

---

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**Virus Hemorrágico Epizoótico (EHDV): filogeografía, complejo viral,  
linajes emergentes y trazas moleculares de introducción**

Realizado por:

**Ing. ANGULO MISHELL**

Director del proyecto:

**Dr. Juan Carlos Navarro, Ph.D**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 31 de marzo de 2025

---

## **DECLARACION JURAMENTADA**

Yo, ANGULO VALLADARES LETICIA MISHHELL, con cédula de identidad 1726706367, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual que correspondan relacionados a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

**Angulo Valladares Leticia Mishell**

C.I.: 1726706367

---

---

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

Declaro haber propuesto el tema bajo mi línea de investigación y, dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

-----  
***Dr Juan Carlos Navarro Castro, Ph.D***

---

---

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**RUBEN ALEXANDER MALDONADO ORBE**

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador

FIRMA

FIRMA

Quito, 31 de MARZO de 2025

---

---

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

-----  
**Angulo Valladares Leticia Mishell**

**C.I.: 1726706367**

---

---

## **DEDICATORIA**

Con amor para mi madre y familia por su apoyo, dedicación y esfuerzo.

---

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi madre por todo su apoyo y confianza a lo largo de mi carrera, asimismo agradezco el apoyo incondicional a mi esposo, sin su motivación no hubiera sido posible todo esta experiencia académica y profesional. También agradezco de manera especial al Dr. Juan Carlos Navarro Castro, por toda su entrega, no cabe duda de que por medio de su experiencia he adquirido nuevos conocimientos, los cuales han contribuido a mi formación profesional.

Artículo de tesis

# Virus Hemorrágico Epizootico (EHDV): filogeografía, complejo viral, linajes emergentes y, trazas moleculares de introducción

Leticia Angulo<sup>1</sup>, Juan Carlos Navarro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; [leticia.angulo@uisek.edu.ec](mailto:leticia.angulo@uisek.edu.ec)

<sup>2</sup> Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas y Ecoepidemiología, Universidad Internacional SEK del Ecuador; [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

\* Autor de Correspondencia: [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

## Resumen

La enfermedad hemorrágica epizootica (EHD) es una patología viral de ruminantes silvestres y domésticos con importantes implicaciones sociales y económicas, causada por un arbovirus (EHDV), género Orbivirus, de ARN-doble cadena, transmitido por mosquitos *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), en cinco continentes. Es un virus emergente en el mediterráneo y, recién emergente en España, Italia y Francia (2022). En Ecuador, la EHD es definida como una enfermedad de notificación o declaración obligatoria. Sin embargo, no se la determina como una enfermedad de control oficial en el Ecuador, ya que existe poca evidencia serológica que demuestre su presencia en las zonas pecuarias del país. El objetivo principal fue inferir las relaciones evolutivas de genotipos virales de EHDV-genVP2, *in silico*, para determinar patrones taxonómicos relacionados con la correlación genotipo-fenotipo (serotipos), y filogeográficos de epidemiología molecular relacionados con su origen y trazas de movilidad e introducción. Se llevó a cabo un análisis filogeográfico utilizando 71 secuencias de ADN del gen VP2 de la cápside, con una longitud de 910 pb, provenientes de 19 países en cinco continentes. El análisis incluyó cuatro Orbivirus de referencia como grupos hermano y externo. Las construcciones filogenéticas se realizaron con Paup4.05build169, aplicando optimizaciones de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, con bootstrap de 1.000 pseudoréplicas para la significancia y apoyo estadístico de clados. Los árboles resultantes de ambos métodos presentaron la misma topología. Se construyeron adicionalmente redes de haplotipos utilizando PopArt-TCS (parsimonia). Los resultados nos permitieron de mostrar la monofilia de los virus EHDV y un complejo viral relacionados con los grupos hermanos y dentro del clado EHDV. Se identificaron dos linajes virales principales, A y B. Los subclados mostraron una correlación genotipo-fenotipo con los serotipos conocidos. Adicionalmente se identificaron dos subclados monofiléticos (A4 de Japón y A1 de China), correlacionados con dos nuevos serotipos. También se determinó que todos los subclados incluyen secuencias de Australia, en su mayoría con posición basal sugiriendo un posible origen del EHDV en esta región y su evolución *in situ* y posible dispersión posterior. Se demostró también una relación evolutiva compartida para la secuencia de Ecuador con aquellas de Estados Unidos, y secuencias de España, Italia y Francia de reciente brote (2022) con secuencias de Túnez, sugiriendo una relación de intercambio comercial. Las redes de haplotipos comprueban estas trazas moleculares de intercambio o introducción con hasta con un solo cambio mutacional. Los resultados y conclusiones demuestran la importancia de la vigilancia genómica para la identificación, determinación de origen geográficos, nuevos linajes y serotipos de enfermedades virales emergentes, y su aplicación en estrategias de vigilancia, contención y control en salud global.

**Palabras clave:** enfermedad hemorrágica epizootica, serotipos; orbivirus; culicoides; VP2; filogenia; bovinos

## Abstract:

Epizootic hemorrhagic disease (EHD) is a viral pathology affecting wild and domestic ruminants with significant social and economic implications, caused by an arbovirus (EHDV), genus Orbivirus, consisting of double-stranded RNA, transmitted by *Culicoides* mosquitoes (Diptera: Ceratopogonidae) across five continents. It is an emerging virus in the Mediterranean, recently identified in Spain, Italy, and France (2022). In Ecuador, EHD is defined as a notifiable or mandatory declaration disease. However, it is not classified as an official control disease in Ecuador due to limited serological evidence demonstrating its presence in the country's livestock areas. The main objective was to infer the evolutionary relationships of EHDV-genVP2 viral genotypes, *in silico*, to determine taxonomic patterns related to genotype-phenotype (serotypes) correlation and molecular epidemiological phylogeography related to its origin and traces of mobility and introduction. A phylogeographic analysis was conducted using 71 DNA sequences from the VP2 gene of the capsid, with a length of 910 bp, from 19 countries across five continents. The analysis included four reference Orbivirus as sister groups and outgroups. Phylogenetic constructions were made using Paup4.05build169, applying Maximum Parsimony and Maximum Likelihood optimizations, with bootstrap values of 1,000 pseudo replicates for significance and statistical support of clades. The resulting trees from both methods exhibited the same topology. Additionally, haplotype networks were constructed using PopArt-TCS (parsimony). The results allowed us to demonstrate the monophyly of EHDV viruses

---

and a viral complex related to the sister groups within the EHDV clade. Two main viral lineages, A and B, were identified. The subclades showed a genotype-phenotype correlation with known serotypes. Furthermore, two monophyletic subclades (A4 from Japan and A1 from China) were identified, correlated with two new serotypes. It was also determined that all subclades include sequences from Australia, mostly in a basal position, suggesting a possible origin of EHDV in this region and its in situ evolution and potential subsequent dispersion. An evolutionary relationship was also shown for the Ecuadorian sequence with those from the United States and sequences from Spain, Italy, and France from the recent outbreak (2022) with sequences from Tunisia, suggesting a trade exchange relationship. Haplotype networks confirm these molecular traces of exchange or introduction, even with a single mutational change. The results and conclusions demonstrate the importance of genomic surveillance for identifying, determining geographic origins, new lineages, and serotypes of emerging viral diseases, and their application in global health surveillance, containment, and control strategies.

**Keywords:** Hemorrhagic epizootic disease, serotype; orbivirus; culicoides; VP2; phylogeny; bovine

---

## 1. Introducción

### 1.1. Aspectos generales

La transmisión de enfermedades hemorrágicas provocadas por *Orbivirus* generan impactos negativos sobre la economía, la ecología y la salud de los rumiantes tanto silvestres como domésticos. Entre estas se encuentra la enfermedad de la lengua azul (LA) y la enfermedad hemorrágica epizootica (EHD). La EHD fue descrita y aislada por primera vez en el venado de cola blanca en Nueva Jersey en 1955. La primera cepa del virus hemorrágico epizootico EHDV que demostró ser patógena para el ganado vacuno fue la cepa Ibaraki (IBAV) aislada en Japón en 1959 (Jiménez-Cabello et al., 2023; Mahmoud et al., 2021; Rivera et al., 2021). Tanto la enfermedad de la lengua azul como la enfermedad hemorrágica epizootica son causadas por un virus de ARN bicatenario perteneciente a la familia *Reoviridae* y género *Orbivirus*, y transmitidas por insectos pertenecientes al género *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) (Caixeta et al., 2024; Castro et al., 2023; Duan et al., 2022). Hoy en día se sabe que estos dos virus son genéticamente distintos y no reaccionan serológicamente de forma cruzada (Brown-Joseph et al., 2019). Sin embargo, estos dos virus se encuentran estrechamente relacionados, no obstante, no existe la inmunidad heterotípica, por lo que no se espera una protección al virus de la lengua azul (BTV) en una región contra la introducción e infección por el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) (Maan et al., 2017). Su contagio está determinado por la exposición de los rumiantes a los mosquitos *Culicoides* en el llamado “nidus del patógeno”, de acuerdo con la definición de Reisen (2010) en epidemiología del paisaje.

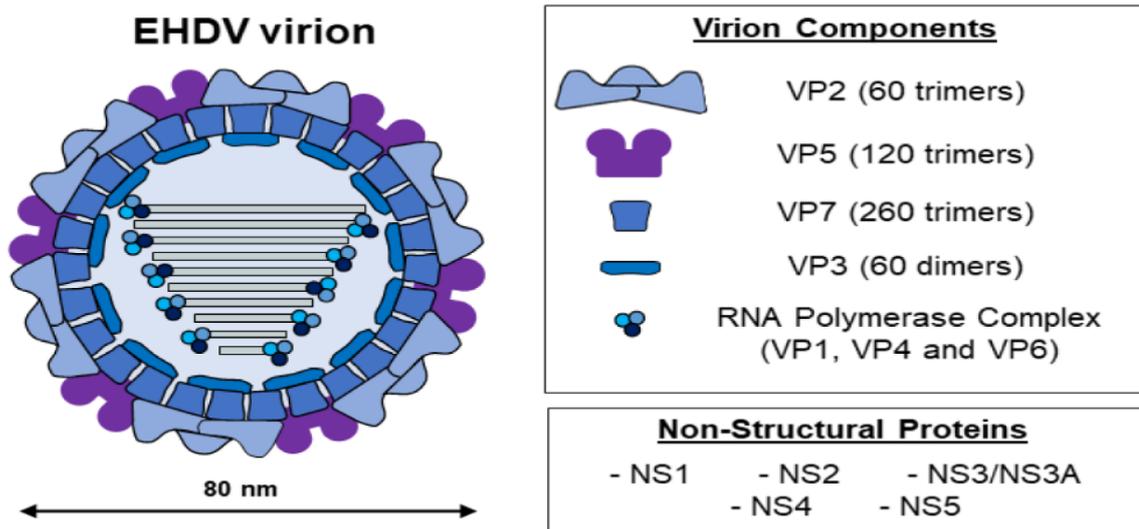
Es esencial señalar que las distintas especies de *Orbivirus* presentan variaciones genéticas y filogenéticas en ciertos segmentos de su genoma, lo que podría reflejar sus orígenes geográficos, conocidos como topotipos. A escala global, los aislados de virus de una misma especie se agrupan en dos categorías topotípicas principales: una occidental, que abarca aislados de América, África, Europa y Medio Oriente, y otra oriental, que incluye aislados de Australia y Asia. En el caso del virus de lengua azul (BTV), la clasificación de un genoma viral (o segmento) dentro de alguno de los topotipos "oriental" u "occidental" se basa en análisis filogenéticos de secuencias. Esto se debe a que no se observan variaciones fenotípicas significativas, como diferencias en el tamaño de los ARN individuales, que permitan identificar rápidamente su origen. En contraste, el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) exhibe características únicas dentro del género *Orbivirus*, ya que las cepas orientales y occidentales pueden distinguirse simplemente analizando sus perfiles de migración de ARN (electroferotipo) en gel de agarosa al 1% (Anthony et al., 2010).

En lo que respecta a los seres humanos, no se han documentado casos de EHDV ni se cuenta con evidencia que respalde su papel como hospedadores del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica. Sin embargo, es relevante mencionar otros tipos de *Orbivirus* que pueden afectarnos. Entre estos se encuentran los virus del complejo antigénico Kemerovo, que incluyen los virus Kemerovo, Lipovnik y Tribec (procedentes de Rusia y Europa del Este), así como el virus Orungo (de África subsahariana), el virus Lebombo (de Sudáfrica y Nigeria) y el virus Changuinola (de América Central) (DeBiasi & Tyler, 2015).

### 1.2. El virus

#### 1.2.1. Composición y estructura

La estructura del virus EHDV está formado por una cápside icosaédrica, la cual está dividida en tres capas proteicas consecutivas, siendo estas la capa interna e intermedia (también denominada núcleo) y la cápside externa (Jiménez-Cabello et al., 2023). Este es un virus de ARN bicatenario que consta de 10 segmentos lineales que codifican para once proteínas. De estas, siete son estructurales nombradas como VP1 a VP7, las mismas que se organizan en dichas tres capas concéntricas, cuya función es albergar el genoma viral. Las cuatro proteínas restantes son proteínas no estructurales identificadas como NS1, NS2, NS3a y NS3b (Brown-Joseph et al., 2019), como se puede observar en la **figura 1**. Es importante resaltar que las principales proteínas son el subnúcleo (VP3), la capa central de superficie (VP7) y la cápside externa que alberga a las proteínas VP2 y VP5 (Jiménez-Cabello et al., 2023).



**Figura 1.** Estructura del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (~80 nm de diámetro). En la presente imagen se puede observar que la cápside externa está formada por tres capas concéntrica, las cuales son constituidas por las proteínas VP2 y VP5. La capa intermedia y el subnúcleo están compuestos por VP7 y VP3. La cápside interna contiene el complejo de la ARN polimerasa, compuesto por las proteínas estructurales VP1, VP4 y VP6. Dentro del ciclo replicativo se ha determinado que al menos cuatro proteínas adicionales se expresan, las cuales son la NS1, NS2, NS3/NS3A y NS4 [Recuperado de (Jiménez-Cabello et al., 2023)].

En la **figura 1**, podemos observar que las proteínas de la cápside externa son la VP2 y VP5 (también denominadas como OC1 y OC2, correspondientemente) las cuales son codificadas por los segmentos 2 y 6, respectivamente (Jiménez-Cabello et al., 2023; Maan et al., 2017). Estas dos proteínas son las más variables (segmentos menos conservados) entre los diferentes serotipos del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, en especial la VP2, debido a la presión selectiva. La función principal de estas dos proteínas recae en las primeras etapas de la infección debido a que están estrechamente relacionadas en la unión y entrada del virus en la célula hospedadora. Adicionalmente, la VP2 es la proteína responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes del virus (nAbs) y juntamente con los ensayos de neutralización cruzada y los amplios estudios filogenéticos, se sabe hoy en día que la proteína VP2 define el serotipo del virus (Jiménez-Cabello et al., 2023).

En términos generales, se puede resaltar que la helicasa viral VP6, codificada por el segmento 9 y que constituye un componente estructural menor del núcleo del virus, es una de las proteínas más conservadas entre todos los *Orbivirus*. Esta proteína presenta variaciones en su secuencia que se correlacionan con el serogrupo y la especie del virus, así como con los orígenes geográficos de los aislados (topotipos) (Maan et al., 2017).

Las proteínas VP1 (codificada por el segmento 1), VP4 (codificada por el segmento 4) y VP6 (codificada por el segmento 9), se encuentran involucradas en la replicación del genoma, y son altamente conservadas, presentando al menos el 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos tanto en las cepas orientales y occidentales. Por su parte, la proteína VP7 (codificada por el segmento 7), se caracteriza por la presencia de una secuencia de aminoácidos altamente conservada, es decir, manifiesta más del 90% de identidad de secuencia entre los diferentes serotipos del virus EHDV. Hoy en día, se la denomina proteína inmunodominante específica del serogrupo (Jiménez-Cabello et al., 2023). Y es utilizada dentro de las pruebas serológicas para el diagnóstico y la vigilancia de la lengua azul y la EHD. El ELISA competitivo (c-ELISA) es la prueba serológica más utilizada para la detección específica de anticuerpos (Abs) de la proteína viral 7 (VP7) tanto para BTV como para EHDV (Bréard et al., 2020).

Por otro lado, las proteínas no estructurales son las encargadas de llevar a cabo procesos virales cruciales como el empaquetamiento del genoma, el transporte intracelular, el ensamblaje de la cápside, la liberación del virus y el control de la respuesta inmune. Dentro de estas proteínas no estructurales se encuentra la NS1. Estudios recientes han demostrado que la NS1 es una proteína idéntica, ya que presenta más del 90% de homología de secuencia entre los diversos serotipos del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica. Durante la replicación viral en células contagiadas se ha observado que esta proteína es la más expresada, y juega un papel fundamental en la regulación positiva de la síntesis de proteínas virales y en la patogenicidad celular. Asimismo, tiene como objetivo formar los túbulos, los mismos que se encargan del transporte viral dentro de las células infectadas (Jiménez-Cabello et al., 2023).

Otra proteína no estructural es la NS2 (codificada por el segmento 8), que tiene actividad ATPasa, y juega un papel fundamental en el empaquetamiento y ensamblaje del virus y en la traducción del ARN. Esta fosfoproteína es el componente principal de los cuerpos de inclusión virales (VIB). En términos de similitud de aminoácidos, NS2 varía más que NS1. Por otro lado, tenemos a la proteína no estructural NS3 (codificada por el segmento 10), esta

---

proteína se expresa a niveles altos, debido a que es la encargada de la liberación del virus en las células infectadas. Dentro de su estructura se puede destacar a sus dominios transmembrana, los cuales permiten la salida del virus a través de gemación, en lugar de lisis, en células de *Culicoides*. Cabe mencionar que la NS3 y la NS3A son proteínas íntimamente relacionadas, ya que las dos son traducidas a partir de los ORFs secuenciales del segmento 10 (Jiménez-Cabello et al., 2023).

### 1.2.2. Clasificación fenotípica (serotipos), filogenia y evolución

La evolución del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) se ve impulsada por dos factores clave. El primero está relacionado con las mutaciones aleatorias, que ocurren durante los ciclos naturales de transmisión y son fundamentales para la diversificación de las cepas de EHDV y su patogenicidad. El segundo factor se refiere al reordenamiento de segmentos genéticos, que resulta del intercambio de segmentos cuando las células son coinfectadas por al menos dos cepas distintas de EHDV (Rajko-Nenow et al., 2019). Por lo tanto, la variación genética que está presente entre las cepas de EHDV, se derivará de mecanismos de recombinación, duplicación genética y mutación puntual. Sin duda la reordenación genética es una fuerza importante que caracteriza la fortaleza evolutiva de EHDV para mantener su aptitud viral (Jiménez-Cabello et al., 2023).

Un ejemplo relevante dentro de la evolución del EHDV según Rajko-Nenow et al. (2019), es la detección de una nueva cepa reordenada de EHDV en el año 2006, denominada como EHDV-6 (Indiana) en los EE. UU, la cual se caracterizó por presentar segmentos de origen distintos. Entre ellos se encontraban los segmentos 2 y 6, los cuales tenían descendencia del virus australiano (EHD6/AUS1981/07) y los segmentos restantes presentan una descendencia de la cepa norteamericana EHDV-2 de Alberta. Es importante resaltar que esta identificación precisa permitió informar de un aumento repentino de la enfermedad causada por EHDV-6 en Nebraska, Dakota del Sur, Michigan y Missouri tanto en ganado doméstico y venados de cola blanca.

Según Maan et al. (2017), se reconocen ocho serotipos del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, los cuales son identificables por la especificidad de las interacciones entre anticuerpos neutralizantes y la proteína VP2. Esta proteína contiene la mayoría de los epítomos que son reconocidos por los anticuerpos neutralizantes, lo que la convierte en el principal determinante del serotipo de EHDV. Investigaciones recientes han demostrado que la proteína VP5 mejora la respuesta neutralizante inducida por VP2.

Actualmente, basándose en los recientes análisis genéticos y filogenéticos de las proteínas que conforman la cápsida externa (VP2 y VP5) y de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, es posible identificar oficialmente siete serotipos del virus (1,2,4,5,6,7 y 8). Es importante destacar que tanto el serotipo 3 y 9 (también conocido como EHDV-318) no se han incluido en esta lista, debido a que estos han sido reclasificados como cepa de EHDV-1 y EHDV-6, respectivamente. Asimismo, es relevante mencionar que el virus Ibaraki, hoy en día se lo clasifica como una cepa de EHDV-2 (Brown-Joseph et al., 2019; Mahmoud et al., 2021).

Como herramienta de análisis evolutivos entre especies se utilizan los análisis filogenéticos. En términos generales, se define árbol filogenético a aquella representación gráfica e hipotética de entidades biológicas que se encuentran conectadas por un ancestro inmediato común. Hoy en día, la mayoría de los árboles filogenéticos se desarrollan a partir de datos moleculares, ya sea estas moléculas de ADN, ARN o proteínas. De manera global se tiende a usar ADN cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, ya que esta molécula nos provee de información relevante del genotipo y fenotipo de las especies. Para realizar análisis filogenéticos de especies lejanamente emparentadas se trabaja también con secuencias de aminoácidos (proteínas) (Mendoza Revilla, 2012). Actualmente, por medio de estas agrupaciones filogenéticas y distancias genéticas se ha reconocido siete serotipos distintos del virus EHDV (Brown-Joseph et al., 2019; Sghaier et al., 2022).

### 1.3. Ecología y Ciclos de transmisión

Para comprender el ciclo de transmisión del EHDV, es fundamental analizar el ciclo de vida de los mosquitos hembra, comenzando por su ciclo gonotrófico. Este ciclo incluye diversos estados: nulípara, paritoria, grávida y alimentada con sangre. Su importancia recae en los mosquitos en estado paritorio, ya que estos son los principales transmisores de los virus BTV y EHDV. Por el contrario, los mosquitos nulíparas son de menor relevancia, pues aún estos no se han alimentado de sangre, por lo que carecen de patógenos (Benn et al., 2024; Dinh et al., 2021).

Otro factor que se ha identificado como causa positiva para la transmisión de EHDV, son los factores ambientales como por ejemplo las altas temperaturas, ya que estas aumentan la capacidad de los artrópodos para transmitir cualquier virus. Hoy en día se ha determinado que las temperaturas más altas disminuyen el período de incubación extrínseca de los virus, provocando una transmisión en intervalos de tiempo más largos provocando más pérdidas de las estimadas (Jiménez-Cabello et al., 2023).

Asimismo, la respuesta inmune generada en los hospedadores rumiantes susceptibles comienza cuando estos son infectados por EHDV. El virus infecta principalmente las células dendríticas y los macrófagos, debido a que estos facilitan el transporte del virus a los ganglios linfáticos regionales y es allí, donde se lleva a cabo la replicación primaria del virus, el cual luego se disemina a varios órganos, sobre todo al bazo y a los pulmones (Jiménez-Cabello et al., 2023). De manera que, la respuesta inmune de los hospedadores susceptibles se basa en la secreción de

citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), las cuales mejoran la patogénesis viral. En otras palabras, se puede afirmar que los mediadores inflamatorios contribuyen a la gravedad de la enfermedad clínica. Es importante destacar que la genética de la huésped relacionada con la respuesta inmune innata probablemente juega un papel en el resultado de la enfermedad (Jiménez-Cabello et al., 2023).

Para entender sobre la ecología de los mosquitos *Culicoides* nos hemos basado en la investigación llevada a cabo por Benn et al., (2024) el cual utilizó un modelo de ocupación para estimar la abundancia de hembras páridas (potencialmente transmisoras de virus) y grávidas (cargadas de huevos) de tres especies de *Culicoides* (*C. haematopotus*, *C. stellifer* y *C. venustus*) en un rancho de vida silvestre en Florida durante las temporadas de transmisión de enfermedades hemorrágicas (EHDV y BTV) en los años 2015 y 2016.

Dentro de su investigación ha podido evidenciar que la ecología larvaria de estos virus es bastante variable, abarcando hábitats que van desde huecos de árboles húmedos hasta márgenes de arroyos, lo cual indudablemente dificultó la identificación precisa de la distribución local de los virus en relación con sus vectores. Asimismo, muestra que un predictor más preciso de la abundancia de mosquitos picadores puede ser una combinación de covariables como el tipo de hábitat, la proximidad al agua, la proximidad a la alimentación con sangre y el drenaje del suelo. Y cabe mencionar que sus resultados muestran que es más probable que los mosquitos grávidos aparezcan cerca de sitios potenciales de oviposición, como sustratos fangosos o arenosos en las orillas de estanques y arroyos, debido a que estos les proporcionan la humedad necesaria para el desarrollo larvario, de manera que se puede razonar que el tipo de hábitat, el tipo de suelo y las áreas limítrofes entre tipos de suelo bien y mal drenados pueden ser un fuerte predictor de la abundancia de mosquitos grávidos.

Es importante señalar que estos autores destacan la necesidad de comprender los patrones de abundancia de los mosquitos *Culicoides*, ya que anticipar los picos en su población facilitaría el desarrollo de estrategias eficaces para el manejo de vectores. Estas estrategias podrían incluir la aplicación de insecticidas específicos o modificaciones del hábitat para disminuir los lugares de reproducción de los mosquitos. Además, considera primordial implementar un manejo adecuado de los animales mediante la reubicación de los comederos o ajustando la disponibilidad de alimentos durante el día. Finalmente, sugieren que el riesgo de EHDV y BTV para los ciervos no es aleatorio en el paisaje, sino que está correlacionado con la abundancia de mosquitos picadores específicos de la especie y su uso del hábitat.

### 1.3.1. Hospedadores y posibles reservorios vertebrados

De manera general podemos señalar a los elefantes africanos y tapires, como hospedadores potenciales de *Orbivirus* (Caixeta et al., 2024). Y de manera específica podemos recalcar que entre los posibles hospedadores intermedios de la enfermedad hemorrágica epizootica se encuentran los rumiantes silvestre y domésticos. Dentro de los rumiantes silvestres se ha determinado que el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) oriundo de América del Norte, es el más susceptible. A diferencia, los venados mulos, los venados de cola negra y los antílopes berrendos que se ven menos afectados por el virus, teniendo mayores tasas de supervivencia (Rajko-Nenow et al., 2019). Y dentro de los rumiantes domesticados se ha observado que afecta de manera especial al ganado bovino, el cual presenta síntomas menos graves o asintomáticos (Casey et al., 2021; Sghaier et al., 2022), por lo tanto, se lo considera como hospedador reservorio del virus (Brown-Joseph et al., 2019; Merrill et al., 2019). Cabe mencionar que EHDV puede también infectar a ovejas, cabras, cerdos, alpacas y yaks (AXON VET, 2023).

A continuación, se presenta la tabla 1, en la cual podemos observar los diferentes hospedadores identificados como fuente de alimento de *Culicoides* spp.

Tabla 1. Hospedadores identificados en muestras de sangre de diferentes *Culicoides* spp.

<i>Culicoides</i> spp.	Especies hospedadores como fuente de sangre identificadas
<i>Culicoides insignis</i>	Ciervo rojo ( <i>Cervus elaphus</i> ), Ciervo europeo en barbecho ( <i>Dama dama</i> ), Chital ( <i>Axis axis</i> ), Ciervo sambar ( <i>Cervus unicolor</i> ), Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Paloma de collar rojo ( <i>Streptopelia tranquebarica</i> ), Lagarto iraní ( <i>Agamura Kermansis</i> ), Pescado amazónico ( <i>Teleocichla MinDanensis</i> ), Cortecerito ( <i>Certhia americana</i> )
<i>Culicoides debilipalpis</i>	Elefante de arbusto africano ( <i>Loxodonta africana</i> ), Humano ( <i>Homo sapiens</i> ), Tapir sudamericano ( <i>Tapirus terrestris</i> )
<i>Culicoides pusillus</i>	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )

Fuente (Caixeta et al., 2024)

### 1.3.2. Insectos vectores

El virus de la enfermedad hemorrágica epizootica es transmitido por mosquitos hembra adultas de la familia *Ceratopogonidae*, género *Culicoides* (ejem. *Culicoides sonorensis*, *C. insignis*). Actualmente la distribución geográfica tanto de BTV y EHDV en América del Norte depende en gran medida de la distribución de *Culicoides*

*sonorensis*, vector principal de BTV y el único vector confirmado de EHDV (Dinh et al., 2021; Rivera et al., 2021). Sin embargo, aunque los mosquitos *C. sonorensis* son vectores confirmados del EHDV, la competencia vectorial puede variar entre los distintos individuos. Hoy en día, no se ha dilucidado los factores que subyacen a la competencia del vector para el EHDV, pero se cree que entre estos factores se encuentran aquellos relacionados a barreras físicas (membrana peritrófica y tejidos del intestino medio), y los vinculados con el sistema inmunitario, es decir, aquellas respuestas inmunes innatas y vías de ARNip. En insectos infectados, se ha reportado que el virus debe atravesar y sobrevivir estas barreras físicas e inmunes para alcanzar el hemocele y luego su posterior diseminación a los distintos tejidos del cuerpo (Nayduch et al., 2019).

Según Caixeta et al., (2024) se ha podido identificar otras especies de *Culicoides spp.*, como posibles vectores de BTV y EHDV. En Brasil, estos resultados señalan que existen dos vectores competentes para la transmisión de estos virus, los cuales son *Culicoides insignis* y *Culicoides pusillus*, y estos pueden estar presentes particularmente en lugares con mamíferos, tanto en corrales o porquerizas. En los estados Minas Gerais y Maranhão se identificó que *Culicoides insignis* es el vector más prevalente y el segundo vector más frecuente es *Culicoides pusillus*.

Asimismo, Jiménez- Cabello et al., (2023) señalan que dentro de las especies de *Culicoides*, posibles responsables de la transmisión de EHDV, se encuentran las siguientes: *Culicoides imicola*, *Culicoides sonorensis*, *Culicoides obsoletus*, *Culicoides brevitarsis*, *Culicoides mohave* y *Culicoides oxystoma*, entre otras.

#### 1.4. Epidemiología, distribución, signos, identificación

Actualmente, se conoce que EHDV está ampliamente distribuido en varias regiones templadas y tropicales de América del Norte, América del Sur, Australia, Asia y África (Rodrigues et al., 2022). Sin embargo, se sabe que EHDV es endémico en partes de América del Norte, Australia y ciertos países de Asia y África. En el presente, EHDV ha sido aislado en América del Norte, América del Sur, África, Asia, Oriente Medio y Oceanía (figura 2) (Jiménez-Cabello et al., 2023).

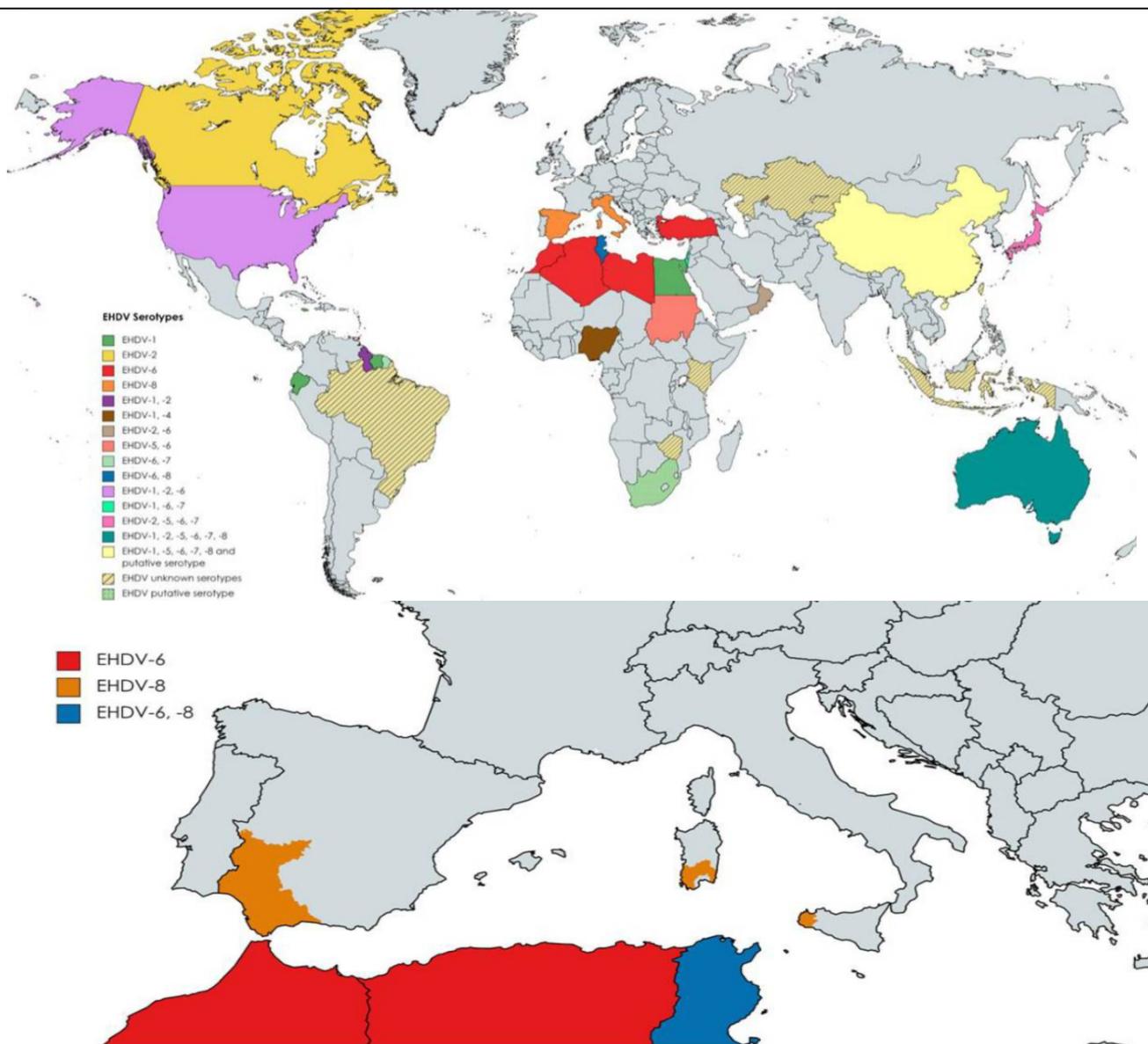
Investigaciones recientes indican que de los siete serotipos de EHDV identificados, EHDV-1, EHDV-2 y EHDV-6 son endémicos en varias áreas de América del Norte, América del Sur y la Cuenca del Caribe. Sin embargo, los serotipos de EHDV-1 y EHDV-6 son únicamente endémicos de Estados Unidos tanto en rumiantes salvajes y domésticos. Asimismo, el serotipo de EHDV-2 es exclusivamente reconocido como endémico del sureste de Estados Unidos (Brown-Joseph et al., 2019; Rajko-Nenow et al., 2019).

A continuación, se detalla la distribución mundial de los diferentes serotipos de EHDV, la misma que se podrá visualizar de mejor manera en la figura 2.

Tabla 2. Distribución mundial de los diferentes serotipos de EHDV

Serotipo identificado	Lugar de identificación
EHDV-1,-2,-6	Turquía
EHDV-6	Argelia, Marruecos y Túnez
EHDV-7	Israel y Jordania
EHDV-1,-2,-5,-6,-7 y -8	Australia
EHDV-2 y -7	Japón
EHDV-5 y -6 (aislados de insectos vectores <i>Culicoides</i> )	Japón
EHDV-1,-5,-6,-7 y -8	China
EHDV-8	Túnez y Australia
EHDV-1	Egipto
EHDV-2 y -6	Omán
EHDV-5 y -6	Sudán
EHDV-1 y -4	Nigeria
EHDV-6	Libia
EHDV-6 y -8	Túnez
EHDV-6	isla de Mayotte
EHDV-6 y -7	Guayana Francesa
EHDV-1	Ecuador
EHDV-6	Trinidad
EHDV-1,-6 y -7	Israel

Fuente (Jiménez-Cabello et al., 2023)



**Figura 2.** Epidemiología del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica a nivel global y en Europa. En la sección superior, se destacan las áreas con brotes de EHDV o evidencia serológica, mientras que en la parte inferior se representan las regiones afectadas de Italia y España, junto con los serotipos específicos identificados en cada país [Recuperado de (Jiménez-Cabello et al., 2023)].

En Israel, en el año 2006 los brotes de EHDV-7 en bovinos provocaron pérdidas económicas significativas las cuales perjudicaron a 83 rebaños lecheros y 22 rebaños de carne, es importante resaltar que estos brotes presentaban tasas de morbilidad (desde 5% al 80%) y tasas de mortalidad inferiores al 1%(Kedmi et al., 2010; Mahmoud et al., 2021).

Hasta el 5 de abril de 2024, varios países europeos habían reportado brotes de enfermedad hemorrágica epizootica en ganado bovino. En Italia, España, Portugal y Francia se han registrado un total de 16, 274, 79 y 225 brotes, respectivamente (Spedicato et al., 2024). Por otra parte, el 16 de septiembre de 2024, la Comunidad Autónoma de Cantabria confirmó que 850 animales habían contraído la enfermedad, con un saldo de 119 muertes. En términos generales, de las 254,606 cabezas de ganado registradas en Cantabria, 253,448 se encuentran sanas, mientras que 1,010 han sido afectadas por la EHD y 147 han fallecido. Se ha señalado también que hay 556 explotaciones ganaderas en la región que han recibido la vacuna contra el serotipo 8 (Fundación iO, 2024). Es crucial que las medidas de control y prevención se mantengan vigentes para mitigar el impacto de esta enfermedad en la ganadería.

Entre los signos que pueden abarcar esta enfermedad están aquellas enfermedades de carácter subclínicas y enfermedades clínicas graves. Entre los síntomas se encuentra fiebre alta, letargo, edema, ulceraciones de la almohadilla dental y la mucosa oral, hemorragias en el corazón, en los pulmones, en los principales vasos sanguíneos y en otros tejidos. También se ha reportado la presencia de anorexia, seguida de rumia reducida, debilidad y marcha rígida. Sin embargo, el signo clínico más importante es la producción reducida de leche, siendo esta una de las

---

principales razones de las pérdidas económicas debido a la infección por EHDV (Kedmi et al., 2010). Estos signos clínicos dependerán de la especie, la raza, la edad y el estado inmunitario de los rumiantes. Es decir, será necesario comprender la fisiología, inmunología y genética de las especies rumiantes susceptibles; además de estudiar la ecología de los insectos vectores (Rivera et al., 2021).

La detección de EHDV se ha llevado a cabo mediante ensayos moleculares dirigidos a los segmentos conservados del genoma 5, 7 y/o 10 (genes NS1, VP7 y/o NS3, respectivamente), por lo tanto, se utiliza cebadores y sondas específicos de la especie/serogrupo de los virus. También se han desarrollado ensayos moleculares convencionales basados en RT-PCR para identificar tipos individuales de EHDV, de forma más rápida y fiable que mediante métodos serológicos convencionales (Maan et al., 2017).

### **1.5. Vacuna: aproximación clásica y reciente**

Hoy en día el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) representa un desafío económico considerable para la producción ganadera. Por ejemplo, en Europa actualmente no existen vacunas autorizadas para el control de EHDV, lo cual ha limitado los esfuerzos para frenar su propagación y sus efectos negativos. Sin embargo, a diferencia de Europa, en Japón se han desarrollado dos tipos de vacunas. La primera es una vacuna inactivada dual y la segunda es una vacuna viva monovalente utilizadas tanto para la fiebre efimera bovina como para EHDV serotipo 2. Por otro lado, en los Estados Unidos, se producen vacunas autógenas inactivadas a partir de cepas de EHDV de ciervos afectados, aunque su eficacia varía. Como se puede apreciar se han investigado diferentes plataformas de vacunación contra el EHDV, pero a pesar de ello no se ha podido confirmar su efectividad en hospedadores silvestres (Jiménez-Cabello et al., 2023; Spedicato et al., 2024).

Es importante resalta que las vacunas de próxima generación deben permitir la diferenciación entre animales infectados naturalmente y vacunados (DIVA). Además, es necesario que estas nuevas vacunas ofrezcan protección contra los múltiples serotipos de EHDV, ya que es probable que se expandan a áreas no endémicas. Hasta ahora, las vacunas desarrolladas se basan en la proteína VP2 recombinante del EHDV-2, la cual ha mostrado resultados alentadores en términos de inmunogenicidad y protección en ciervos de cola blanca (WTD). La inmunización con esta vacuna ha logrado prevenir la enfermedad clínica y la viremia (Jiménez-Cabello et al., 2023).

Las respuestas inmunitarias que se producen a partir de la vacunación y durante la recuperación de infecciones por orbivirus, como el virus de la lengua azul y el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, abarcan la formación de anticuerpos neutralizantes que atacan la proteína VP2, así como anticuerpos no neutralizantes dirigidos a otras proteínas del virus. Los elementos antigénicos responsables de esta neutralización se localizan en la proteína VP2 de la envoltura viral, desempeñando un papel crucial en la defensa inmunitaria. La respuesta inmune que se genera tras la vacunación es significativa, ya que tiene el poder de limitar tanto la cantidad como la duración de la viremia, lo que resulta crucial para prevenir la infección en los mosquitos y, de este modo, evitar la transmisión del virus a animales susceptibles. Es importante destacar que la proteína VP5, también localizada en la envoltura viral, posee una notable capacidad para modificar la estructura de los epítopos de la proteína VP2, lo que podría influir de manera importante en la respuesta inmune generada (McVey & MacLachlan, 2015).

En el ámbito de los avances científicos, se destacan diversas iniciativas relevantes, como las que se están llevando a cabo en los EE. UU., donde actualmente se realizan pruebas de campo y se desarrollan vacunas bivalentes y multivalentes. Se ha propuesto también utilizar plataformas de vacunas ya consolidadas para crear nuevas soluciones contra el EHDV. A su vez, diferentes investigaciones exploran la generación de partículas similares a virus (VLP) y otros enfoques innovadores, incluyendo vacunas vivas atenuadas no replicativas. Aunque algunas de estas estrategias han mostrado resultados prometedores, como la producción de VLP a partir de plantas, aún no han logrado una comercialización efectiva debido a problemas de costo. A esto se suma el reciente aumento en la investigación de vacunas de próxima generación contra el EHDV, motivado por los primeros casos de EHDV-8 en la Unión Europea. La fluctuante epidemiología del virus ha llevado a los científicos a considerar enfoques multiserotípicos en la vacunación. Las respuestas inmunitarias surgidas de la infección o la vacunación contra orbivirus incluyen anticuerpos neutralizantes centrados en la proteína VP2, así como respuestas citotóxicas dirigidas a otras proteínas virales. Investigaciones recientes han revelado epítopos compartidos entre las proteínas VP7 y VP5 de EHDV y BTV, lo que sugiere similitudes inmunológicas entre ambas. Además, experimentos realizados con ganado convaleciente han demostrado que la exposición a un orbivirus no afecta la replicación viral del otro; sin embargo, se requieren más estudios para comprender la reactividad y la posible protección cruzada entre los antígenos de EHDV y BTV (Jiménez-Cabello et al., 2023).

### **1.6. EHDV en Ecuador**

En el Ecuador, se ha identificado el serotipo EHDV-1 en ganado bovino (Rivera et al., 2021; Vinuesa et al., 2019). Sin embargo, en este país existe una gran controversia, debido a que dentro de la resolución 0008 de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario esta enfermedad ha sido calificada como una enfermedad de notificación o declaración obligatoria, más no como una enfermedad de control oficial. Por ello, el sistema de control Fito y Zoonosanitario no tiene la capacidad de diseñar lineamientos técnicos o programas sanitarios eficientes (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario, 2020). Además, no existe presupuesto para desarrollar programas de vigilancia, que lleve consigo campañas de pruebas sanitarias y vacunación. Sin duda, este inconveniente se ha convertido un causante de pérdidas económicas a nivel nacional y mundial. Es por ello, por lo que se es necesario

---

comprender la epidemiología evolutiva global de estos virus para diseñar programas de vigilancia y control, los cuales estarán bajo la responsabilidad de los entes gubernamentales (Maldonado Orbe, 2023).

Es importante señalar que Ecuador es un país florícola, agrícola, y pecuario. Por esta razón, es importante establecer estos lineamientos técnicos y programas sanitarios; ya que, según el Instituto Nacional de Estadística y Censos en el año 2022, se reportó una existencia de 3.860.493 cabezas de ganado vacuno; 551, 960 cabezas de ganado ovino y 93,24 cabezas de ganado porcino. Como se puede observar nuestra economía depende también del sector pecuario y, por lo tanto, cualquier mal control y/o vigilancia podría disminuir la producción de carne, leche y sus derivados.

Finalmente, podemos señalar que a través de diversas investigaciones se ha podido establecer la relación entre las enfermedades/patógenos de transmisión vectorial (ETV), con los factores evolutivos y eco-epidemiológicos, los cuales establecen patrones filogenéticos que explican los mecanismos de emergencia o reemergencia de las enfermedades hemorrágicas. También, se podría demostrar que los aislados de EHDV presentan una diversidad y estructura filogenética que muestran clados taxonómicos concordantes con la identificación serológica (serotipos) y, también con patrones evolutivos (cambios mutacionales apomórficos) que se correlacionan con su patrón biogeográfico.

Por lo tanto, nuestro objetivo principal fue inferir las relaciones evolutivas de genotipos virales de EHDV-genVP2, *in silico*, para determinar patrones taxonómicos relacionados con la correlación genotipo-fenotipo (serotipos), y filogeográficos de epidemiología molecular relacionados con su origen y trazas de movilidad e introducción, mientras que nuestra hipótesis de trabajo plantea que debe existir una estructura filogeográfica que permita establecer un posible origen geográfico del virus, regiones de evolución *in situ*, patrones de intercambio o introducción viral, así como una plataforma de taxonomía molecular mediante las secuencias del gen VP2.

## 2. Materiales y Métodos

Se realizó un muestreo de secuencias del gen VP2 de la cápside viral de EHDV, considerando varios criterios de inclusión: 1-la mayor amplitud geográfica posible de manera de representar a los cinco continentes y países donde se han dado brotes, 2- El gen completo tiene un tamaño de 2,965 pb pero no existen una gran representación con el gen completo y el criterio 1, por tanto se realizó una inclusión de porciones del gen que cumpliera con este criterio, 3. Se incluyeron secuencias VP2 con información completa en cuanto a: país, hospedador.

Se construyó una matriz con el mayor número de secuencias, se alinearon por homología y se cortaron aquellas porciones que no amplificaron con distintos primers y que no alineaban por tamaño de amplicón.

La matriz de alineamiento se obtuvo por medio del software MacVector, 18.7.6, con el algoritmo ClustalW; parámetros de alineamiento buscando homología posicionales de GOP:30.0, GEP: 10.0, utilizando 71 secuencias de ADN muestradas en genbank (NCBI) del gen VP2 de la Cápside, obteniendo una matriz final de una longitud de 910 pb, proveniente de 19 países en cinco continentes.

Se incluyeron cuatro *Orbivirus* de referencia (grupos hermanos y outgroup). El grupo hermano está conformado por el virus de Changuinola (CGLV), virus Ibaraki (IBV) y el virus de la lengua azul (BTV). El outgroup seleccionado por relación taxonómica fue el virus de la peste equina africana (AHSV), Anexo A1 (Tabla 1)

Las construcciones filogenéticas se realizaron con Paup4.05build169, con optimizaciones de Máxima Parsimonia (MP), 1.000 réplicas-adición al azar, TBR para barrido de ramas y búsqueda de islas de árboles, y repesado mediante índice de consistencia recalculado; la construcción con Máxima Verosimilitud, MV(Maximum Likelihood), se realizó con el modelo de sustitución-GTR+G (calculado por ModelTest, via MEGAX).

El apoyo de ramas o clados se obtuvo Bootstrapping 1.000 pseudoréplicas para significancia estadística de clados con base en el 100%. Que se muestran en la base de las ramas. Tanto MP como MV arrojaron árboles de igual topología.

## 3. Resultados y Discusión

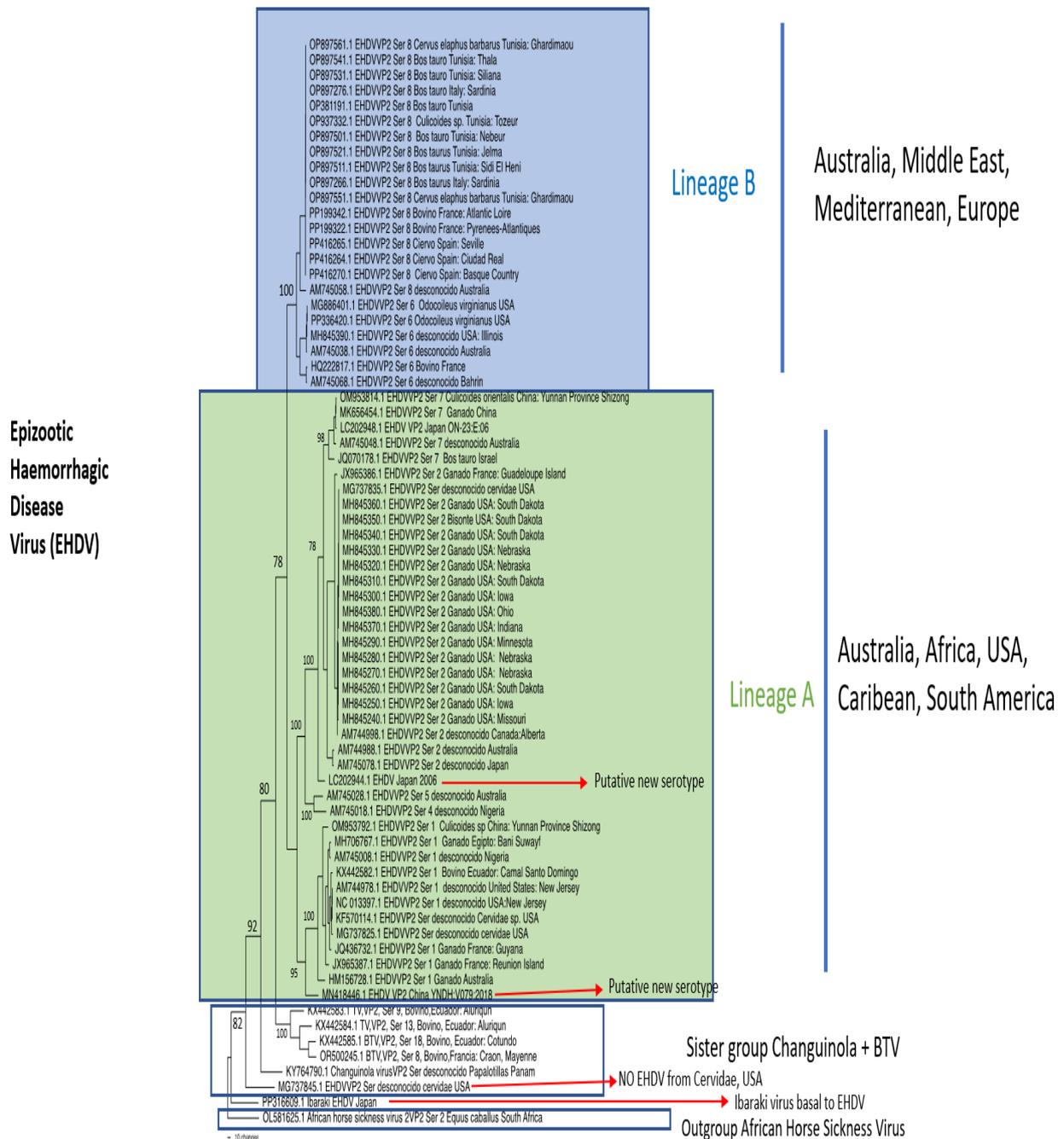
### 3.1. Filogeografía y estructura filogenética

Hoy en día, se sabe que los *Orbivirus* son categorizados según sus características morfológicas, serológicas y fisicoquímicas; en este contexto, las relaciones filogenéticas entre EHDV, BTV, CGLV y AHSV, analizadas en esta investigación, corroboran su clasificación actual dentro del mismo género *Orbivirus*, que pertenece a la familia *Reoviridae*. En la actualidad, se reconoce que esta familia comprende 22 especies virales, entre las cuales se incluyen EHDV, BTV, CGLV y AHSV, además de 10 virus no clasificados o no asignados (Silva et al., 2013, 2014).

En la figura 3, se resaltan varios aspectos de gran relevancia. En primer lugar, se evidencia la monofilia de EHDV en comparación con el virus de la peste porcina. Además, se identifican los virus de Ibaraki, Changuinola y BTV como grupos externos y parientes cercanos de EHDV. Sin embargo, este hallazgo sobre el virus Ibaraki contradice las afirmaciones previas realizadas por Brown-Joseph et al. (2019) y Mahmoud et al. (2021), quienes clasificaron a este virus dentro del serotipo 2. Según nuestro análisis, el virus Ibaraki es, en realidad, distinto del complejo de serotipos de EHDV, lo que sugiere una posible inexactitud en las conclusiones de esos estudios.

En tercer lugar, se resalta que la secuencia de EHDV serotipo 2, aislada de un ciervo en EE. UU. (código MG737845.1), se posiciona como externa y parafilética, lo que sugiere la posible existencia de un virus distinto y no identificado que difiere del clado EHDV y se relaciona con los grupos hermanos IBKV, Changuinola y BTV.

Por último, se observa que el clado EHDV, denominado aquí como complejo viral EHDV, se divide en dos linajes principales: el linaje A, que abarca secuencias de Australia, África, Estados Unidos, el Caribe y América del Sur (equivalente al linaje occidental o "Western" según Anthony et al. (2010)), y el linaje B, que incluye secuencias de Australia, Oriente Medio, el Mediterráneo y Europa (equivalente al linaje oriental o "Eastern" por Anthony et al. (2010)). Cabe destacar que ambos linajes incluyen secuencias procedentes de Australia.

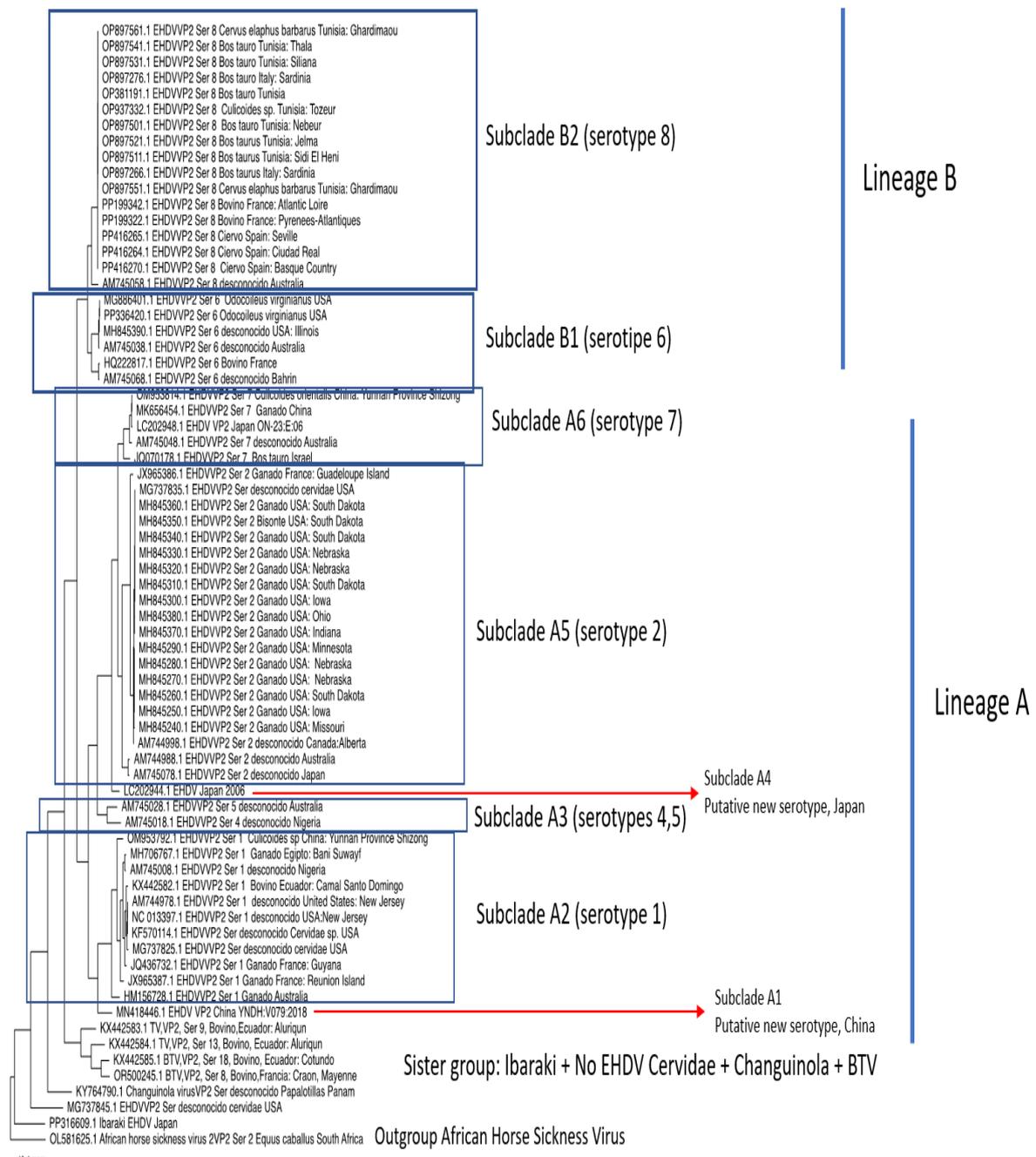


**Figura 3.** Análisis de la Filogenia de EHDV y linajes monofiléticos. El árbol fue construido bajo el criterio de Parsimonia Máxima. Los valores de bootstrap para el apoyo de ramas o clados se muestra sobre las ramas. Se muestran en verde y azul los dos grandes linajes, así como los grupos de referencia.

En la Figura 4, la estructura filogenética y la topología del árbol revelan diferentes subclados dentro de los linajes A y B, que se correlacionan con la identificación serológica (serotipos) conocidos, evidenciando una relación significativa entre el genotipo viral (ADN) y el fenotipo viral (serotipos determinados inmunológicamente), en función del gen VP2, que actúa como inductor de anticuerpos neutralizantes y facilita el reconocimiento y la entrada del virus en las células del hospedador.

Adicionalmente, se identifican dos subclados monofiléticos que son basales para A2 (serotipo 1) y A5 (serotipo 2), designados como A1, correspondiente a China, y A4, correspondiente a Japón, respectivamente. Esto confirma la existencia de dos nuevos serotipos, como lo sugieren los estudios de Yang et al. (2020) en China y Shirafuji et al. (2017) en Japón sin una comprobación filogenética.

El subclado A2 (serotipo 1) incluye secuencias de los siguientes países: China, Egipto, Nigeria, Ecuador, Estados Unidos (Nueva Jersey), Francia (Guayana), Francia (Isla de Reunión) y Australia. Por otro lado, el subclado A5 (serotipo 2) abarca secuencias de Francia (Isla de Guadalupe), Estados Unidos de los estados de Dakota del Sur, Nebraska, Iowa, Ohio, Indiana, Minnesota, Misuri, así como de Canadá (Alberta), Australia y Japón.



**Figura 4.** Correlación de clados genotipo vs fenotipo (serotipos). El árbol fue construido bajo el criterio de Parsimonia Máxima. Las líneas rojas muestran los nuevos serotipos de China y Japón. Los subclados se correlacionan con serotipos.

En la figura 5 se observan y se destacan las relaciones evolutivas entre las secuencias de España, Italia y Francia (serotipo 8), que se encuentran en politomía con secuencias de Túnez y el norte de África, lo que sugiere una posible vía de introducción del virus o de relación de intercambio comercial. Del mismo modo, se muestra una conexión entre la secuencia de Ecuador y la de Estados Unidos.

Todos los subclados incluyen secuencias de Australia, en su mayoría basales/ancestrales, lo que sugiere un posible origen ancestral único del complejo EHDV en esta región, junto con la evolución *in situ* de serotipos y posterior introducción a otras áreas. Las divergencias calculadas entre clados y subclados apuntan a la existencia de un complejo viral similar a un nivel de especies virales, como las divergencias entre los virus hermanos y EDHV.



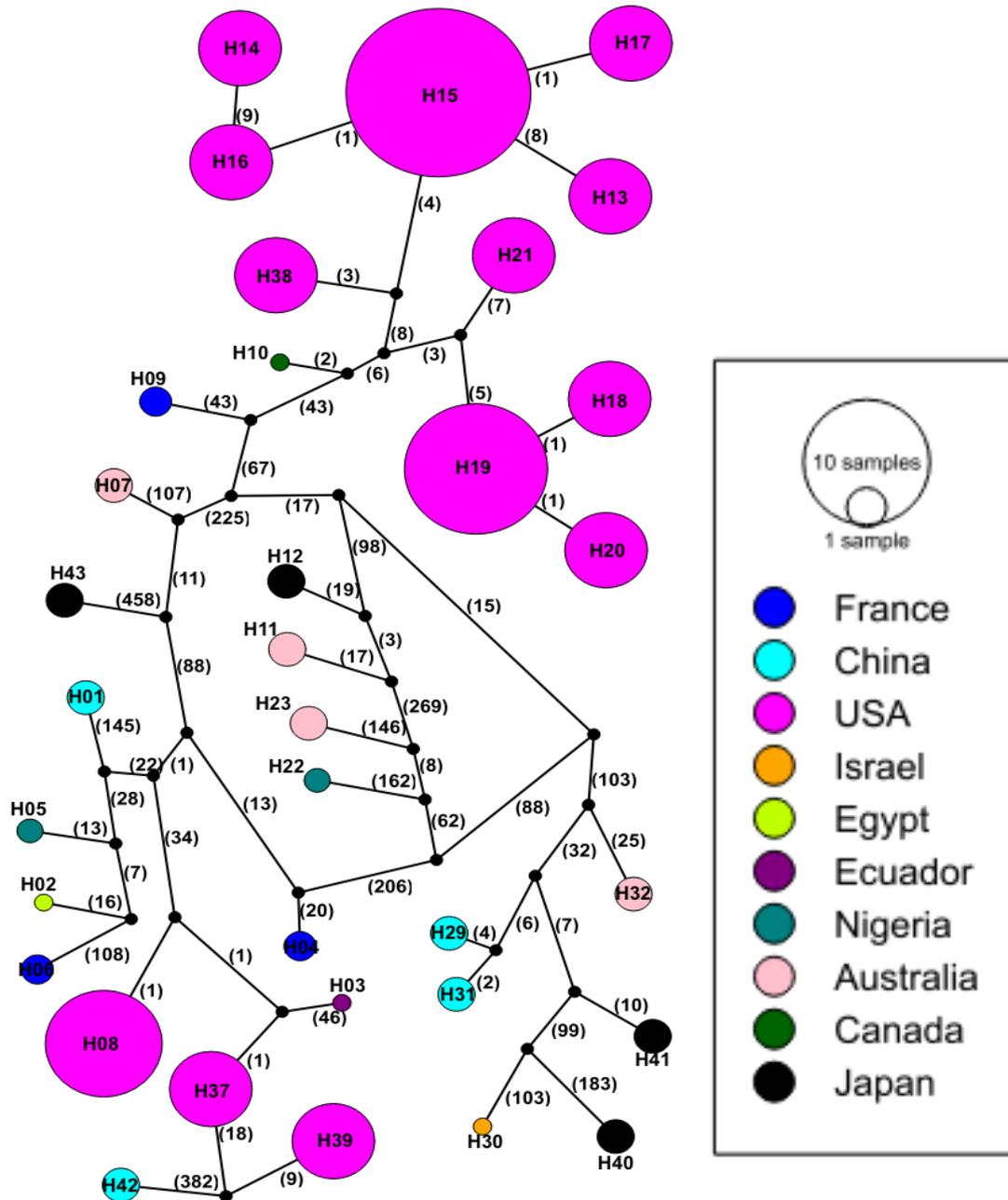
**Figura 5.** Relación filogenética de secuencias de interés. El árbol fue construido bajo el criterio de Parsimonia. En verde se muestra la ubicación en la topología de las secuencias de Australia. En rojo se resaltan secuencias de importación como la de Ecuador y las de España, Italia, Francia y Túnez.

### 3.2. Redes de haplotipos

Los haplotipos se muestran utilizando círculos, donde el tamaño de cada círculo es proporcional al número de individuos que representan. El número de mutaciones entre los haplotipos se señala entre paréntesis a lo largo de las ramas. Los distintos colores empleados indican diferentes periodos temporales, mientras que los haplotipos que no están presentes se representan con pequeños puntos negros (Salado et al., 2023; Waclawik et al., 2021).

Las figuras 6a y 6b fueron generadas a partir de secuencias del gen que codifica la proteína VP2 del virus EHDV, organizándose en grupos que corresponden a los distintos serotipos, dando como resultado 43 haplotipos.

Con relación a nuestro país, se puede resaltar que el haplotipo H03 de Ecuador muestra una conexión molecular con los haplotipos estadounidenses. Es importante destacar que los haplotipos de EE. UU., son predominantemente mayores en tamaño, debido a la mayor diversidad de serotipos que los componen, siendo el haplotipo 08 el más extenso. Por otro lado, la figura 6b indica que el haplotipo H34 (representado en amarillo y azul), compuesto por secuencias de España y Francia, tiene un origen molecular asociado a dos mutaciones derivadas de H33 o H35 de Túnez, lo que sugiere una posible introducción al sur de Europa. Además, podemos ver que no se encuentran diferencias significativas en comparación con las secuencias de Italia, ya que todas pertenecen al mismo haplotipo. Es fundamental señalar que el haplotipo más grande en este contexto es el H33.



**Fig.6a. Red de haplotipos Linaje A.** Esta red fue construida con el software PopArt-TCS. El tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo. Los colores representan el país. Los números en las líneas son el número de cambios mutacionales entre haplotipos. H03 haplotipo de Ecuador.



---

significativamente a dicha diversidad genética. Hoy en día, se sabe que la diversidad de EHDV/BTV está asociada con la reordenación de segmentos del gen viral durante las coinfecciones (con más de una cepa de virus) en células hospedadoras o en sus vectores, lo cual conducen al cambio genético. Esto explicaría la posible evolución *in situ* de los diferentes serotipos identificados en cada continente (Rivera et al., 2021).

Indicado lo anterior, podemos explicar la presencia de los dos nuevos serotipos identificados por Yang et al. (2020) en China y Shirafuji et al. (2017) en Japón. Estas secuencias las hemos incluido en nuestro análisis filogenético y los resultados nos plantean dos serotipos nuevos (subclado 1 y subclado 4, figura 4), los cuales presentan una alta divergencia genética, tal cual lo indica los autores antes mencionados.

Asimismo, podemos relacionar los procesos de mutación y el reordenamiento de segmentos del gen viral con el número de mutaciones que se presentan en los haplotipos (figura 6a y 6b). El número de mutaciones se señala entre paréntesis a lo largo de las ramas.

Dentro de los resultados mostrados dentro la figura 6a se puede resaltar que el haplotipo H03 de Ecuador muestra una conexión molecular con los haplotipos estadounidenses. Y en la figura 6b podemos señalar que el haplotipo H34 (representado en amarillo y azul), compuesto por secuencias de España y Francia, tiene un origen molecular asociado a dos mutaciones derivadas de H33 o H35 de Túnez, lo que sugiere una posible introducción al sur de Europa.

Por otro lado, podemos resaltar el establecimiento de la relación de genotipo/fenotipo de los serotipos seleccionados. Esta relación se establece debido a la identificación de similitud de nucleótidos y de aminoácidos del segmento 2 del virus EHDV, obtenido del análisis filogenético realizado. Según, Shirafuji et al. (2017) los serotipos se lo clasifica debido a la similitud de nucleótidos y aminoácidos presentes en los diferentes segmentos del virus.

Con respecto a las secuencias basales identificadas en la figura 5, se puede señalar que hallazgos recientes indican que los serotipos encontrados tienen un ancestro común con los serotipos australianos, como señala el análisis coalescente bayesiano de las secuencias de VP2 de EHDV-6 llevado a cabo por Brown-Joseph et al. y Rajko-Nenow et al. (2019). Este análisis respalda la hipótesis de que el ancestro común más reciente (MRCA) de los linajes en América y el Caribe se originó en Australia, estimándose que este MRCA del topotipo oriental de VP2 existió aproximadamente hace 93,9 años. Asimismo, Rajko-Nenow et al. (2019) indican que la divergencia del prototipo australiano se produjo alrededor de 1966. Citado lo anterior podemos entender del por qué en cada clado y subclado tenemos secuencias basales de Australia (figura 5).

Finalmente, podemos señalar y resaltar los resultados encontrados respecto al virus Ibaraki. Nuestros hallazgos han demostrado que este virus no presenta ninguna relación con EHDV- 2. Por lo tanto, nuestros resultados contradicen las afirmaciones realizadas por Brown-Joseph et al. (2019) y Mahmoud et al. (2021), quienes clasificaron a este virus dentro del serotipo 2.

## 5. Conclusiones

La presente investigación revela hallazgos significativos sobre EHDV, destacando la existencia de dos linajes evolutivos. Y la correlación entre el genotipo viral (subclados) y los serotipos establecidos (fenotipo), asociado a la función del gen VP2 (inductor de anticuerpos neutralizantes y reconocimiento-entrada a célula del hospedador). De igual manera, se evidencia dos nuevos subclados con una divergencia al nivel de nuevos serotipos (Japón subclados A4 y China subclado A1).

También, se puede observar que las secuencias de España, Italia y Francia (serotipo 8) se encuentran en politomía con secuencias de Túnez y el norte de África, lo cual nos indicaría una posible vía de introducción del virus. Asimismo, podemos determinar que la secuencia de Ecuador presenta conexiones moleculares con Estados Unidos.

Todos los subclados analizados incluyen secuencias de Australia, predominantemente basales o ancestrales, lo que sugiere no solo un posible origen de EHDV, sino también la evolución *in situ* de los serotipos y su introducción en otras regiones. Las divergencias observadas entre clados y subclados parecen indicar la existencia de un complejo viral a nivel de especies virales.

Se determinaron 43 haplotipos de EHDV. El haplotipo H34, compartido entre España y Francia, tiene un origen molecular sustentado por dos mutaciones derivadas del haplotipo H33 o H35 de Túnez, lo que proporciona indicios sobre una posible ruta de introducción hacia el sur de Europa. Además, se documenta el haplotipo H03 de Ecuador, que presenta una conexión molecular con Estados Unidos.

Finalmente, nuestros resultados destacan el análisis del virus Ibaraki, ya que se ha demostrado que este virus no guarda ninguna relación con EHDV-2, lo que contradice las afirmaciones realizadas por Brown-Joseph et al. (2019) y Mahmoud et al. (2021), quienes clasificaron a este virus dentro del serotipo 2.

---

**Contribución de los Autores:** Para artículos de investigación con varios autores, se debe proporcionar un breve párrafo que especifique sus contribuciones individuales. Las siguientes afirmaciones deben usarse: “Conceptualización, JCN.; metodología, JCN, LA.; software, JCN, LA.; validación, JCN.; análisis formal JCN, LA.; recursos, JCN.; curaduría de data, LA.; escritura—preparación del borrador o draft original, LA escritura—revisión y edición, JCN, LA visualización final, JCN, LA.; supervisión, JCN.; administración y gestión de proyecto, JCN.; adquisición de fondos, JCN. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.

**NOTA:** Este trabajo fue aceptado y presentado en el I Congreso Internacional de Enfermedades Emergentes y Zoonóticas, ENZOEM, en la ciudad de Córdoba, España, entre el 4 y 7 de febrero de 2025.

**Agradecimientos:** Fondos Proyecto DII-UISEK-P011617\_2 (Juan Carlos Navarro y José Rubén Ramírez)

#### Referencias citadas

1. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. (2020). Resolución 0008. [www.agrocalidad.gob.ec](http://www.agrocalidad.gob.ec)
2. Anthony, S. J., Darpel, K. E., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H., & Mertens, P. P. C. (2010). The evolution of two homologues of the core protein VP6 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), which correspond to the geographical origin of the virus. *Virus Genes*, 40(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0410-x>
3. AXON VET. (2023, October 3). La amenaza de la enfermedad hemorrágica epizootica a rumiantes domésticos y silvestres. <https://axoncomunicacion.net/la-amenaza-de-la-enfermedad-hemorragica-epizootica-a-rumiantes-domesticos-y-silvestres/>
4. Benn, J. S., Orange, J. P., Gomez, J. P., Dinh, E. T. N., McGregor, B. L., Blosser, E. M., Burkett-Cadena, N. D., Wisely, S. M., & Blackburn, J. K. (2024). Culicoides Midge Abundance across Years: Modeling Inter-Annual Variation for an Avian Feeder and a Candidate Vector of Hemorrhagic Diseases in Farmed Wildlife. *Viruses*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/v16050766>
5. Bréard, E., Viarouge, C., Donnet, F., Sailleau, C., Rossi, S., Pourquier, P., Vitour, D., Comtet, L., & Zientara, S. (2020). Evaluation of a commercial ELISA for detection of epizootic haemorrhagic disease antibodies in domestic and wild ruminant sera. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2475–2481. <https://doi.org/10.1111/tbed.13586>
6. Brown-Joseph, T., Rajko-Nenow, P., Hicks, H., Sahadeo, N., Harrup, L. E., Carrington, C. V., Batten, C., & Oura, C. A. L. (2019). Identification and characterization of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in cattle co-infected with bluetongue virus in Trinidad, West Indies. *Veterinary Microbiology*, 229, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.009>
7. Caixeta, E. A., Pinheiro, M. A., Lucchesi, V. S., Oliveira, A. G. G., Galinari, G. C. F., Tinoco, H. P., Coelho, C. M., & Lobato, Z. I. P. (2024). The Study of Bluetongue Virus (BTV) and Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV) Circulation and Vectors at the Municipal Parks and Zoobotanical Foundation of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (FPMZB-BH). *Viruses*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/v16020293>
8. Casey, C. L., Rathbun, S. L., Stallknecht, D. E., & Ruder, M. G. (2021). Spatial analysis of the 2017 outbreak of hemorrhagic disease and physiographic region in the eastern united states. *Viruses*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/v13040550>
9. Castro, R. J. S., Oliveira, F. A. S., Tenorio, T. G. da S., Porto, W. J. N., Moreira, M. A. S., Soares, M. J. dos S., Silva-Júnior, A., & Schwarz, D. G. G. (2023). Biogeography of the spread of bluetongue disease in sheep in Brazil. *Small Ruminant Research*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.106964>
10. DeBiasi, R. L., & Tyler, K. L. (2015). Orthoreoviruses and Orbiviruses. In Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases (Vol. 2). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00150-8>
11. Dinh, E. T. N., Gomez, J. P., Orange, J. P., Morris, M. A., Sayler, K. A., McGregor, B. L., Blosser, E. M., Burkett-Cadena, N. D., Wisely, S. M., & Blackburn, J. K. (2021). Modeling abundance of culicoides stellifer, a candidate orbivirus

- 
- vector, indicates nonrandom hemorrhagic disease risk for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Viruses*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/v13071328>
12. Duan, Y., Yang, Z., Zhu, P., Xiao, L., Li, Z., Li, Z., Li, L., & Zhu, J. (2022). A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus in China between 2014 and 2019. *Virologica Sinica*, 37(4), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.06.005>
  13. Dusek, R. J., McLean, R. G., Kramer, L. D., Ubico, S. R., Dupuis, A. P., Ebel, G. D., & Guptill, S. C. (2009). Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), 1151–1158. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0106>
  14. Faruk, M. O., Jannat, S. N., & Rahman, M. S. (2022). Impact of environmental factors on the spread of dengue fever in Sri Lanka. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(11), 10637–10648. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03905-y>
  15. Fundación iO. (2024). 17 septiembre 2024. 850 casos y 119 animales muertos por enfermedad hemorrágica epizootica en Cantabria solo en la primera mitad de septiembre. *Fundación IO*, 1–2.
  16. Guimarães Alves, A. C., Sukow, N. M., Adelman Cipolla, G., Mendes, M., Leal, T. P., Petzl-Erler, M. L., Lehtonen Rodrigues Souza, R., Rainha de Souza, I., Sanchez, C., Santolalla, M., Loesch, D., Dean, M., Machado, M., Moon, J. Y., Kaplan, R., North, K. E., Weiss, S., Barreto, M. L., Lima-Costa, M. F., ... Borda, V. (2021). Tracing the Distribution of European Lactase Persistence Genotypes Along the Americas. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671079>
  17. Jiménez-Cabello, L., Utrilla-Trigo, S., Lorenzo, G., Ortego, J., & Calvo-Pinilla, E. (2023). Epizootic Hemorrhagic Disease Virus: Current Knowledge and Emerging Perspectives. *Microorganisms*, 11(5), 1339. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051339>
  18. Kedmi, M., Van Straten, M., Ezra, E., Galon, N., & Klement, E. (2010). Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2486–2495. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2850>
  19. Maan, N. S., Maan, S., Potgieter, A. C., Wright, I. M., Belaganahalli, M., & Mertens, P. P. C. (2017). Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1120–1132. <https://doi.org/10.1111/tbed.12477>
  20. Mahmoud, A., Danzetta, M. L., di Sabatino, D., Spedicato, M., Alkhatal, Z., Dayhum, A., Tolari, F., Forzan, M., Mazzei, M., & Savini, G. (2021). First seroprevalence investigation of epizootic haemorrhagic disease virus in Libya. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 301–308. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.15>
  21. Maldonado Orbe, R. A. (2023). 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 [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.puce.edu.ec/items/d7c72f52-3899-4a9d-9b96-ea6517eff3c9>
  22. McVey, D. S., & MacLachlan, N. J. (2015). Vaccines for Prevention of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in Livestock: A North American Perspective. In *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* (Vol. 15, Issue 6, pp. 385–396). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1698>

- 
23. Mendoza Revilla, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. Contributions of phylogenetics to medical research. In *Rev Med Hered* (Vol. 23, Issue 2).
  24. Merrill, M. M., Boughton, R. K., Lollis, L. O., Sayler, K. A., & Wisely, S. M. (2019). Epidemiology of Bluetongue Virus and Epizootic Hemorrhagic Disease Virus in Beef Cattle on a Ranch in South-Central Florida. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(10), 752–757. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2406>
  25. Nayduch, D., Shankar, V., Mills, M. K., Robl, T., Drolet, B. S., Ruder, M. G., Scully, E. D., & Sasaki, C. A. (2019). Transcriptome response of female *Culicoides sonorensis* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) to early infection with epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV-2). *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050473>
  26. Rajko-Nenow, P., Brown-Joseph, T., Tennakoon, C., Flannery, J., Oura, C. A. L., & Batten, C. (2019). Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in cattle in Trinidad, West Indies, containing nine RNA segments derived from exotic EHDV strains with an Australian origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103931>
  27. Reisen, W. K. (2010). Landscape epidemiology of vector-borne diseases. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 55, pp. 461–483). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085419>
  28. Rivera, N. A., Varga, C., Ruder, M. G., Dorak, S. J., Roca, A. L., Novakofski, J. E., & Mateus-Pinilla, N. E. (2021). Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in the United States of America at the wildlife-livestock interface. *Pathogens*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/pathogens10080915>
  29. Rodrigues, T. C. S., Viadanna, P. H. O., Subramaniam, K., Hawkins, I. K., Jeon, A. B., Loeb, J. C., Krauer, J. M. C., Lednicky, J. A., Wisely, S. M., & Waltzek, T. B. (2022). Characterization of a Novel Reassortant Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 6 Strain Isolated from Diseased White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) on a Florida Farm. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/v14051012>
  30. Salado, I., Preick, M., Lupiáñez-Corpas, N., Fernández-Gil, A., Vilà, C., Hofreiter, M., & Leonard, J. A. (2023). Loss of Mitochondrial Genetic Diversity despite Population Growth: The Legacy of Past Wolf Population Declines. *Genes*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/genes14010075>
  31. Sghaier, S., Sailleau, C., Marcacci, M., Thabet, S., Curini, V., Ben Hassine, T., Teodori, L., Portanti, O., Hammami, S., Jurisic, L., Spedicato, M., Postic, L., Gazani, I., Ben Osman, R., Zientara, S., Bréard, E., Calistri, P., Richt, J. A., Holmes, E. C., ... Lorusso, A. (2022). Epizootic Haemorrhagic Disease Virus Serotype 8 in Tunisia, 2021. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010016>
  32. Shirafuji, H., Kato, T., Yamakawa, M., Tanaka, T., Minemori, Y., & Yanase, T. (2017). Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985–2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types. *Infection, Genetics and Evolution*, 53, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.010>
  33. Silva, S. P., Dilcher, M., Weber, F., Hufert, F. T., Weidmann, M., Cardoso, J. F., Carvalho, V. L., Chiang, J. O., Martins, L. C., Lima, C. P. S., Da Silva, D. E. A., Vianez-Júnior, J. L. S. G., Popov, V. L., Travassos da Rosa, A. P. A., Tesh, R. B., Vasconcelos, P. F. C., & Nunes, M. R. T. (2014). Genetic and biological characterization of selected Changuinola viruses (Reoviridae, Orbivirus) from Brazil. *Journal of General Virology*, 95, 2251–2259. <https://doi.org/10.1099/vir.0.064691-0>

- 
34. Silva, S. P., Dilcher, M., Weidmann, M., Carvalho, V. L., Casseb, A. R., Silva, E. V. P., Nunes, K. N. B., Chiang, J. O., Martins, L. C., Vasconcelos, P. F. C., & Nunes, M. R. T. (2013). Changuinola virus serogroup, new genomes within the genus *Orbivirus* (family *Reoviridae*) isolated in the Brazilian Amazon region. *Genome Announcements*, 1(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00940-13>
  35. Spedicato, M., Ronchi, G. F., Profeta, F., Traini, S., Capista, S., Leone, A., Iorio, M., Portanti, O., Palucci, C., Pulsoni, S., Testa, L., Serroni, A., Rossi, E., Armillotta, G., Laguardia, C., D'Alterio, N., Savini, G., Di Ventura, M., Lorusso, A., & Mercante, M. T. (2024). Efficacy of an inactivated EHDV-8 vaccine in preventing viraemia and clinical signs in experimentally infected cattle. *Virus Research*, 347, 199416. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199416>
  36. Vinueza, R. L., Cruz, M., Bréard, E., Viarouge, C., & Zanella, G. (2019). Bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus survey in cattle of the Galapagos Islands. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(2), 271–275. <https://doi.org/10.1177/1040638718824630>
  37. Yang, H., Li, Z., Wang, J., Li, Z., Yang, Z., Liao, D., Zhu, J., & Li, H. (2020). Novel Serotype of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, China. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3081–3083. <https://doi.org/10.3201/eid2612.19130>
  38. Waclawik, B., Nugnes, F., Bernardo, U., Gebiola, M., Przybycień, M., & Lachowska-Cierlik, D. (2021). An integrative revision of the subgenus *Liophloeodes* (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae: Polydrusini): taxonomic, systematic, biogeographic and evolutionary insights. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 79, 419–441. <https://doi.org/10.3897/asp.79.e64252>

## Anexo 1

**Tabla 1.** Información de las secuencias obtenidas en el GenBank NCBI del virus EHDV, BTV y de los grupos externos para el establecimiento de similitud filogenético entre diferentes serotipos.

Nº	Gen	Molécula	Serotipo	Tamaño (pb)	Hospedero	País	GenBank
1	VP2	ARN genómico	8	2936	<i>Cervus elaphus barbarus</i>	Tunisia: Ghardimaou	OP897561.1
2	VP2	ARN genómico	8	2965	<i>Bos tauro</i>	Tunisia: Thala	OP897541.1
3	VP2	ARN genómico	8	2965	<i>Bos tauro</i>	Tunisia: Siliana	OP897531.1
4	VP2	ARN genómico	8	2965	<i>Bos tauro</i>	Italy: Sardinia	OP897276.1
5	VP2	ARN genómico	8	2965	<i>Bos tauro</i>	Tunisia	OP381191.1
6	VP2	ARN genómico	8	2965	bovino	France: Atlantic Loire	PP199342.1
7	VP2	ARN genómico	8	2965	bovino	France: Pyrenees-Atlantiques	PP199322.1
8	VP2	ARN genómico	8	879	Ciervo	Spain: Seville	PP416265.1
9	VP2	ARN genómico	8	869	Ciervo	Spain: Ciudad Real	PP416264.1
10	VP2	ARN genómico	7	3002	<i>Culicoides orientalis</i>	China: Yunnan Province, Shizong	OM953814.1
11	VP2	ARN genómico	1	2968	<i>Culicoides sp</i>	China: Yunnan Province, Shizong	OM953792.1
12	VP2	ARN genómico	6	2919	<i>Odocoileus virginianus</i>	USA	MG886401.1
13	VP2	ARN genómico	7	2920	<i>Bos tauro</i>	Israel	JQ070178.1
14	VP2	ARN genómico	8	869	Ciervo	Spain: Basque Country	PP416270.1
15	VP2	ARN genómico	8	2936	<i>Culicoides sp.</i>	Tunisia: Tozeur	OP937332.1
16	VP2	ARN genómico	8	2965	<i>Bos tauro</i>	Tunisia: Nebeur	OP897501.1
17	VP2	ARN genómico	7	3002	Ganado	China	MK656454.1
18	VP2	ARN genómico	1	2968	Bovino	Ecuador: Camal Santo Domingo	KX442582.1
19	VP2	ARN genómico	1	2968	-	United States: New Jersey	AM744978.1
20	VP2	ARN genómico	-	2916	<i>Cervidos sp.</i>	USA	KF570114.1
21	VP2	ARN genómico	1	2916	Ganado	France: Guyana	JQ436732.1
22	VP2	ARN genómico	1	2968	desconocido	Nigeria	AM745008.1
23	VP2	ARN genómico	1	2916	Ganado	France: Reunion Island	JX965387.1
24	VP2	ARN genómico	1	2968	Ganado	Australia	HM156728.1
25	VP2	ARN genómico	2	2949	Ganado	France: Guadeloupe Island	JX965386.1
26	VP2	ARN genómico GRUPO EXTERNO	2	3215	<i>Equus caballus</i>	South Africa	OL581625.1
27	VP2	ARN genético GRUPO EXTERNO	-	3607	Papalotillas	Panamá	KY764790.1
28	VP2	ARN genético (BTV)	9	2921	Bovino	Ecuador: Aluriquín	KX442583.1
29	VP2	ARN genético (BTV)	13	2935	Bovino	Ecuador: Aluriquín	KX442584.1
30	VP2	ARN genético	6	2919	<i>Odocoileus virginianus</i>	USA	PP336420.1
31	VP2	ARN genético	8	2936	<i>Cervus elaphus barbarus</i>	Tunisia: Ghardimaou	OP897551.1
32	VP2	ARN genético	8	2965	<i>Bos taurus</i>	Tunisia: Jelma	OP897521.1
33	VP2	ARN genético	8	2965	<i>Bos taurus</i>	Tunisia: Sidi El Heni	OP897511.1
34	VP2	ARN genético	8	2965	<i>Bos taurus</i>	Italy: Sardinia	OP897266.1
35	VP2	ARN genético	6	2919	Bovino	France	HQ222817.1
36	VP2	ARN genético	-	3909	<i>cervidae</i>	USA	MG737845.1
37	VP2	ARN genético	-	2949	<i>cervidae</i>	USA	MG737835.1
38	VP2	ARN genético	-	2916	<i>cervidae</i>	USA	MG737825.1
39	VP2	ARN genético	1	2968	-	USA:New Jersey	NC_013397.1
40	VP2	ARN genético	6	2971	-	Bahréin	AM745068.1

41	VP2	ARN genético	7	3002	-	Australia	AM745048.1
42	VP2	ARN genético	8	2965	-	Australia	AM745058.1
43	VP2	ARN genético	2	3002	-	Canada:Alberta	AM744998.1
44	VP2	ARN genético	2	3002	-	Australia	AM744988.1
45	VP2	ARN genético	6	2971	-	Australia	AM745038.1
46	VP2	ARN genético	5	3019	-	Australia	AM745028.1
47	VP2	ARN genético	4	3017	-	Nigeria	AM745018.1
48	VP2	ARN genético	2	3002	-	Japan	AM745078.1
49	VP2	ARN genético	6	2971	-	USA: Illinois	MH845390.1
50	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Ohio	MH845380.1
51	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Indiana	MH845370.1
52	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: South Dakota	MH845360.1
53	VP2	ARN genético	2	3002	Bisonte	USA: South Dakota	MH845350.1
54	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: South Dakota	MH845340.1
55	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Nebraska	MH845330.1
56	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Nebraska	MH845320.1
57	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: South Dakota	MH845310.1
58	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Iowa	MH845300.1
59	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Minnesota	MH845290.1
60	VP2	ARN genético	2	3003	Ganado	USA: Nebraska	MH845280.1
61	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Nebraska	MH845270.1
62	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: South Dakota	MH845260.1
63	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Iowa	MH845250.1
64	VP2	ARN genético	2	3002	Ganado	USA: Missouri	MH845240.1
65	VP2	ARN genético	7	3002	Bos taurus	Japan ON-23: E:06	LC202948.1
66	VP2	ARN genético	-	3002	Bos taurus	Japan 2006	LC202944.1
67	VP2	ARN genético (BTV)	18	2927	Bovino	Ecuador: Cotundo	KXX442585.1
68	VP2	ARN genético (BTV)	8	2939	Bovino	Francia: Craon, Mayenne	OR500245.1
69	VP2	ARN genético	-	2979	Ganado	China YNDH: V079:2018	MN418446.1
70	VP2	ARN genético	2	1336	<i>Hydropotes inermis argyropus</i>	Japan: Ibaraki	PP316609.1
71	VP2	ARN genético	1	1839	Ganado	Egypt: Bani Suwayf	MH706767.1

<sup>1</sup> Las secuencias 26 y 27 representan a los virus que establecidos como grupos externos; y las secuencias 28,29,67 y 68 pertenecen al virus de la lengua azul (BTV).