



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

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA LA DETECCIÓN  
DEL LINAJE AMÉRICA-1 DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSOCIATED TO  
REVERSE TRANSCRIPTION FOR THE DETECTION OF THE  
AMERICA-1 LINEAGE FROM CANINE DISTEMPER VIRUS**

**Vivian Betsabet Correa Navarro**

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

PROFESOR GUÍA: CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS.

SANTIAGO, CHILE  
2019



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

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA LA DETECCIÓN  
DEL LINAJE AMÉRICA-1 DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSOCIATED TO  
REVERSE TRANSCRIPTION FOR THE DETECTION OF THE  
AMERICA-1 LINEAGE FROM CANINE DISTEMPER VIRUS**

**Vivian Betsabet Correa Navarro**

Nota final: \_\_\_\_\_

Firma

Profesor Guía : Carlos Navarro Venegas

Profesor Corrector : José Pizarro Lucero

Profesor Corrector : Sergio Bucarey Vivanco

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

SANTIAGO, CHILE

2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a cada una de las personas que han estado presentes en todo este proceso, primeramente, a mis padres Margarita Navarro y Pablo Correa, que me ayudaron en todo momento, muchas veces se quedaban despiertos mientras yo estudiaba para mis pruebas para darme un tecito con galletas, los amo. Aunque a mi padre no le pude mostrar mi título, sé que él estaría muy orgulloso con todo esto, al igual que mi mami Marta, que nos dejó cuando iba en segundo año, ella estaba feliz con su nieta en la universidad. A mis hermanos Esteban y Pablo, que han sido pilares de apoyo a lo largo de mi vida, siempre me han ayudado y protegido como la hermana menor que soy. A mis sobrinos Karen, Javiera, Agustín y Santiago que me dan alegrías para seguir adelante. A mi Juan Bofi, que ha sido fundamental en todo este proceso, tuviste que aguantar mis llantos y alegrías en estos años de universidad, comenzamos este proceso siendo pololos y ahora eres mi marido, el tiempo ha pasado y seguimos igual de juntitos, ya no me tendrás que decir estudia, estudia!. Muchas gracias Ingrid por cada clase impresa, ya no te molestaré más. A mis amigas Ivi y Erika, desde el día uno de universidad nos juntamos y no nos separamos más. A Nadia y Ricardo por cada momento compartido, por cada trabajo, momento de estudio y sobre todo por las risas. A Gabriela López, la Gabi, gracias infinitas por toda la ayuda, nos costó un montón terminar, pero por fin lo logramos. A Erica, mi socia y amiga, cada vez que podía me retaba por demorarme tanto en la tesis, ahora sí podremos seguir cumpliendo nuestros sueños de seguir perfeccionándonos como veterinarias especialistas en fisioterapia, y lo que comenzó como un simple proyecto hoy ya es una empresa que cada día está mejor posicionada, nuestro querido “KinesHealth”. También quiero agradecer a mi profesor guía Carlos Navarro, si no fuera por toda su ayuda quizás aún estaría dando vueltas de tesis en tesis, gracias por responder cada correo y mensaje de whatsapp con tanta rapidez, eso se valora, uno como estudiante siente que realmente le importa este proceso de titulación. Son muchas las personas que deberían estar nombradas en esta página, pero como mi familia es tan grande lo resumiré en gracias a mis tías y tíos, a mis primas y primos, a mi padrino Jaime y a mi madrina Lily. Cada una de las personas nombradas, son muy importantes para mí, cada uno de ustedes me ha ayudado a ser la persona que soy hoy en día.

Y no puedo dejar de dedicar esta memoria de título a mis bellos perrunos Peluche y Tiare, por ustedes trataré de ser la mejor veterinaria, doctora de perritos.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	.....	v
<b>Abstract</b>	.....	vi
<b>Introducción</b>	.....	1
<b>Revisión Bibliográfica</b>	.....	2
<b>Objetivo General</b>	.....	7
<b>Objetivos Específicos</b>	.....	7
<b>Materiales y Métodos</b>	.....	8
<b>Resultados</b>	.....	11
<b>Discusión</b>	.....	16
<b>Conclusiones</b>	.....	17
<b>Bibliografía</b>	.....	18
<b>Anexos</b>	.....	21

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Números de acceso al Genbak® .....	11
<b>Cuadro 2</b>	Ejemplo de la utilización del Programa Clustal $\Omega$ y del alineamiento de secuencias comunes candidatas para la obtención de partidores.....	12
<b>Cuadro 3</b>	Uso del Programa OligoPerfect Design® de Invitrogen para el diseño <i>in vitro</i> de partidores para VDC .....	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **Figura 1**

Visualización de RT-PCR de muestras por medio de electroforesis en gel  
Agarosa 2% ..... 14

### **Figura 2**

Visualización de RT-PCR de gen N por medio de electroforesis en gel  
Agarosa 2%..... 15

## RESUMEN

El Distemper Canino (DC) es una de las patologías que provoca mayor tasa de morbilidad y mortalidad en los caninos domésticos a nivel mundial y representa también una importante enfermedad en varias familias de mamíferos terrestres: *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae*, *Hyaenidae*, *Ursidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Felidae* y algunos mamíferos marinos, como la foca cáspica (*pusa caspica*).

Esta enfermedad es causada por el Virus Distemper Canino (VDC), un virus ARN de hebra simple y polaridad negativa, cuyo genoma constituido por seis genes, codifica para seis proteínas estructurales. Entre ellas, la Hemaglutinina codificada por el gen H, presenta la mayor variabilidad aminoacídica, induce la producción de anticuerpos neutralizantes sintetizados por el sistema inmune del hospedero. Basado en la variabilidad del gen H, se ha descrito que a nivel mundial existirían al menos catorce linajes distintos del VDC y en nuestro país se ha descrito la presencia de al menos dos linajes circulando entre nuestros perros enfermos con la patología: América-1 y Europa-1/Sudamérica-1.

Así, el objetivo de esta memoria de título fue implementar la detección del linaje América-1 del Virus Distemper Canino mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a transcripción reversa (RT-PCR) mediante partidores diseñados *in silico*. Para esto, los partidores se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas usadas en el árbol filogenético del gen H de VDC realizado por (Ke *et al.*, 2015, las que se encuentran en la base de datos Genbank®),

Los partidores diseñados resultaron ser eficaces para la detección del VDC y la RT-PCR fue capaz de detectar un fragmento específico del gen H de las muestras positivas, por lo tanto se podría sugerir que estos partidores diseñados *in silico* efectivamente se pueden ocupar para detectar el linaje América-1 del VDC.

**Palabras Clave:** DC, VDC, Linaje América-1, Gen H, partidores, *in silico*, RT-PCR.

## **ABSTRACT**

The Canine Distemper is one of the pathologies that causes the highest rate of morbidity and mortality in domestic dogs worldwide and represents an important disease in several families of terrestrial mammals: *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae*, *Hyaenidae*, *Ursidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Felidae* and some marine mammals, like the cape seal (*pusa caspica*).

This disease is caused by Canine Distemper Virus (CDV), a single-stranded RNA virus with negative polarity, whose genome consists of six genes codifying for six structural proteins. Among them, the Hemagglutinin encoded by the H gene, has the highest amino acid variability, inducing the production of neutralizing antibodies synthesized by the host's immune system. Based on the variability of the H gene, it has been described that worldwide there would be at least fourteen different VDC lineages and in our country the presence of at least two lineages circulating among our sick dogs has been described with the pathology: America-1 and Europe-1/South America-1.

The objective of this title report was to implement the detection of the America-1 lineage of the Canine Distemper Virus through the Polymerase Chain Reaction associated with reverse transcription (RT-PCR) by means of *in silico* designed primers. For this, the primers were designed using the nucleotide sequences used in the phylogenetic tree constructed using the VDC H gene performed by Ke *et al.*, 2015, and stored in the Genbank® database.

The designed primers were found to be effective for the detection of VDC and the RT-PCR was able to detect a specific fragment of the H gene from the positive samples, therefore it could be suggested that these *in silico* designed primers can effectively be used to detect the VDC lineage America-1.

**KEYWORDS:** CD, CDV, America-1 lineage, H gene, primers, *in silico*, RT-PCR.

## INTRODUCCIÓN

El Distemper Canino (DC) es una de las principales enfermedades que causa alta tasa de morbilidad y mortalidad en perros no vacunados, observándose en la clínica que los animales vacunados también enferman. El agente etiológico de esta enfermedad denominado Virus Distemper Canino (VDC) afecta también a animales silvestres y en peligro de extinción en todo el mundo. Los perros domésticos y otras especies relacionadas sirven como reservorios del virus y juegan un rol importante en la transmisión de la enfermedad.

El genoma del virus codifica para seis proteínas estructurales: proteína de la nucleocápside (gen N), proteína de matriz (gen M), fosfoproteína (gen P), polimerasa grande (gen L), hemaglutinina (gen H) y la proteína de fusión (gen F)

El gen H es el que presenta mayor grado de variabilidad y en base a lo anterior, en la actualidad se han descrito 14 linajes distintos considerando esta variabilidad: América-1 (cepa vacunal), América-2, Asia-1, Asia-2, Asia-3 y Asia-4, Europa-1/ Sudamérica-1 (EU-1 / SA-1), Ártico, Europeo Silvestre (EW), Sudamérica-2 (SA-2), Sudamérica-3 (SA-3), Rockborn-like (RL), África-1 y África-2.

En Chile, hoy sabemos que al menos existirían dos de los catorce linajes circulantes en la población canina del país: América 1 y Europa 1.

Debido a que el DC es una enfermedad altamente contagiosa, letal y que afecta a una gran cantidad de especies, es de gran importancia implementar una técnica que permita realizar la detección viral *antemortem* y de esta forma facilitar el diagnóstico y tratamiento temprano.

Así, en esta Memoria de Título se diseñaron partidores *in silico* específicos para el linaje América-1 del gen H del VDC, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa, previa transcripción reversa (RT-PCR). El resultado obtenido permitiría posicionar al gen H como blanco de detección a pesar de la variabilidad descrita.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Etiología.**

El Virus Distemper Canino (VDC) se clasifica en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae* y género *Morbillivirus* (Amarasinghe *et al.*, 2018). Es un virus pleomórfico, posee envoltura lipídica y un diámetro de 150 a 300 nm. (Summers y Appel, 1994).

Su genoma está formado por alrededor de 15,7 kilobases (kb), constituido por una hebra simple de ARN de polaridad negativa, no segmentado, que codifica para seis proteínas estructurales: proteína de la nucleocápside (gen N; 1,5 kb), la proteína de membrana (gen M; 1 kb), dos proteínas asociadas a la transcriptasa: la fosfoproteína (gen P; 1,5 kb), la polimerasa grande (gen L; 6,5 kb), dos tipos de glicoproteínas; hemaglutinina (gen H; 1,8 kb) y la proteína de fusión (gen F; 1,9 kb) (Martella, *et al.*, 2008; Céspedes *et al.*, 2010). Las proteínas F y H, ubicadas en la envoltura lipídica, inducen la producción de anticuerpos neutralizantes sintetizados por el sistema inmune del hospedero (Appel y Summers, 1995). La nucleocápside helicoidal, contiene las proteínas N, P y L, las que inician la replicación intracelular. La proteína M, conecta las glicoproteínas de la superficie y de la nucleocápside durante la maduración viral (Beineke *et al.*, 2009). La proteína Polimerasa grande (L) es la subunidad fundamental del complejo ARN de la polimerasa dado su efecto de catalizador en la síntesis de ARN viral. (Lamb y Parks, 2007).

### **Rango de hospederos del Virus Distemper Canino.**

Los hospederos del VDC incluyen numerosas familias del orden de los carnívoros como *Canidae* (perros, zorros, lobos entre otros), *Procyonidae* (mapaches, coatí), *Mustelidae* (hurón, comadreja, visón, entre otros), *Mephitidae* (zorrillos), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (osos), *Ailuridae* (pandas rojos), *Viverridae* (ginetas, civetas) y *Felidae* (tigres, leones, leopardos, jaguares, a excepción del gato doméstico) (Martella *et al.*, 2008.; Chinnadurai *et al.*, 2017.; Yipeng, *et al.* 2017). Además, se ha detectado en algunos mamíferos marinos como la foca cáspica (*pusa caspica*) (Kuiken *et al.*, 2006).

### **Patogénesis.**

Las principales vías de ingreso del virus son ocular, nasal y oral, a través de secreciones, aerosoles y fómites, alcanzando superficies mucosas (von Messling *et al.*, 2005). El VDC es un virus linfotrópico y altamente inmunosupresor (Pinotti *et al.*, 2009). Rápidamente se inicia la replicación en nódulos linfáticos locales y en siete días a todos los tejidos linfáticos (viremia primaria), produciendo la infección temprana de linfocitos y células mononucleares, por medio del bloqueo de la síntesis y de las vías de señalización de interferones y citoquinas, disminuyendo la proliferación de linfocitos B y T, siendo más afectados estos últimos, lo que resulta en una grave inmunosupresión del hospedero (von Messling *et al.*, 2005). Durante la segunda y tercera semana post infección, algunos perros inician una fuerte respuesta inmune humoral y celular y pueden recuperarse sin signos clínicos posteriores, mientras otros desarrollan una débil respuesta inmune y presentan la enfermedad aguda o subaguda, debido a que los linfocitos y células mononucleares infectadas transportan el virus a la superficie epitelial del tracto digestivo, respiratorio, urogenital, piel y/o al sistema nervioso central, con los signos clínicos respectivos (viremia secundaria) (Appel y Summers, 1999). En el Sistema Nervioso Central (SNC) el virus se replica inicialmente en las neuronas y en las células gliales, puede causar lesiones en la sustancia blanca y en la sustancia gris. En un curso crónico de la infección, debido a una respuesta inmune deficiente o una respuesta tardía, se describen lesiones inflamatorias desmielinizantes características (BSAVA, 2013).

### **Signos clínicos.**

El DC tiene distintas presentaciones clínicas que pueden variar de aguda, subaguda a crónica, donde se ven afectados los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso (Martella, *et al.*, 2008). La gravedad de los signos clínicos observados depende de distintos factores como la virulencia del virus infectante, condiciones ambientales, la edad del hospedero y su estado inmunológico (BSAVA, 2013).

Dentro de los signos sistémicos se observa anorexia, deshidratación, fiebre y descarga serosa óculo-nasal. Entre los signos neurológicos se puede observar mioclonías, ataxia, temores, crisis

convulsivas, déficit visual y disfunción vestibular. Los signos neurológicos pueden ser causados directamente por el virus o pueden ocurrir como resultado de la respuesta inmune contra el SNC, en cuyo caso los animales tienen un nivel de inmunidad intermedio y el compromiso del SNC se puede desarrollar meses o años después (Gamiz *et al.*, 2011; BSAVA, 2013).

### **Tratamiento.**

Debido a la falta de antivirales específicos y de protocolos estandarizados, el tratamiento utilizado consiste en una terapia sintomática, cuidados de soporte (fluidos hidroelectrolíticos, suplementos vitamínicos y nutricionales) y antibióticos para evitar infecciones bacterianas secundarias, frecuentes en animales inmunocomprometidos (Appel y Summers, 1999; Martella *et al.*, 2008, Pinotti *et al.*, 2009).

### **Prevención y control.**

La vacunación es la principal estrategia para prevenir y controlar la enfermedad. Las vacunas con virus vivos atenuados (VVA) estimulan la respuesta inmune humoral y celular e inducen memoria inmunológica (Martella *et al.*, 2008). El desarrollo y la utilización de estas vacunas han contribuido a una drástica reducción en la incidencia de DC en canes domésticos (Appel y Summers, 1999). A pesar de esto, se han observado brotes de la enfermedad en poblaciones de perros inmunizados pertenecientes a diversas regiones geográficas (BSAVA, 2013). Dichos brotes podrían explicarse por la reversión de la virulencia de las cepas atenuadas, por la emergencia de nuevas cepas suficientemente variables como para evadir la respuesta inmune generada por las vacunas, fallas en la administración de las vacunas, o bien, por el estado inmunológico del animal (Salas, 2013)

### **Diagnóstico.**

El diagnóstico de DC se basa en la sospecha clínica apoyada por la manifestación de los signos clínicos y los antecedentes de riesgo predisponentes a la enfermedad (Martella *et al.*, 2008). 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 (inmunohistoquímica y ELISA) y técnicas moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa previa transcripción reversa (RT-PCR) (Pinotti *et al.*, 2009).

### **PCR y la variante RT-PCR.**

La técnica de PCR fue desarrollada en los años ochenta y desde entonces ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio de una amplia gama de genes. Se ha utilizado en múltiples áreas donde el inmenso potencial de PCR para amplificar mínimas cantidades de DNA (o RNA) ha sido particularmente atractivo (Murphy *et al.*, 1999). Recientemente se ha aplicado con éxito, ya que es un método altamente específico, rápido y sensible para el diagnóstico *antemortem* de la infección por VDC, independientemente de la presentación de la enfermedad, de la respuesta inmune humoral, y distribución del antígeno viral (Frisk *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2005; Navarro, 2012). Así, para aplicar esta técnica a partir de ARN, es necesario hacer una transcripción inversa antes de iniciar la amplificación por PCR, esto va a generar un ADN complementario (cADN), el cual será el sustrato para PCR (Elia *et al.*, 2006).

### **Linajes de VDC.**

Mediante RT-PCR se ha establecido a nivel mundial la existencia de al menos 14 linajes de VDC, basadas en la secuencia nucleotídica del gen H (Asia 1, Asia 2, Asia 3, Asia 4, América 1, América 2, Ártico, Europa 1/Sudamérica 1, Sudamérica 2, Sudamérica 3, Europeo silvestre, África 1, África 2 y Rockborn-like) (Ke *et al.*, 2015; Anexo 1).

En Chile, en un estudio realizado por Salas (2013), se estableció por medio del análisis de un segmento del gen H que existirían al menos dos linajes circulantes en la población canina nacional, indicando a los linajes América-1 y Europa-1 como presentes en el país, donde América-1 está genéticamente relacionado con las cepas vacunales.

Como ya se estableció que en el país hay al menos dos tipos de linajes circulando entre los perros enfermos con DC y uno de esos linajes además es el usado en las vacunas, en esta Memoria de Título se planteó el uso de RT-PCR –con partidores diseñados *in silico*- para la detección de VDC utilizando como blanco el linaje América-1 del gen H.

Así, con el éxito de esta estrategia se puede establecer la presencia del virus y determinar directamente si la muestra analizada pertenece a este linaje, sugiriendo el descarte de la secuenciación nucleotídica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar el linaje América-1 del Virus Distemper Canino mediante la reacción de RT-PCR del gen de la Hemaglutinina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diseñar partidores *in silico* para la detección del linaje América-1 del VDC.
2. Implementar la reacción de RT-PCR para la detección del linaje América-1 del VDC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología y Virología Animal del Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile.

### **Objetivo específico 1**

#### **Diseñar partidores *in silico* para la detección del VDC linaje América-1.**

En primer lugar, se recurrió a una base de datos oficial de secuencias genéticas (Genbank®, 2018) para la obtención de las secuencias nucleotídicas del linaje América-1 del VDC, según lo descrito en el árbol filogenético (Anexo 1) desarrollado por Ke y colaboradores (2015). Luego, se utilizó el software Clustal  $\Omega$  (2018), de acceso gratuito, para el alineamiento de secuencias para determinar zonas de identidad nucleotídica, de esta manera, se obtuvo las secuencias candidatas a utilizar para el diseño de partidores. Este diseño contempla el uso del software de acceso libre Oligoperfect Design (Thermofisher scientific., 2018). Al existir más de un par de partidores candidatos, se optó por aquel que entregó mejores parámetros de selección, como el porcentaje de GC y Tm (datos entregados por el software mencionado). La especificidad de los partidores se corroboró mediante el programa BLAST. Una vez obtenida la secuencia de los partidores, se encargó su síntesis a Fermelo® y los partidores liofilizados fueron solubilizados a una concentración final de 1  $\mu$ M.

### **Objetivo 2.**

#### **Implementar la reacción de RT-PCR la detección del linaje América-1 del VDC.**

A. Los partidores obtenidos fueron utilizados en una reacción de RT-PCR para verificar si amplifican muestras positivas a VDC y la reacción contempló el uso de 20 muestras de ARN positivas a VDC (gen N) que se encuentran en el laboratorio, obtenidas de sangre de perros con signología compatible con VDC.

*Mezcla de la Reacción.* Se utilizó el kit “SuperScript™ one step RT-PCR with PlatinumTaq” (Invitrogen®) según instrucción del fabricante. Siguiendo el protocolo propuesto por la

empresa, el cual consistía en 25 uL del componente “2x Reaction Mix”, el cual contiene 0.4 mM de cada desoxiribonucleótido y 3.2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2uL de “SuperScript. III RT/ Platinum Taq Mix”, 5 uL de cada partidor y 5 uL del templado de ARN para llegar a un volumen final de 50uL.

B. Protocolo RT-PCR. Protocolo de RT-PCR: se empleó un termociclador Apollo de 96 pocillos de 0,2 mL.

a) *Retrotranscripción.* Se favoreció la etapa de retrotranscripción del RNA con el fin de obtener el DNA complementario a utilizar en la siguiente etapa realizada según instrucciones del fabricante: 45°C por 30 minutos y posteriormente 94°C por 2 minutos.

b) *Amplificación del DNA.* La fase de desnaturación del DNA se realizó a 94°C por 30 segundos. Durante la fase de alineamiento se utilizó una temperatura de 55°C, determinada según la temperatura de fusión de ambos pares departidores (la cual era de aproximadamente 60°C) por 30 segundos y la fase de elongación contempló una temperatura de 72°C por un minuto. Transcurridos 40 ciclos, se procedió a una etapa de extensión final a 72°C por 8 minutos y luego, se continuó con la visualización del producto amplificado.

Como control positivo se utilizó una muestra tipificada como América-1 (Salas, 2013). Como control negativo se utilizó una muestra tipificada como linaje Europeo (Salas, 2013) y como control de reactivos se ocupó agua libre de nucleasas.

### **Visualización del fragmento de DNA obtenido en RT-PCR.**

Los productos fueron visualizados por medio de electroforesis en gel agarosa 2% en buffer Tris-HCl (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) y se comparó su recorrido frente a un estándar de tamaño molecular (AccuRuler 100bp Plus DNA Ladder, Maestrogen®). Se tomaron 5 µL del producto de PCR y se mezcló con 1 µL de producto comercial de carga (Fermentas®). A continuación, se realizó la electroforesis a 90 V por noventa minutos. Después de la

electroforesis el gel fue incubado con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante treinta minutos, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Medidas de Bioseguridad.**

Uso de material limpio, eliminación de los desechos y utilización de delantal blanco cerrado y guantes durante el desarrollo del trabajo práctico. Al momento de visualizar los geles se ocuparon gafas con filtro UV, y luego de su uso, los geles incubados en bromuro de etidio se eliminaron mediante el uso de incineración, ya que el químico tiene propiedades mutagénicas (Saeidnia y Abdollahi, 2013).

## RESULTADOS

### Objetivo específico 1.

#### Diseñar partidores *in silico* para la detección del linaje América-1 del VDC.

a) **Obtención de secuencias nucleotídicas.** Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas desde la base de datos oficial de secuencias genéticas (Genbank®, 2018), ocupando los números de acceso de las 11 secuencias nucleotídicas (Cuadro 1)

Cepa viral	Nº acceso	Año aislamiento	Lugar aislamiento
<b>America-1</b>			
AF378705_30_ZA_Onderstepoort_Fox	<a href="#">AF378705</a>	1930s	Estados Unidos
Z35493_40_US_Convac_Dog	<a href="#">Z35493</a>	1930-1950	Estados Unidos
AF259552_40_US_SnyderHill_Dog	<a href="#">AF259552</a>	1930-1950	Estados Unidos
DQ903854_51_US_Lederle_Dog	<a href="#">DQ903854</a>	1951	Estados Unidos
AY548109_98_US_2655_Raccoon	<a href="#">AY548109</a>	1998	Estados Unidos
HM046486_07_KZ_Phoca_Seal	<a href="#">HM046486</a>	2007	Kazakstán
HM063009_89_KZ_Shuskiy_Mink	<a href="#">HM063009</a>	1989	Kazakstán
KM926612_92_CN_L_Fitchew	<a href="#">KM926612</a>	1992	China
DQ778941_06_CN_CDV3_Mink	<a href="#">DQ778941</a>	2006	China
GQ332531_08_CN_16_Dog	<a href="#">GQ332531</a>	2008	China
HQ403645_09_CN_GZ1_Dog	<a href="#">HQ403645</a>	2009	China

Cuadro 1

Números de acceso al Genbak® utilizadas para la obtención de zonas nucleotídicas comunes para el linaje America-1

#### b) Alineamiento de secuencias

Se utilizó el software Clustal  $\Omega$  para el alineamiento de secuencias y se determinaron las zonas de identidad nucleotídica. De esta manera, se obtuvo las secuencias candidatas a utilizar para el diseño de partidores como se observa en el Cuadro 2, donde se demuestra el alineamiento de

las once secuencias nucleotídicas, y en las áreas donde hay zonas de identidad nucleotídica se demuestra con un asterisco al final de cada columna.

Z35493.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1282
AF378705.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	8340
DQ903854.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1262
HQ403645.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1262
GQ332531.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1262
DQ778941.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1285
KM926612.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	8340
HM046486.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	8340
HM063009.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	8340
AF259552.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1282
AY548109.1	ACAGTTGCCATCTTATGGGCGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAACT	1262
*****		
Z35493.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	1342
AF378705.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	8400
DQ903854.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	1322
HQ403645.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	1322
GQ332531.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	1322
DQ778941.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	1345
KM926612.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	8400
HM046486.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	8400
HM063009.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTATGA	8400
AF259552.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGTTTATTATGA	1342
AY548109.1	TAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGTTTATTATGA	1322
*****		
Z35493.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1402
AF378705.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	8460
DQ903854.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1382
HQ403645.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1382
GQ332531.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1382
DQ778941.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1405
KM926612.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	8460
HM046486.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	8460
HM063009.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	8460
AF259552.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1402
AY548109.1	AAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCCCAAAAACGGAACAATCCTTGG	1382
*****		

Cuadro 2.

Ejemplo de la utilización del Programa Clustal  $\Omega$  y del alineamiento de secuencias comunes candidatas para la obtención de partidores.

### c) Diseño de partidores.

Existieron varios segmentos del genoma con áreas con zonas de identidad nucleotídica, sin embargo, los partidores que se podían obtener de esas secuencias tenían bajo porcentaje de guanina-citosina, generaban amplicones más pequeños, la temperatura de fusión era muy variable entre los partidores y algunos de esos partidores se podían unir a varios linajes del VDC. Por esta razón, se eligió la zona indicada en el Cuadro 3, donde se optó por aquel que entregó mejores parámetros de selección, como son el porcentaje de GC y Tm. Estos partidores permitirían obtener un amplicón de alrededor de 556 pares de bases (pb).

The screenshot shows the PRIMER VIEWER and SEQUENCE VIEWER interface. The top part displays a DNA sequence with a search result for 'Vivi6' (611 bp). Below this, a table titled 'Available Primers' lists several primer pairs with their sequences, lengths, GC percentages, and melting temperatures (Tm).

Sequence	Length	Statu...	Ampli...	Primer Name	Sequence	Length	%GC	Tm(°C)	S
Vivi6	611	✓	✓	Vivi6_F_1	TGGGCGGTTGACATTACCTC	20	55.00	60.04	
			✓	Vivi6_R_1	ACTGGTTGTAGAGTTGGCGA	20	50.00	58.95	
			✓	Vivi6_F_2	TGGGCGGTTGACATTACCTC	20	55.00	60.04	
			✓	Vivi6_R_2	CACTGGTTGTAGAGTTGGCG	20	55.00	58.85	
			✓	Vivi6_F_3	GGGCGGTTGACATTACCTCT	20	55.00	59.75	
			✓	Vivi6_R_3	ACTGGTTGTAGAGTTGGCGA	20	50.00	58.95	
			✓	Vivi6_F_4	TGGGCGGTTGACATTACCTC	20	55.00	60.04	
			✓	Vivi6_R_4	CACTGGTTGTAGAGTTGGCGA	21	52.38	60.27	

Cuadro 3

Uso del Programa OligoPerfect Design® de Invitrogen para el diseño in vitro de partidores para VDC

### d) Especificidad de los partidores

La especificidad de los partidores se corroboró mediante el programa BLAST (Anexos 2 y 3). Donde se indicó que ambos partidores se pueden unir a secuencias de VDC. Una vez obtenida

la secuencia de los partidores y haber realizado el BLAST a cada uno de los partidores, se encargó su síntesis a Fermelo®.

## **Objetivo 2.**

### **Implementar la reacción de RT-PCR para la detección del linaje América-1 del VDC.**

Con el procedimiento señalado en Material y Método, se visualizaron bandas de ADN únicas y nítidas entre 500 y 600 pb para el control positivo (VDC linaje América-1) y en las 20 muestras positivas a VDC según el gen N. No se observaron bandas en los carriles correspondientes al control negativo (VDC linaje europeo) ni en el control de reactivos (Figura 1).

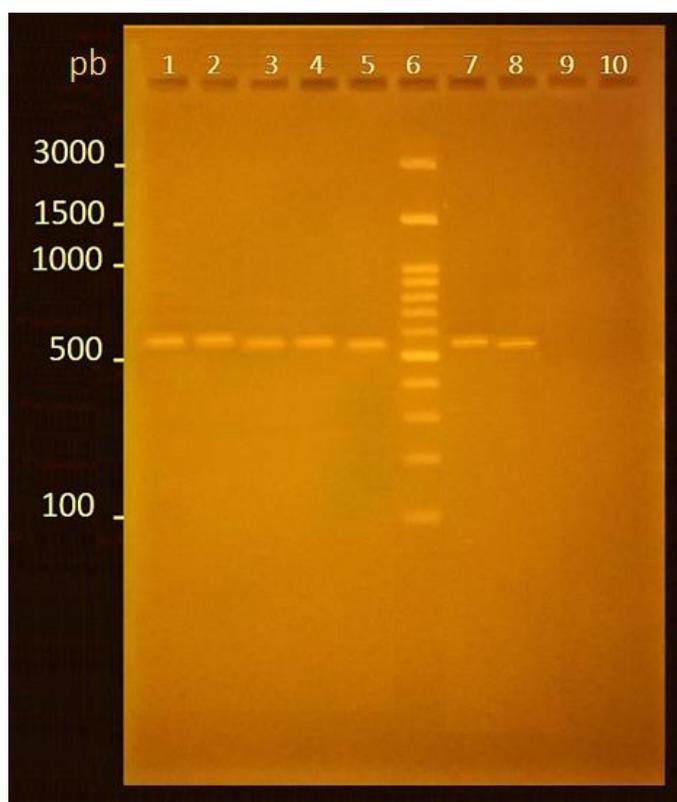


Figura 1: Electroforesis en gel Agarosa 2% de RT-PCR gen H  
Carril 1: Control (+) linaje América 1; Carril 2: muestra 1; Carril 3: muestra 5;  
Carril 4: muestra 8; Carril 5: muestra 10; Carril 6: MTM; Carril 7: muestra 14;  
Carril 8: muestra 17; Carril 9: control (-) linaje europeo; Carril 10: control de reactivos; MTM: Maestrogen® (100-3000 pb)

Para corroborar que la muestra negativa (linaje europeo) lo era realmente y para eliminar la posibilidad de degradación del RNA implicado, se realizó adicionalmente un RT-PCR para detectar el gen N según protocolo establecido anteriormente en este laboratorio (Muñoz, 2013). Se observan bandas de ADN únicas y nítidas de un tamaño cercano a 300 pb y no se observan bandas inespecíficas (Figura 2). Como control negativo de utilizó RNA extraído de sangre de un perro sin vacunar y sin antecedentes de riesgo.

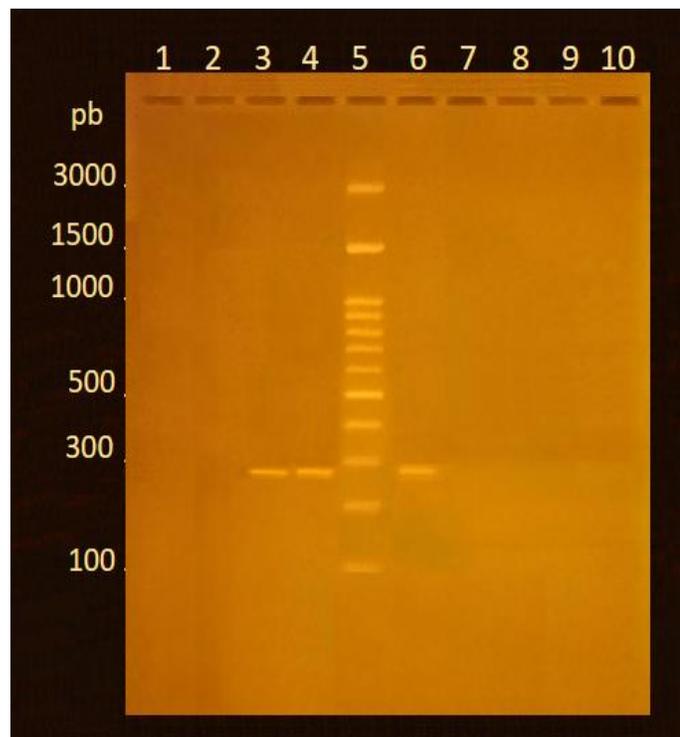


Figura 2

Electroforesis en gel Agarosa 2%. RT-PCR de gen N  
Carril 1: Control (-); Carril 2: control de reactivos; Carril 3: control (+) linaje europeo.  
Carril 4: control (+) linaje América. Carril 5: MTM; Carril 6: muestra 19; Carriles 7-10:  
sin cargar. MTM: Maestrogen® (100-3000 pb).

## DISCUSIÓN

El gen H es uno de los seis genes que componen el genoma del VDC y codifica para la glicoproteína Hemaglutinina, que además de generar la respuesta inmune en el organismo (Appel y Summers, 1995), posee la mayor variabilidad antigénica y genética, presentando alrededor de un 10% de variabilidad entre diferentes linajes. Por lo anterior, varios autores lo describen como un gen no adecuado para el diagnóstico molecular del virus (Gallo *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008).

En la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se han realizado dos memorias de título que utilizaron como blanco de detección al gen H en la técnica de RT-PCR (Jara, 2011; Salas, 2013). En el estudio de Jara (2011) se lograron amplificar cinco de seis muestras almacenadas con una semana de antigüedad y ninguna de las 20 muestras almacenadas con mayor antigüedad. En el estudio de Salas (2013) se logró amplificar tres de las 42 muestras analizadas mediante su protocolo. En ambos casos, la sensibilidad de sus protocolos de RT-PCR fue baja, de lo cual podría inferirse que estos resultados se obtuvieron debido a los partidores utilizados y descritos en estudios anteriores (Mochizuki *et al.*, 1999; Pardo, 2005

En este trabajo, se utilizó un protocolo de RT-PCR con partidores diseñados *in silico* utilizando como blanco de detección el gen H se logró amplificar un fragmento de 556 pb en 20 muestras positivas a VDC según protocolo gen N (Muñoz 2013).

Como el control negativo (linaje europeo) podría corresponder a una muestra de ARN degradado, se realizó una RT-PCR con partidores para el gen N (Muñoz, 2013), incluyendo algunas de las mismas 20 muestras positivas a la RT-PCR implementada en este estudio y así esta posibilidad fue descartada como se observa en la Figura 2.

El criterio de elección de los partidores diseñados incluyó el porcentaje de GC y la temperatura de fusión, sin embargo, la temperatura de alineamiento se determinó disminuyendo cinco grados respecto de la  $T_m$  de los partidores.

Si bien lo óptimo hubiese sido la utilización de un termociclador de gradiente, esto no fue posible debido a que temporalmente no hubo disponibilidad de reactivos necesarios. Lo anterior no fue obstáculo para la obtención de bandas únicas y nítidas.

¿Estos resultados indican que esta RT-PCR solo detecta VDC linaje América-1?

Para poder responder afirmativamente la pregunta, una alternativa práctica es disponer de los catorce linajes disponibles y aplicar el protocolo establecido. Es decir, se requieren doce controles negativos adicionales para garantizar, si se logra, que esta RT-PCR solo detecta VDC linaje América-1.

Otra alternativa práctica es enviar a secuenciar las muestras que resultaron positivas al protocolo implementado y así incluirlas en un árbol filogenético para ver el linaje al que pertenecen. Esta alternativa es posible pues el tamaño del amplicón (556 pb) es adecuado.

Finalmente, considerando la teoría y la existencia de programas bioinformáticos, la especificidad de los partidores ocupados podría también ser corroborada mediante el uso de otros programas existentes, como Vector NTI o DS gene.

## **CONCLUSIÓN**

Los partidores diseñados y la RT-PCR implementada no permitirían la detección de VDC linaje europeo, lo cual sugiere que las veinte muestras positivas corresponden al linaje América-1, requiriéndose estudios adicionales para corroborar esto último.

## BIBLIOGRAFÍA

- AMARASINGHE, G.; ARÉCHIGA-CEBALLOS, N.; BANYARD, A., BASLER, C.; BAVARI, S.; BENNETT, A.** 2018. Taxonomy of the order *mononegavirales*: update 2018. Arch. Virol. doi: 10.1007/s00705-018-3814-x.
- APPEL, M.; SUMMERS, B.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. Vet. Microbiol. 44: 187–191.
- APPEL, M.; SUMMERS, J.** 1999. Distemper canino: estado actual. Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. 5p
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W.** 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine Distemper. Vet. Immunol. Immunopathol. 127: 1-18.
- BRITISH SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION (BSAVA).** 2013. Manual of canine and feline neurology. 3<sup>a</sup> ed. Barcelona, Lexus. 610 p
- CÉSPEDES, 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.
- CHINNADURAI, S.; KINSEL, M.; ADKESSON, M.; TERIO, K.** 2017. Canine distemper in a vaccinated snow leopard (*Panthera uncia*). J. Zoo Wildlife Med. 48(4): 1200–1203.
- CLUSTAL Ω.** 2018. Multiple Sequence Alignment. [en línea] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> [consulta 18-03-2018]
- ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.; LORUSSO, E.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2006. Detection of canine distemper virus in dog by real-time RT-PCR. J. Virol. Methods Vol. 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: 3634- 3643.
- GALLO, 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.
- GAMIZ, C.; MARTELLA, V.; ULLOA, R.; FAJARDO, R.; QUIJANO-HERNANDEZ, I.; MARTINEZ, S.** 2011. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. Vet. Res. Commun. 35:381-390.

**GENBANK**, 2018. NIH genetic sequence database [en línea] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [consulta 12-04-2018]

**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. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.

**KE, G.; HO, C.; CHIANG, M.;SANNO-DUANDA, B.;CHUNG, C.;LIN, M.;SHI, Y.;YANG, M.;TYAN,Y.; LIAO, P.;CHU, P.** 2015.Phylogenetic analysis of the canine distemper virus *hemagglutinin* gene. BMC Vet. Res. 11:164.

**KUIKEN, T.; KENNEDY, S.; BARRETT, T.; VAN DE BILDT, M.; BORGSTEEDE, F.; BREW, S.; CODD, G.; DUCK, C.; DEAVILLE, R.; EYBATOV, T.; FORSYTH, M.; FOSTER, G.; JEPSON, P.; KYDYRMANOV, A.; MITROFANOV, I.; WARD, C.; WILSON, S.; OSTERHAUS, D.** 2006. The 2000 canine distemper epidemic in caspian seals (*Phoca caspica*): Pathology and Analysis of Contributory Factors. Vet. Pathol. 43:321-338.

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

**MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C.** 2008. Canine Distemper Virus. Vet. Clin. Small Anim. 38: 787-797.

**MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURO S.** 1999. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. J Clin Microbiol 37(9): 2936-42.

**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. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 22 p.

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

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

**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.

**PINOTTI, M.; GOLLAN, A.; DELGADO, A.; PASSEGGI, C.; OCCHI, H.; BLAINQ, L.; CANAVESIO, M.** 2009. Distemper canino. Revista FAVET. 8(2): 29-45.

**SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M.** 2013. Are other fluorescent tags used instead of ethidium bromide safer?. DARU 21(1):71.

**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, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 23 p.

**SUMMERS, B.; APPEL, M.** 1994. Aspects of canine Distemper virus and measles virus encephalomyelitis. Neuropath. Appl. Neuro. 20: 525- 534.

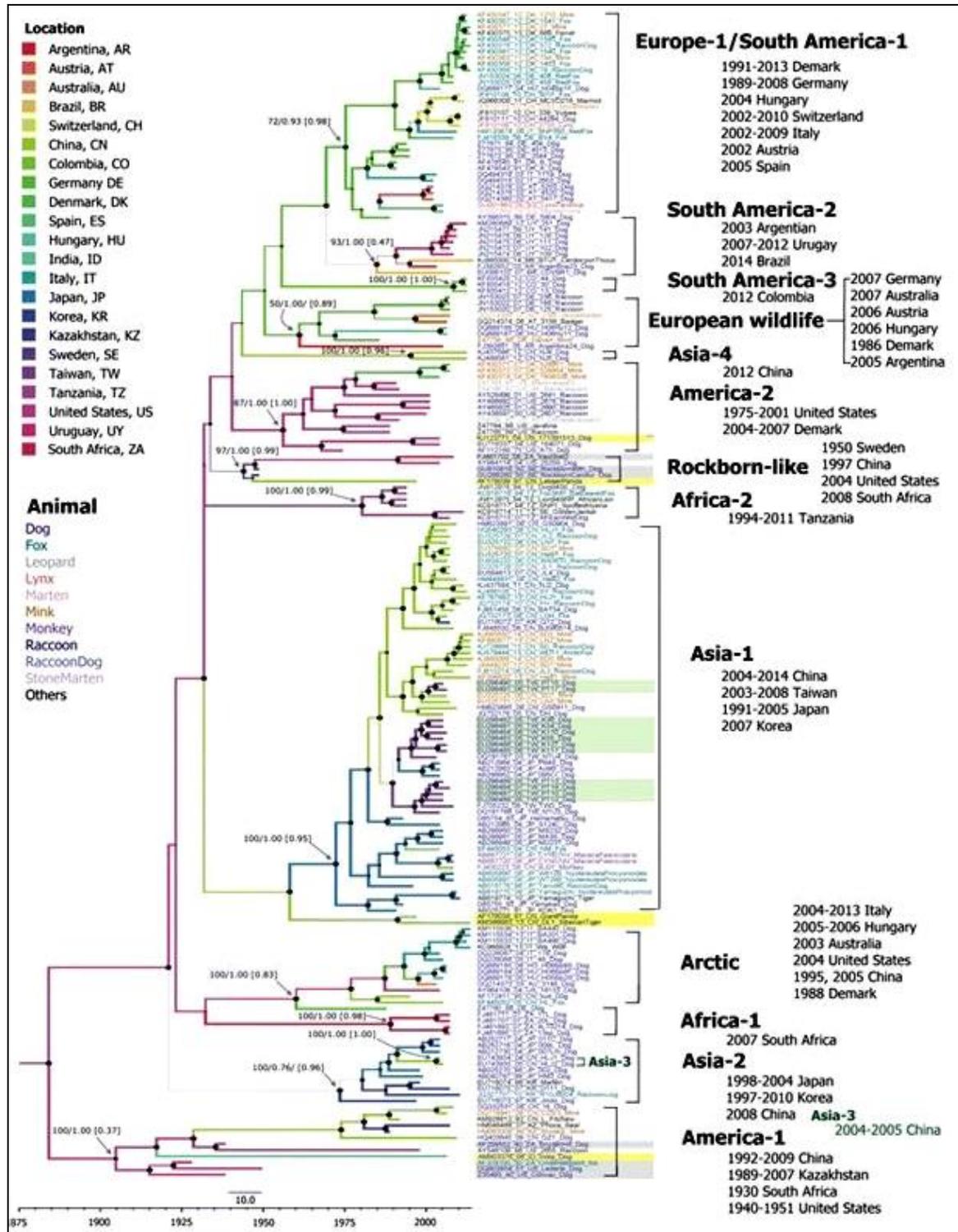
**THERMOFISHER SCIENTIFIC.** 2018. Oligoperfect primer design. [en línea] <https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716> [consulta 15-04-2018]

**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

**YIPENG, J.; XINKE, Z.; YISHENG, M.; YANCHAO, Q.; XIAOBIN, L.; KAIHUI, Z.; CHENGLIN, Z.; DEGUI, L.; XUELIAN, F.; XINRONG, X.; YIWEI, W.; HUANAN, W.** 2017. Canine distemper viral infection threatens the giant panda population in China. J. Oncotarget. 8 (69): 113910-113919.

# ANEXOS

Anexo 1. Árbol filogenético del gen H de VDC (Ke *et al.*, 2015)



**Anexo 2.** Resultado: BLAST realizado a P1: 5'-TGGGCGGTTGACATTACCTC-3'

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine morbillivirus isolate BJ16C9, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF926604.1</a>
Canine morbillivirus isolate BJ16C8, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF926603.1</a>
Canine morbillivirus isolate BJ16C7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF926602.1</a>
Canine morbillivirus isolate BJ16C0, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF926601.1</a>
Canine morbillivirus isolate BJ16B14, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF926598.1</a>
Canine morbillivirus strain C53 hemagglutinin gene, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KY774572.1</a>
Canine morbillivirus isolate D8-4364/2016 hemagglutinin gene, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF964184.1</a>
Canine distemper virus isolate wgswh02 hemagglutinin (H) gene, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX159296.1</a>

**Anexo 3.** Resultado: BLAST realizado a P2: 5'-ACTGGTTGTAGAGTTGGCGA-3'

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine morbillivirus isolate GD1814 hemagglutinin protein mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH558138.1</a>
Canine morbillivirus isolate GD1813 hemagglutinin protein mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH558137.1</a>
Canine morbillivirus isolate GD189 hemagglutinin protein mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH558135.1</a>
Canine morbillivirus isolate GD188 hemagglutinin protein mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH558134.1</a>
Canine morbillivirus isolate GD171 hemagglutinin gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH091812.1</a>
Canine morbillivirus strain 134 hemagglutinin (H) mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MH810099.1</a>
Canine morbillivirus isolate Anhao hemagglutinin gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MG922460.1</a>
Canine morbillivirus isolate Zhao hemagglutinin gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MG922459.1</a>