

**ESTABLECIMIENTO DE LA DIVERSIDAD GLOBAL,
PATRONES DE DISTRIBUCIÓN ESPACIO - TEMPORAL Y
ANÁLISIS FILOGENÉTICO BASADO EN EL GEN VP2 DE
LONGITUD COMPLETA DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS
DE LA LENGUA AZUL**

Ing. Rubén Alexander Maldonado Orbe

**Tutor
Rommel Montúfar PhD**

**Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Facultad de Ingeniería
Maestría en Biología Computacional
Quito, Ecuador
2023**

Tabla de contenido

<i>Resumen</i>	3
1. Introducción	4
1.1. Planteamiento del problema	4
2. Revisión de la literatura	6
2.1. Enfermedad y serotipos	6
2.2. Distribución geográfica.....	7
2.3. Estructura del virus	8
2.4. Filogenia	10
<i>Metodología</i>	11
2.5. Obtención de datos	11
2.6. Análisis filogenético preliminar	11
2.7. Reconstrucción de la historia demográfica del virus	12
2.8. Análisis filogeográfico.....	12
3. Resultados	14
3.1. Análisis de datos	14
3.2. Análisis Filogenético	15
3.3. Historia Demográfica y Filogeográfica	19
4. Discusión	28
5. Conclusiones y Recomendaciones	30
6. Referencias	31
7. Anexos	34

Resumen

La lengua azul (BT) es una enfermedad viral infecciosa, transmitida por vectores, la cual afecta a la especie bovina, caprina, ovina, entre otra. La distribución mundial de la enfermedad está determinada en por la distribución de los vectores competentes, de esta manera se han identificado al veinte y ocho (28) serotipos diferentes. Los brotes del virus de la lengua azul (BTV) son responsables de pérdidas económicas mundiales, así en los países en los que la lengua azul es endémica, el impacto se centra principalmente en la pérdida de comercio debido a las restricciones y a los costes de vigilancia, pruebas sanitarias y vacunación, por lo que comprender la epidemiología evolutiva global del virus es fundamental para diseñar programas de vigilancia y control. En el presente estudio se evaluaron modelos filodinámicos para cuantificar las características evolutivas, los orígenes espaciotemporales y la dinámica de transmisión del virus en todo el mundo. De esta manera, se obtuvieron secuencias completas del gen S2 de la proteína viral VP2 del BTV reportadas en GenBank y aisladas en varios países en el mundo entre 1900 y 2021, se realizó la inferencia de árboles filogenéticos basada en la máxima verosimilitud, se evaluaron diferentes modelos de reloj molecular estimando sus verosimilitudes marginales utilizando simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), las priorizaciones paramétricas seleccionadas incluyeron el tamaño de población constante, mientras que las priorizaciones no paramétricas evaluadas fueron la Bayesiana Skygrid y la GMRF Bayesiana Skyride, finalmente se evaluó la convergencia de los parámetros posteriores y la fuerza de la señal temporal para así inferir los orígenes geográficos globales del BTV y sus significativas rutas de dispersión entre países infectados utilizando métodos de reconstrucción ancestral de estados discretos. Los modelos apuntaron a Sudáfrica y Australia, como países ancestrales probables para la aparición y dispersión del virus de lengua azul por todo el mundo hace aproximadamente 500 años. Sin embargo, la mayor diversificación y dispersión del BTV coincidió con con el inicio del comercio transcontinental de ganado a partir de la década de 1850. El presente análisis descubrió un notable círculo de rutas de dispersión significativas e intensas entre varios países en diferentes continentes lo cual puede en muchos casos estar relacionada a la abundancia de múltiples vectores. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos exhaustivos sobre la epidemiología mundial del BTV, que posteriormente pueden utilizarse para orientar estrategias de control y vigilancia en todo el mundo.

Introducción

1.1. Planteamiento del problema

La lengua azul (BT) es una enfermedad viral infecciosa, principalmente transmitida por vectores, que afecta a rumiantes salvajes y domésticos como ovejas, cabras, vacas, búfalos, ciervos y la mayoría de las especies de antílopes africanos, y a camélidos como huéspedes vertebrados. El virus se transmite principalmente entre hospedadores vertebrados susceptibles mediante especies competentes de mosquitos *Culicoides*, y la distribución mundial de la enfermedad está determinada en gran medida por la distribución de los vectores competentes. Se han identificado al menos veintiséis (26) serotipos diferentes y la capacidad de cada cepa para causar la enfermedad varía considerablemente, los serotipos están determinados principalmente por las diferencias en la proteína de la cápside externa VP2, que induce anticuerpos neutralizantes en los animales infectados (Caporale et al., 2014). La infección por el virus de la lengua azul (BTV) es inaparente en la gran mayoría de los animales, pero puede causar una enfermedad mortal en una proporción de ovejas, ciervos y rumiantes salvajes infectados. En las ovejas muy susceptibles, la morbilidad puede llegar al 100%, mientras que la mortalidad oscila entre el 2 - 30%, aunque puede llegar al 70%.

La infección del ganado bovino suele ser subclínica, con la excepción de la infección por el serotipo 8 (BTV-8). El ganado es especialmente importante en la epidemiología de la enfermedad debido a la viremia prolongada que se produce tras la infección. Cuando se manifiestan, los signos clínicos de la lengua azul son atribuibles principalmente a un aumento de la permeabilidad vascular e incluyen fiebre, hiperemia y congestión, edema facial y hemorragias, erosión de las membranas mucosas, coronitis y laminitis, y hemorragias pleurales y pericárdicas (World Organisation for Animal Health, 2021).

Debido a las afectaciones que ocasiona en distintas especies la lengua azul puede ser una infección costosa por varias razones. La enfermedad clínica en las ovejas puede ser grave, provocando muertes, pérdida de peso y rotura de la lana. En algunos países en los que la enfermedad es endémica, la vacunación supone un coste recurrente. Sin embargo, el mayor coste de la lengua azul es para los países infectados que exportan animales vivos, germoplasma y algunos productos animales como el suero fetal de ternera. En este caso, la presencia del virus de la lengua azul, aunque sea subclínica, provoca pérdidas comerciales debido a las restricciones en el origen de los animales y a los costes de las pruebas sanitarias (Monath, 2019). La lengua azul es una enfermedad de graves consecuencias económicas, lo que la convierte en una enfermedad de importancia para la Organización Mundial de

Sanidad Animal (OMSA). Se ha estimado un impacto mundial de 3.000 millones de dólares. La presencia de enfermedades endémicas puede restringir el comercio de ganado y productos afines, cuyo coste indirecto se ha calculado en 125 millones de dólares anuales. Así, las pérdidas en ganado pueden ser visibles, como la reducción de la producción de leche o el aumento de la mortalidad, la pérdida de peso, la reducción de la tasa de fertilidad, el aborto, la reducción de la eficiencia de la producción de carne y la muerte, mientras que, las pérdidas indirectas incluyen los costes de las vacunas o la pérdida de ingresos, por ejemplo, por las restricciones comerciales que limitan el acceso a los mercados de mayor valor (Rushton & Lyons, 2015). En los países en los que la lengua azul es endémica, el impacto se centra principalmente en la pérdida de comercio debido a las restricciones y a los costes de vigilancia, pruebas sanitarias y vacunación (World Organisation for Animal Health, 2021).

El reordenamiento, la deriva genética y los efectos fundadores durante el paso secuencial de BTV entre vectores y hospederos contribuyen a la diversificación y evolución independiente de cada segmento del BTV que codifican para proteínas del virus. Se han llevado a cabo análisis filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos completas o parciales de diferentes segmentos para determinar las relaciones genéticas y/u orígenes geográficos de diferentes aislamientos (Nomikou et al., 2009).

La información recopilada a través de diagnóstico e investigación de la enfermedad han contribuido a la disponibilidad de datos en bases biológicas, mediante los cuales es posible disponer de información sobre los serotipos del virus y sus relaciones filogenéticas a nivel global, esto permite establecer nuevas estrategias de vigilancia y control en cada país a fin de que contribuyan a la erradicación de la enfermedad. El establecimiento de medidas basadas en resultados genéticos y epidemiológicos podrían adoptarse en diferentes situaciones de enfermedad, las acciones reales dependerán de las circunstancias de los brotes y de si se ha producido en una temporada de vectores activos.

Revisión de la literatura

2.1. Enfermedad y serotipos

La lengua azul fue descrita por primera vez en 1905 entre ovejas en Sudáfrica y es ocasionada por el virus de la lengua azul (BTV), un arbovirus que se replica en rumiantes silvestres y domésticos causando síntomas que van de subclínicos a mortales. A principios del siglo XX, la lengua azul se extendió en África junto con la introducción de razas de ovejas no autóctonas que son muy susceptibles a la enfermedad. Históricamente se ha distribuido entre los 40° Norte y los 35° Sur, en climas subtropicales y tropicales, en casi todos los continentes, es decir, América, África, Australia y Asia, debido a la distribución de su vector, el mosquito picador (*Culicoides spp*) causando pérdidas mundiales que se estimaron en 1996 en 3.000 millones de dólares al año (Schwartz-Cornil et al., 2008). En 1933 se diagnosticó por primera vez en el ganado vacuno y, debido a que sus signos clínicos eran similares a los de la fiebre aftosa, se denominó pseudoaftosa (Sperlova & Zendulkova, 2009). Desde 1998, al menos ocho cepas distintas de BTV de seis serotipos diferentes (tipos 1, 2, 4, 8, 9, 16) han invadido Europa, incluyendo muchos países del norte de Europa (serotipo 8) (Schwartz-Cornil et al., 2008).

Según (Schwartz-Cornil et al., 2008) en agosto de 2006, el serotipo 8 se detectó inicialmente en los Países Bajos, antes de extenderse a Alemania, Bélgica y el noreste de Francia, generando un total de 2.297 casos de lengua azul en el norte de Europa durante 2006. Después de la temporada de invierno, la infección viral mostró un fuerte recrudecimiento y amplió drásticamente su distribución europea en 2007, dando lugar a 40 931 casos en total. En Francia, por ejemplo, la propagación del BTV-8 afectó a 60 departamentos de un total de 95, con 15.253 casos notificados, salvando únicamente las zonas del sur del país. También reapareció en 2007 en Bélgica (6661 casos), Alemania (11 487 casos) y los Países Bajos (5798 casos), y se extendió a Luxemburgo (1315 casos), Dinamarca (1 caso), Suiza (5 casos), la República Checa (1 caso) y el Reino Unido (65 casos). Durante 2007, se importó a Italia un número significativo de animales infectados por el BTV-8. En enero de 2008, se detectaron animales infectados por el BTV-8 en España, y el virus entró en Irlanda del Norte, a través de la importación de animales infectados desde Europa continental, pero fue rápidamente eliminado mediante el sacrificio de todos los animales infectados y en contacto con ellos. En 2006, se detectó el BTV-1 en el norte de África y en Cerdeña y, en 2007, se encontró inicialmente en España y luego en el País Vasco francés.

A nivel mundial, 28 serotipos distintos de VLA han sido reportados. Cualquiera de estos serotipos tiene el potencial de causar la enfermedad en rumiantes. Las variaciones en la secuencia del genoma

Seg-2 y su proteína traducida VP2 determinan los serotipos y también parcialmente por Seg-6 y su proteína traducida VP5. En contraste con los 28 serotipos de BTV ya existentes, se informó de que los serotipos BTV-25, BTV-26 y BTV-27 no son patógenos, se transmiten por contacto directo (también BTV-28), no se pueden cultivar en líneas celulares de Culicoides, se encuentran exclusivamente en pequeños rumiantes y se consideran serotipos "atípicos" (Saminathan et al., 2020).

2.2. Distribución geográfica

Históricamente, se ha determinado que la distribución del virus se encuentra principalmente en climas templados y tropicales (latitudes entre 40°N y 35°S), así la distribución está ligada a vectores competentes. Sin embargo, estos límites han sido superados en regiones de Asia, Norteamérica y Europa, donde la infección se ha detectado hasta los 50°N (Acevedo et al., 2020). Alrededor del mundo, la población ganadera que se encuentran en los trópicos y subtropicos se considera infectada por el virus. Los brotes de la enfermedad de la lengua azul aparecieron en Oriente Medio, Asia, el sur de Europa y Estados Unidos a principios de la década de 1940 y 1950 dando lugar a su posterior descripción como "enfermedad emergente" (Roy, 2008). En Australia apareció por primera vez en 1977 y en Sudamérica se encontró en la década de 1980 (Sperlova & Zendulkova, 2009). Recientemente, se han producido incursiones más allá de la distribución geográfica normal del virus, así en Estados Unidos y países de Europa se ha observado que las cepas se han desplazado entre regiones geográficas y se han adaptado a diferentes especies de mosquitos. Estas adaptaciones han llevado al descubrimiento de nuevos serotipos de virulencia imprevisible junto con patología clínica que han desencadenado en la lengua azul como una enfermedad preocupante (USDA, 2016).

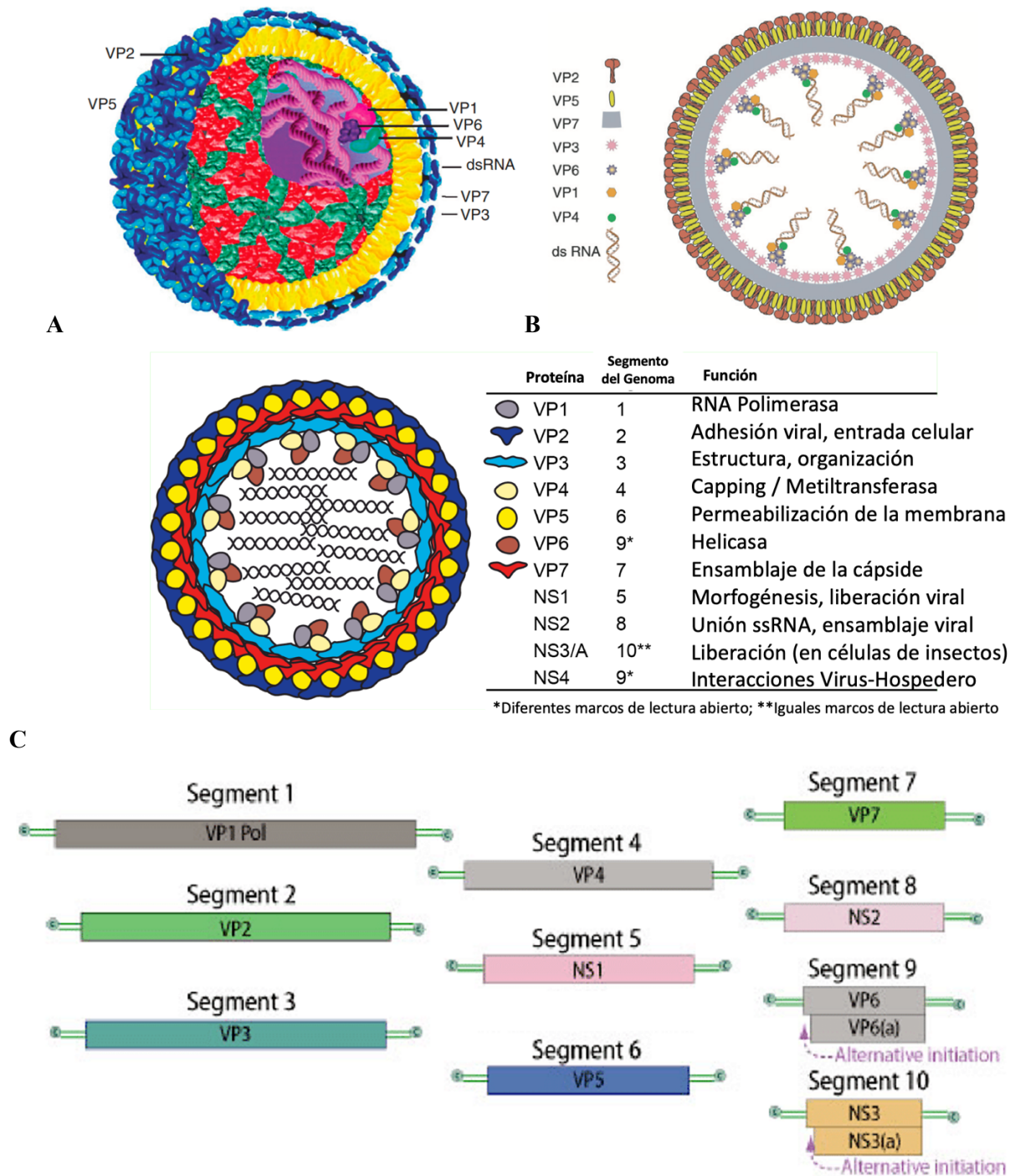
En Sudamérica se han notificado evidencias serológicas de la presencia del virus en todos los países, excepto en Uruguay (que está cerca de la zona seronegativa de Argentina) y Bolivia. En Chile se detectaron bovinos y ovinos seropositivos en 1985, pero la información reciente indica que la infección por el virus no está presente. En Argentina se realizaron dos estudios serológicos para determinar la distribución de la infección por el BTV, en el cual los resultados entre 1995 y 1996 revelaron que bovinos de ciertas zonas poseían anticuerpos. Así en 1998 se realizó un segundo estudio serológico, obteniéndose datos de prevalencia de anticuerpos en el país. Por otra parte, datos similares se obtuvieron en Brasil, donde se comprobó que existían animales positivos (Lager, 2004). Además, a pesar de la escasa información serológica obtenida a inicios de 1980 se determinó que el virus estaba presente en toda la región norte de América del Sur (Ecuador, Colombia, Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana, Suriname y Guyana Francesa) (Acevedo et al., 2020).

Es evidente la cantidad de información que existe en otros continentes en relación con el continente americano, por esta razón, es importante mejorar la labor de vigilancia y seguimiento en la región y una de las vías para obtener esta información es el análisis de relaciones evolutivas de la enfermedad a través de los datos disponibles en bases biológicas.

2.3. Estructura del virus

El virus de la lengua azul pertenece al género *Orbivirus* dentro de la familia *Reoviridae*. Es un virus de 55 nm de diámetro que no presenta envoltura y está formado por una cápside constituida por 32 capsómeros. El virus presenta un genoma de aproximadamente 19 200 pares de bases formado por diez segmentos de ARN de doble cadena (ARNds) (Schwartz-Cornil et al., 2008) donde cada segmento del gen codifica para al menos una proteína (Maclachlan et al., 2015). Los viriones del BTV son estructuras icosaédricas complejas compuestas de 12 proteínas, de las cuales siete son proteínas estructurales (VP1 a VP7) las que han sido codificadas en orden de tamaño decreciente, y cinco corresponden a proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3A y NS4)(Anderson, 2014). Los viriones completos son relativamente frágiles y la infectividad del BTV se pierde fácilmente en condiciones ligeramente ácidas. La cápside externa consta de dos proteínas principales (VP2 y VP5) que constituyen aproximadamente el 40% del contenido proteico total del virus. Además, se compone de dos proteínas principales (VP7 y VP3), tres proteínas menores (VP1, VP4 y VP6) y el genoma dsRNA (Roy, 2008) (Figura 1).

La proteína VP2 es la proteína que interactúa principalmente con el medio ambiental del virus. En este sentido, la respuesta inmunitaria humoral del huésped impone una elevada presión de selección antigénica sobre la VP2. Los amplios datos de secuenciación y los perfiles inmunológicos han demostrado que VP2 es muy variable y se divide en los distintos serotipos, así las alineaciones de secuencias de VP2 demuestran regiones de mayor variación de secuencia, lo que sugiere que regiones específicas de la proteína están sujetas a una mayor presión de selección (Patel & Roy, 2014). En este sentido, la VP2 determina el serotipo, es responsable de la unión al receptor, de la hemaglutinación y de provocar la inmunidad específica del huésped (Sperlova & Zendulkova, 2009).



D
Figura 1. **A.** Diagrama esquemático del virus de la lengua azul (BTV) mostrando las posiciones y organizaciones estructurales de los componentes del virus (Roy, 2008). **B.** Esquema representativo de las proteínas estructurales del BTV y de los segmentos de dsRNA (Schwartz-Cornil et al., 2008). **C.** Esquema del virión del BTV, que incluye las proteínas VP1-VP7 rodeando 10 segmentos genómicos de dsARN. El segmento del genoma que codifica para cada proteína se indica en el gráfico, al igual que las funciones principales de las proteínas individuales (Anderson, 2014). **D.** Estructura del genoma del virus de lengua azul. Segmentos del virus que codifican para proteínas estructurales y no estructurales (Dondona, 2013).

2.4. Filogenia

Las comparaciones filogenéticas de la VP2 de las cepas de referencia muestran una perfecta correlación entre la variación de la secuencia del segmento 2 del genoma (Seg-2), que codifica la VP2, y el serotipo del virus. Las secuencias de segmento 2 de los serotipos se agrupan en diez linajes evolutivos distintos, identificados como nucleotipos A-J. Las secuencias de nucleótidos de VP2 entre los serotipos han demostrado una variación del 29% (BTV-8 y BTV-18) al 59% (BTV-16 y BTV-22). La secuenciación y las comparaciones filogenéticas de la VP2 también han revelado variaciones significativas entre las cepas del mismo serotipo que procedían de diferentes zonas geográficas, con un máximo de 30% de variación en la secuencia de nucleótidos dentro del mismo serotipo. Estas variaciones geográficas definen los topotipos VP2 oriental y occidental dentro de los serotipos individuales. Se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos dirigidos a Seg-2, que se pueden utilizar en ensayos de RT-PCR para facilitar la tipificación de los aislados de campo y de vacuna del BTV de cada serotipo y topotipo. A pesar de la variabilidad general de la secuencia, algunas características de la VP2 parecen conservarse entre los serotipos, incluyendo el perfil de hidrofobicidad, la distribución de la carga y la posición de ciertos residuos de cisteína (Schwartz-Cornil et al., 2008).

Metodología

2.5. Obtención de datos

Las secuencias completas del gen S2 de la proteína viral VP2 del BTV reportadas en GenBank y aisladas en varios países en el mundo entre 1900 y 2021, fueron obtenidas a través de la Base de datos *Recursos de Análisis de Patógenos Virales (ViPR)*. Los metadatos asociados, incluyeron: nombre del serotipo, acceso GenBank, longitud de la secuencia, fecha de colecta y país. Inicialmente fueron obtenidas 1076 secuencias, a continuación, se utilizó el año de colecta para estimar los tiempos de divergencia, por tanto, se excluyeron de los análisis las secuencias correspondientes a fechas de colecta repetidas [$n = 461$ (42,84%)] y secuencias sin información temporal [$n = 131$ (12,17%)]. Además, las secuencias de cepas de vacuna [$n = 6$ (0,56%)] fueron excluidas del conjunto de datos. De esta manera, los datos finales comprendieron de 478 secuencias para los segmentos del gen S2 recogidas en 56 países del mundo.

2.6. Análisis filogenético preliminar

Los análisis filogenéticos preliminares se realizaron mediante NGPhylogeny. Se utilizó el alineamiento múltiple MUSCLE para alinear y confirmar el marco de lectura, así la longitud del alineamiento final de las secuencias fue de 2880 pb. Por otra parte, se identificó la distribución geográfica de los serotipos mediante un mapa creado en MapChart. Además, se identificaron regiones dentro de alineaciones de secuencias múltiples adecuadas para la inferencia filogenética mediante BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy). A continuación, se realizó la Inferencia de árboles filogenéticos basada en la máxima verosimilitud con selección inteligente de modelos (PhyML+SMS). Por último, se realizó la representación del árbol en formato Newick.

Se utilizó el modelo de sustitución GTR+G+I implementado en RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) al ser un modelo utilizado habitualmente en filogenética molecular para estimar distancias evolutivas e inferir la historia evolutiva de secuencias de ADN. Este modelo permite tanto la variación de tasas entre sitios como la presencia de sitios invariantes, lo que permite mejorar la precisión de la inferencia filogenética (Saitou & Nei, 1987). De esta manera el modelo fue usado para evaluar la topología del árbol filogenético. Finalmente, se utilizó TempEst para identificar secuencias con divergencia genética y fechas de colecta incongruentes.

2.7. Reconstrucción de la historia demográfica del virus

Se dedujeron árboles filogenéticos escalados en el tiempo utilizando BEAST 1.10.4 y se evaluaron diferentes modelos de reloj (estricto, relajado no correlacionado y local aleatorio), estimando sus verosimilitudes marginales utilizando simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 10 millones de ciclos muestreando cada 1000 estados. De esta manera, los modelos relajados de reloj molecular fueron usados para reconstruir la historia demográfica del BTV e inferir los tiempos de divergencia dentro de un marco analítico bayesiano.

Las priorizaciones paramétricas seleccionadas incluyeron el tamaño de población constante, mientras que las priorizaciones no paramétricas evaluadas fueron la Bayesiana Skygrid y la GMRF Bayesiana Skyride. A partir del modelo y priorización seleccionados se utilizaron simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 22 millones de ciclos muestreando cada 1000 estados para inferir los parámetros evolutivos posteriores de la filogenia de BTV bajo el modelo. Además, se combinaron simulaciones MCMC con un total de 445 millones de ciclos utilizando LogCombiner para lograr la convergencia del modelo.

La convergencia de los parámetros posteriores se evaluó mediante el tamaño efectivo de la muestra ($ESS > 200$) utilizando Tracer versión 1.7.2. Se realizó el análisis Skyride Gaussian Markov random field Skyride (GMRF) a fin de evaluar la diversidad genética relativa a través del gen VP2 del virus de la lengua azul. Además, se utilizó TreeAnnotator versión 2.7.1 para descartar el primer 10% de las muestras de cada cadena MCMC resumiendo la densidad de probabilidad posterior resultante como un árbol de máxima credibilidad cladística (MCC), eliminando así los árboles con resultados no significativos. Se utilizó Tracer versión 1.7.2 para generar gráficos de las estimaciones de la población efectiva a lo largo del tiempo a partir del árbol coalescente bayesiano. Se utilizó TemEst para evaluar la fuerza de la señal temporal del árbol.

2.8. Análisis filogeográfico

Se infirieron los orígenes geográficos globales del BTV y sus significativas rutas de dispersión entre países infectados utilizando métodos de reconstrucción ancestral de estados discretos implementados en BEAST. Para evaluar el impacto de la resolución de rasgos espaciales en la historia filogeográfica inferida, se buscó modelar la difusión espaciotemporal del BTV entre países. Se utilizó el método de selección de variables de búsqueda estocástica bayesiana (BSSVS), implementado en BEAST, para identificar rutas migratorias significativas y su direccionalidad entre países.

Para el análisis filogeográfico a nivel de país, se agregaron los países con pocas secuencias con sus países vecinos para formar regiones geográficas distintas, con el fin de reducir el impacto de las inferencias posteriores sesgadas resultantes de rasgos discretos con muy pocas secuencias. Sin embargo, los países con un número suficientemente grande número de secuencias y brotes notables de BTV se asignaron como un rasgo discreto espacial independiente.

Se utilizó la herramienta FigTree v1.4.4 para resumir las probabilidades posteriores del estado raíz (RSPP) de los rasgos discretos en los nodos internos de los árboles MCC inferidos a partir de los modelos filodinámicos seleccionados.

Resultados

3.1. Análisis de datos

Un total de 1076 secuencias del gen S2 de la proteína viral VP2 del BTV han sido reportadas en 56 países entre 1900 y 2021. La mayoría de secuencias fueron reportadas en Francia [$n = 170$ (15.80%)], India [$n = 154$ (14,31%)] y Sudáfrica [$n = 120$ (11,15%)]. El serotipo 8 [BTV-8, $n = 196$ (18,22%)] y serotipo 1 [BTV-1, $n = 156$ (14,60%)] son los principales serotipos reportados, los cuales están distribuidos en 14 y 19 países, respectivamente (Figura 2). La mayor diversidad ha sido observada en Sudáfrica, siendo el país con la mayor cantidad de serotipos presentes, con un total de 24 serotipos reportados, seguido de Francia con 19 serotipos (Figura 3).

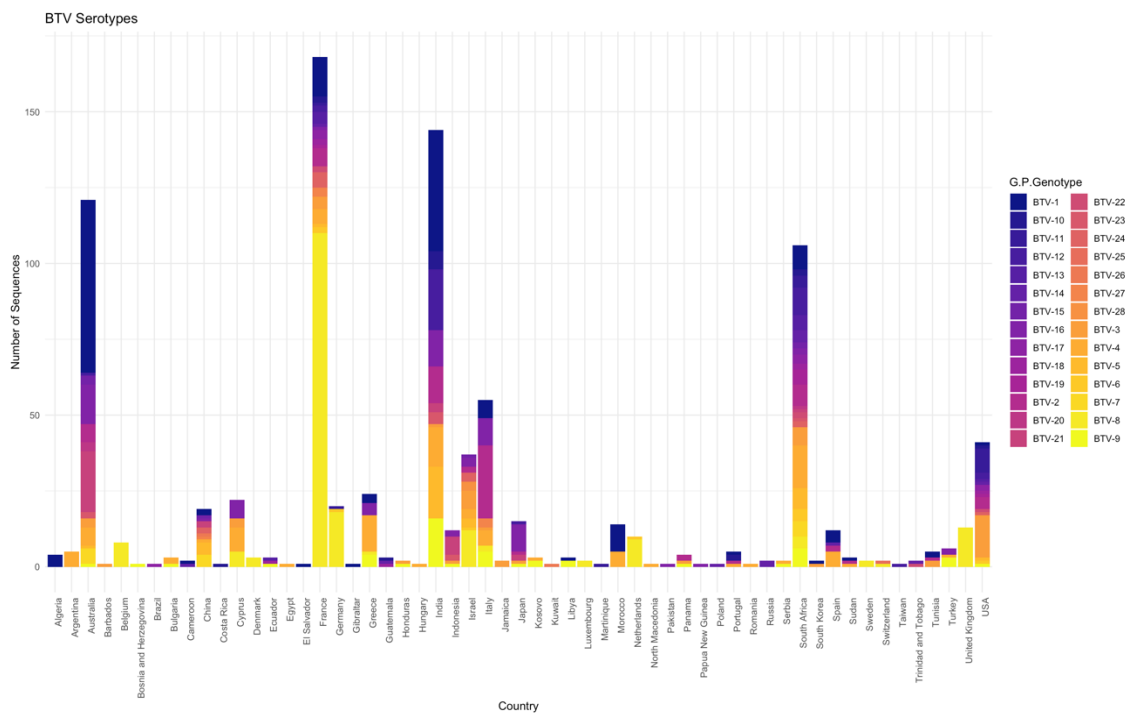


Figura 2. Número de secuencias del virus de la lengua azul (BTV). El gráfico de barras presenta el número de secuencias de cada serotipo del BTV reportados por país. Entre 1900 y 2021 se aislaron un total de 28 serotipos procedentes de 56 países. El serotipo 8 (BTV-8) fue el más reportado, seguido del serotipo 1 (BTV-1).

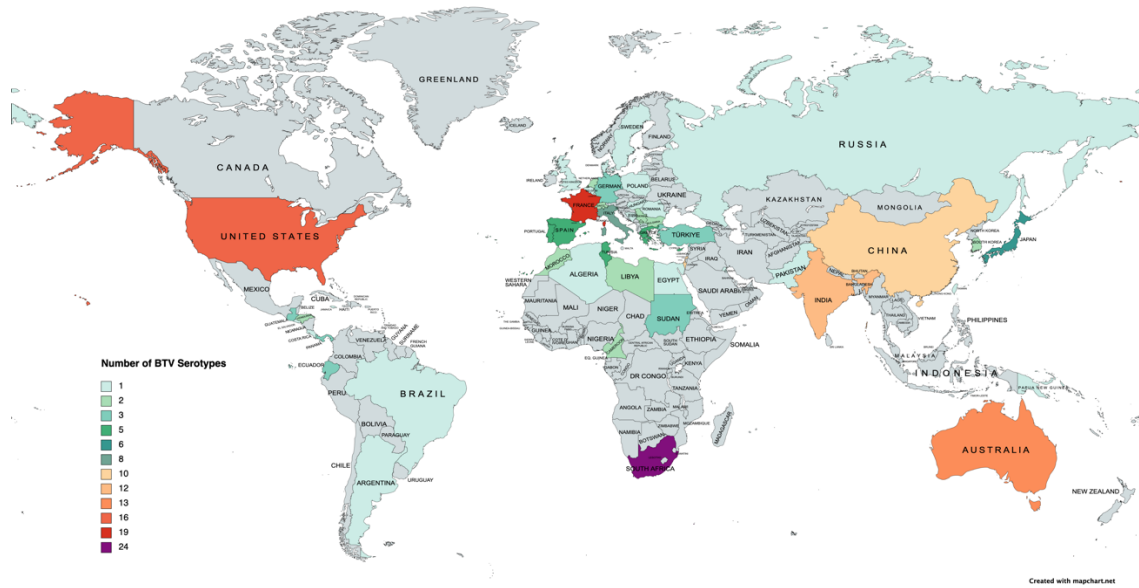


Figura 3. Mapa mundial que indica el número de serotipos de BTV reportados por país; las zonas morada, roja, naranja y verde muestran la diversidad de serotipos desde alta hasta baja, respectivamente.

3.2. Análisis Filogenético

El árbol filogenético del gen S2 de la proteína VP2 del BTV mostró identidad de secuencia nucleotídica (Figura 4) correspondiente a cada serotipo en distintos países en el mundo (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de serotipos del virus de lengua azul (BTV) por país

País	Serotipo BTV																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Algeria	X																											
Argentina				X																								
Australia	X	X	X	X	X		X		X			X			X	X				X	X		X					
Barbados			X																									
Belgium								X																				
Bosnia and Herzegovina									X																			
Brazil																	X											
Bulgaria				X					X																			
Cameroon	X												X															
China	X			X	X		X								X	X				X			X			X	X	
Costa Rica										X																		
Cyprus			X	X				X								X												
Denmark								X																				
Ecuador									X				X						X									
Egypt				X																								
El Salvador	X																											
France	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X		X	X	X	X			X		X				X

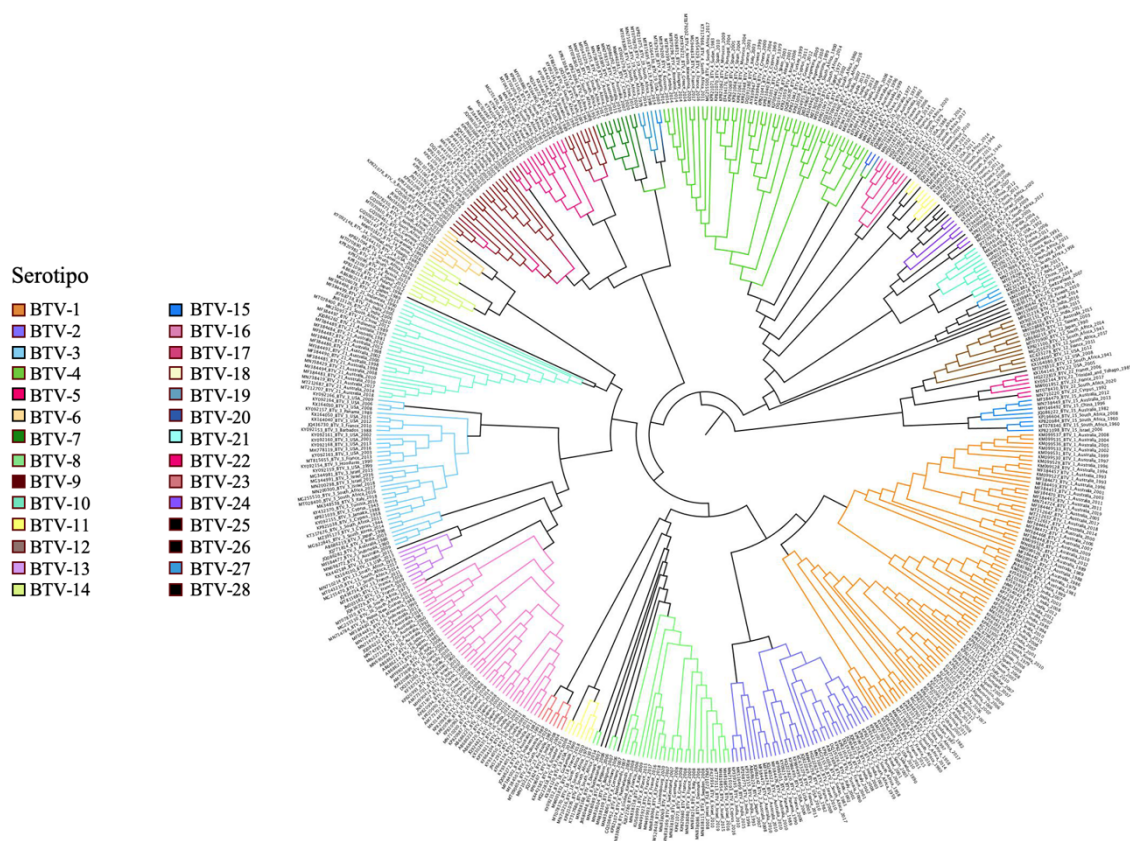


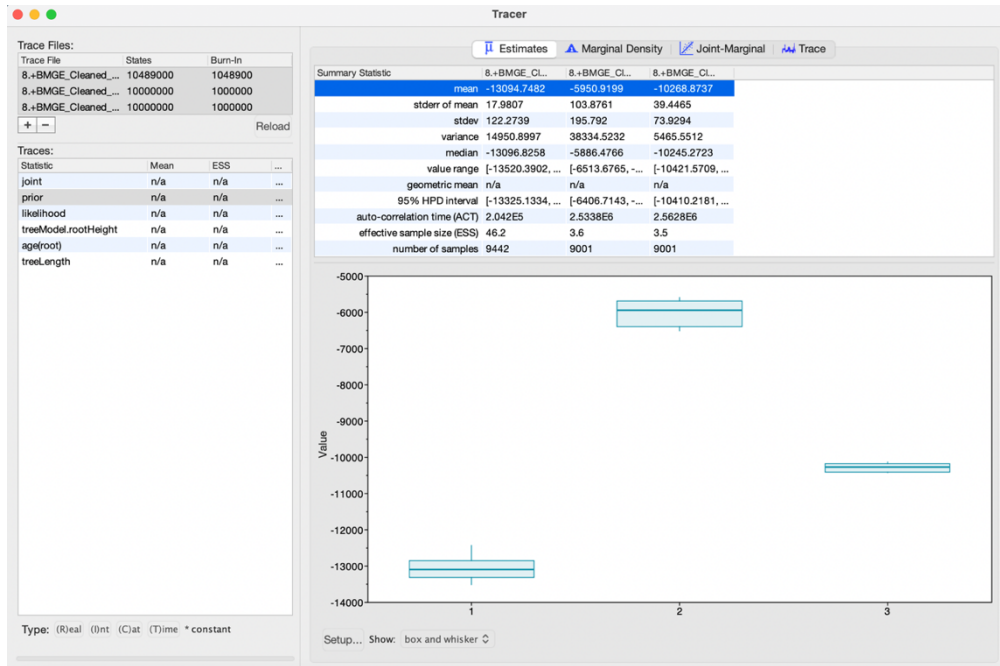
Figura 4. Árbol filogenético circular de las secuencias del gen S2 de la proteína VP2 del virus de la lengua azul entre 1900 y 2021 en todo el mundo. Las secuencias virales están codificadas por colores según el serotipo. El modelo de sustitución de mejor ajuste utilizado para el análisis filogenético fue GTR+G+I. El árbol se generó con el método de máxima verosimilitud mediante NGPhylogeny. El árbol filogenético fue editado con el software FigTree v1.4.4.

Para determinar la dinámica evolutiva del BTV, primero se determinó si los conjuntos de datos individuales contenían suficiente estructura temporal para emprender análisis detallados del reloj molecular. De esta manera, se evaluaron los modelos de reloj estricto, relajado no correlacionado y local aleatorio, estimando sus verosimilitudes marginales utilizando simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 10 millones de ciclos. Además, se consideraron las priorizaciones paramétricas que incluyeron el tamaño de población constante y las priorizaciones coalescentes no paramétricas Bayesianas Skygrid y GMRF Bayesianas Skyride.

Los resultados de la evaluación para 10 millones de ciclos de los modelos de reloj indicaron que el modelo estricto fue el mejor con un ESS de 46.2 en comparación con los modelos relajado no correlacionado y local aleatorio que presentaron un ESS igual a 3.6 y 3.5

respectivamente. Por otra parte, la evaluación de las priorizaciones no paramétricas indicó que la priorización Bayesiana GMRF Skyride fue la mejor para una evaluación de 10 millones de ciclos con un ESS igual a 66.1 en comparación con el ESS de la priorización Skygrid la cual fue de 4.6 (Figura 5).

A



B

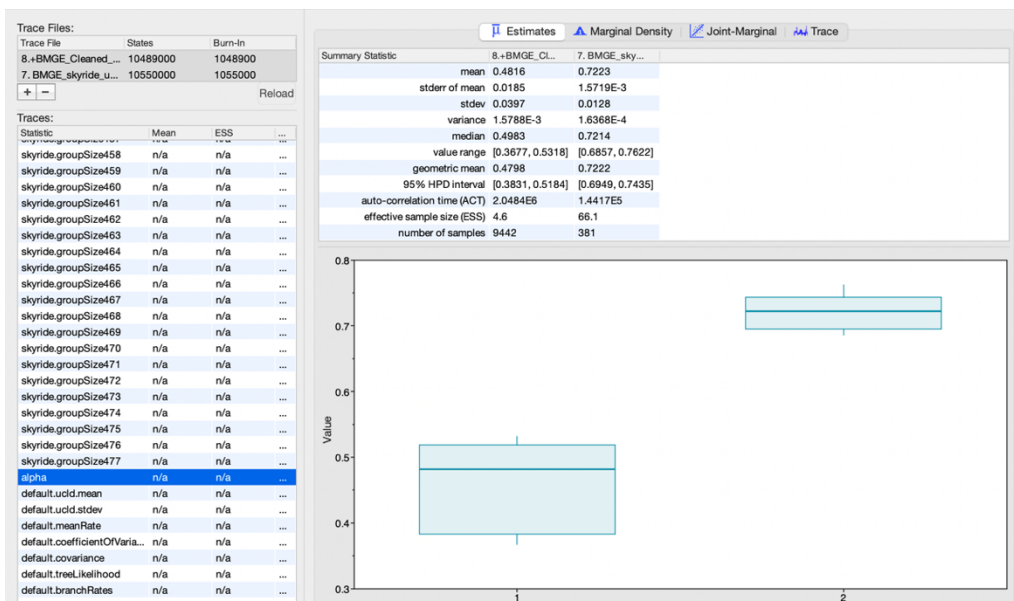


Figura 5. A. Comparación de modelos de reloj molecular para la evaluación de la estructura temporal previo al análisis filogeográfico. **B.** Comparación de modelos no paramétricos para la evaluación de la estructura temporal previo al análisis filogeográfico.

Simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 22 millones de ciclos se combinaron hasta un total de 445 millones de ciclos utilizando LogCombiner lográndose la convergencia del modelo al presentar valores ESS > 200 (Figura 6). Los valores para el tamaño efectivo de la muestra indicaron que las cadenas MCMC exploraron adecuadamente la distribución posterior y por lo tanto las estimaciones son fiables.

A

Trace File	States	Burn-In
BTVlogcombiner	445975000	44597500

Statistic	Mean	ESS	...
joint	-2.016E5	14182	R
prior	-15604.258	15957	R
likelihood	-1.86E5	6169	R
treeModel.rootHeight	494.821	106	R
age(root)	1526.179	106	R
treeLength	29995.456	125	R
skyride.precision	0.149	2294	R
skyride.logPopSize1	7.229	352	R
skyride.logPopSize2	7.247	294	R
skyride.logPopSize3	7.252	303	R
skyride.logPopSize4	7.26	299	R
skyride.logPopSize5	7.274	287	R
skyride.logPopSize6	7.291	281	R
skyride.logPopSize7	7.309	284	R
skyride.logPopSize8	7.321	287	R
skyride.logPopSize9	7.334	289	R
skyride.logPopSize10	7.351	289	R
skyride.logPopSize11	7.37	294	R
skyride.logPopSize12	7.389	301	R
skyride.logPopSize13	7.405	303	R
skyride.logPopSize14	7.422	310	R
skyride.logPopSize15	7.438	310	R
skyride.logPopSize16	7.456	312	R
skyride.logPopSize17	7.472	314	R
skyride.logPopSize18	7.486	327	R
skyride.logPopSize19	7.499	328	R
skyride.logPopSize20	7.513	332	R
skyride.logPopSize21	7.53	334	R
skyride.logPopSize22	7.543	334	R

Type: (R)real (I)nt (C)at (T)ime * constant

B

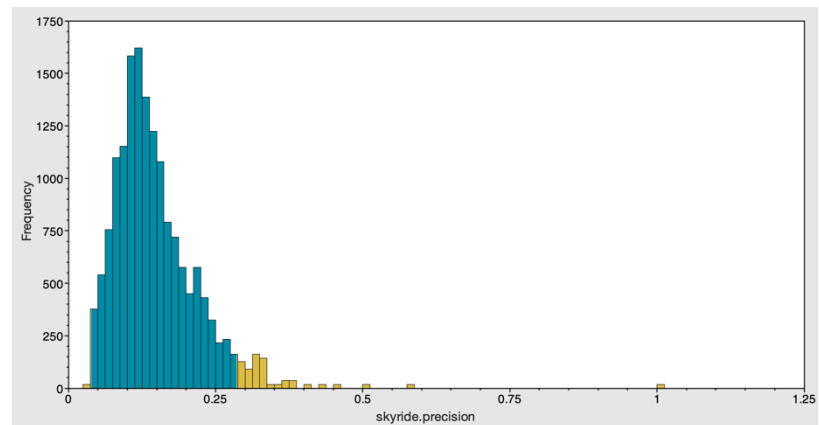


Figura 6. Simulaciones Bayesianas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 445 millones de ciclos **A.** Tamaño efectivo de la muestra (ESS) de los parámetros analizados mediante la priorización Bayesiana Skyride **B.** Trazados de las cadenas MCMC que indican la progresión de las estimaciones de los parámetros a lo largo de la ejecución.

3.3. Historia Demográfica y Filogeográfica

La reconstrucción demográfica del BTV a través del tiempo reveló que el tiempo aproximado de divergencia del virus se dedujo hace unos 300 años (Figura 7) utilizando el gen VP2. El segmento génico mostró un aumento de la diversidad genética a principios del año 1800, incrementando dicha diversidad hasta el año 1970, año a partir del cual se observa un declive hasta la actualidad.

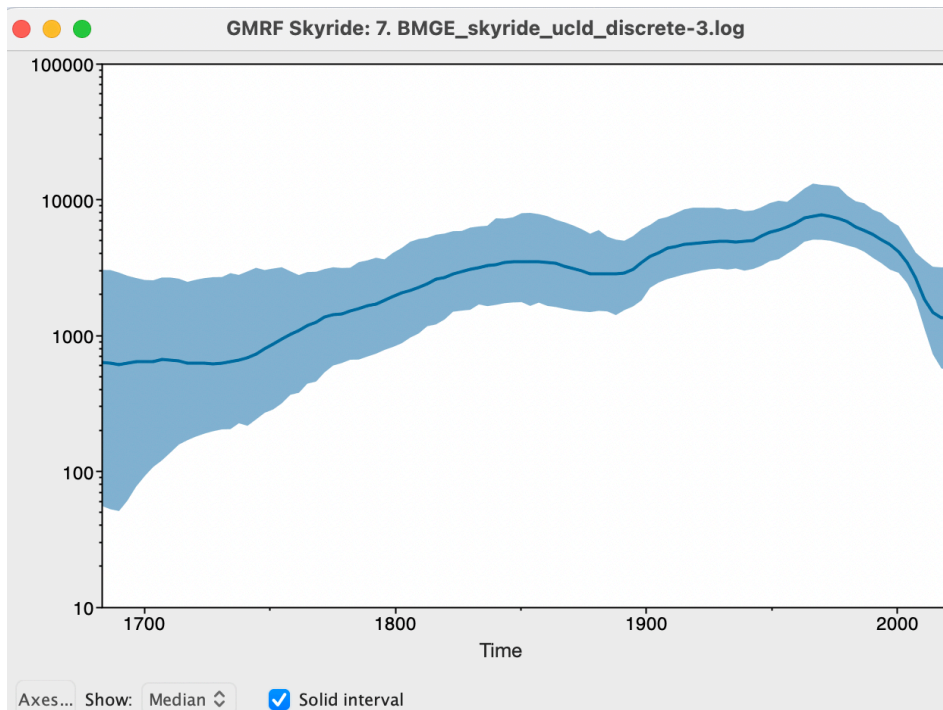


Figura 7. Gráfico del análisis Skyride Gaussian Markov random field Skyride (GMRF) de la diversidad genética relativa a través del gen VP2 del virus de la lengua azul entre 1682 y 2021. La estimación de la mediana posterior se indica mediante la línea azul oscura, y las áreas sombreadas en azul claro corresponden al 95% de la densidad posterior alta (HPD). Además, se representa el momento estimado en el que la diversidad genética relativa pasó de una tasa de crecimiento lenta a una rápida. El gráfico es una ampliación detallada de la diversidad genética de las secuencias incluidas en los análisis BEAST.

La priorización coalescente no paramétrica Bayesiana Skyride fue usada para capturar la dinámica al ser una población compleja. El modelo Skyride fue usado al tener datos informativos sobre la historia de la población, así al contar con puntos fijos pre-especificados en tiempo el modelo permite estimar el tamaño de la población para múltiples genealogías a la vez. Mediante TemEst se evaluó la fuerza de la señal temporal del árbol obtenido posterior a la densidad de probabilidad resultante como un árbol de máxima credibilidad cladística (MCC) obteniéndose un valor de 1 tanto para el R^2 como para el coeficiente de correlación (Figura 8). La reconstrucción demográfica del BTV a través del tiempo reveló que el tiempo aproximado de divergencia del virus se remota alrededor de 190 años utilizando el segmento del gen S2. El segmento genético mostró un notable incremento genético a partir del año 1900s, presentándose gran diversidad genética alrededor del año 1990 (Figura 9).

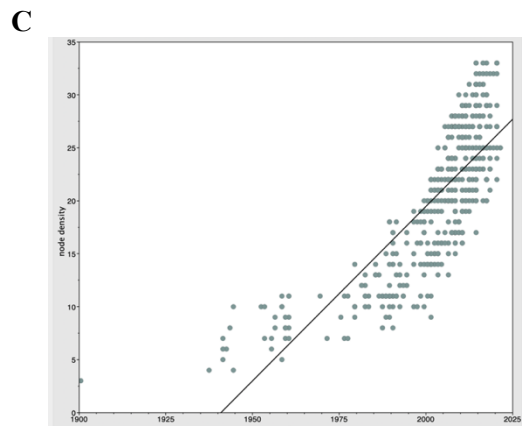
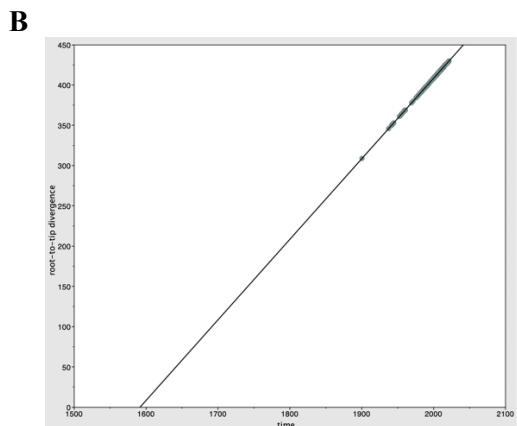
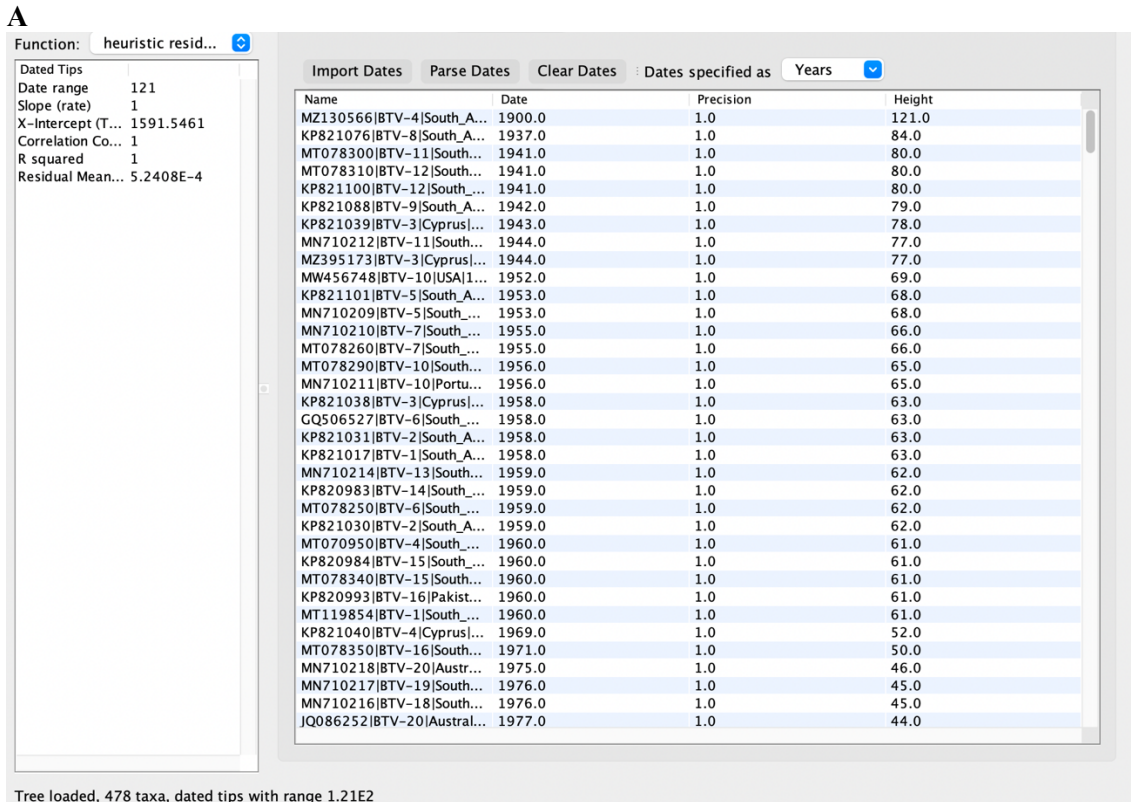


Figura 8. Evaluación de la señal temporal del árbol obtenido mediante priorización bayesiana **A.** Raíz más adecuada. Función de media cuadrática residual heurística. Ajuste lineal representado mediante el valor de R^2 y coeficiente de correlación. **B.** Gráfico de divergencia de estado raíz-punta (root-to-tip) versus tiempo. **C.** Gráfico de densidad de nodos versus tiempo.

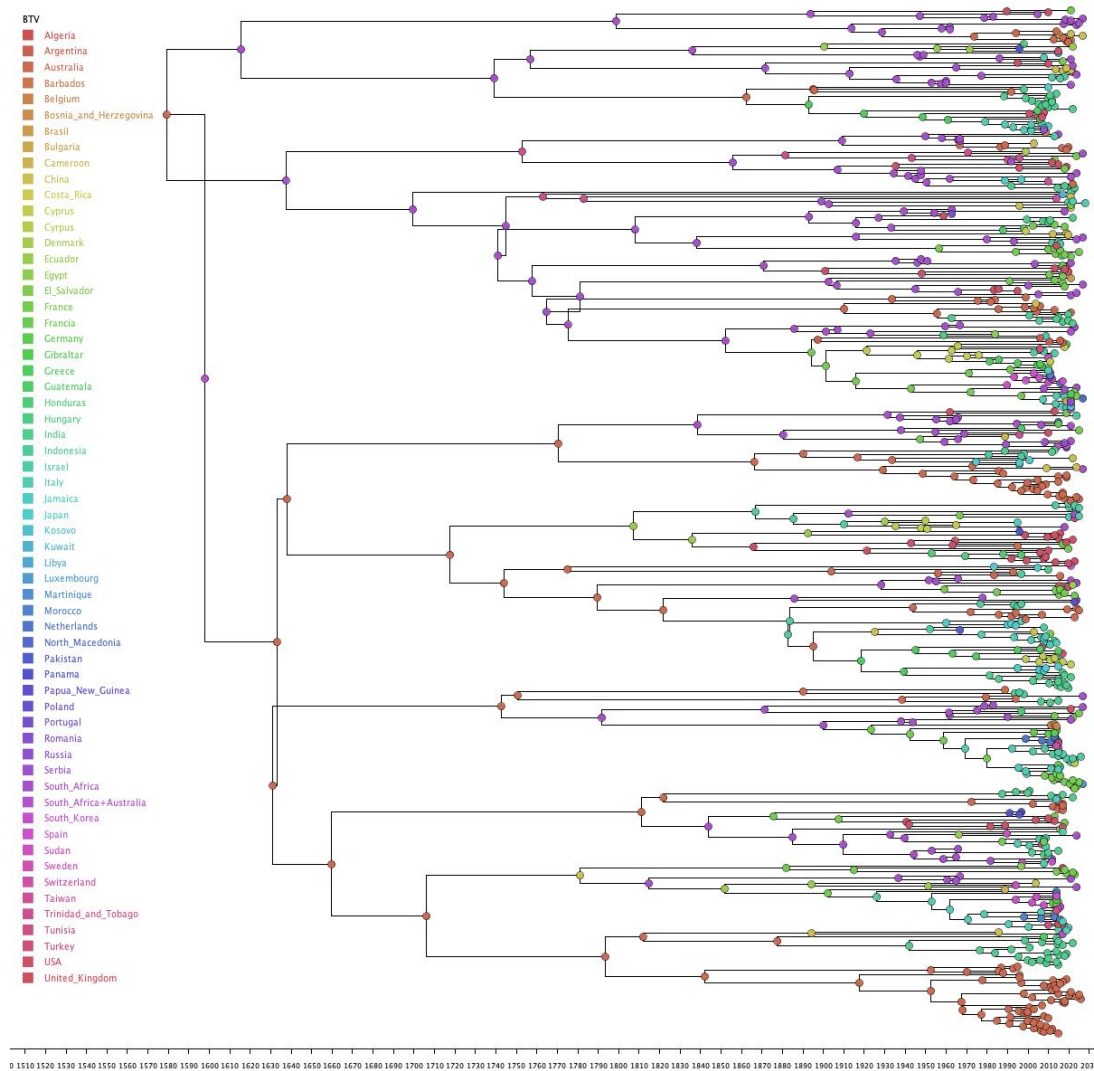


Figura 9. Filogenia de máxima credibilidad cladística (MCC) de las secuencias del segmento 2 del virus de la lengua azul entre 1579 y 2021. Los árboles se infieren a partir del modelo filogeográfico simétrico con transiciones reversibles. El color de los nodos representa el estado de localización más probable de sus nodos descendientes. El código de colores representa las probabilidades posteriores del estado de localización de la raíz para cada país. Árbol de MCC inferido a partir del análisis filogeográfico.

Los resultados de los análisis filogeográficos globales basados en el segmento del gen VP2 sugieren que el BTV surgió de Sudáfrica y Australia ([RSPP] = 1,00). A partir del gen se deduce que las migraciones del virus a partir de Sudáfrica y Australia comenzaron a finales del año 1500. A raíz de esta migración se deducen diferentes clados correspondientes a los distintos serotipos del virus, observándose que a partir de Sudáfrica se deducen clados para los serotipos BTV-19, BTV-7, BTV-9, BTV-5, BTV-15, BTV-22, BTV-12, BTV-28, BTV-26, BTV-25, BTV-27, BTV-10, BTV-24, BTV-11, BTV-17, BTV-20 y BTV-4 (Figuras 10 y 11) mientras que a partir de Australia se deducen clados para los serotipos BTV-6, BTV-14, BTV-21, BTV-3, BTV-13, BTV-16, BTV-23, BTV-18 y BTV-8 (Figuras 12 a 14).

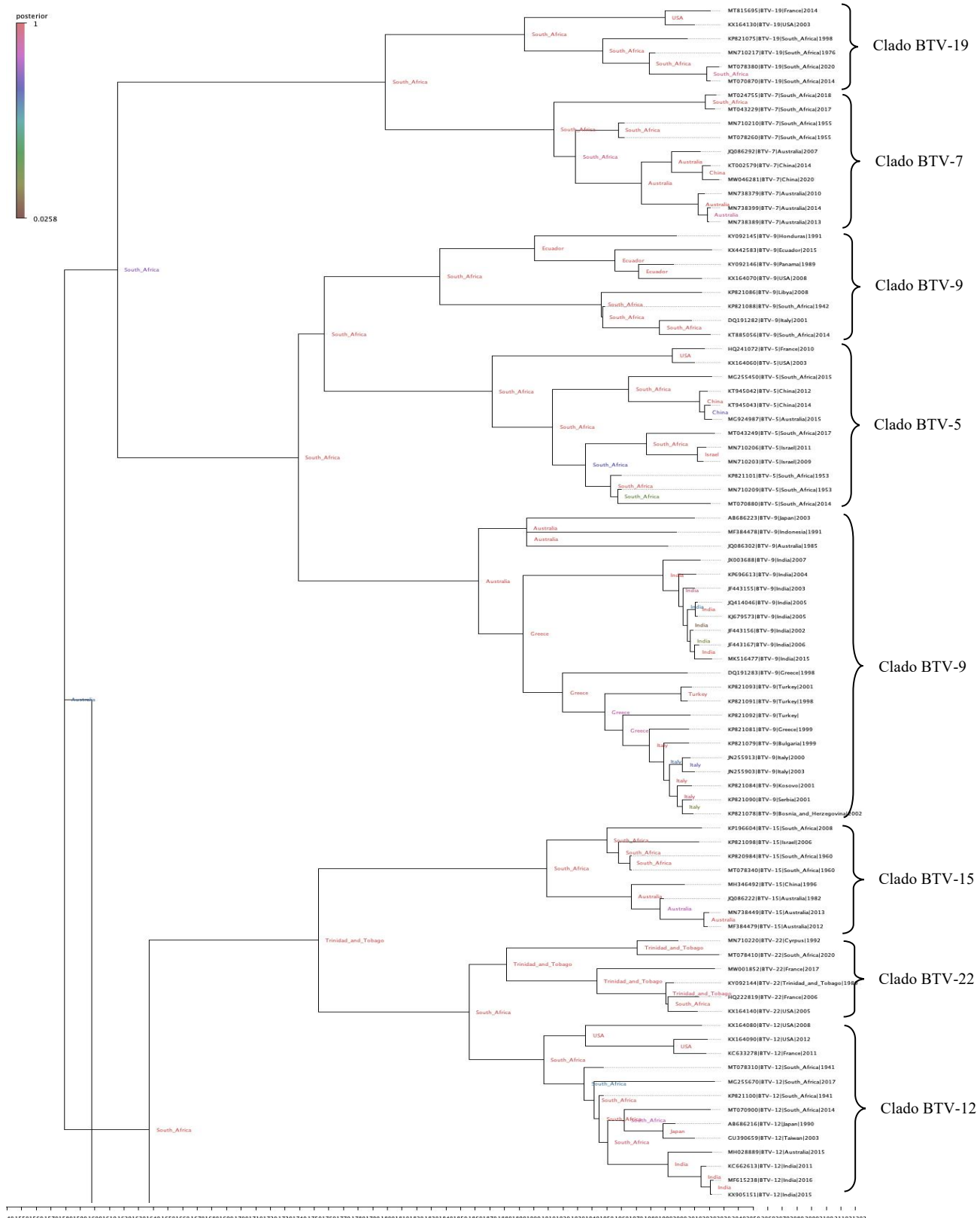


Figura 10. Árbol de máxima credibilidad cladística a escala temporal para el segmento 2 del virus de la lengua azul. Relaciones evolutivas entre los linajes del virus investigadas mediante el análisis BEAST utilizando un modelo de coalescencia Skyride de tamaño de población constante. Clados para los serotipos BTV-19, BTV-7, BTV-9, BTV-5, BTV-15, BTV-22 y BTV-12.

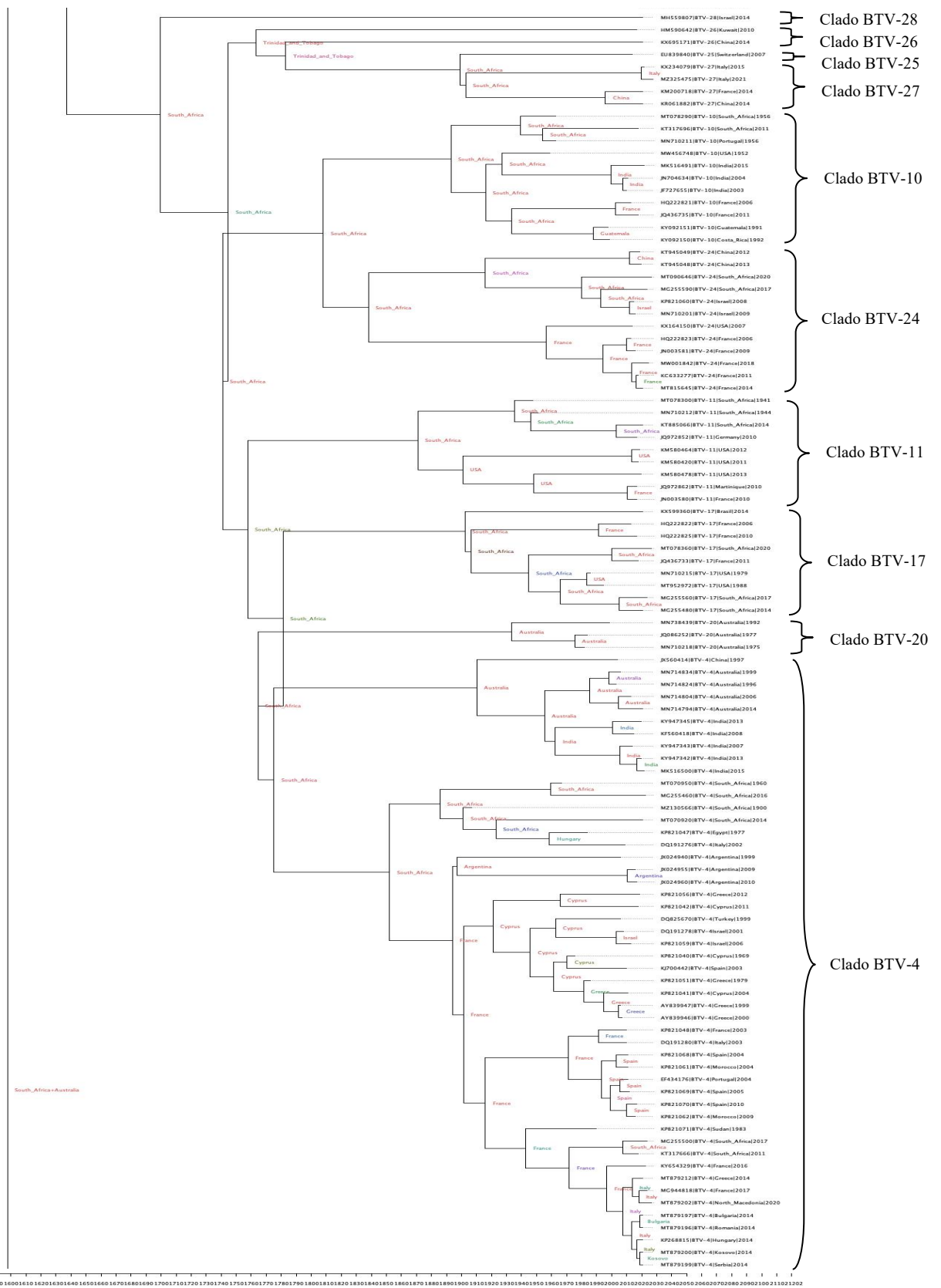


Figura 11. Árbol de máxima credibilidad cladística a escala temporal para el segmento 2 del virus de la lengua azul. Relaciones evolutivas entre los linajes del virus investigadas mediante el análisis BEAST utilizando un modelo de coalescencia Skyride de tamaño de población constante. Clados para los serotipos BTV-28, BTV-27, BTV-26, BTV-25, BTV-10, BTV-24, BTV-11, BTV-17, BTV-20 y BTV-4.

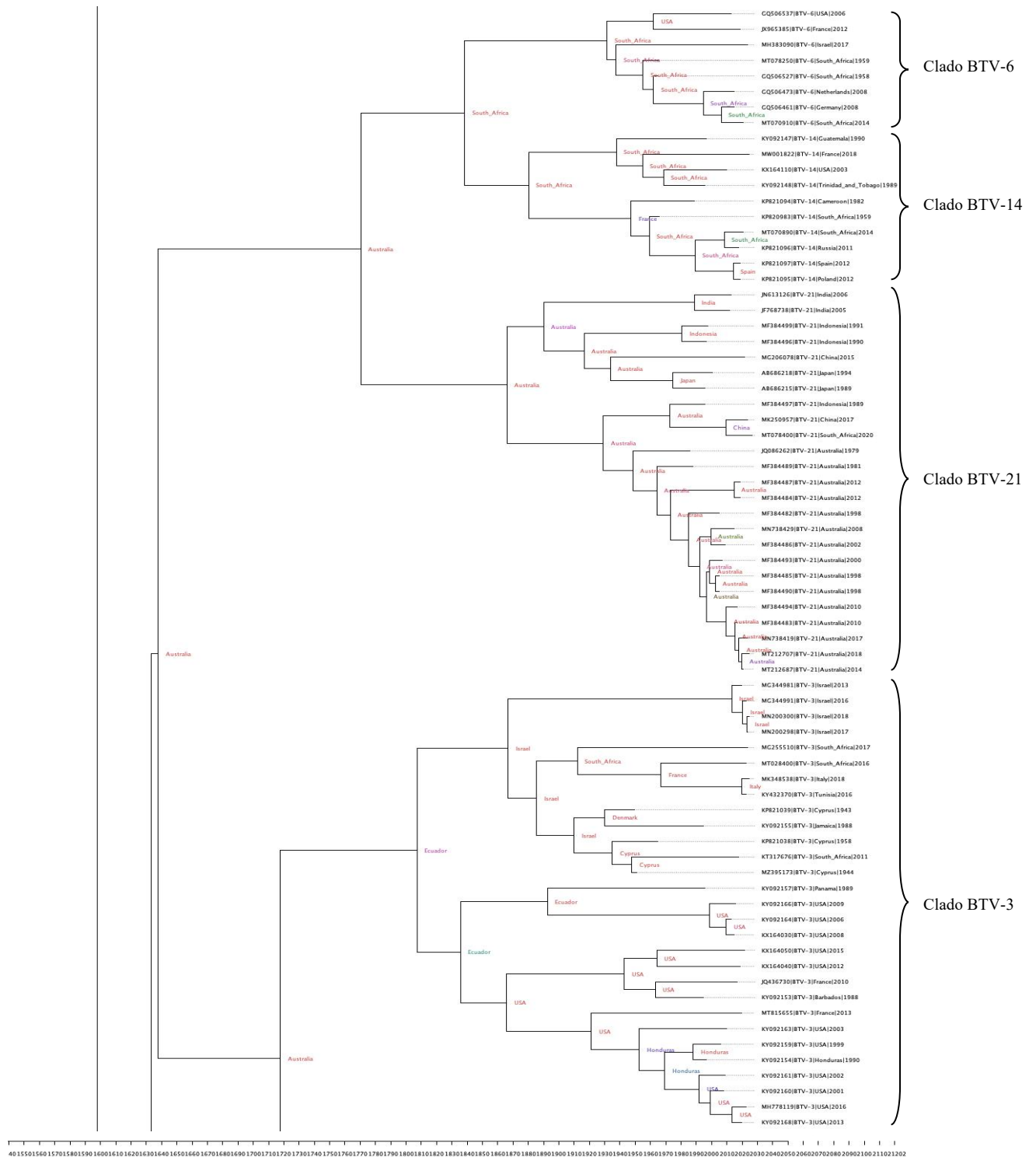


Figura 12. Árbol de máxima credibilidad cladística a escala temporal para el segmento 2 del virus de la lengua azul. Relaciones evolutivas entre los linajes del virus investigadas mediante el análisis BEAST utilizando un modelo de coalescencia Skyride de tamaño de población constante. Clados para los serotipos BTV-6, BTV-14, BTV-21 y BTV-3.

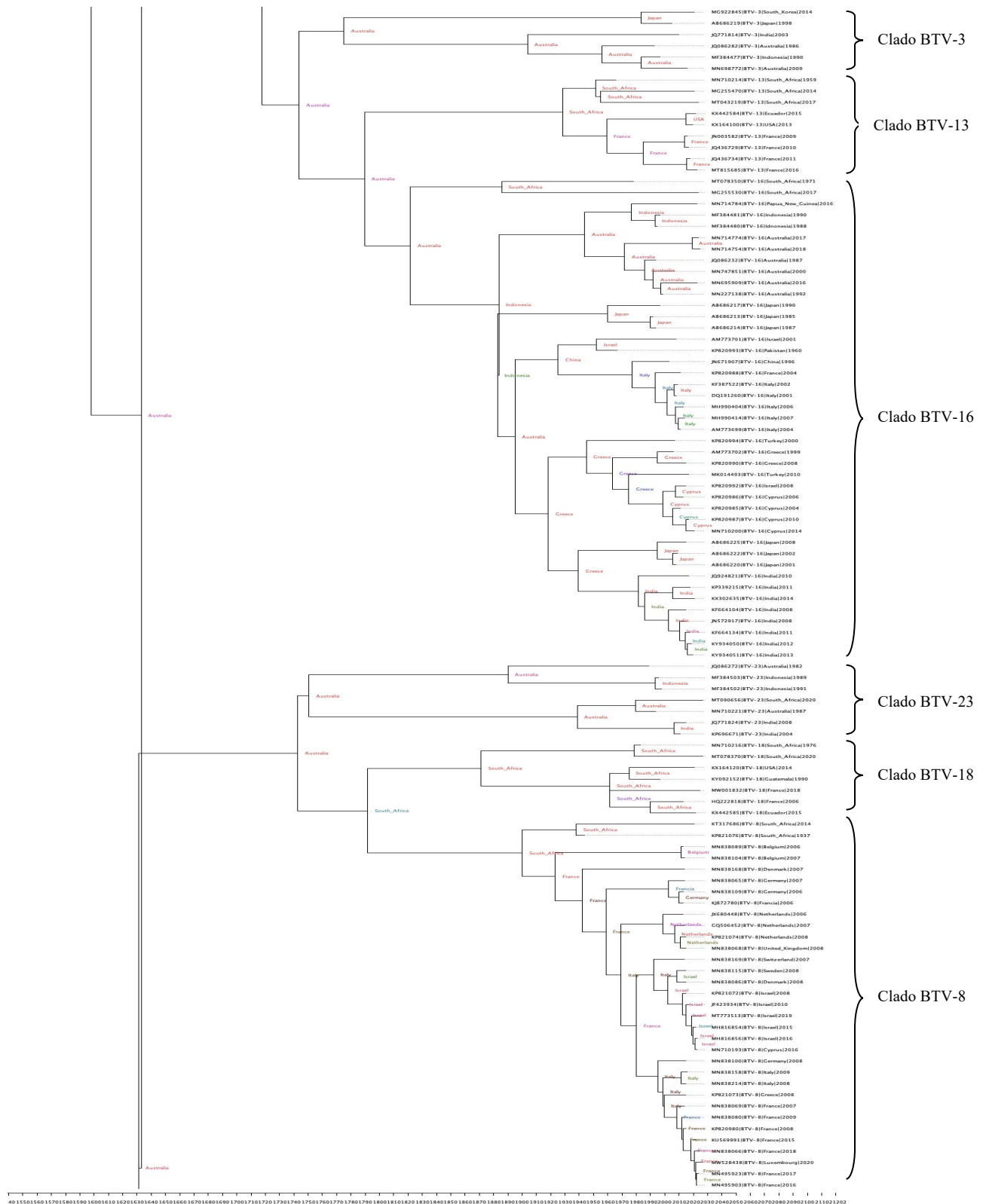


Figura 13. Árbol de máxima credibilidad cladística a escala temporal para el segmento 2 del virus de la lengua azul. Relaciones evolutivas entre los linajes del virus investigadas mediante el análisis BEAST utilizando un modelo de coalescencia Skyride de tamaño de población constante. Clados para los serotipos BTV-3, BTV-13, BTV-16, BTV-23, BTV-18 y BTV-8.



Figura 14. Árbol de máxima credibilidad cladística a escala temporal para el segmento 2 del virus de la lengua azul. Relaciones evolutivas entre los linajes del virus investigadas mediante el análisis BEAST utilizando un modelo de coalescencia Skyride de tamaño de población constante. Clados para los serotipos BTV-2 y BTV-1.

Discusión

Antes de utilizar un modelo de reloj molecular para inferir un árbol temporal a partir de secuencias heterócronas, se confirmó que las secuencias investigadas contengan suficiente "señal temporal" para una estimación fiable. En otras palabras, se buscó contar con suficiente cambio genético entre los tiempos de muestreo para reconstruir una relación estadística entre la divergencia genética y el tiempo. Esto es especialmente importante para los enfoques de inferencia bayesiana implementado en BEAST, ya que los modelos de reloj molecular empleados están condicionados estadísticamente a tener una tasa evolutiva mayor que cero, y normalmente permitirán que la inferencia continúe incluso cuando los alineamientos analizados contengan poca o ninguna información temporal (Rambaut et al., 2016).

Según (Rambaut et al., 2016) la regresión de la distancia genética entre raíces y puntas (root-to-tip) en función del tiempo de muestreo puede utilizarse como una herramienta de diagnóstico para los modelos de reloj molecular. En este sentido, una tendencia lineal con residuos pequeños indica que la evolución estará adecuadamente representada por un reloj molecular estricto. La misma tendencia con una mayor dispersión de la línea de regresión sugiere que un modelo de reloj molecular relajado puede ser el más apropiado. Una fuerte tendencia no lineal sugiere que la tasa evolutiva ha cambiado sistemáticamente a lo largo del tiempo, mientras que la ausencia total de tendencia indica que los datos contienen poca señal temporal y no son adecuados para la inferencia mediante modelos de reloj molecular filogenético. Los resultados en TempEst indicaron una tendencia lineal ($R^2 = 1$) lo cual indicó que la evolución fue representada adecuadamente por un reloj molecular estricto.

Por medio del análisis filodinámico bayesiano, se han definido nuevos aspectos de la epidemiología evolutiva global del virus de la lengua azul. En el presente estudio se obtuvieron datos sobre la historia filogeográfica de los orígenes y la dispersión del virus entre países de todo el mundo. Basado en el gen S2 de la proteína VP2 del BTV se estimó que el virus ha circulado en poblaciones animales aproximadamente desde el año 1591 (Figura 8). Sin embargo, en un estudio filogenético global basado en el análisis de los genes S10 y S6 se estimó que el BTV ha circulado en poblaciones de ungulados durante al menos 1000 años y potencialmente más de 2000 años, con estimaciones de inicio de alrededor del año 1100,

mencionando que estas estimaciones estarían apoyadas en orígenes más antiguos en línea con la expansión del comercio entre oriente y occidente a través de la ruta de la seda, así la diversidad genética a través del tiempo en dicho estudio demostró que el restablecimiento del crecimiento exponencial de la población de BTV después de la década de 1850 coincidió con el aumento de las actividades de comercio de animales entre continentes (Alkhamis et al., 2020). Al comparar los resultados del presente estudio con los resultados del análisis filogeográfico realizado por (Alkhamis et al., 2020) con base en el gen S6 se puede apreciar una distribución genética similar a partir de lo reportado alrededor del año 1500 con un ancestro común en África que continúa hacia Asia y Oceanía.

Nuestro modelo filogeográfico sugiere que Sudáfrica y Australia son el lugar ancestral de origen y diseminación del BTV en todo el mundo (Figura 9). Aunque nuestra inferencia coincide con la noción común de que el BTV surgió de África, se ha detectado ancestros comunes en Europa y Asia, esto puede explicarse en el hecho de que, durante la primera mitad del siglo XX, sólo se informó de la presencia del BTV en el continente africano, sin embargo, en 1951 también se confirmó un brote de lengua azul en Israel. Años más tarde en 1961 el BTV se confirmó en Asia, cuando se detectó un brote de la enfermedad en la India, y después en Australia. Mientras tanto, en Europa, un importante brote afectó a población ovina de España y Portugal entre 1956 y 1960. Además, la mortalidad masiva experimentada en Iberia demostró que, aunque las incursiones del BTV en Europa eran infrecuentes en aquella época, algunas partes del sur de Europa eran capaces de soportar la transmisión del virus siendo el ganado europeo altamente vulnerable al virus. Esto puede explicar los ancestros presentado en el estudio filodinámico (Wilson & Mellor, 2009).

El análisis filogeográfico proporcionó evidencia adicional de la importancia de la región de África y Oceanía como puntos calientes de entrada para el BTV. De esta manera, se observó que las secuencias de América presentan ancestros comunes en Sudáfrica y Australia sugiriendo que el BTV pudo haber ingresado hacia el Centro y Sur de América desde estos países para posteriormente distribuirse hacia el Norte de América alrededor de 1910. (Alkhamis et al., 2020) menciona que sus resultados de filogenia global sugieren a Latinoamérica como la fuente de nuevas introducciones del BTV en Norteamérica en la década de 1900, lo cual corrobora los resultados obtenidos. Estas nuevas incursiones se

atribuyeron a mosquitos transportados por el viento que portaban el BTV desde regiones endémicas de América Latina, como la cuenca del Caribe, al sureste de EE. UU. A nivel local el modelo filogeográfico sugiere el ingreso del virus a Ecuador a inicios del año 1900 y en 2015 a partir de Sudáfrica (BTV-9, BTV-18) mientras que en 2015 sugiere el ingreso a partir de Estados Unidos (BTV-13).

Conclusiones y Recomendaciones

Los datos obtenidos contribuyen a la vigilancia molecular del virus de la lengua azul en todo el mundo, permitiendo controlar este patógeno que tiene un impacto económico. Nuestro estudio aporta una visión de la epidemiología evolutiva global del BTV, donde se pueden destacar rutas históricas de dispersión del virus entre y dentro de los continentes de todo el mundo. Los resultados indican un incremento en la diversidad genética del virus de la lengua azul alrededor del año 1920. Además, se identificó que Francia, India y Sudáfrica presentan mayor cantidad de secuencias reportadas presentándose una mayor diversidad de serotipos en el país africano. Por otra parte, los resultados revelaron un notable círculo de rutas de dispersión significativas e intensas entre los países que rodean la cuenca mediterránea, lo que se atribuye a las condiciones climáticas cálidas y secas, así como a la abundancia de múltiples vectores. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos exhaustivos sobre la epidemiología mundial del BTV, que posteriormente pueden utilizarse para orientar estrategias de control y vigilancia en todo el mundo.

Referencias

- Acevedo, A. M., Curiel, M., Relova, D., & Perera, C. L. (2020). Virus de la lengua azul: actualización de la situación en las Américas, el Caribe y Cuba. *Revista de Salud Animal*, 42(2), 1–9.
<http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v42n2/2224-4700-rsa-42-02-e06.pdf>
- Alkhamis, M. A., Aguilar-Vega, C., Fountain-Jones, N. M., Lin, K., Perez, A. M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2020). Global emergence and evolutionary dynamics of bluetongue virus. *Scientific Reports*, 10(1), 21677. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78673-9>
- Anderson, J. (2014). *Development and Evaluation of a Subunit DIVA Vaccine Against Bluetongue Virus Serotype 8 in Cattle*. University of Uppsala.
- Caporale, M., Di Gialleonardo, L., Janowicz, A., Wilkie, G., Shaw, A., Savini, G., Van Rijn, P. A., Mertens, P., Di Ventura, M., & Palmarini, M. (2014). Virus and Host Factors Affecting the Clinical Outcome of Bluetongue Virus Infection. *Journal of Virology*, 88(18), 10399–10411.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01641-14>
- Dondona, A. C. (2013). *Bluetongue in springboks and wildebeests in the Etosha National Park (Namibia): circulating strains and epidemiology. June 2013*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34368.05124>
- Lager, I. A. (2004). Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, 40(3), 89–93.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419641>
- Maclachlan, N. J., Mayo, C. E., Daniels, P. W., Savini, G., Zientara, S., & Gibbs, E. P. J. (2015). Bluetongue. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(2), 329–340.
<https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2360>
- Monath, T. P. (2019). *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* (T. P. Monath (ed.)). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9780429280245>

- Nomikou, K., Dovas, C. I., Maan, S., Anthony, S. J., Samuel, A. R., Papanastassopoulou, M., Maan, N. S., Mangana, O., & Mertens, P. P. C. (2009). Evolution and phylogenetic analysis of full-length VP3 genes of eastern Mediterranean bluetongue virus isolates. *PLoS ONE*, *4*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006437>
- Patel, A., & Roy, P. (2014). The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Research*, *182*, 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.017>
- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, *2*(1), vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>
- Roy, P. (2008). Bluetongue Viruses. *Encyclopedia of Virology*, *2002*, 328–335. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00454-4>
- Rushton, J., & Lyons, N. (2015). Impatto economico della Bluetongue: Analisi degli effetti sulla produttività. *Veterinaria Italiana*, *51*(4), 401–406. <https://doi.org/10.12834/VetIt.646.3183.1>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saminathan, M., Singh, K. P., Khorajiya, J. H., Dinesh, M., Vineetha, S., Maity, M., Rahman, A. F., Misri, J., Malik, Y. S., Gupta, V. K., Singh, R. K., & Dhama, K. (2020). An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Veterinary Quarterly*, *40*(1), 258–321. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1831708>
- Schwartz-Cornil, I., Mertens, P. P. C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P. S., James MacLachlan, N., & Zientara, S. (2008). Bluetongue virus: Virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, *39*(5). <https://doi.org/10.1051/vetres:2008023>
- Sperlova, A., & Zendulkova, D. (2009). Bluetongue: A review. *Veterinarni Medicina*, *54*(4), 430–452. <https://doi.org/10.17221/3206-VETMED>

USDA. (2016). Bluetongue SOP 1. Etiology and Ecology, FAD PReP. *SOP Manual, 1*, 1–20.

https://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergency_management/downloads/sop/sop_btv_e-e.pdf

Wilson, A. J., & Mellor, P. S. (2009). Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2669–2681.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0091>

World Organisation for Animal Health. (2021). Bluetongue (Infection with bluetongue virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (2021st ed., Vol. 3, Issue 1, pp. 1–19).

Anexos

Anexo 1. Secuencias del virus de lengua azul a nivel mundial obtenidas a través de la base de datos Recursos de Análisis de Patógenos Virales (ViPR)

Serotipo	Acceso GenBank	Longitud de Secuencia	Fecha de Colecta	País
BTV-1	KP821017	2940	1958	South Africa
BTV-1	KM099523	2886	1981	Australia
BTV-1	KP820998	2940	1982	Cameroon
BTV-1	KM099524	2886	1986	Australia
BTV-1	KP821022	2940	1987	Sudan
BTV-1	KM099525	2886	1988	Australia
BTV-1	KM099526	2886	1989	Australia
BTV-1	MF384442	2886	1989	Australia
BTV-1	KY092170	2940	1990	El Salvador
BTV-1	KM099527	2886	1993	Australia
BTV-1	KM099528	2886	1994	Australia
BTV-1	KM099529	2886	1996	Australia
BTV-1	KM099530	2886	1997	Australia
BTV-1	KM099531	2886	1999	Australia
BTV-1	KF563931	2940	1999	India
BTV-1	KP821005	2940	2001	Greece
BTV-1	KM099533	2886	2002	Australia
BTV-1	KM099535	2886	2004	Australia
BTV-1	KM099536	2886	2005	Australia
BTV-1	MF384447	2886	2005	Australia
BTV-1	EU625361	2940	2006	Algeria
BTV-1	MF384472	2886	2006	Australia
BTV-1	KJ736002	2940	2006	Italy
BTV-1	KP821009	2940	2006	Morocco
BTV-1	MF384468	2886	2007	Australia
BTV-1	FJ437557	2886	2007	France
BTV-1	KP821004	2940	2007	Gibraltar
BTV-1	JX101694	2903	2007	India
BTV-1	KF563933	2940	2007	India
BTV-1	KF664114	2940	2007	India
BTV-1	KP821008	2940	2007	Libya
BTV-1	KP821010	2940	2007	Morocco
BTV-1	EU498674	2886	2007	Portugal
BTV-1	KP821018	2940	2007	Spain
BTV-1	KP821023	2940	2007	Tunisia
BTV-1	KP820997	2940	2008	Algeria
BTV-1	KM099537	2886	2008	Australia
BTV-1	HM014236	2940	2008	India
BTV-1	KF664124	2940	2008	India
BTV-1	KP821020	2940	2008	Spain
BTV-1	MF384448	2886	2009	Australia
BTV-1	KP821014	2940	2009	Morocco
BTV-1	KP821021	2940	2009	Spain

BTV-1	KM099538	2886	2010	Australia
BTV-1	KP339135	2940	2010	India
BTV-1	KJ577115	2940	2010	Italy
BTV-1	KC153300	2944	2010	South Korea
BTV-1	KX164020	2940	2010	USA
BTV-1	MF384463	2886	2011	Australia
BTV-1	MF384470	2886	2011	Australia
BTV-1	JQ436736	2886	2011	France
BTV-1	KP735614	2940	2011	India
BTV-1	KJ577105	2940	2011	Tunisia
BTV-1	MN698762	2886	2012	Australia
BTV-1	KY934047	2940	2012	India
BTV-1	KJ577095	2940	2012	Italy
BTV-1	KJ577125	2940	2013	Italy
BTV-1	MT212637	2886	2014	Australia
BTV-1	MT070930	2940	2014	South Africa
BTV-1	KY049854	2940	2015	France
BTV-1	MK516502	2934	2015	India
BTV-1	MW001802	2940	2016	France
BTV-1	MT212647	2932	2017	Australia
BTV-1	MG255520	2940	2017	South Africa
BTV-1	MT212657	2930	2018	Australia
BTV-1	MT119854	2940	1960	South Africa
BTV-1	JN881986	2940	1979	Australia
BTV-1	KC879616	2940	1979	China
BTV-1	KF563929	2940	1985	India
BTV-1	MF384457	2886	1993	Australia
BTV-1	KF563930	2940	1994	India
BTV-1	MF384473	2886	1996	Australia
BTV-1	JN848760	2940	1997	China
BTV-1	MF384464	2886	2000	Australia
BTV-1	MF384459	2886	2001	Australia
BTV-1	MF384453	2886	2003	Australia
BTV-1	KF563932	2940	2003	India
BTV-1	MN714724	2939	2019	Australia
BTV-2	KP821031	2943	1958	South Africa
BTV-2	KP821030	2943	1959	South Africa
BTV-2	KP821036	2943	1983	Sudan
BTV-2	KF986501	2923	1989	Panama
BTV-2	KY092149	2923	1990	Panama
BTV-2	KP821037	2943	2000	Tunisia
BTV-2	KP821024	2943	2001	France
BTV-2	KP821027	2943	2001	Israel
BTV-2	AM773698	2889	2002	Italy
BTV-2	KF986499	2943	2003	USA
BTV-2	AM773697	2889	2005	Spain
BTV-2	HQ222820	2889	2006	France
BTV-2	KF986495	2943	2006	USA
BTV-2	AB686224	2943	2007	Japan
BTV-2	JQ086242	2932	2008	Australia
BTV-2	JQ904072	2943	2008	India

BTV-2	HQ222824	2889	2009	France
BTV-2	JQ240322	2933	2010	Australia
BTV-2	MF384474	2889	2010	Australia
BTV-2	MF384475	2889	2010	Australia
BTV-2	MF384476	2889	2010	Australia
BTV-2	KP339165	2942	2010	India
BTV-2	MN710207	2943	2010	Israel
BTV-2	JQ822249	2943	2010	USA
BTV-2	KC633279	2889	2011	France
BTV-2	MK516499	2938	2015	India
BTV-2	MG255570	2943	2017	South Africa
BTV-2	MW456738	2929	1982	USA
BTV-2	KP339155	2922	1993	India
BTV-2	KP268775	2943	1994	India
BTV-2	DQ191262	2943	2000	Italy
BTV-2	DQ191261	2943	2001	Italy
BTV-2	JQ681258	2943	2003	India
BTV-2	KP696593	2943	2003	India
BTV-2	EF434177	2889	2005	Portugal
BTV-3	KP821039	2935	1943	Cyprus
BTV-3	KP821038	2935	1958	Cyprus
BTV-3	KY092153	2934	1988	Barbados
BTV-3	KY092155	2935	1988	Jamaica
BTV-3	KY092157	2935	1989	Panama
BTV-3	KY092154	2935	1990	Honduras
BTV-3	KY092159	2935	1999	USA
BTV-3	KY092160	2935	2001	USA
BTV-3	KY092161	2935	2002	USA
BTV-3	KY092163	2935	2003	USA
BTV-3	KY092164	2935	2006	USA
BTV-3	KX164030	2935	2008	USA
BTV-3	MN698772	2913	2009	Australia
BTV-3	KY092166	2935	2009	USA
BTV-3	JQ436730	2880	2010	France
BTV-3	KT317676	2935	2011	South Africa
BTV-3	KX164040	2935	2012	USA
BTV-3	MT815655	2935	2013	France
BTV-3	MG344981	2933	2013	Israel
BTV-3	KY092168	2935	2013	USA
BTV-3	MG922845	2934	2014	South Korea
BTV-3	KX164050	2935	2015	USA
BTV-3	MG344991	2936	2016	Israel
BTV-3	MT028400	2935	2016	South Africa
BTV-3	KY432370	2935	2016	Tunisia
BTV-3	MH778119	2935	2016	USA
BTV-3	MN200298	2923	2017	Israel
BTV-3	MG255510	2935	2017	South Africa
BTV-3	MN200300	2928	2018	Israel
BTV-3	MK348538	2899	2018	Italy
BTV-3	MZ395173	2935	1944	Cyprus
BTV-3	JQ086282	2914	1986	Australia

BTV-3	MF384477	2880	1990	Indonesia
BTV-3	AB686219	2934	1998	Japan
BTV-3	JQ771814	2934	2003	India
BTV-4	KP821040	2926	1969	Cyprus
BTV-4	KP821047	2926	1977	Egypt
BTV-4	KP821051	2926	1979	Greece
BTV-4	KP821071	2926	1983	Sudan
BTV-4	JX024940	2917	1999	Argentina
BTV-4	MN714834	2871	1999	Australia
BTV-4	AY839947	2871	1999	Greece
BTV-4	DQ825670	2871	1999	Turkey
BTV-4	AY839946	2871	2000	Greece
BTV-4	KP821048	2926	2003	France
BTV-4	KJ700442	2871	2003	Spain
BTV-4	KP821041	2926	2004	Cyprus
BTV-4	KP821061	2926	2004	Morocco
BTV-4	KP821068	2926	2004	Spain
BTV-4	KP821069	2926	2005	Spain
BTV-4	MN714804	2871	2006	Australia
BTV-4	KP821059	2926	2006	Israel
BTV-4	KY947343	2871	2007	India
BTV-4	KF560418	2926	2008	India
BTV-4	JX024955	2917	2009	Argentina
BTV-4	KP821062	2926	2009	Morocco
BTV-4	JX024960	2916	2010	Argentina
BTV-4	KP821070	2926	2010	Spain
BTV-4	KP821042	2926	2011	Cyprus
BTV-4	KT317666	2926	2011	South Africa
BTV-4	KP821056	2926	2012	Greece
BTV-4	KY947345	2871	2012	India
BTV-4	KY947342	2871	2013	India
BTV-4	MN714794	2871	2014	Australia
BTV-4	MT879197	2926	2014	Bulgaria
BTV-4	MT879212	2926	2014	Greece
BTV-4	KP268815	2926	2014	Hungary
BTV-4	MT879200	2926	2014	Kosovo
BTV-4	MT879196	2926	2014	Romania
BTV-4	MT879199	2926	2014	Serbia
BTV-4	MT070920	2926	2014	South Africa
BTV-4	MK516500	2926	2015	India
BTV-4	KY654329	2926	2016	France
BTV-4	MG255460	2926	2016	South Africa
BTV-4	MG944818	2907	2017	France
BTV-4	MG255500	2926	2017	South Africa
BTV-4	MT879202	2926	2020	North Macedonia
BTV-4	MZ130566	2927	1900	South Africa
BTV-4	MT070950	2926	1960	South Africa
BTV-4	MN714824	2871	1996	Australia
BTV-4	JX560414	2926	1997	China
BTV-4	DQ191278	2926	2001	Israel
BTV-4	DQ191276	2926	2002	Italy

BTV-4	DQ191280	2926	2003	Italy
BTV-4	EF434176	2871	2004	Portugal
BTV-5	KP821101	2921	1953	South Africa
BTV-5	KX164060	2922	2003	USA
BTV-5	MN710203	2921	2009	Israel
BTV-5	HQ241072	2868	2010	France
BTV-5	MN710206	2921	2011	Israel
BTV-5	KT945042	2868	2012	China
BTV-5	KT945043	2868	2014	China
BTV-5	MT070880	2921	2014	South Africa
BTV-5	MG924987	2886	2015	Australia
BTV-5	MG255450	2921	2015	South Africa
BTV-5	MT043249	2921	2017	South Africa
BTV-5	MN710209	2921	1953	South Africa
BTV-6	GQ506537	2922	2006	USA
BTV-6	GQ506461	2922	2008	Germany
BTV-6	GQ506473	2922	2008	Netherlands
BTV-6	JX965385	2868	2012	France
BTV-6	MT070910	2922	2014	South Africa
BTV-6	MH383090	2876	2017	Israel
BTV-6	GQ506527	2922	1958	South Africa
BTV-6	MT078250	2922	1959	South Africa
BTV-7	JQ086292	2936	2007	Australia
BTV-7	MN738379	2932	2010	Australia
BTV-7	MN738389	2921	2013	Australia
BTV-7	MN738399	2915	2014	Australia
BTV-7	KT002579	2936	2014	China
BTV-7	MT043229	2936	2017	South Africa
BTV-7	MT024755	2934	2018	South Africa
BTV-7	MN710210	2935	1955	South Africa
BTV-7	MT078260	2936	1955	South Africa
BTV-7	MW046281	2936	2020	China
BTV-8	KP821076	2939	1937	South Africa
BTV-8	MN838089	2924	2006	Belgium
BTV-8	KJ872780	2939	2006	France
BTV-8	MN838109	2923	2006	Germany
BTV-8	JX680448	2939	2006	Netherlands
BTV-8	MN838104	2929	2007	Belgium
BTV-8	MN838168	2917	2007	Denmark
BTV-8	MN838069	2937	2007	France
BTV-8	MN838065	2931	2007	Germany
BTV-8	GQ506452	2939	2007	Netherlands
BTV-8	MN838169	2916	2007	Switzerland
BTV-8	MN838086	2927	2008	Denmark
BTV-8	KP820980	2939	2008	France
BTV-8	MN838100	2939	2008	Germany
BTV-8	KP821073	2939	2008	Greece
BTV-8	KP821072	2939	2008	Israel
BTV-8	MN838214	2930	2008	Italy
BTV-8	KP821074	2939	2008	Netherlands
BTV-8	MN838115	2923	2008	Sweden

BTV-8	MN838068	2914	2008	United Kingdom
BTV-8	MN838080	2939	2009	France
BTV-8	MN838158	2920	2009	Italy
BTV-8	JF423934	2938	2010	Israel
BTV-8	KT317686	2939	2014	South Africa
BTV-8	KU569991	2939	2015	France
BTV-8	MH816854	2938	2015	Israel
BTV-8	MN710193	2939	2016	Cyprus
BTV-8	MN495903	2939	2016	France
BTV-8	MH816856	2938	2016	Israel
BTV-8	MN495923	2931	2017	France
BTV-8	MN838066	2927	2018	France
BTV-8	MT773513	2939	2019	Israel
BTV-8	MW528438	2939	2020	Luxembourg
BTV-9	KP821088	2921	1942	South Africa
BTV-9	KY092146	2922	1989	Panama
BTV-9	KY092145	2921	1991	Honduras
BTV-9	KP821079	2921	1999	Bulgaria
BTV-9	KP821081	2921	1999	Greece
BTV-9	KP821092	2921	2000	Turkey
BTV-9	KP821084	2921	2001	Kosovo
BTV-9	KP821090	2921	2001	Serbia
BTV-9	KP821093	2921	2001	Turkey
BTV-9	KP821078	2921	2002	Bosnia and Herzegovina
BTV-9	KJ679573	2921	2005	India
BTV-9	JF443167	2921	2006	India
BTV-9	JX003688	2917	2007	India
BTV-9	KP821086	2921	2008	Libya
BTV-9	KX164070	2921	2008	USA
BTV-9	KT885056	2921	2014	South Africa
BTV-9	KX442583	2921	2015	Ecuador
BTV-9	MK516477	2911	2015	India
BTV-9	JQ086302	2917	1985	Australia
BTV-9	MF384478	2868	1991	Indonesia
BTV-9	DQ191283	2921	1998	Greece
BTV-9	KP821091	2921	1998	Turkey
BTV-9	JN255913	2921	2000	Italy
BTV-9	DQ191282	2922	2001	Italy
BTV-9	JF443156	2896	2002	India
BTV-9	JF443155	2883	2003	India
BTV-9	JN255903	2921	2003	Italy
BTV-9	AB686223	2921	2003	Japan
BTV-9	KP696613	2921	2004	India
BTV-9	JQ414046	2868	2005	India
BTV-10	KY092151	2927	1991	Guatemala
BTV-10	KY092150	2926	1992	Costa Rica
BTV-10	JN704634	2900	2004	India
BTV-10	HQ222821	2871	2006	France
BTV-10	JQ436735	2871	2011	France
BTV-10	KT317696	2926	2011	South Africa
BTV-10	MK516491	2917	2014	India

BTV-10	MW456748	2917	1952	USA
BTV-10	MN710211	2926	1956	Portugal
BTV-10	MT078290	2926	1956	South Africa
BTV-10	JF727655	2896	2003	India
BTV-11	JN003580	2871	2010	France
BTV-11	JQ972852	2926	2010	Germany
BTV-11	JQ972862	2926	2010	Martinique
BTV-11	KM580420	2926	2011	USA
BTV-11	KM580464	2926	2012	USA
BTV-11	KM580478	2926	2013	USA
BTV-11	KT885066	2926	2014	South Africa
BTV-11	MT078300	2926	1941	South Africa
BTV-11	MN710212	2926	1944	South Africa
BTV-12	KX164080	2904	2008	USA
BTV-12	KC633278	2853	2011	France
BTV-12	KC662613	2884	2011	India
BTV-12	KX164090	2904	2012	USA
BTV-12	MT070900	2904	2014	South Africa
BTV-12	MH028889	2888	2015	Australia
BTV-12	KX905151	2903	2015	India
BTV-12	MF615238	2904	2016	India
BTV-12	MG255670	2904	2017	South Africa
BTV-12	KP821100	2904	1941	South Africa
BTV-12	MT078310	2904	1941	South Africa
BTV-12	AB686216	2904	1990	Japan
BTV-12	GU390659	2904	2003	Taiwan
BTV-13	JN003582	2880	2009	France
BTV-13	JQ436729	2880	2010	France
BTV-13	JQ436734	2880	2011	France
BTV-13	KX164100	2935	2013	USA
BTV-13	MG255470	2935	2014	South Africa
BTV-13	KX442584	2935	2015	Ecuador
BTV-13	MT815685	2935	2016	France
BTV-13	MT043219	2935	2017	South Africa
BTV-13	MN710214	2935	1959	South Africa
BTV-14	KP820983	2922	1959	South Africa
BTV-14	KP821094	2922	1982	Cameroon
BTV-14	KY092148	2922	1989	Trinidad and Tobago
BTV-14	KY092147	2922	1990	Guatemala
BTV-14	KX164110	2922	2003	USA
BTV-14	KP821096	2922	2011	Russia
BTV-14	KP821095	2922	2012	Poland
BTV-14	KP821097	2922	2012	Spain
BTV-14	MT070890	2922	2014	South Africa
BTV-14	MW001822	2922	2018	France
BTV-15	KP820984	2909	1960	South Africa
BTV-15	KP821098	2909	2006	Israel
BTV-15	KP196604	2909	2008	South Africa
BTV-15	MF384479	2859	2012	Australia
BTV-15	MN738449	2892	2013	Australia
BTV-15	JQ086222	2909	1982	Australia

BTV-15	MH346492	2909	1996	China
BTV-16	KP820993	2935	1960	Pakistan
BTV-16	AM773702	2880	1999	Greece
BTV-16	KP820994	2935	2000	Turkey
BTV-16	AM773701	2880	2001	Israel
BTV-16	KP820985	2935	2004	Cyprus
BTV-16	KP820988	2935	2004	France
BTV-16	AM773699	2880	2004	Italy
BTV-16	KP820986	2935	2006	Cyprus
BTV-16	MH990404	2935	2006	Italy
BTV-16	MH990414	2935	2007	Italy
BTV-16	KP820990	2935	2008	Greece
BTV-16	JN572917	2921	2008	India
BTV-16	KF664104	2929	2008	India
BTV-16	KP820992	2935	2008	Israel
BTV-16	AB686225	2935	2008	Japan
BTV-16	KP820987	2935	2010	Cyprus
BTV-16	JQ924821	2929	2010	India
BTV-16	MK014493	2935	2010	Turkey
BTV-16	KF664134	2929	2011	India
BTV-16	KP339215	2919	2011	India
BTV-16	KY934050	2929	2012	India
BTV-16	KY934051	2929	2013	India
BTV-16	MN710200	2935	2014	Cyprus
BTV-16	KX302635	2931	2014	India
BTV-16	LC586239	2880	2014	Japan
BTV-16	MN695909	2915	2016	Australia
BTV-16	MN714784	2920	2016	Papua New Guinea
BTV-16	MG255530	2935	2017	South Africa
BTV-16	MN714754	2912	2018	Australia
BTV-16	MT078350	2935	1971	South Africa
BTV-16	AB686213	2935	1985	Japan
BTV-16	JQ086232	2921	1987	Australia
BTV-16	AB686214	2935	1987	Japan
BTV-16	MF384480	2880	1988	Indonesia
BTV-16	MF384481	2880	1990	Indonesia
BTV-16	AB686217	2935	1990	Japan
BTV-16	MN227138	2916	1992	Australia
BTV-16	JN671907	2935	1996	China
BTV-16	MN747851	2917	2000	Australia
BTV-16	DQ191260	2935	2001	Italy
BTV-16	AB686220	2935	2001	Japan
BTV-16	KF387522	2935	2002	Italy
BTV-16	AB686222	2935	2002	Japan
BTV-16	MN714774	2920	2017	Australia
BTV-17	HQ222822	2868	2006	France
BTV-17	HQ222825	2874	2010	France
BTV-17	JQ436733	2868	2011	France
BTV-17	KX599360	2874	2014	Brazil
BTV-17	MG255480	2923	2014	South Africa
BTV-17	MG255560	2923	2017	South Africa

BTV-17	MN710215	2923	1979	USA
BTV-17	MT952972	2923	1988	USA
BTV-17	MT078360	2874	2020	South Africa
BTV-18	KY092152	2927	1990	Guatemala
BTV-18	HQ222818	2874	2006	France
BTV-18	KX164120	2927	2014	USA
BTV-18	KX442585	2927	2015	Ecuador
BTV-18	MW001832	2927	2018	France
BTV-18	MN710216	2927	1976	South Africa
BTV-18	MT078370	2927	2020	South Africa
BTV-19	KX164130	2938	2003	USA
BTV-19	MT815695	2938	2014	France
BTV-19	MT070870	2938	2014	South Africa
BTV-19	MN710217	2938	1976	South Africa
BTV-19	KP821075	2938	1998	South Africa
BTV-19	MT078380	2938	2020	South Africa
BTV-20	MN710218	2925	1975	Australia
BTV-20	JQ086252	2925	1977	Australia
BTV-20	MN738439	2915	1992	Australia
BTV-20	MT078390	2925	2020	South Africa
BTV-21	JN613126	2887	2006	India
BTV-21	MN738429	2919	2008	Australia
BTV-21	MF384483	2868	2010	Australia
BTV-21	MF384494	2868	2010	Australia
BTV-21	MF384484	2868	2012	Australia
BTV-21	MF384487	2868	2012	Australia
BTV-21	MT212687	2922	2014	Australia
BTV-21	MG206078	2922	2015	China
BTV-21	MT212707	2922	2018	Australia
BTV-21	JQ086262	2922	1979	Australia
BTV-21	MF384489	2868	1981	Australia
BTV-21	MF384497	2868	1989	Indonesia
BTV-21	AB686215	2922	1989	Japan
BTV-21	MF384496	2868	1990	Indonesia
BTV-21	MF384499	2868	1991	Indonesia
BTV-21	AB686218	2922	1994	Japan
BTV-21	MF384482	2868	1998	Australia
BTV-21	MF384485	2868	1998	Australia
BTV-21	MF384490	2868	1998	Australia
BTV-21	MF384493	2868	2000	Australia
BTV-21	MF384486	2868	2002	Australia
BTV-21	JF768738	2899	2005	India
BTV-21	MN738419	2920	2017	Australia
BTV-21	MK250957	2922	2017	China
BTV-21	MT078400	2922	2020	South Africa
BTV-22	KY092144	2892	1989	Trinidad and Tobago
BTV-22	KX164140	2907	2005	USA
BTV-22	HQ222819	2856	2006	France
BTV-22	MW001852	2907	2017	France
BTV-22	MN710220	2907	1992	Cyprus
BTV-22	MT078410	2907	2020	South Africa

BTV-23	JQ086272	2909	1982	Australia
BTV-23	MN710221	2927	1987	Australia
BTV-23	JQ771824	2927	1988	India
BTV-23	MF384503	2874	1989	Indonesia
BTV-23	MF384502	2874	1991	Indonesia
BTV-23	KP696671	2927	2004	India
BTV-23	MT090656	2921	2020	South Africa
BTV-24	HQ222823	2868	2006	France
BTV-24	KX164150	2923	2007	USA
BTV-24	KP821060	2923	2008	Israel
BTV-24	JN003581	2868	2009	France
BTV-24	MN710201	2923	2009	Israel
BTV-24	KC633277	2868	2011	France
BTV-24	KT945049	2868	2012	China
BTV-24	KT945048	2868	2013	China
BTV-24	MT815645	2923	2014	France
BTV-24	MG255590	2923	2017	South Africa
BTV-24	MW001842	2868	2018	France
BTV-24	MT090646	2923	2020	South Africa
BTV-25	EU839840	2880	2007	Switzerland
BTV-26	HM590642	2929	2010	Kuwait
BTV-26	KX695171	2926	2014	China
BTV-27	KR061882	2926	2014	China
BTV-27	KM200718	2877	2014	France
BTV-27	KX234079	2929	2015	Italy
BTV-27	MZ325475	2928	2021	Italy
BTV-28	MH559807	2918	2014	Israel

