

Análisis filodinámico del virus Distemper Canino



Bch. Eddie Fuques

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Dra. Yanina Panzera

Co-orientador: MSc. Gonzalo Tomás

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias (UdelaR)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yanina Panzera por darme la oportunidad de trabajar en su línea de investigación, por el apoyo y la confianza desde el primer momento.

Al MSc. Gonzalo Tomás por su enorme disposición y los conocimientos brindados.

A los integrantes de los centros de investigación de Perú y Ecuador, por facilitarnos las muestras para llevar a cabo este trabajo.

A Andrés Milano por su colaboración en el área informática.

A mi familia, sin la cual nada de esto hubiese sido posible.

A mis amigos, los que estuvieron y los que están, los de lejos y los de cerca.

A todos los integrantes de la Sección Genética Evolutiva, por hacerme sentir parte de este gran grupo de investigadores.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 4 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 2.1 EL VIRUS DISTEMPER CANINO | 6 |
| 2.2 GENOMA VIRAL Y ESTRUCTURA DEL VIRIÓN | 6 |
| 2.3 CICLO VIRAL..... | 8 |
| 2.4 PATOGÉNESIS Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD | 10 |
| 2.4.1 PATOGÉNESIS | 10 |
| 2.4.1 CONTROL DE LA ENFERMEDAD | 10 |
| 2.5 DIAGNÓSTICO..... | 11 |
| 2.5.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO | 11 |
| 2.5.2 ENSAYOS SEROLÓGICOS | 11 |
| 2.5.3 AISLAMIENTO VIRAL..... | 12 |
| 2.5.4 TÉCNICAS MOLECULARES | 12 |
| 2.6 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA..... | 13 |
| 2.7 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN SUDAMÉRICA..... | 14 |
| 2.8 HISTORIA EVOLUTIVA DE CDV | 14 |
| 3. OBJETIVOS..... | 17 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 17 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 4.MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| 4.1 ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN..... | 18 |
| 4.2 MUESTRAS ANALIZADAS | 18 |
| 4.3 EXTRACCIÓN DE ARN..... | 20 |
| 4.4 RETROTRANSCRIPCIÓN..... | 20 |
| 4.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO FINAL | 20 |
| 4.5.1 DIAGNÓSTICO..... | 20 |
| 4.5.2 CARACTERIZACIÓN | 20 |
| 4.6 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR | 21 |
| 4.7 PURIFICACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN..... | 21 |
| 4.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS | 21 |
| 4.8.1 EDICIÓN DE SECUENCIAS | 21 |
| 4.8.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y DISTANCIA GENÉTICA..... | 22 |
| 4.8.3 GENERACIÓN DE SET DE DATOS HETEROCRÓNICO | 22 |
| 4.8.4 ANÁLISIS DE REGRESIÓN..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.8.5 DETECCIÓN DE RECOMBINANTES | 22 |
| 4.8.6 ANÁLISIS DE COALESCENCIA | 23 |
| 5. RESULTADOS | 24 |
| 5.1 DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL | 24 |
| 5.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN H | 24 |
| 5.3 EDICIÓN DE SECUENCIAS | 25 |
| 5.4 DIVERSIDAD ENTRE SECUENCIAS SUDAMERICANAS | 25 |
| 5.5 GENERACIÓN DE SET DE DATOS HETEROCRÓNICO | 27 |
| 5.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y FILOGENIA..... | 28 |
| 5.7 DETECCIÓN DE RECOMBINANTES | 32 |
| 5.8 ANÁLISIS DE COALESCENCIA | 33 |
| 6. DISCUSIÓN | 36 |
| 6.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN MUESTRAS DE PERÚ Y ECUADOR..... | 36 |
| 6.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN H Y ANÁLISIS DE VARIABILIDAD | 36 |
| 6.3 RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE CEPAS SUDAMERICANAS | 37 |
| 6.4 ANÁLISIS DE CALIDAD DEL SET DE DATOS..... | 38 |
| 6.5 RELACIONES DE ANCESTRALIDAD | 40 |
| 6.6 TASA DE SUSTITUCIÓN | 41 |
| 7. CONCLUSIONES | 42 |
| 8. PERSPECTIVAS | 42 |
| ANEXO I: PROTOCOLOS..... | 43 |
| ANEXO II: SET DE DATOS | 46 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |

1. RESUMEN

El virus distemper canino (CDV o *morbillivirus canino*) es el agente causante de una importante infección multisistémica denominada Distemper (CD), Moquillo, Carré o Joven Edad. Es un virus envuelto que pertenece al género *Morbillivirus*, familia *Paramyxoviridae*. Presenta un genoma de ARN no segmentado (15.7 Kb) de polaridad negativa que codifica para seis proteínas estructurales que conforman el virión y dos no estructurales. Se encuentra distribuido a nivel mundial y cuenta con un amplio rango de huésped afectando especies de carnívoros terrestres, acuáticos, primates no homínidos, roedores y suinos.

Diversas técnicas han sido desarrolladas para la detección de este virus, siendo las técnicas moleculares las más rápidas, efectivas y precisas. La amplificación por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con un paso previo de retrotranscripción) de un fragmento conservado del gen N (que codifica para la proteína de la Nucleocápside) es la técnica más comúnmente utilizada para detectar la presencia de CDV en muestras de campo. A su vez las técnicas moleculares permitieron la caracterización de CDV en linajes, siendo los genes H (Hemaglutinina) y F (Fusión) los blancos predilectos a la hora de genotipificar las cepas circulantes. El criterio de clasificación basado en el análisis de la variabilidad del gen H establece que dos cepas pertenecen a un mismo linaje si se agrupan en un mismo clado filogenético y presentan una divergencia aminoacídica menor al 4%. Actualmente, en base a este criterio han sido identificados más de catorce linajes circulantes en todo el mundo.

Análisis filodinámicos recientes basados en el análisis del gen H afirman que el ancestro común más reciente de las cepas circulantes a nivel mundial surgió en Norte América alrededor de 1880 y se diversificó en dos linajes ancestrales. Uno de ellos se expandió por todo el mundo dando origen a los linajes que actualmente circulan a nivel mundial. Sin embargo, aún existen interrogantes acerca del origen de este virus. Los registros históricos postulan que CDV surgió en Sudamérica (Perú) en el siglo XVIII y que de aquí fue exportado a Europa, producto de los constantes viajes desde y hacia el viejo continente. Por este motivo resulta fundamental ampliar los estudios filodinámicos, incluyendo muestras de otras regiones de Sudamérica, de las cuales no se han caracterizado hasta la fecha las cepas circulantes.

En el presente trabajo se amplificó por primera vez el gen H completo en muestras provenientes de Perú (posible centro de origen del virus), Ecuador y se obtuvieron nuevas secuencias de cepas circulantes en Uruguay. El estudio de las relaciones filogenéticas y la divergencia que presentan, sugiere que cepas peruanas y ecuatorianas pertenecen a un mismo linaje, el cual también está formado por cepas provenientes de Estados Unidos, y que hemos propuesto denominar NA4/SA3. Para el caso de las cepas uruguayas, se observó que presentan una alta similitud

entre ellas, pero que difieren significativamente del resto de las caracterizadas anteriormente en nuestro país.

Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para generar un set de datos conteniendo 422 secuencias provenientes de distintas partes del mundo. El mismo fue sometido a un análisis de coalescencia, permitiendo analizar las relaciones de ancestralidad entre las cepas circulantes. Los resultados obtenidos sugieren que todas las cepas circulantes en Sudamérica reportadas hasta el momento tienen un origen estimado que varía entre 1964 y 1985. Además pudo determinarse la tasa de sustitución de CDV, obteniendo un valor estimado de $6,95 \times 10^{-4}$ sustituciones por sitio por año.

La información contenida en este trabajo constituye un gran aporte a nivel regional, ampliando el número de países sudamericanos donde se han caracterizado cepas de CDV. Además la obtención de cepas actuales de Uruguay contribuye al relevamiento continuo que lleva el grupo de Genética de Microorganismos y a seguir la historia evolutiva de CDV en el país. Mantener un seguimiento del curso evolutivo resulta fundamental dada la alta tasa de sustitución que presenta este virus.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El virus distemper canino

El virus distemper canino (CDV o *morbilivirus canino*) es el agente causante de una importante infección multisistémica en canes denominada Distemper (CD), Moquillo, Carré o Joven Edad (Carré, 1905). CDV presenta una distribución mundial y afecta un amplio rango de huéspedes que abarca todas las especies de carnívoros terrestres y algunos acuáticos, siendo reportado recientemente en primates no homínidos, roedores y suinos (Bolt et al. 1997; Martínez-Gutierrez and Ruiz-Saenz, 2016; Origi et al. 2013; Qiu et al. 2011; Sun et al. 2010; Yoshikawa et al. 1989).

Desde el punto de vista taxonómico, CDV es un virus envuelto que pertenece al orden de los *Mononegavirales*. Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV por sus siglas en inglés), la familia *Paramyxoviridae*, a la cual pertenece CDV, es una de las ocho familias que conforman el orden *Mononegavirales*. Hasta el año 2016, esta familia se encontraba dividida en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. Diferencias entre ellas, y similitudes entre los pneumovirus y los filovirus (otra familia dentro del orden de los *Mononegavirales*) determinaron su separación en dos familias distintas (Afonso et al. 2016). La familia *Paramyxoviridae* contiene siete géneros: *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbilivirus*, *Respovirus* y *Rubulavirus*. CDV pertenece al género *Morbilivirus*, el cual presenta siete especies que afectan a animales y humanos: *morbilivirus canino*, *morbilivirus cetáceo*, *morbilivirus felino*, *sarampión*, *morbilivirus fócido*, el virus de la *peste bovina*, y el virus de *pequeños rumiantes* (<https://talk.ictvonline.org>).

2.2 Genoma viral y estructura del virión

Al igual que el resto de los *Paramyxovirus*, CDV presenta un genoma de ARN simple hebra, no segmentado y de polaridad negativa. Este genoma tiene una longitud de 15,7 kilobases (Kb). En sus extremos 3' y 5', se encuentran dos regiones denominadas *leader* y *trailer* respectivamente, implicadas en los mecanismos de transcripción y replicación del genoma (Lamb & Parks, 2007). Presenta seis unidades transcripcionales no solapadas, separadas por cortas regiones intergénicas, que codifican para las proteínas estructurales del virión: nucleocápside (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina (H) y la proteína larga o polimerasa (L) (van Regenmortel et al. 2000) (Figura 1). Cada gen contiene un único marco abierto de lectura (ORF), salvo el gen P, el cual además codifica para dos proteínas no estructurales: C y V (Bellini et al. 1985; Cattaneo et al. 1989).

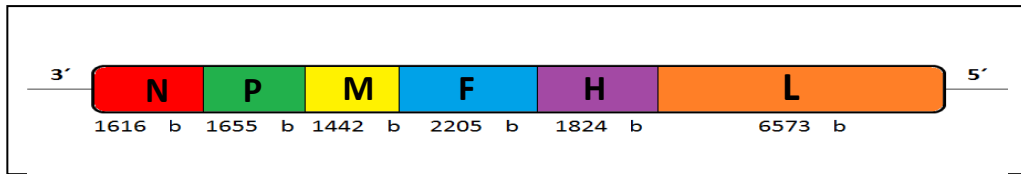


Figure 1. Representación esquemática del genoma de CDV indicando los seis genes que lo componen y su extensión en bases (b).

El virión se encuentra envuelto por una membrana lipídica, la cual contiene inmersas las glicoproteínas de superficie H y F. La proteína M, se asocia a la parte interna de la membrana e interactúa con el Complejo Ribonucleoproteico (RNP). El RNP presenta una estructura helicoidal y está compuesto por el genoma de ARN, la proteína N, la Polimerasa viral y su cofactor, la proteína P (Lamb & Parks, 2007) (Figura 2).

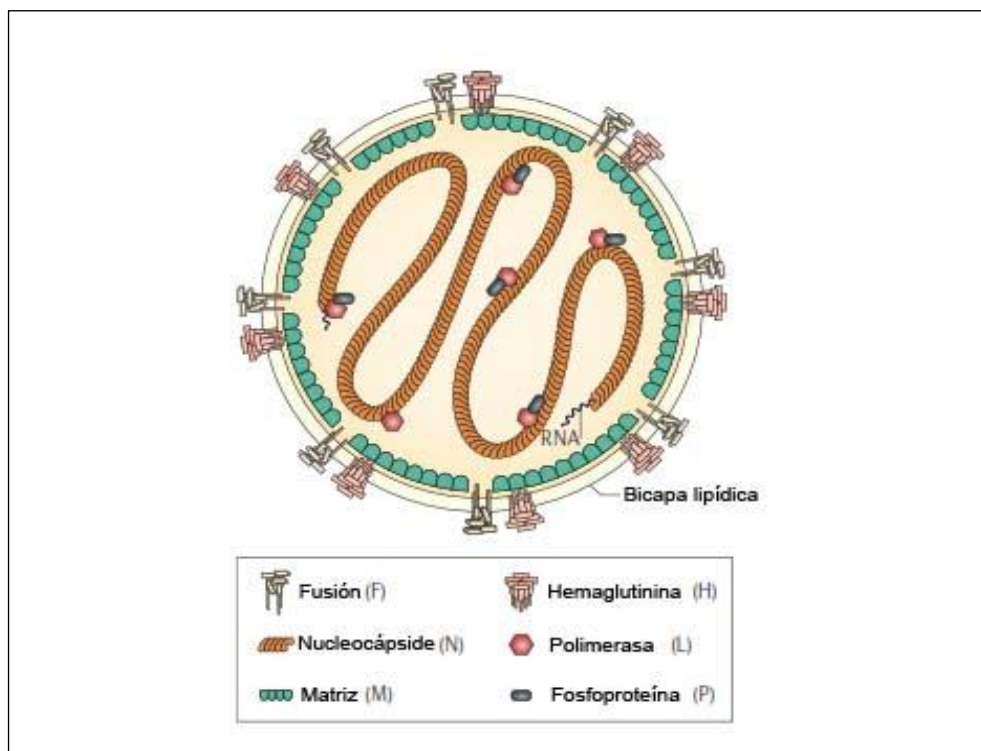


Figura 2. Estructura de un virión de la familia *Paramyxoviridae*. Extraído de Nature Publishing Group. Nature reviews/Microbiology.

2.3 Ciclo viral

El ciclo viral de CDV comienza con el reconocimiento por parte de la proteína H del receptor celular. El receptor reconocido en las primeras etapas de proliferación se denomina Molécula de Activación de Señalización de Linfocitos (SLAM, también conocido como CD150). Se trata de una glicoproteína de membrana que expresan las células dendríticas y los linfocitos T y B (Tatsuo et al. 2001). Este primer reconocimiento, se da a nivel de los alveolos del tracto respiratorio del hospedero. En etapas posteriores de proliferación CDV infecta células epiteliales mediante el reconocimiento de otro receptor, la nectina-4 (Pratakpiriya et al. 2012). La unión entre la proteína H y el receptor celular genera un cambio conformacional que favorece la actividad de la proteína F. Dicha proteína promueve la fusión de la membrana de la célula huésped con la envoltura viral, permitiendo el ingreso al citoplasma del complejo RNP. En el interior, el complejo RNP comienza el proceso de transcripción del genoma. El ARNm sintetizado es cubierto en el extremo 5' (por un residuo modificado de guanosina denominado cap-5') y poliadenilado en el extremo 3', procesos llevados a cabo por la polimerasa viral. El poliadenilado se logra mediante un mecanismo denominado *stuttering* o tartamudeo, a través del cual la polimerasa es capaz de usar como molde la misma base nitrogenada cientos de veces, logrando así el agregado de la cola poli-A al final de cada gen (Kolakofsky, 2016). Por su parte la transcripción ocurre de manera discontinua, por un proceso llamado *start-stop*, en el cual la transcripción comienza en el primer gen del extremo 3' (gen N) y se detiene en cada región intergénica, tras la escisión de la polimerasa. De esta forma, se genera un gradiente transcripcional, donde los genes situados hacia el extremo 3' (N, P/V/C) presentan una mayor cantidad de transcritos, mientras que los cercanos al extremo 5' (H, L) presentan una menor cantidad de transcritos (Lamb & Parks, 2007).

Como consecuencia del proceso de transcripción discontinuo, la acumulación de elevadas concentraciones de N dispara el mecanismo de replicación. Este ocurre de manera continua, siendo el complejo RNP el encargado de sintetizar el ARN de sentido positivo (antigenoma) que será utilizado como molde para la síntesis de nuevos genomas virales (von Messling et al. 2001) (Figura 3).

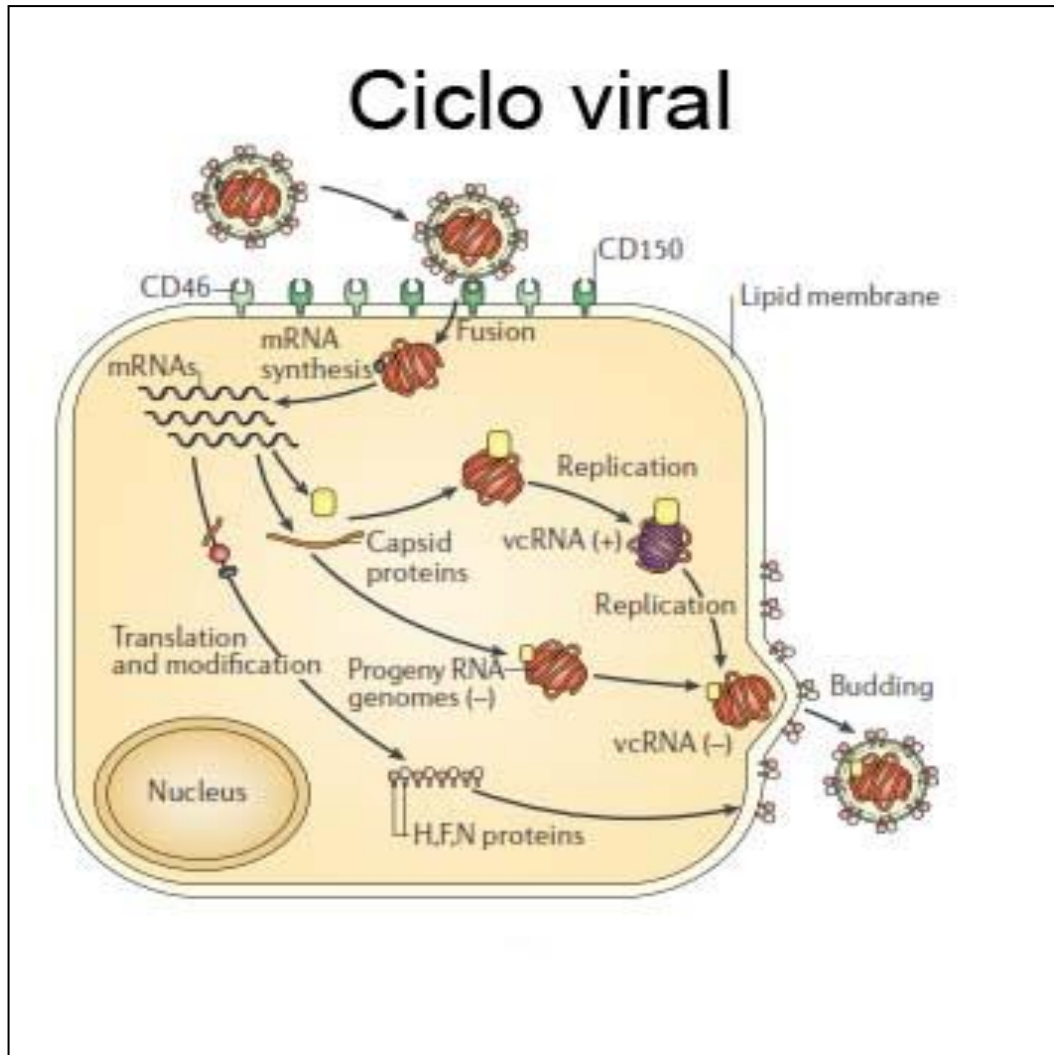


Figura 3. Ciclo replicativo de la familia *Paramyxoviridae*. Extraído de Nature Publishing Group. Nature reviews/Microbiology.

El genoma viral neo-sintetizado es rápidamente encapsidado y transportado hacia la membrana celular, donde se encuentran asociadas las proteínas M, H y F. Finalmente los viriones formados egresan de la célula huésped por brotación (Lamb & Parks, 2007) (Figura 3).

CDV cuenta además con un mecanismo de expansión que consiste en la fusión de las membranas celulares, generando células multinucleadas denominadas sincitios (Stern et al. 1995).

2.4 Patogénesis y control de la enfermedad

2.4.1 Patogénesis

El ingreso del virus al tracto respiratorio se da como consecuencia de la inhalación de aerosoles producidos por animales infectados. Mediante los linfocitos y macrófagos infectados, el virus atraviesa los epitelios respiratorios, alcanzando los órganos linfoides secundarios y dando lugar a una primera etapa de proliferación. Las células infectadas llevan el virus a través del torrente sanguíneo, permitiendo que alcance varios tejidos corporales, sistema urinario, digestivo y el sistema nervioso central. Esto ocurre alrededor de los primeros diez días post-infección (Appel & Summers 1999).

La sintomatología clínica depende tanto del sistema inmune del hospedero como de la cepa viral. Sin embargo, en la mayoría de los casos la infección se desarrolla mediante signos clínicos leves tales como anorexia, depresión o decaimiento. Si el animal infectado cuenta con un sistema inmune en buen estado, es capaz de eliminar el virus antes de desarrollar una infección sistémica (von Messling et al. 2001). De lo contrario, tiene lugar una infección aguda que afecta el sistema respiratorio, gastrointestinal y al sistema nervioso central (Appel y Summers, 1995; Deem et al. 2000).

Desde el primer reporte, CD constituye una de las afecciones principales en canes con elevadas tasas de mortalidad y un gran riesgo para la fauna silvestre. Ante la necesidad de prevenir y controlar la enfermedad, mecanismos tales como el diseño de vacunas y métodos de detección y caracterización del agente patógeno han sido desarrollados.

2.4.2 Control de la enfermedad

En el año 1923 se desarrolló la primera vacuna con virus inactivados contra CD. La misma brindaba un nivel de protección limitado (Appel, 1999). Más adelante, a fines de la década del 50 se desarrollaron vacunas en base a virus vivos modificados que permitieron controlar la enfermedad en canes de manera adecuada (Appel & Summers, 1995; 1999).

Desde la década del 50 hasta la actualidad, se han desarrollado una amplia variedad de vacunas a virus vivos atenuados, en donde el virus pierde su capacidad infectiva, pero continúa provocando una respuesta inmune humoral y celular induciendo la memoria inmunológica. Actualmente, una de las vacunas más utilizadas es la que contiene la cepa *Onderstepoort*. Esta cepa fue obtenida a partir de un brote ocurrido en zorros criados en granjas de Norte América, y ha sido adaptada a células aviares (Demeter et al. 2009; Haig D.A. 1956). Otras cepas utilizadas en el desarrollo de vacunas son *Snyder Hill Convac*, *Rockborn* y

Lederle (Chapuis 1995; Gillespie & Richard, 1956; Norrby et al. 1986; Rockborn G. 1959).

Si bien en cánidos actualmente la administración de vacunas con virus vivos atenuados es el principal mecanismo de prevención contra la enfermedad, aún continúan siendo reportados brotes en poblaciones de animales vacunados en todas partes del mundo (Blixenkrone-Møller et al. 1992; Calderón et al. 2007; Gemma et al. 1996; Riley & Wilkes, 2015; Sarute et al. 2011; Swati et al. 2015). Este hecho puede deberse a la reversión de las cepas atenuadas y/o al surgimiento de cepas de campo con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas (Martella et al. 2006; Pardo et al. 2005). No obstante, no se han encontrado hasta el momento evidencias de reversión de las cepas vacunales. Además, en las últimas décadas se ha registrado una expansión en el rango de huéspedes susceptibles a este virus (Decaro et al. 2004; Harder et al. 1996; Martella et al. 2010; Nava et al. 2009; Origgi et al. 2013; Willi et al. 2015).

En forma paralela al desarrollo de vacunas, el control de la enfermedad es abarcado mediante la implementación de diversas metodologías de diagnóstico, que permiten detectar y confirmar la presencia del virus en casos presuntivos de Distemper.

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Diagnóstico clínico

Diversos signos clínicos, como la presencia de secreciones óculo-nasales, hiperqueratosis, anorexia o ataxias, ayudan a los médicos veterinarios a diagnosticar la enfermedad. Sin embargo, la gran variedad de signos clínicos y lo impredecible del desarrollo de la enfermedad, hacen que resulte difícil establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso. Sumado a esto, otras enfermedades producen signos clínicos similares, tales como la tos de la perrera en etapa temprana, parainfluenza canina, adenovirus canino tipo 2 o coronavirus respiratorio canino (Demeter et al. 2007; Kim et al. 2001). Por este motivo se desarrollaron diversas técnicas con el fin de obtener un diagnóstico de la enfermedad más preciso y confiable.

2.5.2 Ensayos serológicos

Existen una serie de técnicas basadas en ensayos serológicos e inmunológicos para el diagnóstico de CD: test de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT), ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) y sero-neutralización. Estos ensayos son utilizados para detectar la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-CDV (Blixenkrone-Møller et al.

1991), de los cuales existe un único serotipo (Harder et al. 1997). Aún así, la presencia de estos anticuerpos no necesariamente indica que el animal esté infectado en el momento de toma de la muestra, sino que estuvo en contacto con el patógeno en algún momento. Sin embargo, este tipo de ensayo presenta falsos negativos y no permite distinguir entre una infección por parte de una cepa viral salvaje, una reversión producto de la vacunación con virus vivo modificado, o la presencia de especies recombinantes entre vacunas y cepas salvajes (Martinez-Gutierrez & Ruiz-Saenz, 2016).

En Sudamérica este tipo de ensayos son muy utilizados en hospitales veterinarios y veterinarias privadas como técnicas de rutina para el diagnóstico de CD. Sin embargo, solo existen reportes publicados de Argentina, Bolivia, Brasil y Chile (Acosta-Jamett, 2009; Ferreyra et al. 2009; Fiorello et al. 2007; Furtado et al. 2013; Navas et al. 2008). Estos estudios indican una permanencia de CDV en la región, no solamente en canes, sino también en animales salvajes como ocelotes, jaguares y zorros.

2.5.3 Aislamiento viral

La detección de CDV mediante el aislamiento de las partículas virales se ha llevado a cabo mediante el cultivo de linfocitos de los alveolos pulmonares, co-cultivo de tejidos infectados con linfocitos derivados de perros sanos (Appel MJG, 1992), o cultivo de linfocitos de sangre de hurón (Whetstone, 1981). En 2001 fueron diseñadas células Vero a partir de células epiteliales de riñón de mono, que expresan el receptor SLAM. Las mismas son altamente sensibles a la infección del virus, mostrando un evidente efecto citopático dentro de las 24 hs posteriores a la inoculación (Ono et al. 2001; Seki et al. 2003).

Si bien estos métodos permiten obtener un resultado confiable acerca de la presencia de CDV en las muestras analizadas, los mismos resultan costosos y requieren mucho tiempo, pudiendo demorar de varios días a semanas.

2.5.4 Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares permiten detectar la presencia del virus de forma sensible y rápida, obteniendo un diagnóstico *ante-mortem* eficaz sin tener en cuenta el grado de patogenicidad de la cepa viral, los títulos de anticuerpos generados por el huésped, ni la distribución de los antígenos virales. Se han desarrollado técnicas basadas en RT-PCR en tiempo final (Reacción en Cadena de la Polimerasa precedida por una etapa de RetroTranscripción) (Frisk et al. 1999; Hoyland et al. 2003), PCR anidado (nested PCR) (Shin et al. 2004), y más recientemente PCR en tiempo real (qPCR) (Elia et al. 2006; Scagliarini et al. 2007).

Diversas regiones del genoma de CDV han sido seleccionadas como blanco para la detección del genoma viral (genes N, M, P, regiones intergénicas) (Hoyland et al. 2003; Keawcharoen et al. 2004; Kim et al. 2001; Scagliarini et al. 2007). Sin embargo, una de las más utilizadas es la reportada por Frisk et al. 1999, mediante la amplificación de un fragmento de 287 pb del gen N, altamente conservado. Esta metodología ha demostrado tener una alta eficiencia, similar incluso a la obtenida por metodologías más sensibles como el PCR en tiempo real (Elia et al. 2006; Scagliarini et al. 2007).

En Sudamérica, el primer reporte de implementación de un método molecular de diagnóstico se llevó a cabo en Brasil (Gebara et al. 2004), utilizando la metodología desarrollada por Frisk et al. 1999. Más adelante, el mismo abordaje fue implementado en Argentina (Calderón et al. 2007). Nuevos reportes en Brasil utilizan una región más amplia del mismo gen (Castilho et al. 2007). Estos estudios confirman la presencia del virus en la región desde hace más de una década.

El grupo de investigación Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias (UdelaR) comenzó a trabajar en CDV en el año 2006. En el año 2011 reportó el primer diagnóstico molecular en Uruguay utilizando la metodología de Frisk et al. 1999. Además fue desarrollada una técnica de RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción) para diferenciar entre cepas vacunales y cepas de campo, determinando que todos los casos eran debido a infecciones con muestras de campo y no a la reversión de la cepa vacunal (Sarute et al. 2011).

2.6 Caracterización genética

El desarrollo de las técnicas moleculares permite además, realizar estudios de caracterización genética y comprender las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas de CDV circulantes en el mundo.

Diversas regiones genómicas han sido utilizadas para el análisis de las relaciones filogenéticas (Curran et al. 1991; Harder et al. 1996; Bolt et al. 1997; Haas et al. 1997; Chelt et al. 1998; Mochizuki et al. 1999;). En la década del 90 varios estudios revelaron que el gen H (1824 pb) está sujeto a una variación genética más elevada que el resto de los genes del genoma viral (Orvell et al. 1990; Blixenkrone-Møller et al. 1992; Haas et al. 1997). Los primeros estudios filogenéticos basados en el análisis de este gen indicaron que las cepas de campo siguen un patrón de distribución geográfico acorde a los continentes y se encuentran filogenéticamente distantes de las cepas utilizadas en las vacunas (Bolt et al. 1997; Carpenter et al. 1998; Haas et al. 1997; Harder et al. 1996; Iwatsuki et al. 1997; Martella et al. 2002; Mochizuki et al. 1999). Estos primeros estudios llevaron a clasificar CDV en linajes. El criterio para definir linajes fue establecido unos años más tarde por Martella et al. 2006 y establece que dos cepas pertenecen a un mismo linaje si se agrupan en un mismo clado filogenético y presentan una divergencia aminoacídica en la proteína H

menor al 4% (Martella et al. 2006). En base a este criterio, hasta el momento se han caracterizado tres linajes en Europa, cuatro en Asia, cuatro en Norte América, dos en África y tres en Sudamérica (Martella et al. 2006; An et al. 2008; Espinal et al. 2014; Ke et al. 2015; Panzera et al. 2012; Radtanakantikanon et al. 2013; Riley et al. 2015; Woma et al. 2010; Zhao et al. 2010).

2.7 Caracterización genética en Sudamérica

El primer reporte de caracterización de las cepas de CDV circulantes en Sudamérica se restringió a Argentina, basado en la amplificación de una región parcial del gen H (Calderón et al. 2007). Estos estudios evidenciaron la co-circulación en dicho país de dos variantes genéticas o genotipos. Unos años más tarde, nuestro grupo de investigación identificó, mediante el estudio del gen H completo, la co-circulación de dos linajes en Argentina, confirmando los datos anteriormente publicados por Calderón (Panzera et al. 2012). Uno de estos linajes circula además en Uruguay y Brasil (Negrao et al. 2013; Panzera et al. 2012). Este linaje se encuentra altamente relacionado con cepas europeas previamente identificadas pertenecientes al linaje Europa 1, y por ello ha sido denominado Europa 1/ Sudamérica 1 (EU1/SA1). El mismo es hasta el momento el único linaje reportado en nuestro país y en Brasil. El segundo linaje, exclusivo de Argentina, recibió el nombre de Sudamérica 2 (SA2).

Estudios posteriores sugieren la circulación de un genotipo diferente en Ecuador, denominado Sudamérica 3 (SA3). El mismo fue identificado por medio de una región muy corta del gen H (Panzera et al. 2014) y basándose en una región de 405 pb del gen F denominada Fsp (Fusion signal peptide) (Sarute et al. 2014), la cual es filogenéticamente informativa al igual que el gen H (Sarute et al. 2013). Poco tiempo después, Espinal et al. 2014 obtienen las primeras secuencias del gen H completo en muestras provenientes de Colombia e identifican un nuevo linaje circulante, denominado Sudamérica 4 (SA4).

2.8 Historia evolutiva de CDV

El momento y lugar de origen de CDV se encuentra en discusión, y existen varias discrepancias respecto a su historia evolutiva. Según datos históricos, en 1746, Antonio de Ulloa describe por primera vez la enfermedad Distemper en sus viajes a Sudamérica. El lugar establecido como origen del virus fue Perú, desde donde se estima que emigró hacia Europa en el correr del siglo XVIII (Blancou, 2004). Los primeros casos de canes con sintomatología de Distemper en el viejo continente datan de la década de 1760 en España, Italia, Rusia e Inglaterra (Blancou, 2004). En 1809, Edward Jenner describe la situación en Inglaterra, donde fueron

reportados casos de perros que presentaban los signos clínicos característicos de Distemper, aunque se pensaba que se trataba de una enfermedad similar a la viruela (Jenner, 1809). La enfermedad estaba descrita únicamente en base a sus signos clínicos, hasta que finalmente en el año 1905, Henri Carré logra aislar el virus (Carré, 1905).

La primera secuencia completa del gen H de CDV data de 1975 en Estados Unidos. Desde ese entonces el número de secuencias reportadas ha ido aumentando, lo cual lleva a que en la actualidad se disponga de más de 400 secuencias en la base de datos del GenBank. El desarrollo de metodologías moleculares, la implementación de análisis filogenéticos, y el avance de nuevas técnicas computacionales permiten hoy estudiar en más detalle las relaciones filogenéticas de las cepas circulantes.

Recientemente, los estudios de coalescencia se han convertido en una herramienta fundamental para dilucidar aspectos acerca de la historia evolutiva y la dinámica poblacional de una población viral (Volz et al. 2013). Obtener datos acerca de las relaciones de ancestralidad entre las cepas circulantes, las rutas de migración, o las tasas de sustitución (sustituciones por sitio por año), es parte de la información que es posible obtener mediante la implementación de este tipo de metodologías.

El primer estudio que tuvo como objetivo determinar la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de las cepas circulantes de CDV fue publicado por Pomeroy et al. 2008. El set de datos utilizado constaba de tan sólo 35 secuencias del gen H colectadas entre 1982 y 2001 en Japón, Estados Unidos, y países de Europa Occidental. Este estudio, sugiere que el virus surge aproximadamente en 1943, resultado aproximado que se encuentra dentro de un rango temporal denominado 95% HPD (Highest Posterior Density), en cuyo caso va desde 1894 hasta 1974 (Pomeroy et al. 2008).

En el año 2015, nuestro grupo de investigación realizó un segundo análisis utilizando un set de datos mayor, con 208 secuencias del gen H pertenecientes a 16 países provenientes de muestras colectadas entre 1975 y 2011. La estimación del tMRCA fue aproximadamente 1886 (95% HPD 1858 – 1913). Además se estimó que el tMRCA de las actuales cepas circulantes tiene como el origen más probable Norte América. Este ancestro se diversificó en dos linajes ancestrales, uno de los cuales se mantuvo en Norte América (actualmente denominado Norte América-1), mientras que el segundo se expandió dando origen al resto de los linajes que actualmente circulan a nivel mundial (Panzera et al. 2015). Análisis filodinámicos posteriores apoyan estos resultados, contribuyendo al conocimiento de la evolución y la distribución espacio-temporal del virus (Fischer et al. 2016; Ke et al. 2015).

Si bien estos resultados posicionan a Estados Unidos como centro de origen de CDV, los mismos no refutan los registros históricos que datan del siglo XVIII, ya que el set de datos empleado abarca muestras aisladas

a partir de 1975. Sin embargo, la restricción a nivel temporal no es el único factor que puede afectar los resultados obtenidos en este tipo de trabajos. El amplio rango de huésped que abarca CDV refleja la necesidad de contar con un mayor muestreo, el cual sea más representativo de toda la población viral existente. De esta forma se puede tratar disminuir el sesgo en las inferencias realizadas.

El estudio de las rutas de migración sugiere que CDV ingresó a Sudamérica mediante dos vías distintas. El linaje EU1/SA1, proveniente de Europa, arribó a Brasil en el entorno de 1975, luego a Uruguay y Argentina. Mientras que el linaje SA2 llegó a Argentina alrededor de 1950 directamente de Estados Unidos (Panzera et al. 2015). Para el linaje EU1/SA1, datos similares fueron obtenidos en los estudios posteriores (Fischer et al. 2016; Ke et al. 2015). Además Ke et al. 2015 posiciona el origen del linaje compuesto por cepas colombianas (SA4) alrededor del año 1950.

Si bien estos últimos trabajos han contribuido sustancialmente al conocimiento de la historia evolutiva de CDV, aún resta mucho por saber. A la fecha se cuenta con pocas secuencias del gen H completo provenientes de tan solo 4 países de los 13 que componen Sudamérica: Argentina (4 secuencias), Brasil (15 secuencias), Colombia (15 secuencias) y Uruguay (6 secuencias).

Recientemente nuestro grupo generó una colaboración con laboratorios de Perú y Ecuador, con el objetivo de implementar abordajes moleculares en las cepas circulantes en estos países. La caracterización de cepas provenientes de Perú (posible centro de origen de CDV), y la obtención de secuencias completas del gen H en cepas ecuatorianas, podría contribuir al conocimiento de la historia evolutiva del virus, logrando abarcar una mayor distribución geográfica del virus en la región.

En el presente trabajo nos propusimos amplificar el gen H completo de cepas de CDV en estas muestras y en muestras de nuestro país, ampliando así los datos numéricos y heterocronicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la historia evolutiva de CDV.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar la detección y caracterización genética de cepas de CDV provenientes de Perú y Ecuador.
- Ampliar el set de datos correspondiente al gen H en nuestro país.
- Analizar la divergencia genética entre las cepas que circulan actualmente en Sudamérica.
- Realizar una reconstrucción de la dinámica poblacional de CDV utilizando métodos Bayesianos, a partir de cepas provenientes de todo el mundo.
- Contribuir al conocimiento acerca del origen ancestral de las cepas de CDV que circulan en la actualidad, haciendo énfasis en Sudamérica.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia de investigación

Mediante el desarrollo de protocolos ya estandarizados por nuestro grupo, se llevó a cabo el diagnóstico a través de la amplificación por PCR en tiempo final de un fragmento conservado del gen N (Sarute et al. 2011) y la caracterización genética por medio de la amplificación del gen H completo de CDV (1824 pb) (Panzer et al. 2012). Los amplicones obtenidos correspondientes al gen H fueron enviados a secuenciar, y sus secuencias fueron editadas y ensambladas. Posteriormente se generó un set de datos conteniendo secuencias del gen H provenientes de todo el mundo, con su correspondiente país de origen, año de aislamiento, y huésped. Este set de datos fue empleado para realizar el análisis de coalescencia.

4.2 Muestras analizadas

Nuestro laboratorio cuenta con material biológico (cDNA) proveniente de Perú y Ecuador (12 y 20 muestras respectivamente). Dichas muestras fueron tomadas en un rango de tres años que abarca desde el 2012 hasta el 2015 (Tabla 1).

Para poder contar con datos heterocronicos más representativos de nuestro país, se seleccionaron cuatro muestras de los años 2014 y 2015 previamente diagnosticadas como positivas para CDV, producto del constante relevamiento que lleva nuestro grupo de investigación. Para el procesamiento de las mismas el material de partida fue orina y/o secreción óculo-nasal según el caso (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras analizadas en este estudio. Con el signo + se indican los casos donde fue posible amplificar el gen H en su totalidad.

| Muestra | País | Año | Tipo de muestra | Diagnóstico | Amplificación del gen H |
|---------|---------|------|-----------------|-------------|-------------------------|
| P2 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | + |
| P10 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | - |
| P11 | Perú | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| P14 | Perú | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| P20 | Perú | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| P21 | Perú | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| P25 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | - |
| P54 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | - |
| P58 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | - |
| P65 | Perú | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| P69 | Perú | 2013 | cDNA | Positivo | + |
| P71 | Perú | 2015 | cDNA | Positivo | - |
| EC4 | Ecuador | 2012 | cDNA | Positivo | + |
| EC8 | Ecuador | 2012 | cDNA | Negativo | - |
| EC12 | Ecuador | 2012 | cDNA | Positivo | - |
| EC17 | Ecuador | 2013 | cDNA | Negativo | - |
| EC23 | Ecuador | 2014 | cDNA | Negativo | - |
| EC25 | Ecuador | 2014 | cDNA | Positivo | + |
| EC30 | Ecuador | 2014 | cDNA | Positivo | + |
| EC32 | Ecuador | 2014 | cDNA | Positivo | + |
| EC36 | Ecuador | 2014 | cDNA | Positivo | - |
| EC40 | Ecuador | 2014 | cDNA | Negativo | - |
| EC43 | Ecuador | 2015 | cDNA | Negativo | - |
| CDV297 | Uruguay | 2014 | Secreción | Positivo | - |
| CDV305 | Uruguay | 2014 | Orina | Positivo | - |
| CDV312 | Uruguay | 2015 | Secreción | Positivo | + |
| CDV314 | Uruguay | 2015 | Secreción | Positivo | + |

4.3 Extracción de ARN

El genoma viral fue extraído a partir de las muestras uruguayas utilizando el kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El ARN se eluyó en 35 µL de agua libre de nucleasas y se conservó a -20°C (protocolo en Anexo I).

4.4 Retrotranscripción

El ARN extraído fue sometido a una reacción de retrotranscripción, utilizando el kit *RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas). Los cebadores empleados en dicha reacción son hexámeros aleatorios denominados *Random primers* (Integrated DNA Technologies). Los mismos permiten retrotranscribir la totalidad del genoma, permitiendo así amplificar posteriormente diversas regiones de interés (protocolo en Anexo I).

4.5 Amplificación por PCR en tiempo final

4.5.1 Diagnóstico

La metodología para la detección de CDV consiste en la amplificación de un fragmento de 287 pb del gen N. Para ello se emplearon los cebadores Forward "Dist F": 5'_ACAGGATTGCTGAGGACCTAT (posición 769-789) y Reverse "Dist R": 5'_CAAGATAACCATGTACGGTGC (posición 1055-1035) (Frisk et al. 1999) (protocolo en Anexo I). El equipo utilizado para todas las reacciones de PCR es el termociclador Arktik V.01.07 de Thermo Scientific.

4.5.2 Caracterización

Para la caracterización se amplificó el gen H completo en aquellas muestras donde se detectó la presencia del genoma viral. Este gen tiene una extensión de 1824 pb, y fue amplificado mediante el uso de dos pares de cebadores, que dan lugar a dos amplicones solapantes, denominados H1 y H2. La obtención de ambos amplicones fue realizada bajo las mismas condiciones de PCR (protocolo en Anexo I).

En el caso del fragmento H1 de 1038 pb fueron empleados los cebadores Forward "FE7056": 5'_CTTAGGGCTCAGGTAGTCCAAC (posición 7056-7077) y Reverse "RI8094": 5'_GAGCGACAGGTATCACTTCTTC (posición 8093-8072).

Por otra parte, el fragmento H2 se obtiene con el par de cebadores Forward “F17742”: 5’_GCTATCTCAGACGGAGTGTATGG (posición 7742-7764) y Reverse “RE8969”: 5’_GTCGGTAAGGGATTTCTCACCTC (posición 8969-8947). Este par de cebadores amplifica un fragmento de 1227 pb.

4.6 Visualización de productos de PCR

Con los amplicones obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1x (Tris, Acetato, EDTA). El buffer empleado es también TAE 1x y la corrida electroforética se realiza a 90 Volts y 150mA durante 30 minutos. El agente intercalante empleado es el Bromuro de Etidio y la visualización se lleva a cabo bajo luz UV.

4.7 Purificación, cuantificación y secuenciación

Los amplicones correspondientes al gen H fueron purificados con el kit Zymo *DNA Clean & ConcentratorTM-5*, siguiendo el protocolo correspondiente a la purificación de productos de PCR que dicta el fabricante (protocolo en Anexo I).

Una vez purificados, fueron cuantificados por espectrofotometría para corroborar que la concentración de ADN presente en los productos de PCR alcanzaba los valores requeridos por el servicio StandardSeq de la empresa MacroGen o el servicio de secuenciación brindado por el Instituto Pasteur de Montevideo. El equipo utilizado para la cuantificación es el espectrofotómetro *NanoDrop2000* (Thermo).

4.8 Análisis bioinformáticos

4.8.1 Edición de secuencias

Las secuencias de los fragmentos H1 y H2 obtenidas, secuenciadas en ambos sentidos fueron editadas y corregidas según su correspondiente cromatograma. Posteriormente fueron solapadas y ensambladas con el programa *SeqMan* del paquete *Lasergene 7.0* (DNASTAR) utilizando como secuencia de referencia la cepa uruguaya Uy-141/9 (número de acceso JN215477).

4.8.2 Análisis de secuencias y distancia genética

Se realizó un alineamiento con el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) utilizando el algoritmo ClustalW. Dicho alineamiento contiene las secuencias obtenidas en este trabajo y el resto de las secuencias provenientes de países sudamericanos disponibles en la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, ncbi.nlm.nih.gov*). Posteriormente se llevó a cabo el cálculo de la distancia genética (p) a nivel aminoacídico que presentan entre sí las secuencias de un mismo linaje (o país en caso de no estar asignado un linaje) y con respecto al resto de los países/linajes sudamericanos.

4.8.3 Generación de set de datos heterocrónico

Tras una exhaustiva búsqueda de secuencias del gen H completo de CDV disponibles en la base de datos del GenBank del NCBI, se generó un set de datos heterocrónicos de secuencias provenientes de distintas partes del mundo. Para todas las secuencias que conforman dicho set de datos, se dispone de la siguiente información: país de origen, año de recolección de la muestra y huésped.

4.8.4 Análisis de regresión

Se evaluó la calidad del set de datos en cuanto a su señal temporal y a su comportamiento según el modelo de reloj molecular, por medio de un análisis de regresión root-to-tip con el software TempEst (Rambaut, 2016).

Para ello fue necesario establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias mediante la construcción de un árbol filogenético con el método de neighbor-joining utilizando el software MEGA6 (Tamura et al. 2013). La significancia estadística de dicha filogenia fue estimada por el análisis de bootstrap con 1000 replicaciones.

4.8.5 Detección de recombinantes

La detección de secuencias recombinantes en el set de datos se llevó a cabo con el programa RDP4 (Martin et al. 2015), usando los parámetros por defecto. Como criterio para validar la presencia de un evento de recombinación, se aceptaron aquellos casos donde la recombinación haya sido detectada por al menos 4 de los algoritmos que utiliza el programa.

4.8.6 Análisis de coalescencia

Los análisis de coalescencia se llevaron a cabo con el paquete BEAST2 v.2.3.2 (Bouckaert et al. 2014). La preparación de los datos fue realizada con el programa BEAUTi. El modelo de reloj molecular empleado para el análisis fue el de reloj estricto, y el *prior* de árbol coalescente utilizado fue constante. El modelo de sustitución que mejor se ajustaba al set de datos fue previamente seleccionado con el programa jModelTest (Posada, 2008). El largo de la cadena MCMC fue de 1×10^8 generaciones. Las corridas del programa BEAST2 se llevaron a cabo en el portal CIPRES (<https://www.phylo.org>), y los resultados obtenidos fueron visualizados con el programa Tracer v1.6 (Drummond & Rambaut, 2007). Fueron descartados como *Burn In* los datos obtenidos en el 8% inicial de la corrida.

Finalmente para la obtención de la filogenia de máxima credibilidad (MCC) se utilizó el programa TreeAnnotator v2.3.2, y los resultados fueron visualizados con el programa FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

5. RESULTADOS

5.1 Detección del genoma viral

Un total de 32 muestras de Perú y Ecuador fueron sometidas a la reacción de PCR para amplificar un fragmento de 287 pb del gen N acorde a las condiciones puestas a punto por Sarute et al. 2011. La presencia del genoma viral se confirmó en 7 muestras de Perú y 6 de Ecuador (Figura 4).

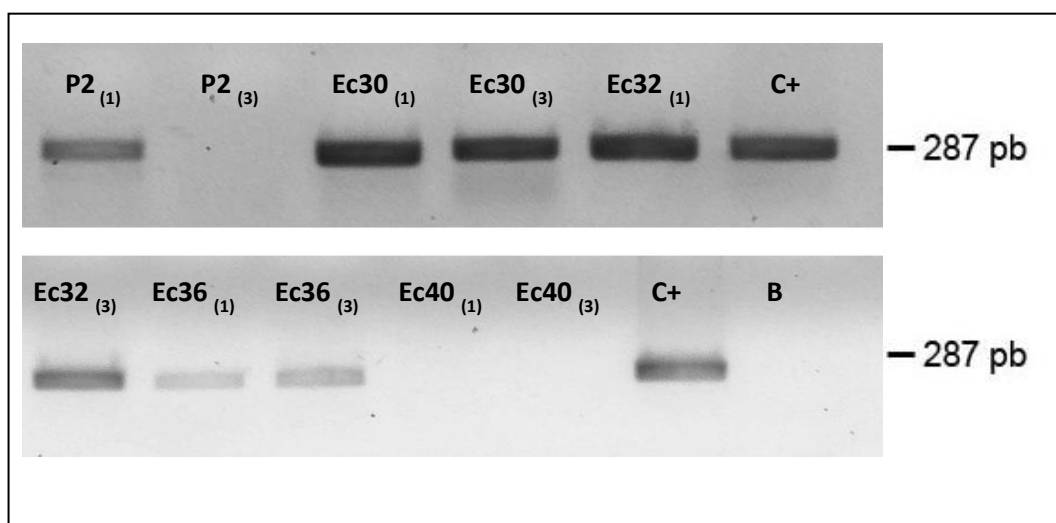


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, tinción con Bromuro de Etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Entre paréntesis pueden verse los microlitros (μL) de cDNA empleados como molde para la reacción de PCR. Carriles, Arriba: 1 y 2: P2 (Perú), 3 y 4: Ec30 (Ecuador), 5: Ec32 (Ecuador), 6: control positivo. Carriles, Abajo: 1: Ec32 (Ecuador), 2 y 3: Ec36 (Ecuador), 4 y 5: Ec40 (Ecuador), 6: control positivo, 7: Blanco. En todos los casos se corrieron 7 μL .

5.2 Amplificación del gen H

Se realizaron las reacciones de PCR para amplificar los fragmentos H1 (1038 pb) y H2 (1227 pb) en todas las muestras positivas de Perú y Ecuador, y en 4 muestras de Uruguay. Estas últimas fueron previamente procesadas mediante protocolos de extracción de ARN y Retrotranscripción, como se describe en materiales y métodos. En algunos casos, para amplificar los dos fragmentos solapantes correspondientes al gen H, se realizaron re-amplificaciones, usando como molde el producto de reacciones de PCR anteriores. Fue posible obtener los amplicones del tamaño esperado en 4 muestras de Ecuador (Ec4, Ec25, Ec30 y Ec32), 2 de Perú (P2 y P69), y 2 de Uruguay (CDV312 y CDV314) (Figura 5).

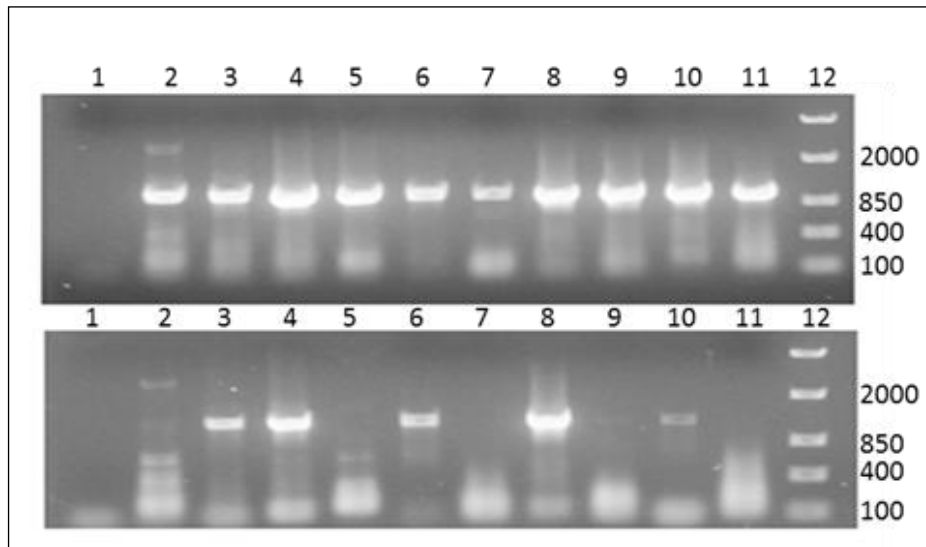


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%, tinción con Bromuro de Etidio. Productos de PCR y re-amplificaciones (R). Arriba (fragmento H1), carriles: 1- Blanco, 2- P2(R), 3- P2, 4- Ec4, 5- Ec4(R), 6- Ec25, 7- Ec25(R), 8- Ec30, 9, Ec30(R), 10- CDV312, 11- CDV312(R), Marcador de Peso Molecular. Abajo (fragmento H2), carriles: 1- Blanco, 2- P2(R), 3- P2, 4- Ec4, 5- Ec4(R), 6- Ec25, 7- Ec25(R), 8- Ec30, 9- Ec30(R), 10- CDV312, 11- CDV312(R), Marcador de Peso Molecular.

5.3 Edición de secuencias

Se secuenciaron un total de 16 amplicones previamente purificados, correspondientes a los fragmentos H1 y H2 de las 8 muestras anteriormente mencionadas. Las secuencias obtenidas fueron editadas según los cromatogramas correspondientes, y finalmente ensambladas. Fue posible ensamblar la secuencia completa de 1824 pb correspondiente al gen H para las 8 muestras.

5.4 Diversidad entre secuencias sudamericanas

El análisis comparativo de las secuencias obtenidas en este estudio reveló que para el caso de las dos cepas peruanas existen 44 sitios variables a nivel nucleotídico, de los cuales 15 corresponden a cambios no sinónimos (que generan un cambio de codón, codificando para un aminoácido diferente). Por su parte las cuatro secuencias ecuatorianas presentan 41 sitios variables, 8 de ellos no sinónimos. Finalmente, para el caso de las dos secuencias uruguayas, éstas difieren únicamente en 2 nucleótidos, uno de los cuales genera un cambio de aminoácido en la

proteína traducida (Figura 6). Sin embargo, la comparación de éstas últimas 2 secuencias con el resto de las provenientes de Uruguay mostró que existen 19 aminoácidos diferentes entre las obtenidas y las anteriormente reportadas (dato no mostrado).

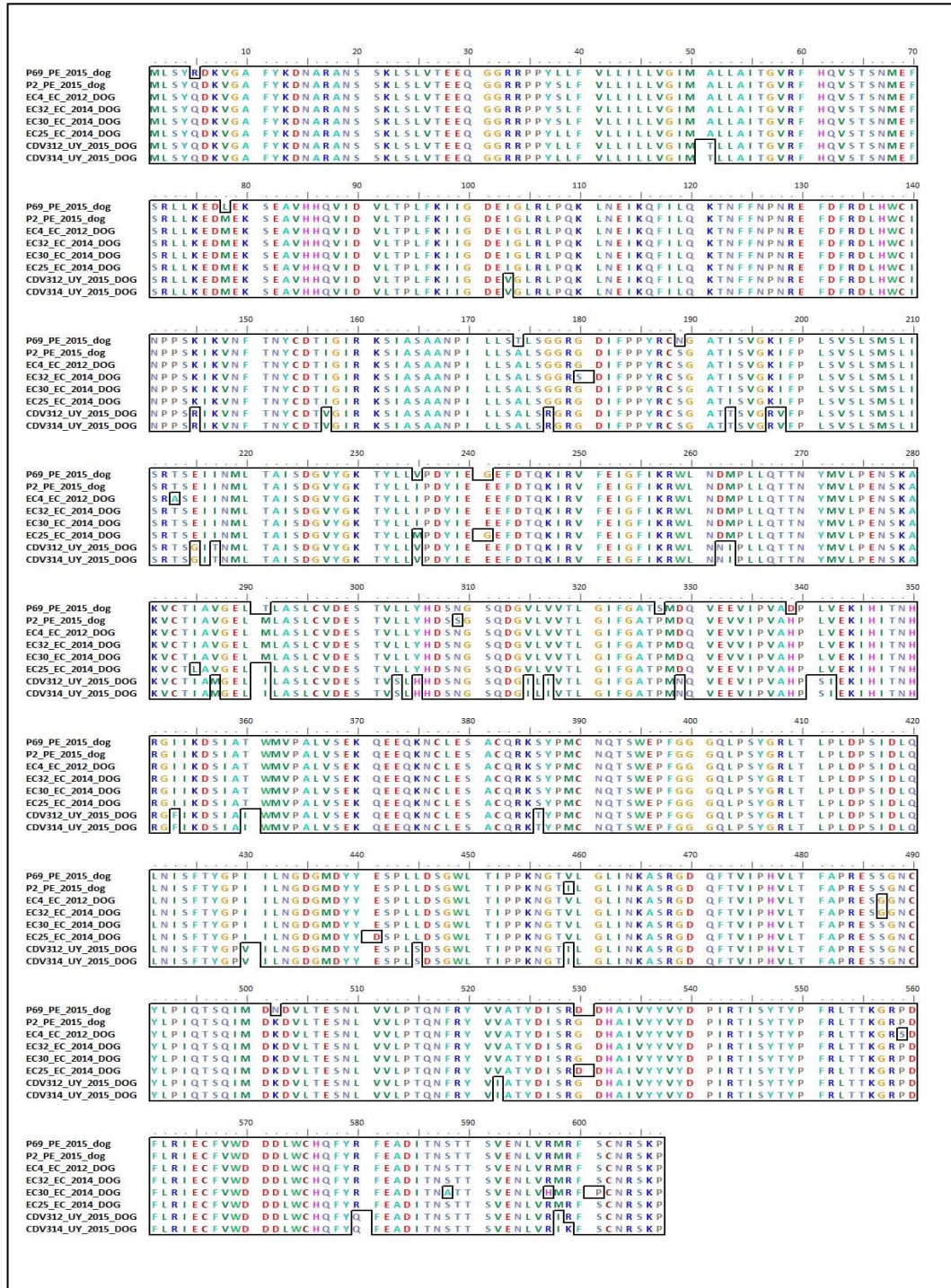


Figura 6. Alineamiento a nivel aminoacídico de las 8 secuencias obtenidas en este trabajo. Las posiciones indicadas con recuadro corresponden a cambios aminoacídicos.

La distancia genética (p-distance) fue determinada para las distintas cepas circulantes en Sudamérica. Para ello fueron agrupadas de la siguiente manera: SA1 (Argentina, Brasil y Uruguay), SA2 (Argentina), EC (Ecuador), SA4 (Colombia) y PE (Perú). La distancia entre los 5 grupos fue en todos los casos mayor al 4,5%, salvo entre las cepas ecuatorianas y las peruanas, donde existe una distancia genética de 1,7 % (Tabla 3). La divergencia genética dentro de cada grupo va desde 0,6% en el caso de SA4, hasta 2,9% para el caso de SA1 (Tabla 3).

Tabla 3. Distancia genética (p) del gen H a nivel inter e intragrupos.

| | Entre grupos | | | | Intragrupos |
|------|--------------|-------|-------|-------|-------------|
| | SA 1 | SA 2 | EC | SA 4 | |
| SA 1 | — | | | | 0.029 |
| SA 2 | 0.049 | — | | | 0.013 |
| EC | 0.052 | 0.057 | — | | 0.013 |
| SA 4 | 0.054 | 0.062 | 0.053 | — | 0.006 |
| PE | 0.051 | 0.057 | 0.017 | 0.055 | 0.025 |

5.5 Generación de set de datos heterocrónico

En total se alinearon 422 secuencias (Tabla A2, Anexo II). El set de datos generado contiene muestras recolectadas en 25 países diferentes, y abarca un rango de 40 años (desde 1975 hasta 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Países que conforman el set de datos generado. Cada país está representado por un código de dos letras, como se indica.

| País | Código ISO | Nº de secuencias | Rango de años |
|----------------|------------|------------------|---------------|
| Alemania | DE | 14 | 1994 - 2008 |
| Argentina | AR | 4 | 2003 - 2008 |
| Austria | AT | 7 | 2002 - 2007 |
| Brasil | BR | 15 | 2007 - 2014 |
| China | CH | 156 | 2004 - 2015 |
| Colombia | CO | 15 | 2011 - 2012 |
| Corea del Sur | KR | 7 | 1997 - 2011 |
| Dinamarca | DK | 43 | 1991 - 2013 |
| Ecuador | EC | 4 | 2012 - 2014 |
| España | ES | 2 | 2002 - 2005 |
| Estados Unidos | US | 26 | 1975 - 2013 |
| Groenlandia | GL | 1 | 1988 |
| Hungría | HU | 13 | 2004 - 2006 |
| India | IN | 1 | 2006 |
| Italia | IT | 15 | 2000 - 2015 |
| Japón | JP | 26 | 1991 - 2012 |
| Kazajistán | KZ | 2 | 1989 - 2007 |
| México | MX | 1 | 2014 |
| Perú | PE | 2 | 2015 |
| Portugal | PT | 3 | 1998 - 2008 |
| Sudáfrica | ZA | 27 | 2007 |
| Taiwan | TW | 22 | 2004 - 2008 |
| Tanzania | TZ | 6 | 1994 - 2011 |
| Uruguay | UY | 8 | 2007 - 2015 |
| Vietnam | VN | 2 | 2013 - 2014 |

5.6 Análisis de regresión y filogenia

Se llevó a cabo un análisis de regresión root-to-tip con el set de datos de 422 secuencias generado, en el que se observa la divergencia genética que presentan con respecto a su ubicación en el tiempo. De esta manera es posible detectar secuencias cuyo año de aislamiento es incongruente con la diversidad genética que presentan. Los resultados pueden observarse en forma de regresión lineal (Figura 7.A), donde cada punto representa una secuencia del set de datos. Otra manera de visualizar los resultados es mediante un gráfico de dispersión de los residuos de la regresión (Figura 7.B). Las secuencias que no se ajustan a la regresión pueden presentar una divergencia mayor a la esperada

(puntos rojos) o menor (puntos azules), en comparación con su año de aislamiento. Para realizar este análisis, fue necesario construir un árbol filogenético con neighbor-joining y p-distances (Figura 8).

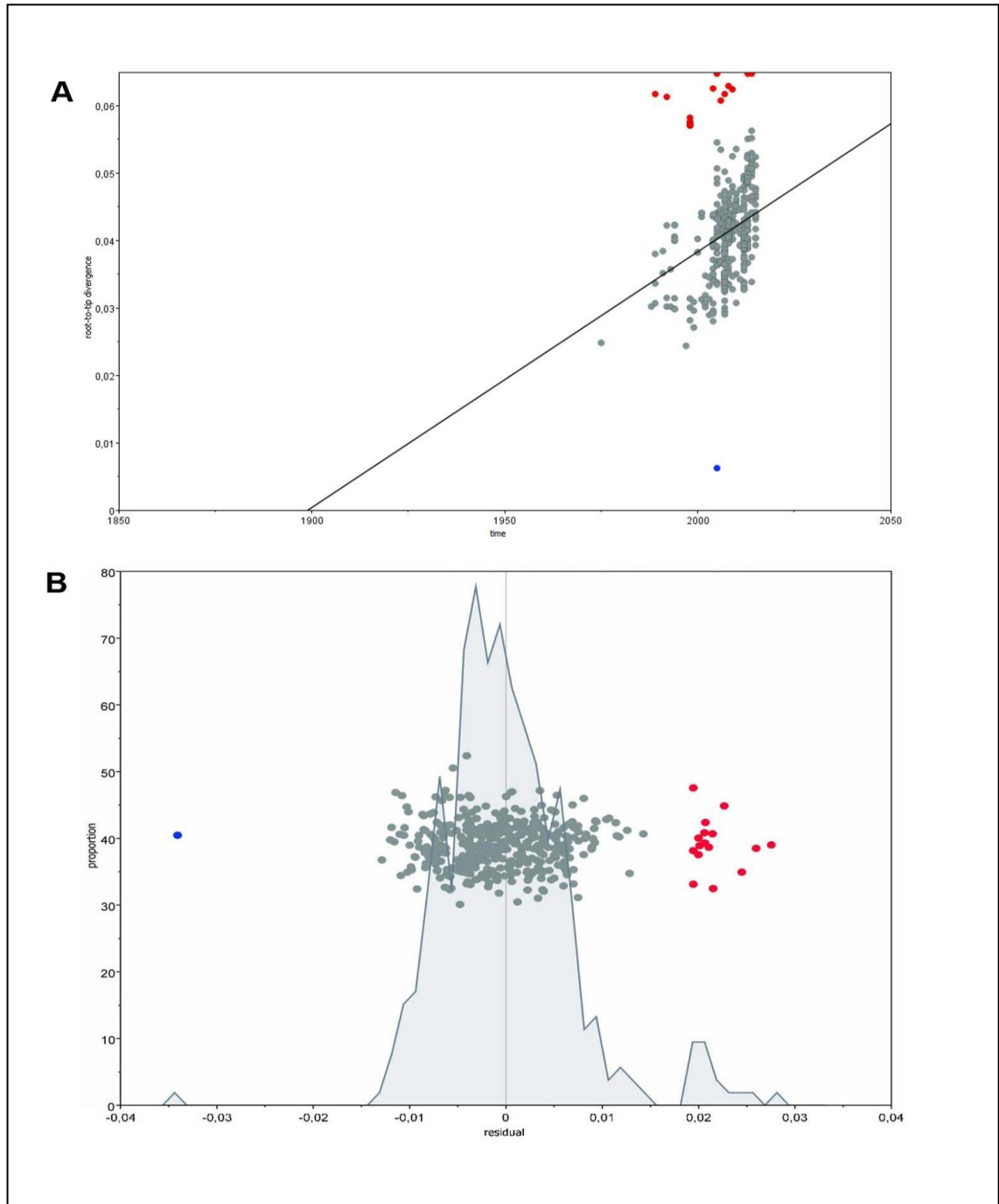


Figura 7. Análisis de regresión root-to-tip. A. El valor de R^2 obtenido fue de 0.09, y el corte con el eje x (aproximado al tMRCA) indica el año 1898. B. Histograma y gráfico de dispersión

Se observaron 17 secuencias que no se ajustaron a la regresión lineal. Las mismas se pudieron identificar en la filogenia realizada, donde se vio que corresponden a 2 secuencias de Vietnam, 1 de India, 2 de Kazajistán, 6 de China y 6 de Estados Unidos. Tras agrupar los distintos clados según los linajes correspondientes, se pudo ver que las secuencias que caen fuera de la regresión corresponden a los linajes NA1 y AS3, mientras que una de las 17 no agrupa dentro de ningún clado. La filogenia muestra además que las cepas de Perú y Ecuador agrupan juntas, y con dos secuencias de Estados Unidos del año 2013 (Figura 8). En cuanto a las secuencias uruguayas, las mismas agrupan dentro del clado correspondiente al linaje EU1/SA1 (dato no mostrado en la figura).

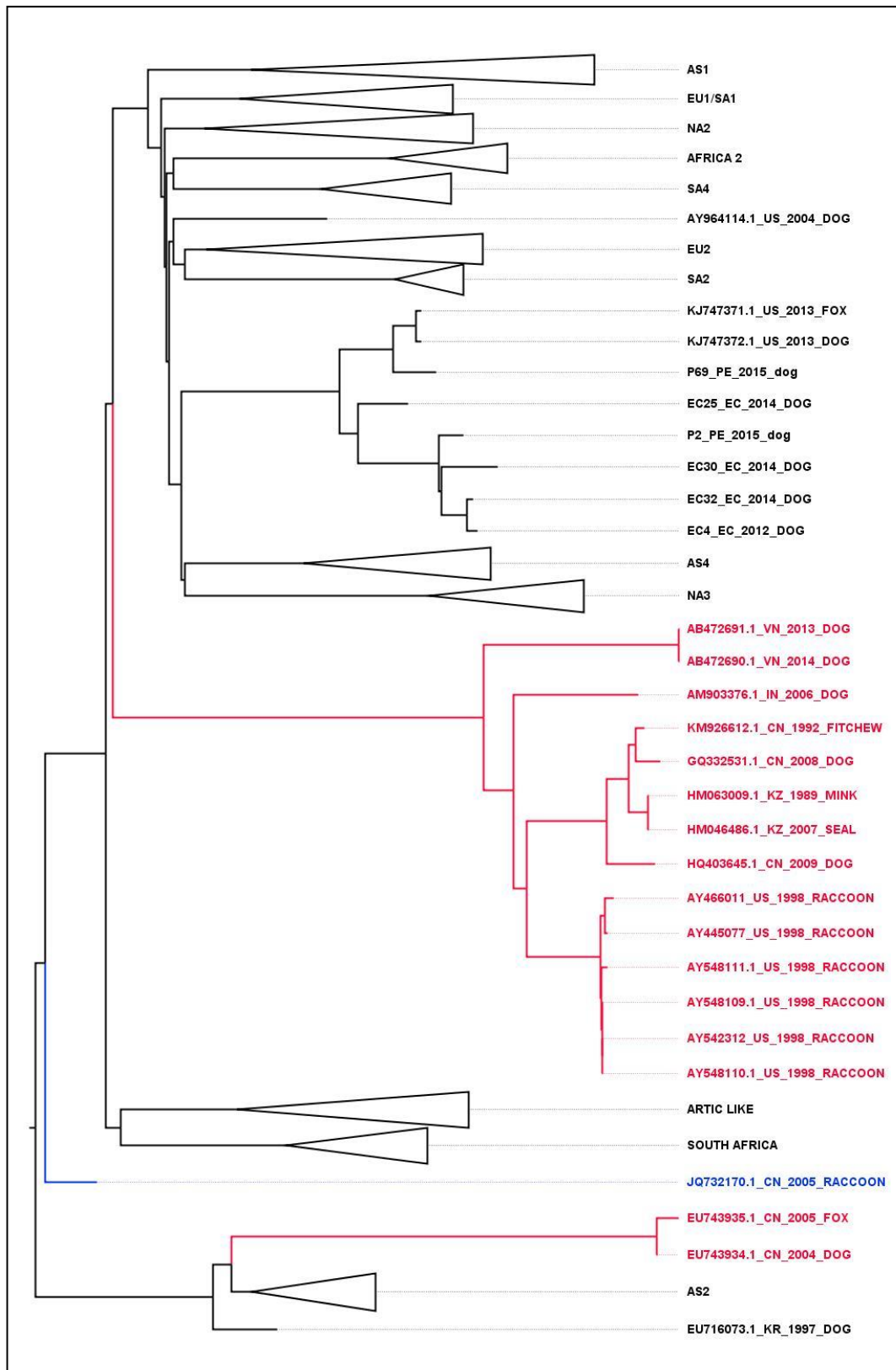


Figura 8. Árbol filogenético construido con neighbor-joining y p-distances de las 422 secuencias del gen H de CDV. En color se indican las secuencias que no se ajustan a la regresión.

5.7 Detección de recombinantes

El set de datos de 422 secuencias fue sometido a un análisis de detección de secuencias recombinantes con el programa RDP4. El resultado de dicho análisis indicó la presencia de una secuencia recombinante: AM903376.1_IN_2006_DOG. El evento de recombinación fue detectado con 4 de los métodos que utiliza el programa (BootScan, MaxChi, Chimaera y 3Seq). Se identificaron dos posibles puntos de corte: en la posición 879 y en la posición 1712. El programa evidencia esto mediante dos filogenias que soportan el resultado (Figura 9), e identifica dos posibles parentales: AY466011_US_1998_RACCOON (parental menor) y AB472690.1_VN_2014_DOG (parental mayor). La región ubicada entre las posiciones 879 y 1712 se agrupa con el parental mayor, mientras que para la secuencia del resto del gen la secuencia recombinante se agrupa con su parental menor. La similitud de la secuencia recombinante con las secuencias parentales también puede verse en forma de gráfico, como muestra la Figura 10.

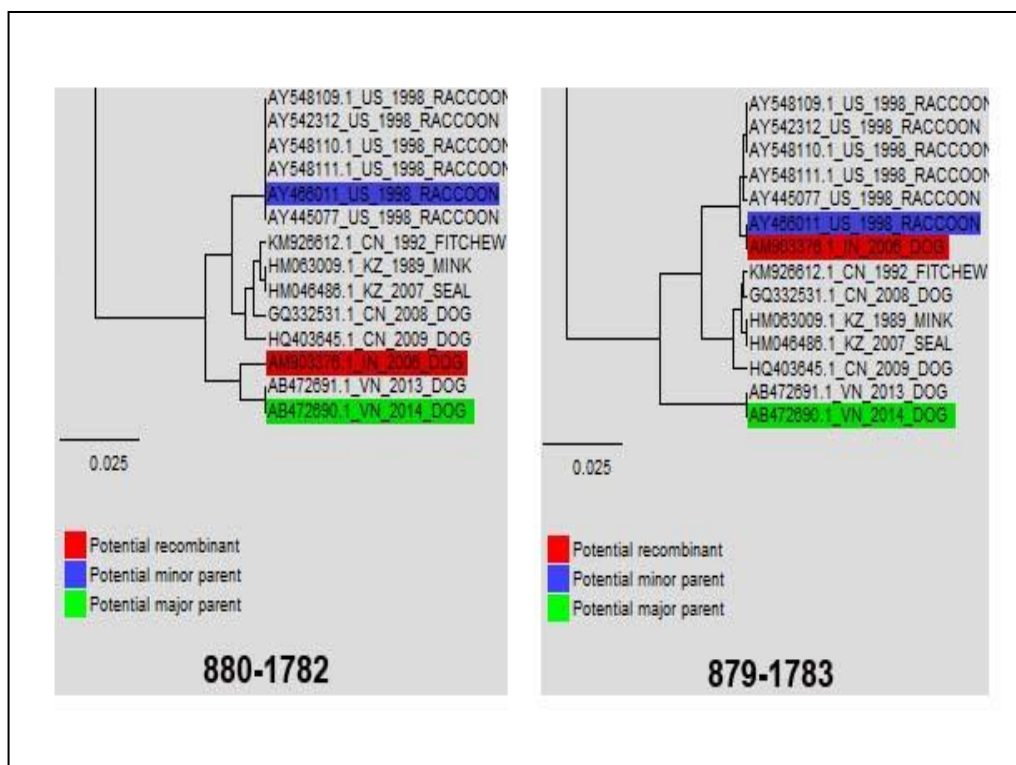


Figura 9. Filogenias obtenidas con el programa RDP4, señalando las regiones del gen H en las que cada una se basa. Se indica la secuencia recombinante (rojo) y sus parentales mayor (verde) y menor (azul).

Las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo, agrupan dentro del clado correspondiente al linaje EU1/SA1, al igual que el resto de las uruguayas caracterizadas hasta el momento y junto con cepas de Argentina, Brasil y Europa, con una probabilidad de 1. El ancestro común más reciente de este linaje tiene un origen aproximado en 1982 (1979 – 1986).

Las cepas argentinas pertenecientes al linaje SA2 comparten un ancestro común con el linaje EU2, el cual data de 1964 (1959 – 1970).

Finalmente, el valor de la tasa de sustitución obtenido (con su correspondiente 95% HPD) luego de la corrida con el programa BEAST fue de $6,95 \times 10^{-4}$ ($6,0 \times 10^{-4} - 7,2 \times 10^{-4}$) sustituciones por sitio por año.

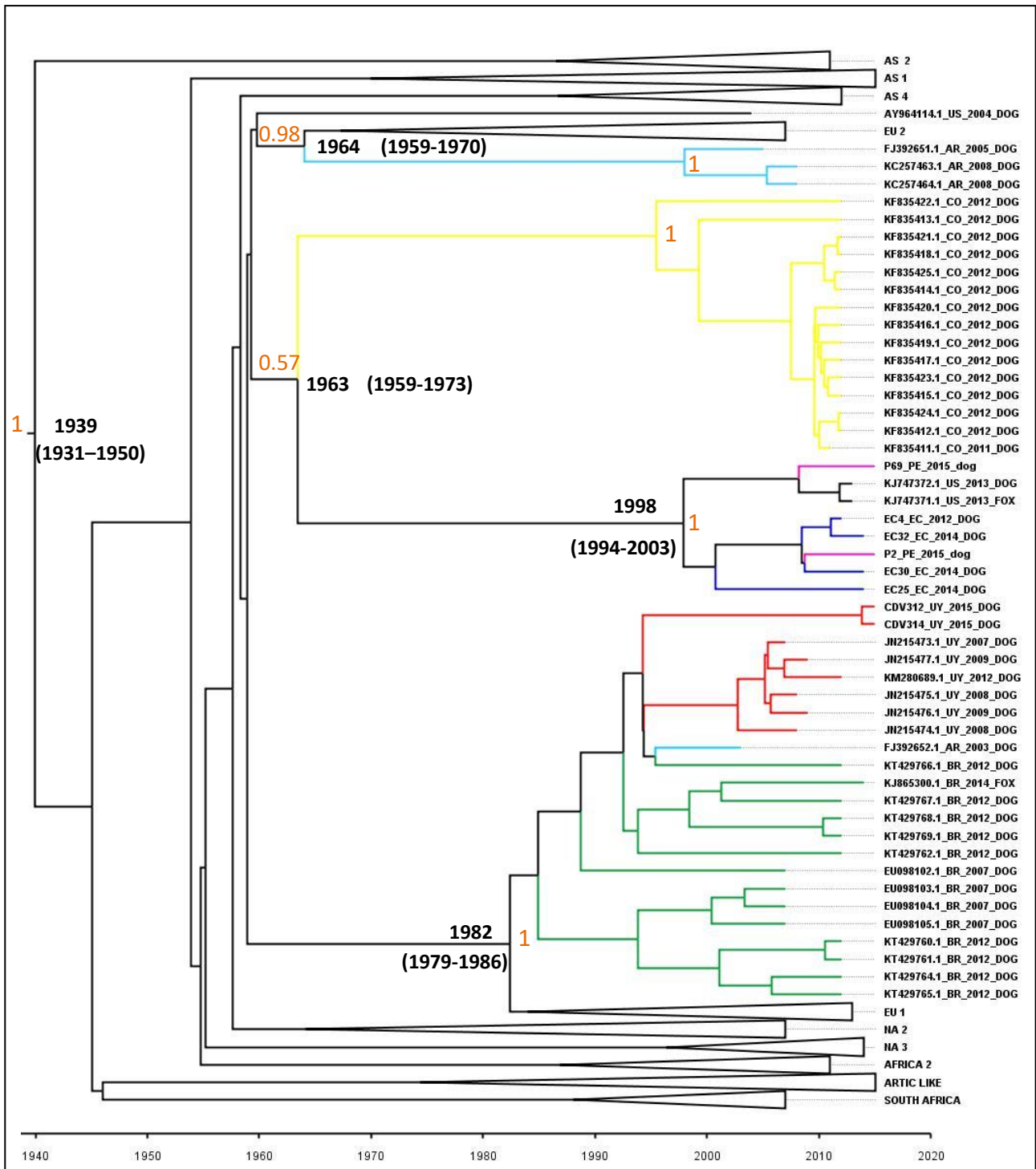


Figura 11. Filogenia de máxima credibilidad (MCC). Se indica la edad de los nodos (node age) con su respectivo 95% HPD, y en naranja la probabilidad posterior de los mismos. Los países sudamericanos se encuentran señalados con color: Argentina (celeste), Brasil (verde), Colombia (amarillo), Ecuador (azul), Perú (rosado) y Uruguay (rojo).

6. DISCUSIÓN

El virus Distemper Canino es el agente responsable de una de las enfermedades más letales en canes domésticos a nivel mundial. Su amplio rango de huésped y su alta tasa de sustitución por ser un virus con genoma de ARN, hacen que sea de suma importancia mantener un constante relevamiento de las cepas circulantes. A su vez, estudiar las relaciones filogenéticas entre las cepas reportadas hasta el momento, en función del año en que fueron aisladas, es fundamental para poder ampliar los conocimientos acerca de la controvertida historia evolutiva de CDV.

La presencia en Sudamérica de tres linajes definidos en base al criterio establecido por Martella et al. 2006 (SA1, SA2 y SA4), sumado a la posible circulación de un cuarto linaje (SA3, propuesto para cepas de Ecuador en base a una región parcial del gen H) (Sarute et al. 2014), son muestra de la gran variabilidad que CDV presenta en nuestro continente. Sin embargo, es reducido el número de países donde existen reportes del virus y más aún de caracterización genética (Panzera et al. 2014). Por lo tanto es necesario extender los estudios moleculares a nuevas regiones y/o países sudamericanos, dado que nuestro continente es propuesto como posible centro de origen del virus.

6.1 Diagnóstico molecular en muestras de Perú y Ecuador

La detección del genoma viral en 13 muestras de Perú y Ecuador (7 y 6, respectivamente), es un importante logro ya que se pudo ampliar el número de reportes moleculares de CDV en países sudamericanos. Este tipo de técnicas permitieron además llevar a cabo la caracterización en aquellas muestras donde se confirmó la presencia del virus.

6.2 Amplificación del gen H y análisis de variabilidad

Si bien se ha demostrado que el gen H es el más adecuado para realizar la caracterización de las cepas de CDV, el mismo presenta ciertas dificultades a la hora de ser amplificado. Sus bajos niveles de expresión, así como su gran extensión (1824 pb), hacen que no siempre sea posible amplificar el gen en su totalidad. Posiblemente este sea el motivo por el cual se pudo obtener la secuencia del gen completo en 8 de las 17 muestras con diagnóstico positivo analizadas durante este trabajo (2 cepas de Perú, 4 de Ecuador, y 2 de Uruguay).

En una primera instancia, se analizó la variabilidad que presentaron las cepas provenientes de un mismo país. La elevada divergencia observada para el caso de las dos cepas peruanas caracterizadas (15 cambios no sinónimos) puede justificarse si se tiene en cuenta que provienen de distintas localidades, e incluso de realidades sociales diferentes. La muestra P2 proviene de Tumba, localidad ubicada en el

noroeste del país (muy cercano a Ecuador), y pertenece a una clínica privada. Mientras tanto, la muestra P69 proviene de Lima y fue obtenida de un hospital veterinario público. No obstante, la divergencia observada refleja la gran diversidad que CDV presenta en este país y remarca la importancia de continuar con la caracterización de las cepas circulantes. Sin embargo esta elevada divergencia no fue observada para el caso de las cepas ecuatorianas, las cuales se mostraron más conservadas, a pesar de provenir de distintas localidades (8 cambios no sinónimos).

La mayor similitud a nivel aminoacídico la presentaron las dos secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo (una única diferencia en el aminoácido número 599). Sin embargo, estas cepas difieren notoriamente del resto de las caracterizadas años anteriores en nuestro país. Tal es así que de los 19 cambios no sinónimos observados, 16 de ellos corresponden a aminoácidos que hasta el momento permanecían invariantes en todas las muestras uruguayas (dato no mostrado).

Dentro de los sitios donde secuencias peruanas y ecuatorianas difieren, se encuentra el aminoácido de la posición número 530 (Figura 6). Dicho aminoácido forma parte del sitio de unión de la proteína H al receptor SLAM. Estudios sugieren que su variación está asociada al salto de huésped entre especies domésticas y salvajes (McCarthy et al. 2007; Loots et al. 2017). Las muestras EC25 y P69 presentan en esta posición un residuo de Ácido Aspártico (D), el cual según McCarthy et al. 2007 se encuentra asociado a cepas que infectan especies silvestres. Hasta el momento este residuo sólo se encontraba reportado en Sudamérica para las cepas argentinas del linaje SA2, el cual se ha visto que está estrechamente relacionado con el linaje EU2 (también denominado European Wildlife) (Calderón et al. 2007; Panzera et al. 2015).

En suma, las variaciones que presentan las cepas y la elevada divergencia observada remarcan la importancia de continuar con el relevamiento de las cepas circulantes en la región, no solamente en canes domésticos sino también en especies silvestres.

6.3 Relaciones filogenéticas entre cepas sudamericanas

Actualmente, el criterio establecido por Martella et al. 2006 para la caracterización de las cepas de CDV, establece que dos cepas pertenecen a un mismo linaje si agrupan juntas en un mismo clado filogenético y presentan una divergencia a nivel aminoacídico con respecto al gen H inferior al 4%.

La filogenia de máxima credibilidad realizada agrupa las cepas peruanas con aquellas de origen ecuatoriano y con dos secuencias de Estados Unidos, formando parte de un mismo clado con una probabilidad posterior de 1 (Figura 11). Además el análisis de distancia genética muestra que cepas peruanas y ecuatorianas presentan una divergencia

del 1,7% (Tabla 3). Por lo tanto los resultados sugieren la inclusión de estas cepas dentro de un mismo linaje.

En cuanto a las dos cepas provenientes de Estados Unidos que forman parte de este clado (KJ747371 y KJ747372), las mismas fueron reportadas por Riley et al. 2015, donde se propuso asignarlas como un nuevo linaje denominado América 4. Dado que es la primera vez que se tienen en cuenta cepas de Perú y Ecuador en un análisis del gen H completo, fue posible ver que estas agrupan con las reportadas por Riley et al. 2015. Anteriormente fue propuesto un linaje para cepas provenientes de Ecuador denominado SA3, designado en base a la región Fsp (Sarute et al. 2014), y a la secuencia parcial del gen H (Panzera et al. 2014). El análisis de estas secuencias parciales con las obtenidas en este estudio las agrupa dentro de un mismo clado (dato no mostrado). Estos resultados indican que el linaje NA4 propuesto por Riley et al. 2015, y el linaje SA3 propuesto por Sarute et al. 2014, son en realidad un mismo linaje, el cual proponemos denominarlo NA4/SA3.

De esta forma se evidenciaría que este linaje está presente no solamente en Norte América sino también en Sudamérica, abarcando un patrón geográfico mucho mayor.

Con respecto a las secuencias uruguayas del gen H obtenidas en este estudio, el análisis las ubica en el clado correspondiente al linaje EU1/SA1, al igual que el resto de las secuencias de Uruguay que nuestro grupo ha caracterizado hasta el momento, y junto con secuencias de Argentina y Brasil. Cepas sudamericanas y europeas de este linaje agrupan juntas con un valor de probabilidad posterior de 1 (Figura 10).

En resumen, se identificó la presencia en Sudamérica de 4 linajes bien definidos, sustentados por altos valores estadísticos. A los 3 linajes anteriormente identificados (SA1, SA2 y SA4), se le suma el linaje NA4/SA3, integrado por cepas de Perú, Ecuador y Estados Unidos. El mismo sería el segundo linaje sudamericano con carácter intercontinental, luego de EU1/SA1.

6.4 Análisis de calidad del set de datos

Previo a la realización del análisis de coalescencia, fue necesario evaluar la calidad del set de datos generado. Esto significa analizar si la variabilidad observada en las secuencias y el año de aislamiento se ajustan al modelo de reloj molecular estricto, o bien al de reloj molecular relajado. Para ello, el análisis de regresión realizado tiene como objetivo detectar secuencias que puedan llegar a afectar de manera negativa la confiabilidad y la validez de los resultados.

Al observar que la mayoría de las secuencias se ajustan a una regresión lineal, es de esperar que la población viral siga un comportamiento que se ajuste al modelo de reloj molecular estricto, según Rambaut, 2016. El motivo de la presencia de secuencias que caen fuera de la regresión puede deberse a la existencia de distintas presiones selectivas, a que se trate de secuencias recombinantes, o a errores cometidos en la edición de las secuencias. En cualquiera de los casos, este tipo de secuencias deben ser eliminadas del set de datos que finalmente será empleado para realizar el análisis de coalescencia.

De las 422 secuencias que conforman el set de datos original, se observaron 17 secuencias que no se ajustaron al comportamiento evolutivo que supone el modelo de reloj molecular estricto. La gran mayoría de ellas (14 secuencias) se agrupan en un mismo clado y pertenecen al linaje denominado Norte América 1 (NA1) según la filogenia de la figura 7. Este linaje estuvo considerado extinto, hasta que se reportaron casos de circulación del mismo no solo en Norte América, sino también países de Asia como Tailandia y Vietnam (Keawcharoen et al. 2005; Lednicky et al. 2004). Estudios anteriores sugieren que el linaje NA1 es el que primero se diversificó de la cepa ancestral de CDV (Panzera et al. 2015). Además en este clado se agrupan las cepas vacunales Convac, Lederle, Snyderhill y Onderstepoort (Martella et al. 2011). Esta diversificación temprana, y la presión selectiva generada producto del uso de vacunas que contienen cepas que pertenecen a este linaje, son posibles motivos por los cuales estas secuencias podrían no presentar un comportamiento evolutivo similar al resto de los linajes.

El posterior estudio en busca de recombinantes evidencia que una de las cepas perteneciente al clado de NA1, anotada bajo el nombre AM903376.1_IN_2006_DOG, se trata de un caso de recombinación. Esta secuencia ya había sido reportada como recombinante según Ke et al. 2015, lo cual sustenta el resultado obtenido en este estudio y explica el hecho de que no se ajuste a la regresión lineal.

Otras dos secuencias que caen fuera de la regresión corresponden a dos cepas de China: EU743934.1_CN_2004_DOG y EU743935.1_CN_2005_FOX. Estas secuencias son las únicas hasta el momento reportadas para el linaje denominado AS3. Este linaje fue identificado como el segundo reportado en China, luego de AS1 (Zhao et al. 2010). Existe la posibilidad de que estas cepas estén sometidas a presiones selectivas que las obliguen a tener una tasa evolutiva mayor al resto de las secuencias del set de datos (producto del entorno, ya que ambas fueron aisladas del mismo lugar). Sin embargo, también es posible que se hayan cometido errores al editar las secuencias, generando una incongruencia entre el año de aislamiento y la divergencia que presentan.

Por su parte, la secuencia JQ732170.1_CN_2005_RACOON fue la única de las que no se ajustaron que cayó por debajo de la regresión. Esto sugiere que presenta una divergencia menor a la esperada para su año de aislamiento. Dicha secuencia figura como “no publicada” en la

base de datos del GenBank, aunque se le adjudica al genotipo AS2. El análisis filogenético no la agrupa en este clado, y posiblemente esté sujeta a errores al editar la misma.

6.5 Relaciones de ancestralidad

El valor estimado del tMRCA para el set de datos utilizado fue de 76 años antes de la muestra más reciente analizada (2015), correspondiente al año 1939 con un intervalo de 95% HPD que va de 1931 a 1950 (figura 10). Si bien para el análisis de coalescencia no se tuvo en cuenta el linaje NA1, de gran importancia ya que es propuesto como linaje ancestral (Panzera et al. 2015), este resultado es similar a las estimaciones realizadas en trabajos anteriores: 1945 (Ke et al. 2015), 1919 (Fischer et al. 2016), 1886 (Panzera et al. 2015) y 1943 (Pomeroy et al. 2008). A su vez el valor del intervalo 95% HPD obtenido (19 años) es el menor reportado hasta el momento, dándole mayor robustez al valor del tMRCA.

Las cepas pertenecientes al linaje NA4/SA3, presentan un ancestro común que data en el entorno de 1998 (95% HPD 1994-2003). A su vez se determinó que este linaje presenta un ancestro común con las cepas del linaje SA4 (cepas de Colombia), el cual se diversificó alrededor de 1963 (95% HPD 1959-1973). Es la primera vez que se determina la edad de estos ancestros, ya que las secuencias norteamericanas del linaje propuesto anteriormente como América 4 no fueron tenidas en cuenta en los estudios filodinámicos previos.

Para el linaje EU1/SA1 (Argentina, Brasil, Uruguay y cepas europeas) se determinó que presentan un ancestro común que tuvo origen alrededor de 1982 (95% HPD 1979-1986). Esto reafirma los resultados recientemente publicados donde se estima el tMRCA para el linaje SA1 aproximadamente entre 1975 y 1990 (Fischer et al. 2016; Panzera et al. 2015). Por su parte, el linaje SA2 exclusivo de Argentina presenta un ancestro común con el linaje EU2, que se estimó en el entorno de 1964 (95% HPD 1959-1970). Este resultado es similar al obtenido por Panzera et al. 2015, donde se estima que estos dos linajes se diversificaron alrededor de 1950.

En suma, el análisis filodinámico revela que todas las cepas sudamericanas tienen un origen estimado entre 1964 y 1985. Si bien estas estimaciones están restringidas a la escasa información con la que se dispone de CDV en la región, es posible afirmar que los resultados volcados en este trabajo presentan un mayor sustento que los obtenidos en estudios anteriores. El set de datos utilizado es el más completo hasta el momento, en cuanto al número de cepas que contiene y a que abarca regiones nunca antes tenidas en cuenta para este tipo de análisis.

Para poder determinar eventos de coalescencia más lejanos (como puede ser el origen de una cepa ancestral de la cual deriven todas las cepas que circulan actualmente) y analizar las rutas de migración del virus, es

necesario continuar ampliando el número de cepas caracterizadas, tanto en animales domésticos como silvestres.

6.6 Tasa de sustitución

La elevada tasa evolutiva que presentan los virus de ARN (generalmente del orden de $\times 10^{-4}$), se debe principalmente a la ausencia de un mecanismo de corrección de errores por parte de la ARN polimerasa dependiente de ARN (Lauring & Andino, 2010).

El valor estimado de la tasa evolutiva de CDV tras el análisis de coalescencia se encuentra dentro del orden esperado, obteniendo un valor de $6,95 \times 10^{-4}$ (95% HPD $6,0 \times 10^{-4} - 7,2 \times 10^{-4}$) sustituciones por sitio por año. A su vez este valor es similar a los reportadas anteriormente para CDV, en cuyo caso van desde $4,8 \times 10^{-4}$ (Panzera et al. 2015) a $7,4 \times 10^{-4}$ (Ke et al. 2015) sustituciones por sitio por año. Estos valores se alejan del obtenido por Pomeroy et al. 2008, donde se estimó la tasa de sustitución en $11,65 \times 10^{-4}$ sustituciones por sitio por año. Esta discrepancia puede deberse al acotado set de datos con que se contaba en ese primer análisis.

La elevada tasa de sustitución observada, el acotado número de países sudamericanos donde se han logrado caracterizar las cepas circulantes y la gran variabilidad que presenta CDV en nuestro continente, hacen que sea de gran importancia el constante relevamiento de las cepas circulantes. Además, de esta manera se contribuye a mantener un seguimiento del curso evolutivo de CDV que puede ser de utilidad como herramienta para evaluar la efectividad de vacunas y/o comprender aspectos acerca de su historia evolutiva.

7. CONCLUSIONES

- Se logró la detección y caracterización genética de CDV en muestras (cDNA) proveniente de casos clínicos reportados en Perú y Ecuador.
- Se reportó la existencia de un nuevo linaje en Sudamérica, que incluye cepas de Perú, Ecuador y Norte América denominado NA4/SA3.
- Se amplió el número de casos caracterizados en muestras de nuestro país, aportando dos secuencias del año 2015 que si bien pertenecen al mismo linaje, presentan una elevada variabilidad con respecto a las ya reportadas para nuestro territorio en años anteriores (2007- 2012).
- Se realizó un análisis de coalescencia con el mayor set de datos hasta la fecha (405 secuencias provenientes de 23 países) y que abarcan un rango de 40 años (1975-2015).
- Se estimó el tMRCA para todas las cepas de CDV conocidas en el entorno de 1939.
- Se estimó que todas las cepas sudamericanas reportadas hasta el momento tienen un origen estimado que se ubicaría entre 1964 y 1985.
- Se estimó el valor de la tasa evolutiva de CDV en $6,95 \times 10^{-4}$ sustituciones por sitio por año.

8. PERSPECTIVAS

- Continuar con el relevamiento de la población viral de CDV en la región.
- Llevar a cabo un estudio de las rutas de migración.
- Expandir los estudios filodinámicos a otros países del continente y a huéspedes silvestres.

ANEXO I: Protocolos

Extracción de ARN, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

- Colocar en un tubo 560 μL de buffer AVL y 140 μL de orina. Incubar a temperatura ambiente (15 - 25°C) por 10 min y realizar un spin.
- Agregar 560 μL de etanol absoluto y mezclar con vortex por 15 segundos. Realizar un spin.
- Transferir el contenido del tubo a una columna QIAamp Mini y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector.
- Agregar a la columna 500 μL de Buffer AW1. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector.
- Agregar a la columna 500 μL de Buffer AW2. Centrifugar durante 3 minutos a 14000 rpm. Descartar el tubo colector
- Colocar la columna en un tubo de 1,5 μL limpio, y agregar 35 μL de agua libre de nucleasas. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Almacenar a -20°C.

Reacción de retrotranscripción (RT)

- Colocar en un tubo 10 μL de ARN y 2 μL de random primers.
- Incubar la mezcla a 70° C por 5 min, posteriormente llevar a hielo por 2 minutos.
- Adicionar 4 μL de Buffer M-MuLV, 2 μL de dNTPs y 1 μL de Ribolock RNAase inhibitor.
- Incubar a 37° C por 5 minutos.
- Agregar 1 μL de RT RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas).
- Incubar a 42° C por 60 minutos.
- Incubar a 70° C por 10 minutos.
- Almacenar a -20 ° C.

Reacción de PCR para diagnóstico

Concentraciones y volúmenes utilizados para la reacción de PCR (Sarute et al. 2011).

| Reactivo | Concentración Stock | Concentración final | Vol (μ L) /tubo |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Agua (Vf) | -- | -- | 6.2 - 4.2(10) |
| Buffer | 10x | 1x | 1 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2 mM | 0.8 |
| dNTPs | 10 mM | 0.2 mM | 0.2 |
| Dist F | 10 μ M | 0.3 μ M | 0.3 |
| Dist R | 10 μ M | 0.3 μ M | 0.3 |
| Taq DNA Polymerase (Fermentas) | 5 U/mL | 1 U/mL | 0.2 |
| ADN | -- | -- | 1 - 3 |

Protocolo de ciclado:

| Etapa | Temperatura $^{\circ}$ C | Tiempo | Ciclos |
|--------------------------|--------------------------|--------|--------|
| 1 ^{ra} | 94 | 3' | |
| Desnaturalización | | | |
| Desnaturalización | 94 | 30'' | 35 |
| Hibridación | 49 | 45'' | |
| Extensión | 72 | 45'' | |
| Extensión final | 72 | 7' | |

Reacciones de PCR para amplificación del gen H

Volúmenes y concentraciones utilizados para la amplificación de los fragmentos H1 y H2 respectivamente según Panzera et al. 2012:

| Reactivo | Concentración Stock | Concentración final | Vol (μ L) /tubo |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Agua (Vf) | -- | -- | 11.3 (20) |
| Buffer | 10x | 1x | 2 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2 mM | 1.6 |
| dNTPs | 10 mM | 0.2 mM | 0.4 |
| FE7056 | 10 μ M | 0.3 μ M | 0.6 |
| RI8094 | 10 μ M | 0.3 μ M | 0.6 |
| Taq DNA Polymerase (Fermentas) | 5 U/mL | 1 U/mL | 0.5 |
| ADN | -- | -- | 3 |

| Reactivo | Concentración Stock | Concentración final | Vol (µL) /tubo |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| Agua (Vf) | -- | -- | 11.3 (20) |
| Buffer | 10x | 1x | 2 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2 mM | 1.6 |
| dNTPs | 10 mM | 0.2 mM | 0.4 |
| FI7742 | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 |
| RE8969 | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 |
| Taq DNA Polymerase (Fermentas) | 5 U/mL | 1 U/mL | 0.5 |
| ADN | -- | -- | 3 |

Condiciones del protocolo de ciclado para ambas reacciones:

| Etapa | Temperatura °C | Tiempo | Ciclos |
|--------------------------|----------------|--------|--------|
| 1 ^{ra} | 94 | 2' | |
| Desnaturalización | | | |
| Desnaturalización | 94 | 30'' | 35 |
| Hibridación | 57 | 60'' | |
| Extensión | 72 | 90'' | |
| Extensión final | 72 | 7' | |

Purificación de productos de PCR, kit DNA Clean and Concentrator (ZYMO)

- Colocar en un tubo 15 µl de producto de PCR y 75 µl de DNA Binding Buffer. Mezclar con vortex.
- Transferir a una columna Zymo-Spin con tubo colector y centrifugar por 30 segundos. Descartar el líquido del tubo colector.
- Adicionar 200 µL de DNA Wash Buffer al columna. Centrifugar por 30 segundos. Repetir este paso.
- Agregar 30 µL de agua libre de nucleasas, e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Transferir la columna a un tubo de 1,5 µL y centrifugar por 30 segundos.
- Almacenar a -20°C

ANEXO II: Set de datos

Tabla A2. Set de datos generado. Las secuencias no submitidas en trabajos científicos se señalan con UN, y aquellas a las que no se les asignó linaje NL.

| Secuencia (N° acc_País_Año_Host) | Referencia Gen Bank | Linaje |
|---|----------------------------|---------------------|
| KP127961.1_CN_2013_mink | UN- Huang et al. | NL |
| KP127956.1_CN_2012_mink | UN -Huang et al. | NL |
| KP127964.1_CN_2014_mink | UN-Huang et al. | NL |
| KP127963.1_CN_2014_dog | UN -Huang et al. | NL |
| KP127967.1_CN_2014_dog | UN -Huang et al. | NL |
| KP127957.1_CN_2012_dog | UN -Huang et al. | NL |
| KP127955.1_CN_2012_fox | UN -Huang et al. | NL |
| KP127959.1_CN_2012_mink | UN -Huang et al. | NL |
| KP127960.1_CN_2012_mink | UN -Huang et al. | NL |
| KT001210.1_CN_2014_mink | UN -Zhao et al. | AS1 |
| KT001209.1_CN_2014_mink | UN -Zhao et al. | AS1 |
| KC494688.1_CN_2012_mink | UN -Zhao et al. | AS1 |
| JX844220.1_CN_2012_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF880682.1_CN_2013_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF880681.1_CN_2013_raccoon | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF880683.1_CN_2013_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF880680.1_CN_2013_fox | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF880679.1_CN_2013_raccoon | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KP127966.1_CN_2013_mink | UN Huang et al. | NL |
| KF880684.1_CN_2013_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KP127958.1_CN_2013_mink | UN Huang et al. | NL |
| KF880678.1_CN_2013_raccoon | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KP127962.1_CN_2013_mink | UN -Huang et al. | NL |
| KP127965.1_CN_2013_fox | UN -Huang et al. | NL |
| KP765763.1_CN_2014_fox | UN -Sun et al. | NL |
| KP738610.1_CN_2014_raccoon | UN -Shi et al. | AS1 |
| KJ569205.1_CN_2013_Raccoon | UN - Dai,X. and Chang,W. | NL |
| KJ685550.1_CN_2014_mink | UN - Dai,X. and Chang,W. | NL |
| KJ994343.1_CN_2013_raccoon | UN - Dai,X. and Chang,W. | AS1 |
| KJ579444.1_CN_2013_Arcticfox | UN - Dai,X. and Chang,W. | AS1 |
| KF880677.1_CN_2013_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| JX844221.1_CN_2012_fox | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| FJ848535.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ848531.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| JX276746.1_CN_2009_dog | UN - Yi et al. | NL |
| KJ848781.1_CN_2014_raccoon | UN - Yi et al. | AS1 |

| | | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| HQ128600.1_CN_2010_dog | UN - Yi et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HQ128599.1_CN_2010_dog | UN - Yi et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HQ128601.1_CN_2010_raccoon | Yi et al. 2012 | AS1 |
| FJ848533.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ851457.1_CN_2008_dog | UN - Xhi et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ851453.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ851451.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HQ657209.1_CN_2010_dog | Yi et al. 2012 | AS1 |
| JX844219.1_CN_2012_fox | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| JX844218.1_CN_2011_fox | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KP872502.1_CN_2010_fox | Zhao et al. 2015 | AS1 |
| KP765764.1_CN_2010_fox | Zhao et al. 2015 | AS1 |
| EU296491.1_TW_2006_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296492.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 (Panzera 2015) |
| EU296493.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 (Panzera 2015) |
| EU296490.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU325727.1_CN_2007_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| EU325725.1_CN_2006_mink | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ848534.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| EU325730.1_CN_2007_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| EU325731.1_CN_2007_mink | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ810215.1_CN_2008_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| KP793921.1_CN_2014_giantpanda | UN - Feng et al. | AS1 |
| KP677502.1_CN_2015_giant_panda | Jin et al. 2015 | AS1 |
| EF445054.1_CN_2006_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ848532.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ810214.1_CN_2008_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| KF006820.1_CN_2013_mink | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| KF006819.1_CN_2013_raccoon | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| HM448833.1_CN_2009_raccoon | UN - Yan et al | AS1 |
| HM448830.1_CN_2009_raccoon | UN - Yan et al | AS1 |
| JF343962.1_CN_2009_dog | Tan et al. 2011 | AS1 |
| HM749644.1_CN_2009_dog | Wang et al. 2010 | AS1 |
| FJ423607.1_CN_2008_dog | UN - Zhao et al. | NL |
| FJ851455.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | NL |
| HQ850147.1_CN_2008_dog | UN - Wang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HM623895.1_CN_2009_dog | UN - Wang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ423608.1_CN_2004_raccoon | UN - Zhao et al. | NL |
| JN896331.1_CN_2010_dog | Yi et al. 2013 | AS1 |
| HM623891.1_CN_2009_dog | UN - Wang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HM623893.1_CN_2009_dog | UN - Wang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| FJ423606.1_CN_2008_dog | UN - Zhao et al. | NL |
| GQ332535.1_CN_2008_dog | UN - Yi et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| GQ332533.1_CN_2008_dog | Yi et al. 2013 | AS1 (Panzera 2015) |
| EU325724.1_CN_2007_mink | Zhao et al. 2010 | AS1 |

| | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|
| HQ540293.1_CN_2006_fox | UN - Jiang et al. | NL |
| JX681125.1_CN_2006_fox | Jiang et al. 2013 | AS1 |
| FJ851450.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU325726.1_CN_2006_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ851454.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU934233.1_CN_2006_raccoon | UN - Ma et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU325723.1_CN_2007_mink | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| HM448834.1_CN_2009_fox | UN - Yan et al. | AS1 |
| EU325720.1_CN_2007_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| KC427278.1_CN_2008_mink | UN - Zhu et al. | AS1 |
| EU379560.1_CN_2007_mink | UN - Zhao et al. | AS1 |
| EU325722.1_CN_2006_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| HQ540292.1_CN_2007_dog | UN - Jiang et al. | NL |
| EU325729.1_CN_2007_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ848536.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| GQ332534.1_CN_2008_dog | Yi et al. 2012 | AS1 (Panzeria 2015) |
| EF445051.1_CN_2006_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 (Panzeria 2015) |
| EF042818.1_CN_2006_raccoon | UN - Zeng et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| GQ332530.1_CN_2008_dog | Yi et al. 2012 | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU684265.1_CN_2007_dog | UN - Meng et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ423609.1_CN_2008_fox | UN - Zhao et al. | NL |
| KJ466106.1_CN_2012_raccoon | Cheng et al. 2015 | AS1 |
| HM448832.1_CN_2009_raccoon | UN - Yan et al. | AS1 |
| HM448829.1_CN_2009_fox | UN - Yan et al. | AS1 |
| FJ851452.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ851458.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| KT119347.1_CN_2015_dog | UN - Gao et al. | NL |
| EU564813.1_CN_2007_dog | UN - Zhao et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU325728.1_CN_2007_raccoon | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| EU564812.1_CN_2007_dog | UN - Zhao et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ810213.1_CN_2008_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ409464.1_CN_2008_dog | UN - Jiang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| HM448831.1_CN_2009_fox | UN - Yan et al. | AS1 |
| FJ423604.1_CN_2008_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| FJ423605.1_CN_2008_fox | UN - Zhao et al. | NL |
| KF767692.1_CN_2013_fox | Zhao et al. 2014 | AS1 |
| FJ851456.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ535063.1_CN_2008_dog | UN - Xia et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| EU716072.1_KR_2007_dog | An et al. 2008 | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ848530.1_CN_2008_dog | UN - Zhang et al. | AS1 (Panzeria 2015) |
| FJ705235.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| FJ705236.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| FJ705233.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| EU296487.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296488.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
| EU296489.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296494.1_TW_2007_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| FJ705230.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| FJ705232.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| FJ705231.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| EU296482.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296481.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296484.1_TW_2006_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296483.1_TW_2005_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296486.1_TW_2006_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| EU296485.1_TW_2006_dog | Ke et al. 2015 | AS1 |
| FJ705234.1_TW_2008_dog | Chulakasian et al. 2010 | AS1 |
| DQ191175.1_TW_2004_dog | UN - Huang et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| AB212964.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2006 | AS1 |
| AB212963.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2006 | AS1 |
| AB286952.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2006 | AS1 |
| DQ922630.1_CN_2005_fox | UN - Zeng et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| EU325721.1_CN_2007_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 |
| AB212965.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2006 | AS1 |
| LC007975.1_JP_2011_raccoon | UN - Maeda et al. | NL |
| LC007974.1_JP_2010_fox | UN - Maeda et al. | NL |
| LC007976.1_JP_2012_raccoon | UN - Maeda et al. | NL |
| AB605890.1_JP_2008_raccoon | Kameo et al. 2012 | AS1 (Panzera 2015) |
| AB605891.1_JP_2007_raccoon | Kameo et al. 2012 | AS1 (Panzera 2015) |
| AB286951.1_JP_2005_dog | Lan et al. 2009 | AS1 |
| AB286950.1_JP_2005_dog | Lan et al. 2009 | AS1 |
| GQ332532.1_CN_2008_dog | Yi et al. 2012 | AS1 (Panzera 2015) |
| JN381191.1_CN_2011_dog | UN - Zeng et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| AB286949.1_JP_2005_dog | Lan et al. 2009 | AS1 |
| EF445053.1_CN_2004_fox | Zhao et al. 2010 | AS1 (Panzera 2015) |
| AB687720.2_JP_2008_monkey | Sakai et al. 2013 | AS1 |
| KF856711.1_CN_2006_monkey | UN - Feng et al. | NL |
| AB687721.2_JP_2008_monkey | Sakai et al. 2013 | NL |
| FJ405223.1_CN_2008_monkey | UN - Gao et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| HM852904.1_CN_2008_monkey | Qiu et al. 2011 | NL |
| FJ405224.1_CN_2008_monkey | UN - Gao et al. | AS1 (Panzera 2015) |
| AB619774.1_JP_2010_tiger | Nagao et al. 2012 | AS1 |
| AB619775.1_JP_2009_raccoon | Nagao et al. 2012 | AS1 |
| AB025271.2_JP_1991_dog | Mochizuki et al. 1999 | AS1 (Nagao 2012) |
| KM386683.1_CN_2013_Siberian_tiger | UN - Hao et al. | NL |
| JN153023.1_DE_2007_raccoon | Nikolin et al. 2012 | EU2 / Wildlife |
| JN153021.1_DE_2007_raccoon | Nikolin et al. 2012 | EU2 / Wildlife |
| JN153020.1_DE_2007_raccoon | Nikolin et al. 2012 | EU2 / Wildlife |
| JN153019.1_DE_2007_raccoon | Nikolin et al. 2012 | EU2 / Wildlife |
| JN153022.1_DE_2007_raccoon | Nikolin et al. 2012 | EU2 / Wildlife |

| | | |
|----------------------------|------------------------|---|
| GQ214374.2_AT_2006_racoon | UN - Benetka et al. | EU2 / Wildlife (Panzer 2015) |
| GQ214369.2_AT_2007_marten | UN - Benetka et al. | EU2 / Wildlife (Panzer 2015) |
| DQ228166.1_IT_2000_dog | Martella et al. 2006 | EU2 / Wildlife |
| DQ889188.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU2 / Wildlife (Panzer 2015) |
| DQ889189.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU2 / Wildlife (Panzer 2015) |
| DQ889187.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU2 / Wildlife (Panzer 2015) |
| Z47759.1_DK_1992_mink | Bolt et al. 1997 | NL |
| KC257463.1_AR_2008_dog | Sarute et al. 2013 | SA2 |
| KC257464.1_AR_2008_dog | Sarute et al. 2013 | SA2 |
| FJ392651.1_AR_2005_dog | UN - Gallo Calderon | SA2 |
| Ec32_EC_2014_dog | UN | NL |
| Ec4_EC_2012_dog | UN | NL |
| Ec30_EC_2014_dog | UN | NL |
| Ec25_EC_2014_dog | UN | NL |
| P2_PE_2015_dog | UN | NL |
| P69_PE_2015_dog | UN | NL |
| KJ747371.1_US_2013_fox | Riley et al. 2015 | AMERICA 4 (Riley 2015) |
| KJ747372.1_US_2013_dog | Riley et al. 2015 | AMERICA 4 (Riley 2015) |
| KT266736.1_MX_2014_dog | UN – Gonzalez et al. | AMERICA 3 (Riley 2015) |
| | | AMERICA 3 (Riley 2015) / EUROPEAN WILDLIFE (Kapil 2008) |
| AY964110.1_US_2004_dog | Pardo et al. 2005 | AMERICA 3 (Riley 2015) |
| AY964114.1_US_2004_dog | Pardo et al. 2005 | AMERICA 3 (Riley 2015) |
| AY443350.1_US_2000_raccoon | Lednicky et al. 2004 | NL |
| AY438597.1_US_2000_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA2 (Panzer 2015) |
| Z54156.1_US_1992_leopard | Harder et al. 1996 | NA2 (Panzer 2015) |
| Z47762.1_US_1989_dog | Bolt et al. 1997 | NA2 (Panzer 2015) |
| AY465925.1_US_2001_raccoon | Lednicky et al. 2004 | NA2 (Panzer 2015) |
| AY649446_US_2001_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA2 (Panzer 2015) |
| AY498692.1_US_2001_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA2 (Panzer 2015) |
| Z47765.1_US_1989_raccoon | Bolt et al. 1997 | NA2 (Panzer 2015) |
| Z47764.1_US_1989_javelina | Bolt et al. 1997 | NA2 (Panzer 2015) |
| KJ123771.1_US_2004_dog | UN - Puricelli et al. | NL |
| EU716337.1_US_2004_dog | UN - Lednicky et al. | NL |
| AF164967_US_1975_dog | UN - Wiederkehr et al. | NA2 (Panzer 2015) |
| Z47763.1_US_1991_leopard | Bolt et al. 1997 | NA2 (Panzer 2015) |
| AY526496.1_US_2001_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA2 (Panzer 2015) |
| KF835415.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835411.1_CO_2011_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835417.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835423.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835424.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835412.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835419.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835420.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835425.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |

| | | |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|
| KF835416.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835414.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835421.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835418.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835413.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| KF835422.1_CO_2012_dog | Espinal et al. 2014 | SA3 |
| GQ214384.2_AT_2002_dog | UN - Benetka et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| GQ214380.2_AT_2002_dog | UN - Benetka et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| GQ214376.2_AT_2002_dog | UN - Benetka et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| GQ214378.2_AT_2002_dog | UN - Benetka et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| HM563058.1_PT_2008_wolf | UN - Muller et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| HM563059.1_PT_2007_dog | UN - Muller et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| GU001863.1_ES_2005_lynx | Meli et al. 2010 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| GU001864.1_ES_2002_marten | Meli et al. 2010 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| HM563057.1_PT_1998_wolf | UN - Muller et al. | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| Z77671.1_DE_1994_dog | UN - Haas et al. | NL |
| Z77672.1_DE_1994_dog | UN - Haas et al. | NL |
| Z77673.1_DE_1994_dog | UN - Haas et al. | NL |
| Z47761.1_DK_1993_dog | Bolt et al. 1997 | NL |
| DQ494319.1_IT_2003_dog | Martella et al. 2006 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| DQ494318.1_IT_2002_dog | Martella et al. 2006 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| DQ494317.1_IT_2003_dog | Martella et al. 2006 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| FJ416338.1_DE_2008_badger | Sekulin et al. 2011 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| FJ416336.1_DE_2008_fox | Sekulin et al. 2011 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| FJ416339.1_DE_2008_fox | Sekulin et al. 2011 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| FJ416337.1_DE_2008_fox | Sekulin et al. 2011 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| HM120874.1_IT_2009_red-fox | Martella et al. 2010 | EU1 |
| JN153025.1_DE_2008_red-fox | Nikolin et al. 2012 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| JN153024.1_DE_2008_red-fox | Nikolin et al. 2012 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| DQ889177.1_HU_2004_dog | Demeter et al. 2007 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| JN215475.1_UY_2008_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| JN215473.1_UY_2007_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| JN215476.1_UY_2009_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| JN215477.1_UY_2009_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| JN215474.1_UY_2008_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| KM280689.1_UY_2012_dog | Panzera et al. 2012 | EU1 / SA1 |
| CDV312_UY_2015_dog | UN | NL |
| CDV314_UY_2015_dog | UN | NL |
| FJ392652.1_AR_2003_dog | Panzera et al. 2012 | EU1/SA1 |
| KJ865300.1_BR_2014_Cerdocyon | UN - Tozato et al. | NL |
| EU098102.1_BR_2007_dog | Negrao et al. 2013 | EUÑ1 / SA1 (Panzera 2015) |
| EU098103.1_BR_2007_dog | Negrao et al. 2013 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| EU098104.1_BR_2007_dog | Negrao et al. 2013 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| EU098105.1_BR_2007_dog | Negrao et al. 2013 | EU1 / SA1 (Panzera 2015) |
| FJ461718.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |

| | | |
|---------------------------|----------------------|----------------------------------|
| FJ461698.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461704.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461722.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461693.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461703.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461699.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461715.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461714.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461697.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461716.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461695.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461706.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461721.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461723.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461719.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461720.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461694.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461707.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461711.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461700.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461712.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461724.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461717.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461696.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461705.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| FJ461713.1_ZA_2007_dog | Woma et al. 2010 | AFRICA 1 |
| KM115534.1_IT_2013_dog | UN - Martella et al. | EU3 / Arctic like |
| KM115533.1_IT_2012_dog | UN - Martella et al. | EU3 / Arctic like |
| KM115536.1_IT_2013_dog | UN - Martella et al. | EU3 / Arctic like |
| KM115532.1_IT_2013_dog | UN - Martella et al. | EU3 / Arctic like |
| KM115535.1_IT_2013_dog | UN - Martella et al. | EU3 / Arctic like |
| KX024709.1_IT_2015_badger | UN - Marcacci et al. | NL |
| KX024708.1_IT_2015_badger | UN - Marcacci et al. | NL |
| KF914669.1_IT_2013_dog | UN - Marcacci et al. | EU3 / Arctic like |
| DQ226088.1_IT_2005_dog | Martella et al. 2006 | EU3 / Arctic like |
| DQ226087.1_IT_2004_dog | Martella et al. 2006 | EU3 / Arctic like |
| DQ889180.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889178.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889181.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889179.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889182.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889183.1_HU_2005_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889185.1_HU_2006_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889186.1_HU_2006_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |
| DQ889184.1_HU_2006_dog | Demeter et al. 2007 | EU3 / Arctic like (Panzera 2015) |

| | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| GQ214373.2_AT_2003_dog | UN - Benetka et al. | EU3 / Arctic like (Panzer 2015) |
| AY964108.1_US_2004_dog | Pardo et al. 2005 | EU3 / Arctic like (Panzer 2015) |
| AY964112.1_US_2004_dog | Pardo et al. 2005 | EU3 / Arctic like (Panzer 2015) |
| EF445052.1_CN_2005_fox | Zhao et al. 2010 | EU3 / Arctic like |
| Z47760.1_GL_1988_dog | Bolt et al. 1997 | EU3 / Arctic like |
| AY548109.1_US_1998_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| AY542312_US_1998_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| AY548110.1_US_1998_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| AY548111.1_US_1998_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| AY466011_US_1998_raccoon | Lednicky et al. 2004 | NA1 (Panzer 2015) |
| AY445077_US_1998_raccoon | UN - Lednicky et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| KM926612.1_CN_1992_fitchew | UN - Li et al. | NL |
| GQ332531.1_CN_2008_dog | Yi et al. 2012 | NA1 (Panzer 2015) |
| HM063009.1_KZ_1989_mink | UN - Zholdybayeva et al. | NL |
| HM046486.1_KZ_2007_seal | UN - Zholdybayeva et al. | NL |
| HQ403645.1_CN_2009_dog | UN - Zhou et al. | NA1 (Panzer 2015) |
| AM903376.1_IN_2006_dog | UN - Kumar et al. | NL |
| AB252718.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2007 | AS2 |
| AB252717.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2007 | AS2 |
| AB212730.1_JP_2004_dog | Lan et al. 2007 | AS2 |
| AB040766.1_JP_1999_dog | Hashimoto et al. 2001 | AS2 (Panzer 2015) |
| AB025270.1_JP_1998_dog | Mochizuki et al. 1999 | AS2 (Panzer 2015) |
| JQ327708.1_KR_2011_raccoon | UN - Cha et al. | NL |
| AB040768.1_KR_1999_dog | Hashimoto et al. 2001 | Genotype Asia/H2 group |
| AB040767.1_JP_1999_dog | Hashimoto et al. 2001 | Genotype Asia/H2 group |
| EU716075.1_KR_2007_dog | An et al. 2008 | AS2 (Panzer 2015) |
| EU716074.1_KR_1998_marten | An et al. 2008 | AS2 (Panzer 2015) |
| JQ327707.1_KR_2010_raccoon | UN - Cha et al. | NL |
| EU743935.1_CN_2005_fox | UN - Cui et al. | AS3 (Zhenwei 2015) |
| EU743934.1_CN_2004_dog | UN - Cui et al. | AS3 (Zhenwei 2015) |
| EU716073.1_KR_1997_dog | An et al. 2008 | AS2 (Panzer 2015) |
| KJ437594_CN_2011_dog | Bi et al., 2015 | AS4 |
| KJ437596_CN_2012_dog | Bi et al., 2015 | AS4 |
| KJ489381_CN_2012_dog | Bi et al., 2015 | AS4 |
| KC916716_TZ_1994_bat eared fox | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| JN812976_TZ_1994_dog | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| KC916717_TZ_1994_hyena | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| JN812975_TZ_1994_african lion | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| KC916714_TZ_2011_golden jackal | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| KC916715_TZ_2007_african wild dog | UN - Nikolin et al., 2013 | AFRICA 2 (Ke 2015) |
| KT429760.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429761.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429762.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429763.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429764.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |

| | | |
|----------------------------|--------------------------|-----------|
| KT429765.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429766.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429767.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429768.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429769.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KT429762.1_BR_2012_dog | UN - Silva et al., 2015 | NL |
| KU983523.1_CN_2014_dog | UN - Li et al., 2016 | NL |
| KU162860.1_CN_2015_ferret | UN - Wang et al., 2015 | NL |
| KX347928.1_CN_2015_dog | UN - Liu et al., 2016 | NL |
| KU521344_CN_2014_mink | UN - Bi et al., 2016 | NL |
| KR185351.1_CN_2014_raccoon | UN - Zhao et al., 2015 | ASIA 1 |
| KJ728667.1_CN_2013_fox | UN - Dai et al., 2014 | ASIA 1 |
| KU521345.1_CN_2014_mink | UN - Bi et al., 2016 | NL |
| KU521343.1_CN_2014_mink | UN - Bi et al., 2016 | NL |
| KU030831.1_CN_2015_dog | UN - Liu et al., 2015 | NL |
| KU030833.1_CN_2015_dog | UN - Liu et al., 2015 | NL |
| AB472691.1_VN_2013_dog | Lan et al. 2009 | AS1 |
| AB472690.1_VN_2014_dog | Lan et al. 2009 | AS1 |
| KX499865.1_CN_2015_fox | UN Sun et al. 2016 | NL |
| KU983522.1_CN_2014_dog | UN Li,C. and Sun,D. 2016 | NL |
| JQ732172.1_CN_2010_dog | UN Liu et al. 2012 | AS1 |
| KJ489383.1_CN_2012_dog | UN, Bi et al. 2014 | NL |
| JQ732174.1_CN_2010_raccoon | UN, Liu et al. 2012 | AS1 |
| KJ437595.1_CN_2012_dog | UN, Bi et al. 2014 | NL |
| KJ437593.1_CN_2012_dog | UN, Bi et al. 2014 | NL |
| KU521346.1_CN_2015_dog | UN, Bi et al. 2016 | NL |
| D85753.1_JP_1992_dog | Iwatsuki et al. 1997 | NL |
| D85754.1_JP_1993_dog | Iwatsuki et al. 1997 | NL |
| D85755.1_JP_1994_dog | Iwatsuki et al. 1997 | NL |
| JQ732170.1_CN_2005_raccoon | UN - Liu et al., 2012 | ASIA 2 |
| KF430371.1_DK_2007_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430372.1_DK_2007_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430373.1_DK_2007_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430374.1_DK_2004_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430363.1_DK_2011_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430362.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430357.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430359.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430361.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430348.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430353.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430337.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430355.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430351.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430343.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |

| | | |
|----------------------------|------------------------|-----------|
| KF430339.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430356.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430349.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430354.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430352.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430365.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430338.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430347.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430360.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430367.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430350.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430344.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430345.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430341.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430342.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430340.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430364.1_DK_2012_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430358.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430346.1_DK_2012_fox | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430377.1_DK_2013_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430366.1_DK_2013_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430368.1_DK_2013_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430369.1_DK_2013_raccoon | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430370.1_DK_2013_mink | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430376.1_DK_2013_raccoon | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KF430375.1_DK_2013_ferret | Trebbier et al. 2014 | EU1 / SA1 |
| KM923900.1_CN_2008_monkey | UN - Feng et al., 2014 | NL |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Jamett, G. 2009: Role of domestic dogs in diseases of significance to humans and wildlife health in central Chile. PhD thesis, The University of Edinburgh, London, United Kingdom.
- Afonso CL, Amarasinghe GK, Banyai K, et al. 2016. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. *Arch. Virol.* 161: 2351–2360.
- Appel MJ, 1987. Canine Distemper Virus. In: Appel MJ, editor. Virus infection of Carnivores. *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, pp. 133-159.
- Appel MJ, Pearce-Kelling S, Summers BA. 1992. Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. *J Vet Diagnostic Investig.* 4:258–263.
- Appel MJ, 1999. Forty years of canine vaccination. *Adv. Vet. Med.* 41: 309-324.
- Appel MJ & Summers BA, 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* 44: 187-191.
- Appel MJG & Summers BA, 1999. Canine Distemper: Current Status. *Advances.*
- Bellini WJ et al. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of virology*, 53(3), pp.908–19.
- Blixenkrone-Møller M, Pedersen IR, Appel MJ, et al. 1991. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet. Diagnostic Investig.* 3:3–9.
- Blixenkrone-Møller M, Sharma B, Varsanyi TM, et al. 1992. Sequence analysis of the genes encoding the nucleocapsid protein and phosphoprotein (P) of phocid distemper virus, and editing of the P gene transcript. *Journal of General Virology.* 73: 885-893.
- Bolt G, Jensen TD, Gottschalck E, et al. 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *Journal of General Virology.* 78: 367-372.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, et al. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol* 10(4): e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537
- Calderón MG, Remorini P, Periolo O, et al. 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet Microbiol.* 15;125 (3-4):341- 9.
- Carré H, 1905. Sur la maladie des jeunes chiens. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 140 (689– 690), 1489–1491.
- Castilho JG, Brandao PE, Carnieli P, et al. 2007 Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 59:654–659.
- Cattaneo R. et al. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 56(5), pp.759–64.

- Chapuis G, 1995. Control of canine distemper. *Vet. Microbiol.* 44: 351-358.
- Decaro N, Camero M, Greco G, et al. 2004. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 27(2):177-81.
- Deem SL et al. 2000. Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(4), pp.441–451.
- Demeter Z, Lakatos B, Palade EA, et al. 2007. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122: 258-269.
- Demeter Z, Palade EA, Hornyák A, et al. 2009. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet Microbiol.* 142: 420–426
- Dong XY, Li WH, Zhu JL, et al. 2014. Detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus by a duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Iranian Journal of Vet Res.* 16(2): 172-175.
- Drummond AJ, Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Elia G, Decaro N, Martella V, et al. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 136:171–6.
- Ferreyra H, Calderón MG, Marticorena D, et al. 2009. Canine distemper infection in Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, 45 (4), 1158 – 1162.
- Fiorello CV, Noss AJ, Deem SL, et al. 2007. Serosurvey of Small Carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases.* 43 (3), 551 – 557.
- Fischer CDV, Ikuta N, Canal CW, et al. 2013 Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. *Journal of Virological Methods.* 194: 39– 45.
- Frisk AL et al. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology.* 37(11), pp.3634–43.
- Furtado MM, Domingues J, Scheffer KC, et al. 2013. Serosurvey for selected viral infections in free-ranging Jaguars (*Panthera onca*) and domestic carnivores in Brazilian Cerrado, Pantanal, and Amazon. *Journal of Wildlife Diseases.* 49 (3): 510 – 521.
- Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrao FJ, et al. 2004. Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(4): 480-48.
- Gemma T, Watari T, Akiyama K, et al. 1996. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J Vet Med Sci.* 58(6):547-50.
- Gillespie JH, Rickard CG. 1956. Encephalitis in dogs produced by distemper virus. *Am. J. Vet. Res.* 17:103–108.

- Griffin DE, 2007. Measles Virus. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1552–1585.
- Haig DA, 1956. Canine distemper—immunisation with avianised virus, Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 27: 19–53.
- Harder TC, Kenter M, Vos H, et al. 1996. Canine distemper virus from diseased large felids: bio-logical properties and phylogenetic relationships. *Journal of General Virology.* 77: 397-405.
- Harder TC, Osterhaus AD, 1997. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbio.*; 5:120–124.
- Headley SA, Santos TR, Bodnar L, et al. 2015. Molecular detection and phylogenetic relationship of wild-type strains of canine distemper virus in symptomatic dogs from Uberlandia, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 67(6): 1510-1518.
- Hoyland JA, Dixon JA, Berry JL, et al. 2003. A comparison of in situ hybridisation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. *Journal of Virological Methods.* 109: 253-259.
- Jenner E, 1809. Observations on the Distemper in Dogs. *Med Chir Trans,* 1:265-270.
- Ke GM, Ho CH, Chiang MJ, et al. 2015. Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Vet Res.* 11 (1): 164.
- Keawcharoen J, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, et al., 2004. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol.* 105: 137-142.
- Kim Y, Cho K, Youn H, et al. 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2: 59-63.
- Kolakofsky D, 2016. Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology,* 498: 94–98.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS, 2006. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology,* 344:30–7.
- Lamb RA, Parks GD, 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins, 5th Ed.
- Luring AS, Andino R, 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 6 (7), e1001005.
- Lednicky JA, Dubach J, Kinsel MJ et al. 2004. Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Viol. J.* 1–2, 1–14.
- Loots AK, Mitchell E, Dalton DL, 2017. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. *Journal of General Virology.* 98:311–321.
- McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ, 2007. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc. Biol. Sci.* 274: 3165–3174.
- Martella V, Cirone F, Elia G, et al. 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116: 301-309.

- Martella V, Elia G, Buonavoglia C, 2008. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 38:787–797.
- Martella V, Bianchi A, Bertoletti I, et al. 2010. Canine Distemper Epizootic among Red Foxes, Italy, 2009. *Emerging infectious diseases*. 16 (12):2009.
- Martin D, Murrel B, Golden M, et al. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* doi: 10.1093/ve/vev003
- Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J, 2016. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Vet. Res.* 12:78.
- Nava AF, Cullen LJ, Sana DA et al. 2009. First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth*. Dec; 5(4):513-8.
- Negrão FJ, Gardinali NR, Headley SA, et al. 2013. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil, *Genetics and Molecular Research*. 12: 2549-2555.
- Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y et al. 2001. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 75: 4399-4401.
- Origi FC, Sattler U, Pilo P, and Waldvogel AS, 2013. Fatal combined infection with canine distemper virus and othopoxvirus in a group of Asian Marmots (*Marmota caudata*). *Vet Pathology* 50(5): 914-920.
- Panzera Y, et al. 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research*. 163: 401–404.
- Panzera Y, Sarute N, Carrau L, et al. 2014. Genetic Diversity of Canine Distemper Virus in South America. *British Journal of Virology*. 1(2): 48-53.
- Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB, 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J Clin Microbiol*. 43(10):5009-17.
- Pomeroy LW, Bjørnstad ON, Holmes EC, 2008. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. *J. Mol. Evol.* 66: 98–106.
- Posada D, 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.
- Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, et al. 2012. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *J Virol* 86: 10207–10210.
- Qiu W, Zheng Y, Zhang S, et al., 2011. Canine distemper outbreak in Rhesus Monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases*. 17(8): 1541-1543.
- Radtanakantikanon A, Keawcharoen J, Charoensival N, et al., 2013. Genotypic lineages and restriction fragment length polymorphism of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol.* (166): 76-83.
- Rambaut, Lam, de Carvalho & Pybus, 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evolution* 2: vew007 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ve/vew007>
- Riley MC and Wilkes RP. 2015. Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States

associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Virology*. Dec 18(12): 219.

- Rockborn G. 1959. An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. *Nature*, 184 (Suppl 11):822.
- Sarute N, et al. 2011. Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del virus Distemper Canino en Uruguay. *Veterinaria*, 47(598): 7–13.
- Sarute N, Calderón MG, Pérez R, et al. 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), p.e63595.
- Sarute N, Pérez R, Aldaz J, et al. 2014. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus genes* Jun. 48(3):474-8.
- Sarute N, et al. 2014. First genome sequence of a canine distemper virus strain from South America. *Genome announcements*, 2(5).
- Scagliarini A, dal Pozzo F, Gallina L, et al. 2007. TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. *Vet Res Commun*. 31:261–263.
- Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. 2003. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol*. 77:9943–9950.
- Shin YJ, Cho KO, Cho HS, et al. 2004. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust Vet J*. 82:83–86.
- Stern LB, et al. 1995. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *Journal of virology*. 69(3):1661–8.
- Sun Z, Li A, Ye H, et al. 2010. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus Monkeys in China. *Vet Microbiol*. 141(3-4): 374-378.
- Swati, Dipak Deka, Sanjeev, et al. 2015. Isolation and phylogenetic characterization of Canine distemper virus from India. *Virus disease* 26(3):133-140.
- Tamura K, et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12): 2725–9.
- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y, 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J. Virol*. 75: 5842-5850.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, 2000. Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 7, 1167.
- Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9, e1002947.

- Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, et al. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol.* 75: 6418-6427.
- Whetstone CA, Bunn TO, Gourlay JA, 1981. Canine distemper virus titration in ferret peritoneal macrophages. *Cornell Vet.* 71:144–148.
- Willi B, Spiri AM, Meli ML, et al. 2015. Clinical and molecular investigation of a canine distemper outbreak and vector-borne infections in a group of rescue dogs imported from Hungary to Switzerland. *BMC Vet Res.* Jul 16;11:154.
- Woma TY, van Vuuren M. 2009. Isolation of canine distemper viruses from domestic dogs in South Africa using Vero.DogSLAM cells and its application to diagnosis. *African J Microbiol.* 3: 111–118.
- Woma TY, van Vuuren M, Bosman AM, et al. 2010. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143: 126-32.
- Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y, et al. 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fus-cata*). *Vet Microbiol.* 20(3):193–205.
- Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, et al., 2010. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Vet. Microbiol.* 140: 34-42.