



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

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PREVIA
TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA LA DETECCIÓN DIFERENCIAL
DE DOS LINAJES DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**USE OF THE REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN
REACTION FOR DIFFERENTIAL DETECTION OF TWO
LINEAGES OF THE CANINE DISTEMPER VIRUS**

Paola Andrea Bolívar Araya

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
2019



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

**USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PREVIA
TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA LA DETECCIÓN DIFERENCIAL
DE DOS LINAJES DEL VIRUS DISTEMPER CANINO**

**USE OF THE REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN
REACTION FOR DIFFERENTIAL DETECTION OF TWO
LINEAGES OF THE CANINE DISTEMPER VIRUS**

Paola Andrea Bolívar Araya

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:	LORENA AGUILAR GUZMÁN

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Desearía que mis ángeles estuvieran en este momento para abrazarlos, sé que están viendo y siguiendo cada uno de mis pasos y logros, no alcancé a que me vieran con mi título en las manos, pero claramente este éxito va dedicado a ustedes, mi amado padre Jaime y mi adorada abuela, mi mamá Hilda. Cada día están en mi memoria y cada día me hacen más falta.

Quiero agradecer a mi madre Cecilia, quien es el pilar fundamental de mi vida y mi motivación de salir adelante. Eres la persona más importante de mi vida y te agradezco todo lo que has dado por mí.

A mis hermanos Mauricio y Sebastián, gracias por ser mis protectores y siempre ayudarme cuando los necesito, me han dado el privilegio de ser tía de unos hermosos bebés; Antonia, Elvis, Fernanda y Amanda, quienes siempre han sido una alegría fundamental para mí, los malos días desaparecen al verlos crecer y hacer sus locuras. También quiero agradecer a mi tía Maru, sin duda eres mi ejemplo a seguir, gracias por todos esos almuerzos de celebración.

Quiero agradecer a cada una de las personas que ha sido parte de mi vida en estos años de universidad, tanto aquellos que siguen a mi lado como aquellos que en algún momento alegraron mis días. Pero quiero hacer una mención honrosa a la Cata, que ha estado conmigo desde el primer minuto de esta carrera, acompañándome en todas, explicándome lo que no entiendo y obvio, escuchando todas mis tonteras, gracias por todo. Y a mi profesor guía, Carlos Navarro, quien me ha ayudado en todo este proceso de titulación, desde la concepción de la idea de esta memoria, hasta en el trabajo en el laboratorio, gracias por darse el tiempo de ayudar a esta alumna tan seria que a veces se ríe con sus chistes fomes.

Finalmente quiero agradecer a mis bebés Danka y Achita, mi fuente de inspiración para todo lo que hago, mis niñas preciosas, que me han demostrado que el amor no necesita palabras y que es incondicional. Gracias a ustedes es que me propongo ser cada día una mejor profesional. Son mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	ii
Abstract	iii
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	2
Objetivos	6
Materiales y métodos	7
Resultados	10
Discusión	13
Conclusión	15
Bibliografía	16
Anexos	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Ejemplo de alineamiento y obtención de zonas comunes	10
Figura 1. Resultados de controles y muestras analizadas	11
Figura 2. Resultados de las muestras analizadas	12

RESUMEN

El Distemper Canino es una enfermedad altamente prevalente, de distribución mundial y que presenta una variada pero alta morbilidad y mortalidad. El agente causal es el Virus Distemper Canino (VDC), el cual posee un amplio rango de hospederos donde es patogénico, entre ellos algunos primates, cetáceos y numerosas familias del orden de los carnívoros. Presenta un alto tropismo por tejido linfoide, neurológico y epitelial, conduciendo a una infección de casi todos los sistemas orgánicos, por lo que los signos clínicos observados son muy variados.

El diagnóstico se realiza en base a la sospecha clínica, la que debe ser confirmada por un método diagnóstico de laboratorio, como la técnica molecular denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa previa Transcripción Reversa (RT-PCR), la cual ha sido utilizada además para caracterizar las cepas virales en base al análisis del gen H. Este análisis ha determinado la presencia de 14 linajes circulantes en el mundo, dos de los cuales se han descrito en Chile, correspondientes a los linajes América-1 y Europa-1/Sudamérica-1.

El objetivo de este trabajo fue implementar un protocolo de RT-PCR múltiple, diseñando partidores *in silico* en base a las secuencias nucleotídicas almacenadas en la base de datos Genbank®, el cual fuera capaz de detectar los dos linajes descritos en Chile de manera diferencial, con el fin de aportar una herramienta diagnóstica de apoyo para estudios epidemiológicos y en un futuro cercano conocer la prevalencia de estos linajes en el país. Los resultados obtenidos sugieren que los partidores diseñados para cada linaje son específicos. Además de indicar que el protocolo establecido fue exitoso, las muestras analizadas corresponderían en su totalidad al linaje América-1, permitiendo en un futuro, seguir analizando muestras positivas al VDC, para conocer la prevalencia real de ambos linajes en el país.

Palabras Clave: VDC, RT-PCR, gen H, América-1, Europa-1/Sudamérica-1.

ABSTRACT

The Canine Distemper is a highly prevalent disease, of worldwide distribution and has a variable but high morbidity and mortality. The causative agent is the Canine Distemper Virus (CDV), which has a wide host range where it is pathogenic, among them some primates, cetaceans and numerous families of the order of carnivores. It presents a high tropism for lymphoid, neurological and epithelial tissue, leading to an infection of almost all organic systems, so the clinical signs observed are very varied.

The diagnosis is made based on clinical suspicion, which must be confirmed by a laboratory diagnostic method, where the molecular technique called Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), which has also been used to characterize viral strains based on the analysis of the H gene, which has determined the presence of 14 circulating lineages in the world, two of them have been described in Chile, corresponding to the America-1 and Europe-1/South America-1 lineages.

The objective of this work was to implement a multiple RT-PCR protocol, designing *in silico* primers based on the nucleotide sequences stored in the Genbank® database, which was capable of detecting the two lineages described in Chile in a differential way, to provide a support diagnostic tool for epidemiological studies and in near future to know the prevalence of these lineages in the country. The results obtained suggest that the primers designed for each lineage are selective against these. In addition to indicating that the established protocol was successful, observing that all the samples analyzed corresponded to the America-1 lineage, allowing in the future to keep analyzing positive samples to CDV, in order to know the prevalence of both lineages in Chile.

KEYWORDS: CDV, RT-PCR, H gene, America-1, Europe-1/South America-1.

INTRODUCCIÓN

El Distemper Canino es una de las enfermedades infecciosas más severas en perros y en muchos otros carnívoros, siendo de carácter multisistémica, muy contagiosa y de distribución mundial. Esta patología presenta variables morbilidad y mortalidad según la especie, esta última pudiendo superar el 50% en perros. El agente etiológico es el Virus Distemper Canino, un *Morbillivirus* que posee un solo tipo antigénico, del cual se describen actualmente 14 linajes a nivel mundial, los que son determinados en base al análisis del gen H, que codifica para una de sus proteínas estructurales, la hemaglutinina.

El virus presenta un alto tropismo por tejido linfoide, neurológico y epitelial, por lo que puede producir una infección multisistémica, incluyendo el sistema digestivo, respiratorio, nervioso central, entre otros. Por ende, se presenta una gran variabilidad de signos clínicos al momento de generarse esta patología, los cuales dependerán del principal sistema afectado. Debido a esta alta cantidad de manifestaciones clínicas, es que se vuelve necesario contar con herramientas diagnósticas de laboratorio, que permitan confirmar la presencia del virus. Actualmente existen diversas técnicas como inmunofluorescencia, ELISA, RT-PCR, entre otras, para cumplir este fin. El RT-PCR ha permitido identificar los diferentes linajes circulantes del virus, con lo que se ha descubierto que en Chile se describen al menos dos linajes circulantes, América-1 y Europa-1/Sudamérica-1.

En base a lo anterior, la presente memoria de título buscó desarrollar una técnica de RT-PCR capaz de detectar en forma diferencial los dos linajes presentes en Chile, utilizando partidores diseñados *in silico*, considerando las secuencias nucleotídicas oficiales conocidas y almacenadas en el Genbank®. De esta manera, se lograría identificar a cuál de los dos linajes pertenece el virus detectado por esta reacción de RT-PCR. Sin embargo, podrían ocurrir dos resultados adicionales: que la muestra sea positiva a ambos linajes o que no reconozca ninguno. Esta última alternativa abriría la opción de que otro linaje del Virus Distemper Canino, aún no determinado, estuviera presente en el país.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Etiología del Virus Distemper Canino

El Virus Distemper Canino (VDC) es el agente etiológico causante del Distemper Canino (DC). Pertenecce al género *Morbillivirus*, de la familia *Paramixoviridae*, orden *Mononegavirales*. Es un virus muy lábil en el medioambiente, susceptible a la mayoría de los desinfectantes. Contiene un genoma RNA no segmentado de polaridad negativa y cuenta con seis genes que codifican para las seis proteínas estructurales del virión: la proteína de membrana M, 2 glicoproteínas (hemaglutinina H y proteína de fusión F), 2 proteínas de transcripción (fosfoproteína P y polimerasa L) y la proteína de nucleocápside N, que envuelve el genoma viral (Martella *et al.*, 2008; MacLachlan y Dubovi, 2011; ICTV, 2017).

Linajes

El gen H, que codifica para la proteína hemaglutinina, ha demostrado el mayor grado de variabilidad genética dentro del género *Morbillivirus*, siendo su secuencia utilizada para caracterizar genéticamente a las cepas virales. Dentro del VDC, la variación aminoacídica de la hemaglutinina alcanza el 10% dentro de las cepas. Esta variabilidad, en conjunto al análisis filogenético de esta proteína H, han permitido establecer los distintos linajes genéticos del VDC circulantes por el mundo (Sarute *et al.*, 2013).

En base a lo mencionado, se han descrito 14 linajes circulantes del VDC: África-1; África-2; América-1; América-2; Asia-1; Asia-2; Asia-3; Asia-4; Europa-1/Sudamérica-1; Europa-2 (Europeo silvestre); Europa-3 (Ártico); Rockborn-like; Sudamérica-2; Sudamérica-3 (Panzera *et al.*, 2012; Sarute *et al.*, 2014; Bi *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2016).

Epidemiología

El VDC posee un amplio rango de hospederos donde es patogénico. Entre ellos, se pueden mencionar numerosas familias del orden Carnivora, tal como *Canidae* (perros y zorros), *Felidae* (felinos salvajes), *Mustelidae* (hurones y visones), además de la superfamilia Pinnipedia, algunos cetáceos y primates japoneses, por lo tanto, es una seria amenaza en la conservación de especies amenazadas alrededor del mundo. La enfermedad es altamente prevalente, de distribución mundial, con una alta morbilidad y mortalidad, la que puede ser

muy variable dentro de los carnívoros (Beineke *et al.*, 2009; Espinal *et al.*, 2014; Beineke *et al.*, 2015).

En Chile, se han reportado oficialmente brotes de distemper canino en zorros y perros, en la región de Coquimbo y en la isla Robinson Crusoe, respectivamente. Este último caso generó una gran preocupación por el potencial riesgo de contagio hacia el lobo de dos pelos de Juan Fernández (*Arctocephalus philippii*), una especie protegida en el país (Moreira y Stutzin, 2005; Jara *et al.*, 2007; Berríos y Pincheira, 2016).

Patogénesis

El VDC es altamente contagioso y es capaz de ingresar a un hospedero susceptible por vía nasal u oral, desde secreciones oronasales u orina de un animal infectado. Dentro del organismo, el VDC se une a células inmunes para iniciar su replicación, como macrófagos alveolares y/o células dendríticas del tracto respiratorio. Estas células infectadas diseminan el virus a través del sistema linfático entre 3 y 6 días luego de la infección, con una subsecuente diseminación viral hacia los tejidos epiteliales, alrededor del día 10 post infección. El virus presenta un alto tropismo por tejido linfoide, neurológico y epitelial, conduciendo a una infección de casi todos los sistemas del organismo (Beineke *et al.*, 2015; Sykes, 2014; Zhao *et al.*, 2015).

La infección más frecuente es la de tejidos respiratorio y/o digestivo y si el animal infectado no posee una respuesta inmune adecuada, el virus puede ingresar al sistema nervioso central (SNC). En menor frecuencia se observan afecciones al sistema urogenital, cardiaco y dermatológico (Beineke *et al.*, 2015).

El VDC se disemina a través de todas las secreciones y excreciones luego de 5 días tras la infección, antes de la aparición de signos clínicos. La diseminación puede continuar por hasta 3 a 4 meses, pero suele durar 1 a 2 semanas post infección (Sykes, 2014).

Signos clínicos

Los signos clínicos del distemper en caninos son muy variados. Su severidad, duración y presentación dependen de la edad del animal, su estado inmune y la virulencia de la cepa, así como de infecciones concomitantes con otros virus y bacterias. En una primera instancia, el animal cursará con linfopenia, fiebre transitoria y una profunda inmunosupresión. Durante la

segunda fase de viremia, se presentarán las diversas manifestaciones clínicas según el tejido afectado. Sin embargo, los primeros signos clínicos se caracterizan por letargia, deshidratación, anorexia y pérdida de peso (Pinotti *et al.*, 2009; Sykes, 2014; Beineke *et al.*, 2015).

Los perros con compromiso respiratorio pueden presentar descarga nasal serosa bilateral, conjuntivitis y tos no productiva. La infección entérica conlleva a la destrucción epitelial del tracto gastrointestinal y con ello, se observa inapetencia, vómitos, diarrea, anormalidades electrolíticas y deshidratación (Sykes, 2014; Beineke *et al.*, 2015).

Los signos neurológicos son progresivos y dependerán de la distribución del virus dentro del sistema nervioso central, pudiendo observarse hiperestesia, mioclonías, convulsiones, nistagmo, ataxia, parálisis o déficit postural, entre otros. De una manera más crónica, pueden observarse manifestaciones dermatológicas y oculares, como dermatitis pustular, hiperqueratosis de las almohadillas plantares y epitelio nasal, uveítis, coriorretinitis y queratoconjuntivitis seca (Pinotti *et al.*, 2009; Sykes, 2014; Beineke *et al.*, 2015).

Vacunación

La vacunación es la principal estrategia para controlar la enfermedad, para lo cual se han desarrollado vacunas con virus vivos atenuados y vacunas recombinantes. La inmunización ha permitido reducir considerablemente la incidencia de distemper canino en la población de perros domésticos, sin embargo, se han observado brotes de la patología en perros vacunados alrededor de todo el mundo. Pese a que no se han determinado las causas de estos sucesos, los brotes podrían explicarse por una atenuación insuficiente del virus de la vacuna, por errores humanos (planes de vacunación incorrectos, administración inadecuada de vacunas, mal almacenamiento o manipulación de éstas), o por variaciones genéticas del virus (cepas capaces de evadir la respuesta inmune inducida por vacunas) (Castilho *et al.*, 2007; Panzera *et al.*, 2012; Sarute *et al.*, 2014; Sykes, 2014).

Diagnóstico

Para establecer el distemper como un diagnóstico, el Médico Veterinario debe basarse en la sospecha clínica, asociada a la manifestación de signos clínicos y antecedentes de riesgo.

Así, cuando se tiene un perro con afección múltiple y susceptible a la enfermedad, el primer prediagnóstico que debiese pensarse es distemper canino (Bosco, 2010; Sykes, 2014).

Sin embargo, resulta necesario establecer un método diagnóstico de laboratorio para confirmar la presencia del virus y excluir otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares (Muñoz, 2013). Así, algunas de las técnicas diagnósticas utilizadas incluyen aislamiento viral, inmunofluorescencia directa, prueba de ELISA para detección de IgM específica contra VDC y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa previa Transcripción Reversa (Pinotti *et al.*, 2009; Sykes, 2014).

Reacción en Cadena de la Polimerasa previa Transcripción Reversa (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR permite el estudio de las variaciones genéticas virales, mediante la caracterización molecular de secuencias del genoma. Gracias a esta técnica, se ha logrado identificar los diferentes linajes que circulan a nivel mundial, mediante el análisis del gen H del virus (Pinotti *et al.*, 2008). De esta manera, Salas (2013) estableció que existen por los menos dos linajes del VDC circulantes en Chile, América-1 y Europa-1/Sudamérica-1.

En este contexto, en la presente Memoria de título se diseñó un protocolo de RT-PCR múltiple -utilizando partidores diseñados *in silico*- capaz de detectar de forma diferencial estos dos linajes presentes en el país, lo que permitiría conocer directamente a cuál de los linajes corresponde la muestra analizada. Con esto, se podrá contar con una herramienta de diagnóstico útil para estudios epidemiológicos, permitiendo así conocer la prevalencia de ambos linajes en el país. Por otra parte, si al utilizar la técnica no se diagnostica ninguno de los dos linajes y se sabe que la muestra analizada es positiva a VDC, se podría inferir que existe otro linaje circulante en el país, aún no descrito.

OBJETIVO GENERAL

Detectar de manera diferencial el linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del Virus Distemper Canino, mediante técnica de RT-PCR múltiple.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar partidores compatibles con la detección diferencial del linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del VDC.
2. Implementar un ensayo de RT-PCR para la detección diferencial del linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del VDC.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente memoria de título se llevó a cabo en los laboratorios de Virología Animal y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Diseño de partidores

En el diseño de los partidores de ambos linajes, se utilizó un árbol filogenético (Anexo 1) del gen H del VDC descrito por Ke y colaboradores (2015), utilizando los números de acceso para las 11 secuencias nucleotídicas oficiales que componen el linaje América-1 y para las 34 secuencias nucleotídicas oficiales del linaje Europa-1/Sudamérica-1, almacenadas en la base de datos de *Genbank*® (Anexo 2).

Posterior a la obtención de las secuencias, se ingresaron al programa *online* Clustal Ω , con el fin de obtener las zonas nucleotídicas conservadas que fueron utilizadas en el diseño de los partidores para cada linaje. Este diseño se realizó utilizando el programa *online* de acceso gratuito *Primer-BLAST* de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), considerando ciertas características que los partidores debían poseer, las cuales fueron: poseer un porcentaje de bases citosina y guanina cercano al 50%; que el fragmento obtenido por cada par de partidores fuera de distinto tamaño; que la diferencia de la temperatura de fusión para cada par de partidores no superara los 3°C; y que esta temperatura de fusión fuera similar para ambos pares de partidores.

Luego de obtenidos los partidores ideales para cada linaje, sus secuencias se compararon con las otras secuencias componentes de cada linaje del gen H del VDC. Además, sus secuencias se ingresaron al programa *online* BLAST, en donde se pudo determinar la especificidad de cada par de partidores. Finalmente, sus secuencias se mandaron a sintetizar a la empresa comercial Fermelo Biotec.

Muestras

Para el análisis se utilizaron 20 muestras de RNA viral de aislados de pacientes nacionales, positivos al gen N del VDC mediante técnica de RT-PCR, de los cuales se desconocía el linaje al que pertenecían, las cuales se encontraban almacenadas a -20°C en los laboratorios

de Virología Animal y Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Como control positivo para la reacción de RT-PCR, se utilizó RNA extraído desde dos muestras positivas a la detección del gen H del VDC mediante RT-PCR (Salas, 2013) y posteriormente positivas a RT-PCR para la detección del gen N (Muñoz, 2013). Una de estas muestras fue secuenciada e identificada dentro del linaje América-1, mientras que la otra fue secuenciada e identificada dentro del linaje Europa-1/Sudamérica-1 (Salas, 2013).

Como control para la detección múltiple de ambos partidores, se utilizó una mezcla de RNA de los controles positivos para los linajes América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 mencionados anteriormente.

Como control negativo, se utilizó RNA extraído desde sangre con anticoagulante (EDTA) de dos perros sin antecedentes de riesgo y signos clínicos de la enfermedad, uno sin vacunación y el otro con calendario de vacunación al día, negativos a RT-PCR sobre el gen N. Como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas.

Implementación de la técnica RT-PCR

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

- a. **Mezcla de la reacción.** Se utilizó 25 μ L del kit comercial “SuperScript one step RT-PCR with Platinum taq DNA Polymerase” (Taq DNA polimerasa, $MgCl_2$ y desoxirribonucleótidos trifosfato), 5 μ L del RNA molde y 5 μ L de cada partidor específico (0,1 – 0,2 μ M), obteniendo un volumen final de 50 μ L.
- b. **Retrotranscripción.** Luego de introducida la mezcla en el termociclador, se realizó la etapa de retrotranscripción del RNA, con el fin de obtener el DNA complementario que sería utilizado en la etapa de PCR. Esta se realizó según instrucciones del fabricante, con una primera etapa a 45°C por 30 minutos para la actuación de la transcriptasa reversa y luego una etapa a 94°C por 2 minutos para la desnaturalización de la enzima.
- c. **Amplificación del DNA.** La etapa de PCR contempla una etapa de desnaturalización del DNA, seguido de una etapa de alineamiento de los partidores y una etapa final de elongación para terminar un ciclo. La fase de desnaturalización del DNA se realizó a 94°C

por 30 segundos. Durante la fase de alineamiento se utilizó una temperatura determinada según la temperatura de fusión de ambos pares de partidores menos 5°C. 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.

Visualización del producto amplificado

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X y comparación de recorrido frente a un estándar de tamaño molecular (AccuRuler 100bp Plus DNA Ladder, Maestrogen®). La electroforesis se llevó a cabo a 90 volts por 45 minutos y luego, el gel se incubó con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 30 minutos, para visualizar las bandas de DNA en un transiluminador de luz ultravioleta y posteriormente ser fotografiado para tener registro de los resultados.

Medidas de Bioseguridad

Dentro de las medidas de bioseguridad establecidas para los laboratorios de Microbiología y Virología Animal se contempló el uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal cerrado y guantes de látex. En el proceso de visualización del producto amplificado, debido al uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV, se utilizaron gafas con filtro UV y una placa de acrílico ubicada entre el equipo y la persona que visualizó el gel. Posteriormente la eliminación del gel incubado en bromuro de etidio contempló su incineración.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: *Diseñar partidores compatibles con la detección diferencial del linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del VDC.*

El ingreso de las secuencias nucleotídicas definidas por los números de acceso (Anexo 2) en el programa Clustal Ω permitió obtener zonas comunes (Cuadro 1; zonas con asterisco) tanto para el linaje América-1, como para el linaje Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del VDC. Así, se construyó una secuencia consenso para cada linaje en que se distinguieran las zonas diferentes y las zonas comunes (Anexo 3 y 4).

Z35493.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACTAATTACTGTGAGTCAATTGGGATCAGA	480
AF378705.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACTAATTACTGTGAGTCAATTGGGATCAGA	480
DQ903854.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACTAATTACTGTGAGTCAATTGGGATCAGA	480
HQ403645.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
GQ332531.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
HM046486.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
HM063009.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
KM926612.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
DQ778941.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
AF259552.1	AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACTAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA	480
AY548109.1	AACCCACCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACTAATTACTGTGATACAATTGGGATCAGA	480

Cuadro 1: Ejemplo de alineamiento según Clustal Ω y obtención de zonas comunes

Posterior a esto, la secuencia consenso obtenida para el linaje Europa-1/Sudamérica-1 fue comparada con las secuencias del linaje Sudamérica-2 por su alta similitud, mediante alineación de secuencias en el programa Clustal Ω . Así, se obtuvo una nueva secuencia para el linaje Europa-1/Sudamérica-1, en que además, se destacaron de distinta manera las zonas que presentaban diferencias entre estos dos linajes (Anexo 5).

En base a esto, en el caso del diseño de partidores para el linaje Europa-1/Sudamérica-1, las zonas comunes que fueron ingresadas al programa *online* Primer-BLAST de NCBI fueron aquellas que presentaran más 25 nucleótidos en común y además un nucleótido diferente con el linaje Sudamérica-2. En tanto, las zonas comunes ingresadas en el diseño de partidores para el linaje América-1, fueron aquellas que permitieran amplificar un fragmento de distinto tamaño al originado por los partidores del linaje Europa-1/Audamérica-1. En base a esto, y de acuerdo con los criterios señalados en Materiales y Métodos, se logró obtener los partidores a utilizar (Anexos 6 y 7).

Luego, las secuencias obtenidas fueron comparadas con las otras secuencias componentes de cada linaje del gen H del VDC, además de ser ingresadas al programa online BLAST. Esto determinó que las secuencias para cada par de partidores son específicas para el linaje para el que fueron diseñadas y posteriormente se mandaron a sintetizar.

Así, las secuencias nucleotídicas a sintetizar respecto del linaje América-1 y que definen un amplicón de 478 pb correspondieron a: P₁: 5'– CTATTGCATCGGCAGCAAATC –3' y P₂: 5'– CCCAGTGTCACTACTAGAATACC –3'. Mientras que las secuencias a sintetizar en relación con el linaje Europa-1/Sudamérica-1 y que originan un amplicón de 940 pb fueron: P₃: 5'– ACCTTGCTTGCTATCACTGG –3' y P₄: 5'– GCACCATCCAGGTTGCTATT –3'

Objetivo específico 2: Implementar un ensayo de RT-PCR para la detección diferencial del linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1 del gen H del VDC.

En la figura 1 es posible observar las bandas originadas en la reacción de RT-PCR de los controles, en donde se observaron bandas nítidas en el caso de los controles positivos para cada uno de los linajes. No se observó presencia de bandas en los controles negativos ni en el control de reactivos. Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de entre 100 y 3000 pb.

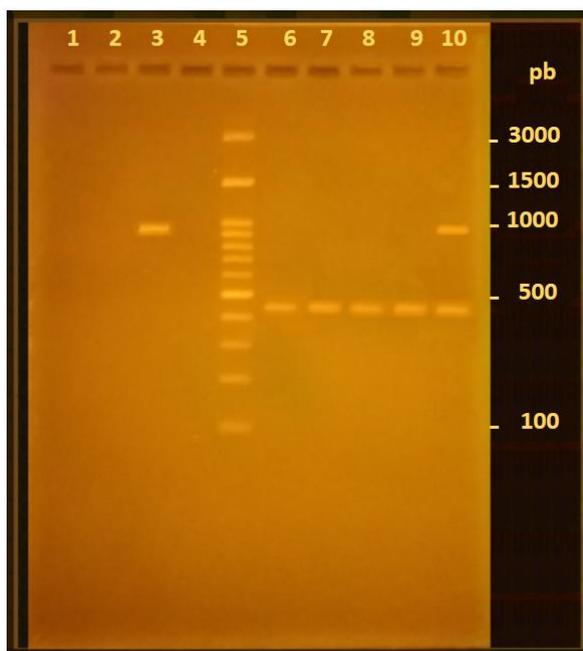


Figura 1: Resultados de controles y muestras analizadas en electroforesis en gel agarosa 2%. Muestras positivas según protocolo de detección del linaje América-1 y Europa-1/Sudamérica-1.

Carril	Contenido
1	Control (-)
2	Control de reactivos
3	Control (+) 940 pb
4	Control (-)
5	MTM
6	Control (+) 478 pb
7	Muestra 1
8	Muestra 2
9	Muestra 3
10	Mezcla controles (+)

Control (+) 478 pb: VDC linaje América-1

Control (+) 940 pb: VDC linaje Europa-1/Sudamérica-1

MTM: Maestrogen® (100-3000pb)

La totalidad de las muestras analizadas reaccionaron sólo con el par de partidores diseñado para el linaje América-1 (figuras 1 y 2).

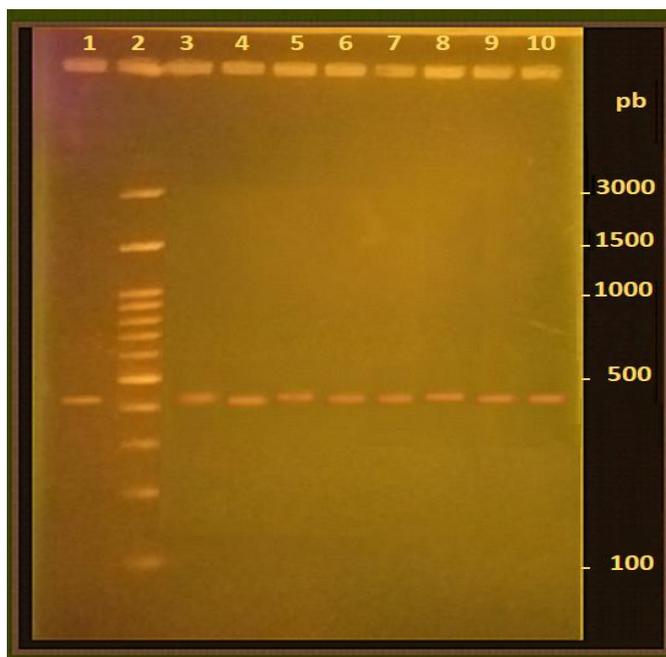


Figura 2: Resultados de las muestras analizadas en electroforesis en gel agarosa 2%. Muestras positivas según protocolo de detección del linaje América-1.

Carril	Contenido
1	Control (+) 478 pb
2	MTM
3	Control (+) 478 pb
4	Muestra 4
5	Muestra 5
6	Muestra 8
7	Muestra 12
8	Muestra 13
9	Muestra 14
10	Muestra 20

Control (+) 478 pb: CDV linaje América-1
 MTM: Maestrogen® (100-3000pb)

DISCUSIÓN

El DC sigue siendo un problema habitual, no solo en las clínicas veterinarias, sino que también en el área de conservación de especies. Es una enfermedad altamente prevalente, muy contagiosa y con muchos hospederos susceptibles, y pese a que existen vacunas para proteger a los animales de la enfermedad, se siguen observando brotes de DC en perros vacunados. Cabe mencionar que las vacunas utilizadas en Chile son preparadas con cepas virales pertenecientes al linaje América-1, uno de los dos linajes descritos en el país. Según la literatura consultada, no existen estudios epidemiológicos sobre la prevalencia del linaje Europa-1/Sudamérica-1 en Chile, lo que sería interesante de conocer, puesto que podría ser una hipótesis interesante que los casos de perros vacunados enfermos con DC sean por una infección con una cepa viral perteneciente a un linaje diferente al de la vacuna, como el linaje Europa-1/Sudamérica-1, por ejemplo.

En este trabajo se diseñaron partidores selectivos para cada linaje, utilizando la técnica de RT-PCR múltiple. Sin embargo, existen muchas similitudes entre algunos linajes, como lo es el caso de los linajes Europa-1/Sudamérica-1 y Sudamérica-2. Durante el diseño de los partidores se consideró una etapa de comparación de los partidores obtenidos con otros linajes, etapa que se realizó de manera manual, por lo que podrían existir errores humanos durante este diseño, además de ser una comparación teórica. Por ello, sería importante obtener virus de otros linajes del VDC, como por ejemplo, del linaje Sudamérica-2, con el fin de comprobar la especificidad práctica y no sólo teórica de los partidores para cada linaje.

Cabe mencionar que la fase de alineamiento de partidores se realizó a una temperatura única, pese a que estaba contemplado determinar la temperatura óptima de alineamiento mediante un termociclador de gradiente. Sin embargo, los resultados observados fueron óptimos, por lo que se podría considerar que los parámetros utilizados durante la técnica fueron adecuados para este trabajo.

Como resultado del análisis de las muestras, se observó que las 20 muestras evaluadas fueron positivas para el linaje América-1. Estas se encontraban congeladas y datan del año 2011, por lo que sería interesante seguir analizando otras muestras más actuales, para conocer con mayor certeza la prevalencia del linaje Europa-1/Sudamérica-1 en el país.

La muestra utilizada en este estudio como control positivo para el linaje Europa-1/Sudamérica-1 corresponde a una muestra de sangre periférica obtenida de un perro con estadio sintomatológico con sospecha de DC, que resultó positiva para la prueba de ELISA específico para VDC (IgM positivo). Esta fue sometida a RT-PCR para detección del gen H del VDC, fue secuenciada, alineada y segregada dentro del linaje Europa-1/Sudamérica-1, según el estudio de Salas (2013). Los datos del paciente del que fue obtenida la muestra corresponden a una perra mestiza de aproximadamente 1 año, la cual contaba con vacunación contra DC y presentaba un nivel de signología neurológica (+).

Resultaría necesario recopilar más antecedentes sobre este paciente, como por ejemplo, conocer sobre viajes que haya realizado, ya que podría pensarse que el paciente contrajo la infección con la cepa viral del linaje Europa-1/Sudamérica-1 fuera del país y haberlo ingresado de manera accidental. En este contexto, también resultaría interesante conocer los manejos rutinarios que se realizaron, por ejemplo, con el manejo de las secreciones. Así, se podría pensar que si se mantuvieron buenos cuidados, esta cepa viral pudo no diseminarse más allá y el hallazgo de este linaje en el país fue accidental.

En la actualidad, la técnica de RT-PCR para el gen H no se considera la mejor alternativa diagnóstica para la enfermedad, por la alta heterogeneidad genética que presenta. Sin embargo, la identificación de los diferentes linajes debe ser realizado en base al análisis del gen H, siendo lo óptimo que la muestra se haya diagnosticado previamente como positiva a VDC. Pese a esto, el presente estudio determinó que los partidores diseñados para cada linaje son específicos, por lo que podrían sugerirse como una herramienta útil para estudios epidemiológicos.

Finalmente, sería interesante conocer de la existencia de algún árbol filogenético descrito recientemente, y junto con ese respaldo de literatura, poder establecer zonas de identidad nucleotídicas actualizadas. Desafortunadamente, en Chile no han sido descritos otros linajes para contar con las muestras necesarias para realizar lo expuesto anteriormente.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos tras el protocolo de RT-PCR establecido, se pudo observar que los partidores diseñados fueron capaces de amplificar específicamente el linaje para los que fueron diseñados.
- El análisis de las muestras indicó que todas fueron positivas para el linaje América-1, por lo que se sugiere que es el linaje predominante en el país.
- Debido al bajo número de virus analizados, resulta necesario realizar estudios epidemiológicos con un mayor número de muestras virales para conocer la prevalencia de los distintos linajes presentes en Chile en la actualidad. Este trabajo ha dado como resultado una técnica capaz de apoyar estos estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127:1-18.

BEINEKE, A.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P. 2015. Cross-species transmission of canine distemper virus – an update. *One Health.* 1:49-59.

BERRÍOS, P.; PINCHEIRA, B. 2016. Distemper canino y su impacto en la fauna silvestre. *Científica.* 13(2):137-148.

BI, Z.; WANG, Y.; WANG, X.; XIA, X. 2015. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in domestic dogs in Nanning, China. *Arch. Virol.* 160(2):523-527.

BOSCO, E. 2010. Distemper canino. **In:** Retamal, P.; Ábalos, P.; Fredes, F. *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos.* Editorial Universitaria. Chile. pp. 152-156.

CASTILHO, J.; BRANDÃO, P.; CARNIELI, P.; OLIVEIRA, R.; MACEDO, C.; PEIXOTO, Z.; CARRIERI, M.; KOTAIT, I. 2007. Molecular analysis of the N gene of canine Distemper virus in dogs in Brazil. *Arq. Bras. de Med. Vet. Zootec.* 59(3): 654-659.

ESPINAL, M.; DÍAZ, F.; RUIZ-SAENZ, J. 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet. Microbiol.* 172:168-176.

FISCHER, C.; GRÄF, T.; IKUTA, N.; LEHMANN, F.; PASSOS, D.; MAKIEJCZUK, A.; SILVEIRA, M.; FONSECA, A.; CANAL, C.; LUNGE, V. 2016. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. *Infect Genet Evol.* 41:135-141.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2017. *Virus Taxonomy: 2017 Release.* [en línea] <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> [consulta: 07 - 07 - 2018]

JARA, C.; MATUS, P.; MOREIRA, R. 2007. Distemper canino en Isla Robinson Crusoe (Archipiélago Juan Fernández, V Región): antecedentes de un brote epidémico, 2007. *Boletín Veterinario Oficial N°8.* Servicio Agrícola Ganadero, División de Protección Pecuaria, Chile. pp. 1-19.

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

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E. 2011. Paramyxoviridae. **In:** Fenner's *Veterinary Virology.* 4ª edición. Academic Press. Londres, Inglaterra. pp. 299-325.

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

MOREIRA, R.; STUTZIN, M. 2005. Estudio de la Mortalidad de Zorros en la IV Región. *Boletín Veterinario Oficial N°3*. Servicio Agrícola Ganadero, División de Protección Pecuaria, Chile. pp. 1-8.

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, Fac. Medicina Veterinaria. 32 p.

PANZERA, Y.; GALLO, M.; SARUTE, N.; GUASCO, S.; CARDEILLAC, A.; BONILLA, B.; HERNÁNDEZ, M.; FRANCIA, L.; BEDÓ, G.; LA TORRE, J.; PÉREZ, R. 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of *canine distemper virus* in South America. *Virus Res.* 163: 401-404.

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

SALAS, V. 2013. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en perros infectados naturalmente en Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 23 p.

SARUTE, N.; GALLO, M.; PÉREZ, R.; LA TORRE, J.; HERNÁNDEZ, M.; FRANCIA, L.; PANZERA, Y. 2013. The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. *PLOS One* 8(5): 1-6.

SARUTE, N.; PÉREZ, R.; ALDAZ, J.; ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; 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(3):474-478.

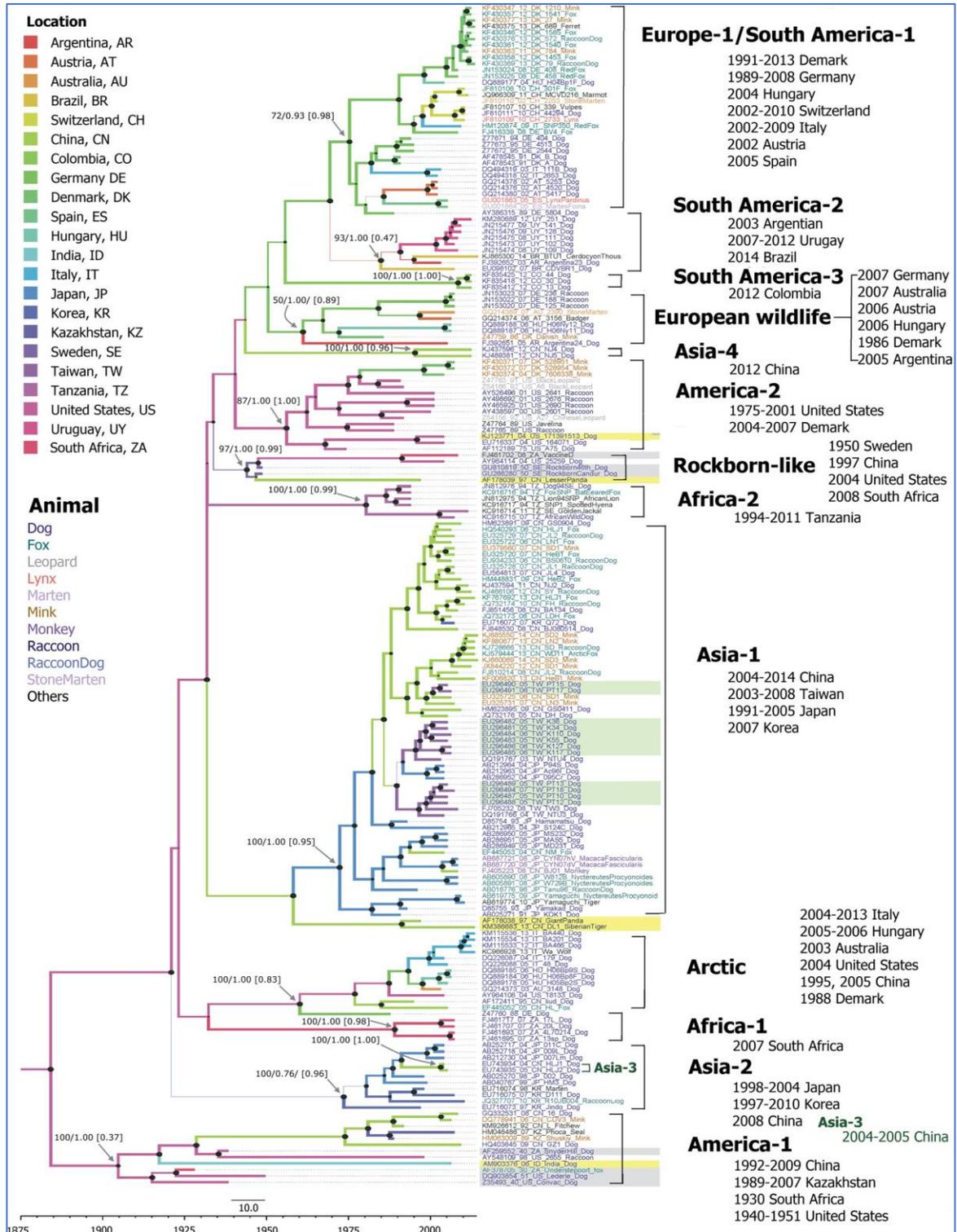
SYKES, J. 2014. Canine Distemper Virus Infection. **In:** *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Health Sciences. Londres, Inglaterra. pp. 152-165.

ZHAO, J.; SHI, N.; SUN, Y.; MARTELLA, V.; NIKOLIN, V.; ZHU, C.; ZHANG, H.; HU, B.; BAI, X.; YAN, X. 2015. Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected racoon dogs, foxes, and minks. *Antivir. Res.* 122:1-11.

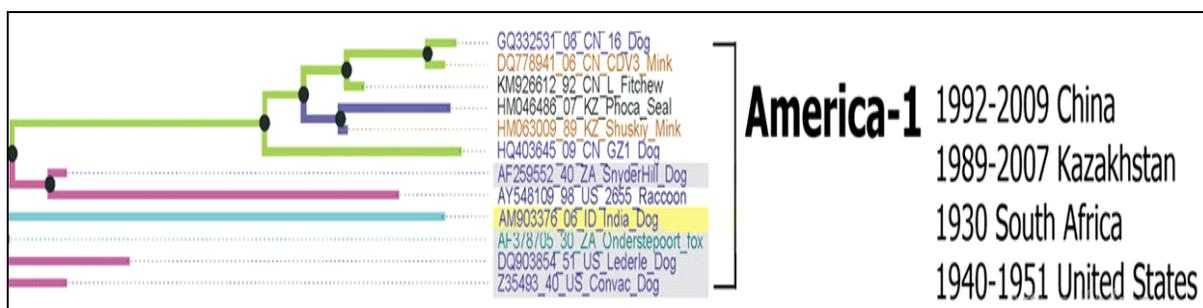
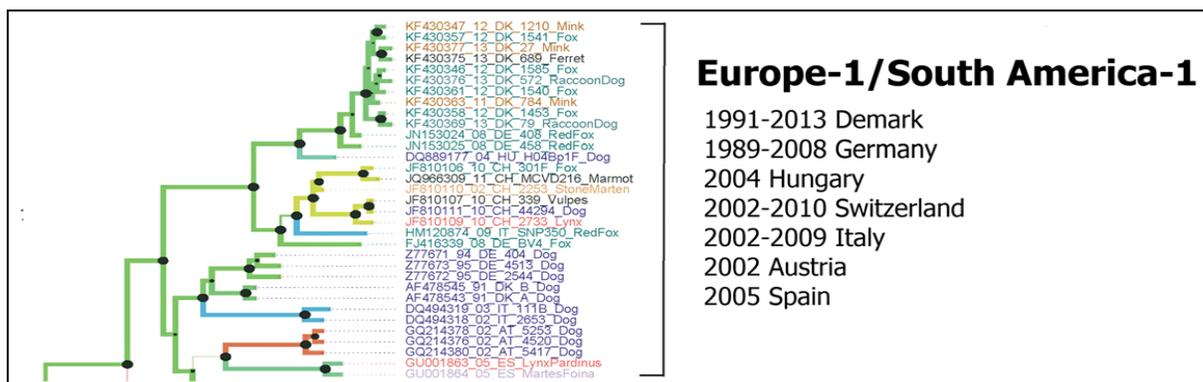
ANEXOS

Anexo 1.

a) Árbol filogenético (Ke *et al.*, 2015)



b) Amplificación de la zona de estudio (Ke *et al.*, 2015)



Anexo 2.

Números de acceso utilizados en el diseño de los partidores

a) Linaje América-1

Cepa viral	Número de acceso Genbak
AF378705_30_ZA_Onderstepoort_Fox	AF378705
Z35493_40_US_Convac_Dog	Z35493
AF259552_40_US_SnyderHill_Dog	AF259552
DQ903854_51_US_Lederle_Dog	DQ903854
AY548109_98_US_2655_Raccoon	AY548109
HM046486_07_KZ_Phoca_Seal	HM046486
HM063009_89_KZ_Shuskiy_Mink	HM063009
KM926612_92_CN_L_Fitchew	KM926612
DQ778941_06_CN_CDV3_Mink	DQ778941
GQ332531_08_CN_16_Dog	GQ332531
HQ403645_09_CN_GZ1_Dog	HQ403645

b) Linaje Europa-1/Sudamérica-1

Cepa viral	Número de acceso Genbank
AY386315_89_DE_5804_Dog	AY386315
Z77671_94_DE_404_Dog	Z77671
Z77672_95_DE_2544_Dog	Z77672
Z77673_95_DE_4513_Dog	Z77673
JN153024_08_DE_408_RedFox	JN153024
JN153025_08_DE_458_RedFox	JN153025
FJ416339_08_DE_BV4_Fox	FJ416339
AF478543_91_DK_A_Dog	AF478543
AF478545_91_DK_B_Dog	AF478545
KF430363_11_DK_784_Mink	KF430363
KF430358_12_DK_1453_Fox	KF430358
KF430346_12_DK_1585_Fox	KF430346
KF430361_12_DK_1540_Fox	KF430361
KF430357_12_DK_1541_Fox	KF430357
KF430347_12_DK_1210_Mink	KF430347
KF430369_13_DK_79_RaccoonDog	KF430369
KF430376_13_DK_572_RaccoonDog	KF430376
KF430377_13_DK_27_Mink	KF430377
KF430375_13_DK_689_Ferret	KF430375
GQ214376_02_AT_4520_Dog	GQ214376
GQ214378_02_AT_5253_Dog	GQ214378
GQ214380_02_AT_5417_Dog	GQ214380
DQ494318_02_IT_2653_Dog	DQ494318
DQ494319_03_IT_111B_Dog	DQ494319
HM120874_09_IT_SNP350_RedFox	HM120874
DQ889177_04_HU_H04Bp1F_Dog	DQ889177
JF810110_02_CH_2253_StoneMarten	JF810110
GU001863_05_ES_LynxPardinus	GU001863
GU001864_05_ES_MartesFoina	GU001864
JF810107_10_CH_339_Vulpes	JF810107
JF810111_10_CH_44294_Dog	JF810111
JF810109_10_CH_2733_Lynx	JF810109
JQ966309_11_CH_MCVD216_Marmot	JQ966309
JF810106_10_CH_301F_Fox	JF810106

Anexo 3.

Secuencia consenso obtenida para el linaje América-1

> América-1

```
ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTACAAGGACAATGCAAGAGCCAATTC
ATCCAAGCTGTCCCAGTGACAGAAGAGCATGGGGGCAGGAGACCACCTTATTTGTTGT
TTGTCCTTCTCATCCATTGTTGGAAATCCTGGCCCTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGA
TTTCACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGA
GAAATCAGAGGCCGTACATCATCAAGTCATAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAGATTA
TTGGGGATGAGATTGGGTACGGTTGCCACAAAAGCTAAACGAGATCAAACAATTTATC
CTTCAAAGACAAATTTCTTCAATCCGAACAGAGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTG
GTGCATTAACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTTACTAATTACTGTGAGTCAATTG
GGATCAGAAAAAGCTATTGCATCGGCAGCAAATCCATCCTTTTATCAGCCCTCCCTGGG
GGCAGGAGTGACATATCCCACCATACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAGTAGGCAA
AGTTTTCCCCCTATCAGTCTCGTTATCCATGTCTTTGATCTCAAGAACCTCAGTGATAA
TCAATATGCTGACCGCTACCTCAGACGGCGTGTATGGCAAACTTACTTTGCTAGTGCCT
GATGATATAGAACGGGAGTTTCGACACTCAAGAGATTTCGAGTCTTTGAATAGGGTTCAT
TAAAAGGTGGCTGAATGACATGCCATTA CTCAAACAACCAACTATATGGTCTCCCGG
AGAATCCAAAGCCAAGGTATGTACCATAGCAGTGGGTGAGTTGACACTGGCTTCCTTG
TGTGTAGAAGAGAGCACTGTATTATTATACCATGACAGCAGGGGTTCAAGGTGGTAT
TCTAGTAGTGACACTGGGGATATTTGGGGCAACACCTATGGATCATGTTGAGGAAGTGA
TACCTGTCGCTCACCCATCAATGGAGAAAATACATATAACAACCACCGTGGTTTTATA
AAAGATTCAATTGCAACCTGGATGGTGCCTGCCCTGGCCTCTGAGAAACAAGAACA
AAAGGTGTCTGGAGTCAGCTTGTCAAAGAAAACCTTACCCCATGTGCAACCAAACGT
CATGGGAACCTTTCGGAGGAGGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTA
GATGCAAGTGTGACCTTCAACTTAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAA
TGGAGATGGTATGGTTTATTATGAAAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTC
CTCCATAAAACGGAACAATCCTTGGATTGATAAACAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTC
ACTGTGATACCCCAAGTATTAACATTTGCGCCAGGGAATCATGTGGAATTTGTTATTT
ACCTATTCAAACATCTCAAATTTATAGATAGAGATGTCCTCATCGAGTCCAATGTAGTGG
TGTTGCCTACACAGAGTTTTAGATATGTCATAGCAACGTACGATATATCACGAAATGAT
CATGCGATTGTTTATTATGTTTATGACCCAATCCGGACGATTTCTTATACGCACCCATT
TAGACTAACTACCAAGGGTAGACCTGATTTCCTAAGGATTGAATGTTTTGTGTGGGATG
ACAATTTGTGGTGTCAACCAATTTTACAGATTCGAGGCTGACATCGCCAACCTCTACAACC
AGTGTGAGAATTTAGTCCGTATAAGATTCTCATGTAACCGTCAAATCCCTGA
```

- Zonas diferentes entre las secuencias
- Zonas comunes entre las secuencias

Anexo 4.

Secuencia consenso obtenida para el linaje Europa-1/Sudamérica-1

>Europa-1/Sudamérica-1

```
ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTATAAGGATAATGCAAGAGCTAATTC
ATCCAAGCTGTCCTTAGTGACAGAAGAGCAAGGGGGCAGGAGACCACCTATTTGCTGT
TTGTCCTTCTCATCCTTCTGGTTGGAATCATGACCTTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGA
TTTCAACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGA
GAAATCAGAGGCCGTACATCACCAGATCATAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAATTA
TTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACAAAACTAAACGAGATCAAACAATTTATC
CTTCAAAGACAAACTTCTTCAATCCGAACAGGGAATTGACTTCCGCGATCTCCACTG
GTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAAATTTACTAATTACTGCGATACAGTTG
GGATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTTTTATCAGCACTCTCAGGA
GGCAGAGGTGACATATTTCCCAACATACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAAGTGGGCAG
AGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTTGATCTCAAAAACATCAGAGATAA
CCAATATGCTAACTGCTATCTCAGACGGAGTGTATGGTAAACCTATTTGCTAGTGCCT
GATTACATTGAAGGGGAGTTTCGACACGCAAAAGATTTCGAGTCTTTGAGATAGGGTTCAT
CAAACGGTGGCTGAATAACATGCCATTACTCCAGACAACCAACTACATGGTCTCCTCCGG
AGAATTCCAAAGCCAAGGTATGTAATAAGTAGTAGTGGGCGAGTTGACACTGGCTTCCCTG
TGTGTAGATGAGACCCGTATTGTTATATCATGACAGCAATGGTTCACAAGATGGTAT
TCTAGTAGTGACGCTGGGGATATTTGGGCAACACCTATGGATCAAGTTGAAGAAAGTGA
TACCTGTCGCTCACCCATCAGTAGAAAAAATACATATAACAAATCACCGTGGGTTCCATA
AAAAATTCAATAGCAACCTGGATGGTGCCTGCAATGGTCTCTGAGAAACAAGAGGAACA
AAAAAATTGTCTGGAGTCCGGCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCTATGTGCAACCAAACGT
CATGGGAACCTTTTGGAGGGGGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTA
GATCCAAGCATTGACCCTCAACTTAACGTATCATTTACATACGGTCCAGTTATACTGAA
TGGAGACGGTATGGATTATTATGAGAGCCACTTTTGGACTCTGGGTGGCTCACCATTC
CTCCCAAGAACCGAACAGTCCCTTGGATTGATAAACAAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTC
ACTGTAATCCCCATGTGTTAACATTTGCGCCAGGGAATCAAGTGGAAATTGTTATTT
ACCTATTCAAACATCCAGATTATGGATAAAGATGTCCTGACTGAGTCCAATTTAGTGG
TGTTGCCACACAGAATTTTAGATATGTCATAGCAACATATGATATATCTCGGGGCGAT
CATGCAATTGTTTATATATGTTTATGACCCAATCCGGACGATTTCTTATACGTACCCATT
TAGACTAACTACCAAGGGTAGACCTGATTTCCCTAAGAATTGAATGTTTTGTGTGGGATG
ACGATTTGTGGTGTACCAATTTTACCAGATTTGAGGCTGACATCACCAACTCTACAATC
AGTGTTGAGAATTTAGTCCATATAAGATTCTCATGTAACCGTTCAAACCTTGA
```

- Zonas diferentes entre las secuencias
- Zonas comunes entre las secuencias

Anexo 5.

Secuencia consenso obtenida para el linaje Europa-1/Sudamérica-1 con diferencias respecto a linaje Sudamérica-2.

> Europa-1/Sudamérica-1 dif

```
ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTATAAGGATAATGCAAGAGCTAATTC
ATCCAAGCTGTCCTTAGTGACAGAAGAGCAAGGGGGCAGGAGACCACCTATTTGCTGT
TTGTCCTTCTCATCCTTCTGGTTGGAATCATGACCTTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGA
TTTACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGA
GAAATCAGAGAGCCGTAATCACCAGATCATAGATGTCTTGACACCCTCTTCAAATTA
TTGGAGATGAGGTTGGGTTACGGTTGCCACAAAACTAAACGAGATCAAACAATTTATC
CTTCAAAGACAACTTCTTCAATCCGAACAGGGAATTGACTTCCGCGATCTCCACTG
GTGCATTAATCCACCTAGTAAGATCAAGGTGAATTTTACTAATTACTGCGATACAGTTG
GGATCAGAAAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTTTTATCAGCACTCTCAGGA
GGCAGAGGTGACATATTTCCACCCATACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAAGTGGGCAG
AGTTTTCCCCCTATCAGTATCATTGTCCATGTCTTTGATCTCAAACAACATCAGAGATAA
CCAATATGCTAACTGCTATCTCAGACGGAGTGTATGGTAAAACCTATTTGCTAGTGCCT
GATTACATTGAAGGGGAGTTTCGACACGCAAAAGATTTCGAGTCTTTGAGATAGGGTTCAT
CAAACGGTGGCTGAATAACATGCCATTACTCCAGACAACCAACTACATGGTCCCTCCCGG
AGAATTCCAAAGCCAAGGTATGTAATAAGTAGTAGTGGGCGAGTTGACACTGGCTTCCTTG
TGTGTAGATGAGAGCACCCTATTGTTATATCATGACAGCAATGGTTCACAAGATGGTAT
TCTAGTAGTGACGCTGGGGATATTTGGGCAACACCTATGGATCAAGTTGAAGAAGTGA
TACCTGTCGCTCACCCATCAGTAGAAAATAACATATAACAATCACCGTGGGTTTCATA
AAAAATTCAATAGCAACCTGGATGGTGCCTGCATTGGTCTCTGAGAAACAAGAGGAACA
AAAAAATTGTCTGGAGTCCGGCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCTATGTGCAACCAAACGT
CATGGGAACCTTTGGAGGGGGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTA
GATCCAAGCATTGACCCTCAACTTAACGTATCATTTACATACGGTCCAGTTATACTGAA
TGGAGACGGTATGGATTATTATGAGAGCCACTTTTGGACTCTGGGTGGCTCACCATTC
CTCCCAAGAACCGGAACAGTCCCTTGGATTGATAAACAAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTC
ACTGTAATCCCCATGTGTTAACATTTGCGCCCAGGGAATCAAGTGGAAATTGTTATTT
ACCTATTTCAAACATCCAGATTATGGATAAAGATGTCCTGACTGAGTCCAATTTAGTGG
TGTTGCCACACAGAATTTTAGATATGTCATAGCAACATATGATATATCTCGGGGCGAT
CATGCAATTGTTTATATATGTTTATGACCCAATCCGGACGATTTCTTATACGTACCCATT
TAGACTAACTACCAAGGTAGACCTGATTTCCCTAAGAATTGAATGTTTTGTGTGGGATG
ACGATTTGTGGTGTACCAATTTTACCGATTTGAGGCTGACATCACCAACTCTACAATC
AGTGTTGAGAATTTAGTCCATATAAGATTCTCATGTAACCGTTCAAACCTTGA
```

- Zonas diferentes entre las secuencias
- Zonas comunes entre las secuencias
- Zonas diferentes con linaje Sudamérica-2

Anexo 6.

Partidores obtenidos para linaje América-1 según programa *online* Primer-BLAST de NCBI.

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CTATTGCATCGGCAGCAAATC	Plus	21	485	505	58.34	47.62
Reverse primer	CCCAGTGTCACTACTAGAATACC	Minus	23	962	940	57.48	47.83
Product length	478						

Anexo 7.

Partidores obtenidos para linaje Europa-1/Sudamérica-1 según programa *online* Primer-BLAST de NCBI.

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	ACCTTGCTTGCTATCACTGG	Plus	20	151	170	57.88	50.00
Reverse primer	GCACCATCCAGGTTGCTATT	Minus	20	1090	1071	58.23	50.00
Product length	940						