
MG1.1	ACACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCA	60
MG1.3	ACACCCCATTCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCA *****	60
MG1.2	ATGCAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTA	120
MG1.1	ATGCAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTA	120
MG1.3	ATGCAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTA *****	120
MG1.2	GGGTAGTATACATGAGCATCTCTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCG	180
MG1.1	GGT TAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCG	180
MG1.3	GGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCG ** *****	180
MG1.2	GGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAG	240
MG1.1	GGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAG	240
MG1.3	GGATGTTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTCACCATTCAAG *****	240
MG1.2	TTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGA	300
MG1.1	TTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGA	300
MG1.3	TTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGA *****	300

MG1.2	CATTCTTGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATT	360
MG1.1	CATTCTTGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATT	360
MG1.3	CATTCTTGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATT *****	360
MG1.2	ACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAA	420
MG1.1	ACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAA	420
MG1.3	ACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAA *****	420
MG1.2	CCAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGTGCAAGGCTCTGAAAGCCCAGCTAGGGT	480
MG1.1	CCAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGGAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGT	480
MG1.3	CCAGTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGTGCAAGGCTCTGAAAGCCCAGCTAGGGT ***** * * * * *	480
MG1.2	TCAAGAAAATCCTGTGT--- 497	
MG1.1	TCAAGAAAATCCTGTGTAC 500	
MG1.3	TCAAGAAAATCCT----- 493 *****	

Anexo 6: Alineamiento nucleotidico (Clustal Omega) y obtención de secuencia consenso MG2.

```
>MG2.1
CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTTCAAATCAAGTCTGTAACGCA
GTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAA
GTTACAGAATTCCTCGCGGGATATTTGAATCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGT
TGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGC
AACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTTG
CTCTAGGAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGG
GTTCAAGAAAACCCCT
```

```
>MG2.2
CCCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTTCAAATCAAGTCTGTAACGC
AGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAA
AGTTACAGAATTCCTCGCGGGATATTTGAATCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAG
TTGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGG
CAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTT
GCTCTAGGAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAG
GGTTCAAGAAAACCCCTGTG
```

```
>MG2.3
CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTTCAAATCAAGTCTGTAACGCA
GTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGTAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAA
GTTACAGAATTCCTCGCGGGATATTTGAATCCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGT
TGAGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATTCATGGTGCATATCGGC
AACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTGTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTGTTG
CTCTAGGAGGGATAGGGGAACCAAGTCTTACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGG
GTTCAAGAAAACCCCTGTGTTACA
```

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

MG2.3	-CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTT	59
MG2.1	-CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTT	59
MG2.2	CCCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTT	60

MG2.3	CAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGG	119
MG2.1	CAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGG	119
MG2.2	CAAATCAAGTCTGTAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGG	120

MG2.3	TAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGA	179
MG2.1	TAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGA	179
MG2.2	TAGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGA	180

MG2.3	TATTTGAATTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG	239
MG2.1	TATTTGAATTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG	239
MG2.2	TATTTGAATTCGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCATTCAAGTTG	240

MG2.3	AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACAT	299
MG2.1	AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACAT	299
MG2.2	AGGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACAT	300

MG2.3	TCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACT	359
MG2.1	TCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACT	359
MG2.2	TCATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACT *****	360
MG2.3	GTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGAACCA	419
MG2.1	GTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGAACCA	419
MG2.2	GTAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGAACCA *****	420
MG2.3	GTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCA	479
MG2.1	GTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCA	479
MG2.2	GTCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCAGCTAGGGTTCA *****	480
MG2.3	AGAAAACCCTGTGTTACA	497
MG2.1	AGAAAACCCT-----	489
MG2.2	AGAAAACCCTGTG----- *****	493

Anexo 7: Porcentaje de identidad nucleotídica de MG1, según BLAST.

Sequences producing significant alignments:

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

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Cb1/H	893	893	100%	0.0	99%	AB490678.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus M, F, H, L genes for matrix protein, fusion protein, hemagglutinin, large polymerase protein, complete cds, strain: 50Cb1	893	893	100%	0.0	99%	AB476403.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con	893	893	100%	0.0	99%	AB476402.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007LmVB	887	887	100%	0.0	99%	AB490680.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007LmVH	887	887	100%	0.0	99%	AB490679.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con/H	887	887	100%	0.0	99%	AB490676.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C/H	887	887	100%	0.0	99%	AB490674.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 009L/H	887	887	100%	0.0	99%	AB490672.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 55L/H	887	887	100%	0.0	99%	AB490670.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: 007Lm-H358p8	887	887	100%	0.0	99%	AB823707.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: 007Lm-VDS	887	887	100%	0.0	99%	AB823706.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C	887	887	100%	0.0	99%	AB476401.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus M, F, H, L genes for matrix protein, fusion protein, hemagglutinin, large polymerase protein, complete cds, strain: 009L	887	887	100%	0.0	99%	AB475101.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 55L	887	887	100%	0.0	99%	AB475099.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: M25CR/H	881	881	100%	0.0	99%	AB490681.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete genome, strain: M25CR	881	881	100%	0.0	99%	AB475097.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus noncoding RNA, noncoding genome, strain: 007Lm	876	876	100%	0.0	99%	AB474307.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Cb1/H
Sequence ID: [AB490678.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 3778 to 4269 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
893 bits(483)	0.0	489/492(99%)	0/492(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACACCCCATTTGCACATCTTA	ACTCCGTTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCA	60	
Sbjct 3778	ACACCCCATTTGCACATCTTA	ACTCCGTTGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTCA	3837	
Query 61	ATGCAAAATCAAGTCTGTAACG	CAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTA	120	
Sbjct 3838	ATGCAAAATCAAGTCTGTAACG	CAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTA	3897	
Query 121	GGGTAGTATACATGAGCATCACT	CGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAAATCCCTCGCG	180	
Sbjct 3898	GGGTAGTATACATGAGCATCACT	CGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAAATCCCTCGCG	3957	
Query 181	GGATGTTTGAATTCCGCTCCAG	GAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCAATCAAG	240	
Sbjct 3958	GGATGTTTGAATTCCGCTCCAG	GAATGCTTTAGCATTTAATATTTTAGTCACCAATCAAG	4017	
Query 241	TTGAGGGAGATGCTGTTC	AAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGA	300	
Sbjct 4018	TTGAGGGAGATGCTGTTC	AAGCCGAGGTAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGA	4077	
Query 301	CATTCTTGGTGCAATATCGGC	AACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATT	360	
Sbjct 4078	CATTCTTGGTGCAATATCGGC	AACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATT	4137	
Query 361	ACTGTA	AAACTGAAAAATGAAAAAGATGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAA	420	
Sbjct 4138	ACTGTA	AAACTGAAAAATGAAAAAGATGGGATTAGTGTGTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAA	4197	
Query 421	CCAGTCTT	CACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCCAGCTAGGGT	480	
Sbjct 4198	CCAGTCTT	CACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCCAGCTAGGGT	4257	
Query 481	TCAAGAAAATCC	492		
Sbjct 4258	TCAAGAAAATCC	4269		

Anexo 8: Porcentaje de identidad nucleotídica de MG2, según BLAST.

Sequences producing significant alignments:

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

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Cb/H	881	881	100%	0.0	99%	AB490678.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus M, F, H, L genes for matrix protein, fusion protein, hemagglutinin, large polymerase protein, complete cds, strain: 50Cb/H	881	881	100%	0.0	99%	AB476403.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con	881	881	100%	0.0	99%	AB476402.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/B	876	876	100%	0.0	99%	AB490690.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 007Lm/H	876	876	100%	0.0	99%	AB490679.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Con/H	876	876	100%	0.0	99%	AB490676.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C/H	876	876	100%	0.0	99%	AB490674.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 009L/H	876	876	100%	0.0	99%	AB490672.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 55L/H	876	876	100%	0.0	99%	AB490670.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: 007Lm-H358p8	876	876	100%	0.0	99%	AB823707.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus viral cRNA, nearly complete genome, strain: 007Lm-VDS	876	876	100%	0.0	99%	AB823706.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 011C	876	876	100%	0.0	99%	AB476401.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus M, F, H, L genes for matrix protein, fusion protein, hemagglutinin, large polymerase protein, complete cds, strain: 009L	876	876	100%	0.0	99%	AB475101.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 55L	876	876	100%	0.0	99%	AB475099.1
<input type="checkbox"/> Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: M25CR/H	870	870	100%	0.0	99%	AB490681.1

Canine distemper virus genomic RNA, complete sequence, strain: 50Cb/H

Sequence ID: [AB490678.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1

Range 1: 3782 to 4270 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
881 bits(477)	0.0	485/489(99%)	0/489(0%)	Plus/Plus
Query 1		CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTTC		60
Sbjct 3782		CCCATTGCACATCTTAACTCCGTGGGAAGAAGGTCCTTACGAGTGGGAGTGTGTTTCAGTGC		3841
Query 61		AAATCAAGTCTGTAAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGT		120
Sbjct 3842		AAATCAAGTCTGTAAACGCAGTCAATTTAATACCATTAGACATAGCACAGAGATTTAGGGT		3901
Query 121		AGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGAT		180
Sbjct 3902		AGTATACATGAGCATCACTCGACTATCAGACGATGGAAGTTACAGAATTCCTCGCGGGAT		3961
Query 181		ATTTGAATTCGGCTCCAGGAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTACCATTCAAGTTGA		240
Sbjct 3962		GTTTGAATTCGGCTCCAAGAAATGCTTTAGCATTAAATATTTTAGTACCATTCAAGTTGA		4021
Query 241		GGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATT		300
Sbjct 4022		GGGAGATGTCTGTTCAAGCCGAGGTAAATTTGAGCATGTTCAAAGATCACCAAGTGACATT		4081
Query 301		CATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTG		360
Sbjct 4082		CATGGTGCATATCGGCAACTTTAGCCGGAAGAAGAACCAAGCTTACTCTGCTGATTACTG		4141
Query 361		TAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAAACCAG		420
Sbjct 4142		TAAACTGAAAATTGAAAAGATGGGATTAGTGTTTGCTCTAGGAGGGATAGGGGGAAACCAG		4201
Query 421		TCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCCAGCTAGGGTTCAA		480
Sbjct 4202		TCTTCACATACGATGTACTGGTAAGATGAGCAAGGCTCTGAATGCCCAGCTAGGGTTCAA		4261
Query 481		GAAAACCT 489		
Sbjct 4262		GAAAATCCT 4270		