

Primer registro de alfa herpesvirus bovino tipo 1.1 (BoAHV-1.1) en *Rhipicephalus microplus*

First record of bovine alphaherpesvirus type 1.1 (BoAHV-1.1) in Rhipicephalus microplus

 Romera, Sonia Alejandra

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT- INTA-CONICET), Castelar, Buenos Aires, Argentina. Instituto de Investigaciones Veterinarias, Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina. Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL-INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina

 Sebastian, Patrick Stephan

Área Virología, Departamento Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires (FCV-UNCPBA) - CISAPA (Centro de Investigaciones en Sanidad Animal, Pública y Ambiental)

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL-INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina

 Morel, Nicolás

Área Virología, Departamento Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires (FCV-UNCPBA) - CISAPA (Centro de Investigaciones en Sanidad Animal, Pública y Ambiental)

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL-INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina

 Nava, Santiago

Área Virología, Departamento Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires (FCV-UNCPBA) - CISAPA (Centro de Investigaciones en Sanidad Animal, Pública y Ambiental)

Centro de Investigaciones Veterinarias, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires, Comisión Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIVETAN-CONICET/UNCPBA/CICPBA)

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL-INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina

 Maidana, Silvina Soledad

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT-INTA-CONICET), Castelar, Buenos Aires, Argentina. Instituto de Investigaciones Veterinarias, Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina. 3. Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL-INTA-CONICET), Rafaela, Santa Fe, Argentina

Instituto de Investigaciones Veterinarias, Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina.

maidana.silvina@inta.gob.ar

Analecta Veterinaria

vol. 45, e0101, 2025

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 0365-5148

ISSN-E: 1514-2590

Periodicidad: Frecuencia continua

analecta@fcv.unlp.edu.ar

Recepción: 28 enero 2025

Revisado: 24 abril 2025

Aprobación: 3 abril 2025

DOI: <https://doi.org/10.24215/15142590e0101>

Resumen

Este trabajo documenta la presencia de genoma viral de alphaherpesvirus bovino tipo 1 subtipo 1 (BoAHV-1.1) en garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) colectadas de bovinos de Quimili, Provincia de Santiago del Estero, en diciembre de 2019 y abril de 2021. Se realizó, mediante PCR, la detección del genoma viral en cinco (5/57) garrapatas. Los productos de PCR fueron secuenciados y comparados con la base de datos GenBank. Se observó un 100% de identidad nucleotídica de los fragmentos con los aislamientos argentinos (BoAHV-1.1 cepas 40841, 41184, FR y p898) y se confirmó la especie y subtipo viral mediante análisis filogenético. No existe información respecto de la transmisión de alphaherpesvirus de rumiantes a partir de garrapatas, por lo cual una primera aproximación es la detección molecular de ADN viral en las mismas. En este trabajo se describe la primera evidencia de detección molecular de BoAHV-1.1 de rumiantes en *R. microplus* de Argentina; sin embargo, no implica que el mismo sea un vector biológico de este virus, solo confirma la detección del genoma viral en las garrapatas de rebaños bovinos con circulación de BoAHV-1.1. Para determinar si *R. microplus* puede ser un vector de este virus deben llevarse a cabo estudios específicos de competencia y capacidad vectorial.

Palabras clave

Detección molecular, garrapatas, bovinos

Abstract

This work documents the presence of bovine alphaherpesvirus type 1 subtype 1(BoAHV-1.1) viral genome in *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) ticks collected from cattle in Quimili, Santiago del Estero Province, in December 2019 and April 2021. PCR detection determined five (5/57) BoAHV positive ticks. These PCR products were sequenced and compared with the GenBank database. A 100% nucleotide identity of the fragments with the Argentinean isolates (BoAHV-1.1 strain 40841, 41184, FR and p898) was observed and viral species and subtype was confirmed by phylogenetic analysis. There is no information on tick-borne transmission of alphaherpesviruses from ruminants, so a first approach is a molecular detection of the viruses in ticks. This work describes the first evidence of molecular detection of ruminant alphaherpesvirus in *R. microplus* of Argentina. However, this finding does not imply that *R. microplus* is a biological vector of this virus. Instead, it demonstrates the presence of the viral genome in ticks from BoAHV-1 circulating cattle herds. To determine if *R. microplus* can be a vector of this virus, specific studies on vector competence and capacity need to be conducted.

Keywords

Molecular detection, ticks, cattle

Introducción

El BoAHV-1 (alfaherpesvirus bovino tipo 1) es el agente causante de diversas enfermedades en el ganado bovino, como la rinotraqueítis infecciosa bovina, la vulvovaginitis pustular infecciosa y la balanopostitis. Estas enfermedades causan considerables pérdidas económicas, incluidas las generadas por los abortos y restricciones al comercio internacional. El alfaherpesvirus bovino, al igual que otros miembros de la familia, tiene la capacidad de establecer latencia en el hospedador, lo que convierte a los animales infectados en reservorios y diseminadores del patógeno dentro de las poblaciones bovinas, especialmente en aquellas que no han estado previamente expuestas (Jones, 2019). Se ha demostrado que las principales rutas de transmisión para este virus son la respiratoria y la genital (Romera *et al.*, 2014); sin embargo, no ha sido reportada la transmisión viral por un vector. Si esto ocurriese, podría provocar un notable impacto epidemiológico. En esta línea, se considera que las garrapatas son los principales vectores implicados en la transmisión de patógenos en los animales domésticos y silvestres (de la Fuente *et al.*, 2008). En Argentina existen, al menos, nueve especies de garrapatas que parasitan con frecuencia a los bovinos (Nava *et al.*, 2017), siendo *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) la especie más relevante que afecta la producción bovina, no solo por los altos niveles de infestación que puede generar en los animales, sino también por las enfermedades provocadas por patógenos transmitidos por esta garrapata. En Argentina, *R. microplus* se encuentra al norte del paralelo 31° S, con excepción de la región andina, en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe, Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Entre Ríos, Corrientes y Chaco. Recientemente, Ergunay *et al.* (2022) comunicaron la detección del alfaherpesvirus bovino 5 (BoAHV-5), un virus genética y antigénicamente relacionado a BoAHV1. Los autores analizaron, mediante aproximación metagenómica cuatro grupos de *Rhipicephalus* spp. (8,7% del muestreo) todos provenientes de diferentes mamíferos de Kenia, África. No existe información respecto de la transmisión de alfaherpesvirus de rumiantes por garrapatas, por lo cual una primera aproximación es detectar la presencia de los virus en las garrapatas de bovinos. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue analizarla posible detección molecular de BoAHV en muestras de *R. microplus* colectadas de bovinos.

Materiales y métodos

Especímenes adultos de *R. microplus* (n:57; 30 hembras-partenoginas y 27 machos) fueron colectados en su fase parasitaria de bovinos en la localidad de Quimili (provincia de Santiago del Estero), en diciembre de 2019 y abril de 2021. La clasificación taxonómica se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela-INTA-Santa Fe. El ADN se extrajo de cada garrapata usando un kit comercial (Roche, Mannheim, Alemania). Los ADN fueron analizados mediante PCR de punto final, utilizando cebadores específicos para una región del gen que codifica la glicoproteína B (443 pb) de todos los alfaherpesvirus de rumiantes (Thiry *et al.*, 2007). Los productos fueron estudiados mediante electroforesis en gel de agarosa, visualizados y registrados con un sistema de documentación y adquisición de imágenes GelDoc (BioRad).

Los productos amplificados se purificaron utilizando el kit de purificación de bandas de ADN a partir de gel de agarosa TIAN gel (TIANGEN). La calidad de todas las preparaciones de ADN se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se

cuantificaron mediante espectrofotometría UV (Nano Drop Thermo Scientific). Las reacciones de secuenciación se realizaron en la unidad de genómica del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO-INTA-CONICET). Cada producto se secuenció dos veces en ambas direcciones, utilizando cebadores directos e inversos. Las secuencias de nucleótidos se alinearon y analizaron con BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Las relaciones filogenéticas de nucleótidos se investigaron mediante análisis bootstrap (100 réplicas) utilizando el modelo de estimación por máxima verosimilitud (MLE por sus siglas en inglés) y el método Kimura de dos parámetros (K2P, versión Mega 11) (Tamura *et al.*, 2021). En el análisis se incluyeron secuencias de aislamientos virales argentinos obtenidos de bovinos. Los números de acceso al GenBank de algunas de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético son los siguientes: BoAHV-1 (KU198480.2) cepa Cooper, (KM258880.1) cepa K22, (MH751900.1) cepa C29, (MG407783.1) cepa MN9, BuAHV-1 (KU936049.1) cepa B6, BoAHV-5 (AY261359.1), CvAHV-1 (AF359761), CvAHV-2 (AF 359762) y cepas de referencia de CpAHV-1 (AF359783) como grupo externo. Las secuencias argentinas (cepas de campo) utilizadas en el análisis filogenético fueron las siguientes: 1) BoAHV-1.1: 40841, 12 255, 03 404, p898, 41184, 86274; BoAHV-1.2: 03 41, 03 134, 09 210, 67.89, 997, 98759, 67 89; 2) BoAHV-5: 136 85, 75 85, 2010, 54 89, 15520, 80518). Estas secuencias argentinas aún no están depositadas en la base de datos.

Resultados

Se observaron bandas electroforéticas de 443 pb (peso esperado) en cinco garrapatas (cuatro hembras y un macho) clasificadas como *R. microplus* (5/57) (Figura 1). Dicho fragmento genético no diferencia entre BoAHV-1 o BoAHV-5, solamente determina la existencia de material genético de algún alfaherpesvirus de rumiantes. Las secuencias de los fragmentos génicos virales de las garrapatas fueron obtenidas con éxito y el análisis de identidad nucleotídica determinó un 100% de identidad con aislamientos de BoAHV-1 argentinos y el genoma de aislamientos de EE.UU. (MN9, C29) (Chothe *et al.*, 2018). El análisis filogenético nucleotídico del fragmento de la glicoproteína viral gB agrupó a las cinco secuencias virales de las garrapatas con los alfaherpesvirus bovinos tipo 1.1 (Figura 2), junto con las secuencias de aislamientos argentinos del mismo subtipo.

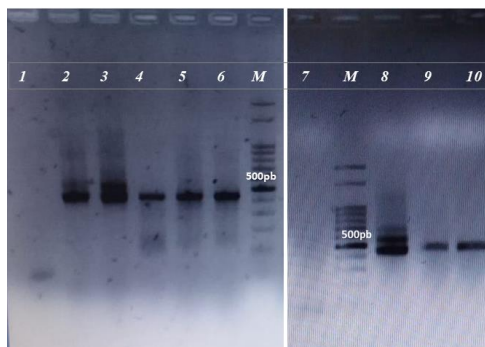


Figura 1. Electroforesis en geles de agarosa para detección de BoAHV en *Rhipicephalus microplus*. Calles 1 y 7: control negativo, M: marcador de peso molecular 100 pb, calles 2 (BoAHV-1), 3 (BoAHV-5) y 8 (BoAHV-1): controles positivos, calles 4, 5, 6, 9 y 10 (SM94, SM93, SM84, SM34 y SM26): muestras de ADN de *R. microplus*.

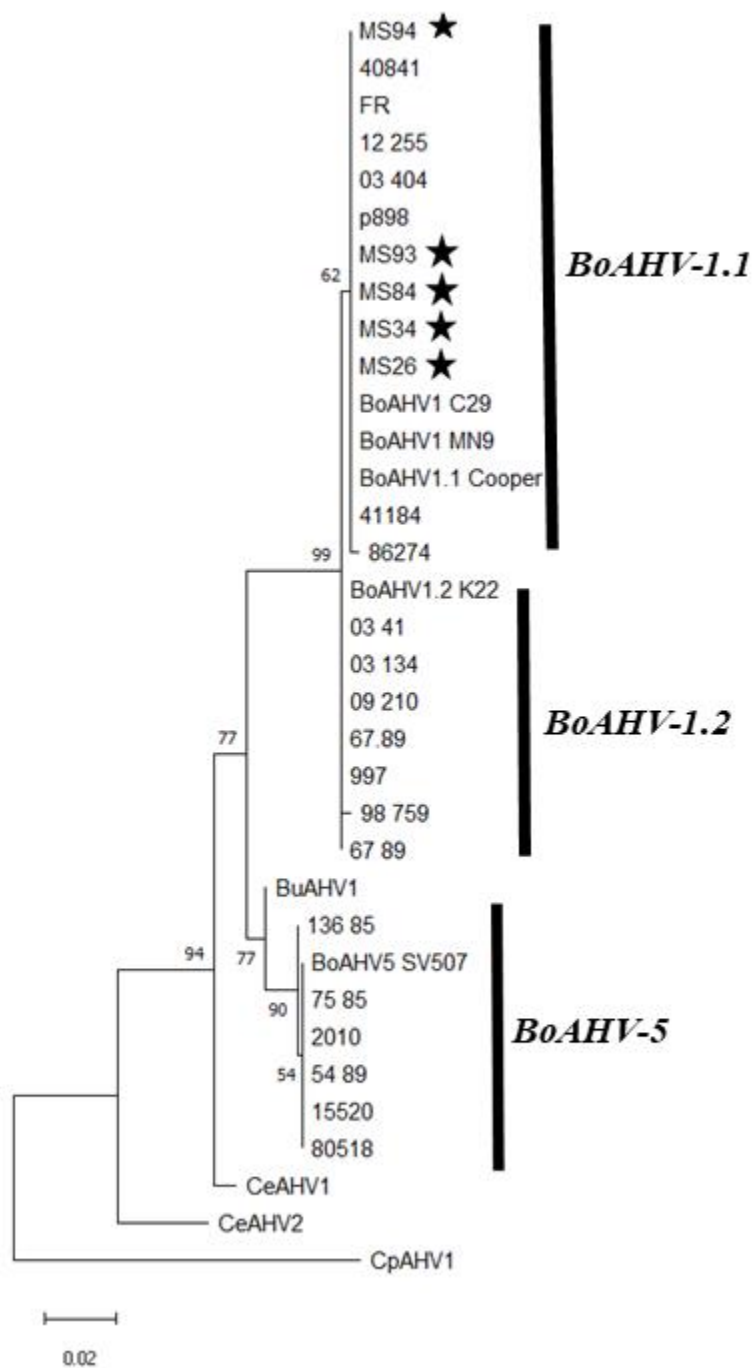


Figura 2. Análisis filogenético basado en un fragmento del gen gBde BoAHV. El análisis fue realizado con 100 réplicas de bootstrap, utilizando el software MEGA 11. Las secuencias virales de garrapatas se indican con una estrella. Los números de acceso al GenBank se presentan en Materiales y métodos.

Discusión

En la actualidad, las garrapatas transmiten más de 35 especies de virus pertenecientes a seis familias diferentes y, excepto el virus de la peste porcina africana (familia *Asfarviridae*), todos los virus transmitidos son virus ARN. Los esfuerzos por controlar las enfermedades emergentes muchas veces se ven frustrados por la falta de control de garrapatas, por lo cual detectar y conocer los virus que posiblemente se transmitan cobra relevancia a la hora de definir la prevención y tratamiento de las enfermedades virales (Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

En este trabajo demostramos la presencia de genoma viral de BoAHV-1.1 en *R. microplus*. En 2022 se describió la presencia de genoma viral de BoAHV-5 en *Rhipicephalus* spp. en grupos de muestras colectadas de búfalos, ganado bovino, cebras de Grévy y leopardos infestados (Kenia, África). Sin embargo, no hay evidencias, ni en dicho trabajo ni en la literatura, que *R. microplus* estuviese involucrado en el ciclo de transmisión de herpesvirus de rumiantes. Otros virus de ADN como el mastadenovirus humano C y el virus de Epstein-Barr también fueron detectados en *Rhipicephalus* spp. La metodología utilizada fue la aproximación metagenómica, específicamente RNA-seq, por lo cual los autores adjudican la detección de ADN a la fracción de ARNm de esos virus (Ergunay *et al.*, 2022). Con la misma metodología se han detectado, en especímenes de *R. microplus* de Brasil y Colombia, otras familias de virus diferentes a los alfaherpesvirus (Molina-Hoyos *et al.*, 2024). Durante la infección aguda con BoAHV, los bovinos presentan excreción viral durante 15 días aproximadamente, con picos a los días 6/7 post infección (Romera *et al.*, 2014). Estudios previos han reportado que tanto BoAHV-1 (Jones, 2019) como BoAHV-5 (Favier *et al.*, 2014) infectan los linfocitos durante la infección aguda, circulando en sangre durante un corto periodo hacia los órganos secundarios de infección. Considerando los resultados citados por estos autores, es probable que, en este trabajo, la presencia de ADN viral haya sido consecuencia de la alimentación de las garrapatas de bovinos cursando la etapa de infección aguda o, quizás, por la ingesta de virus latentes en leucocitos de sangre periférica.

Los hallazgos de este trabajo demuestran solamente la circulación de BoAHV-1.1 en el área de estudio y, hasta el momento, no implican que *R. microplus* sea un potencial vector de este virus, ya que las garrapatas fueron alimentadas y colectadas de bovinos. Para determinar si *R. microplus* puede actuar como vector, es necesario llevar a cabo estudios específicos que evalúen tanto su competencia como su capacidad vectorial. Estos estudios permitirán analizar la relación entre la garrapata y el virus, identificando si son capaces de adquirir, mantener y transmitir el patógeno a través de sus ciclos biológicos. Solo mediante la realización de estas investigaciones detalladas se podrá establecer con certeza el rol de *R. microplus* en la transmisión del BoAHV-1.

Declaración de autorías

Romera, Sonia A: revisión. Sebastián, Patrick S: recolección, taxonomía y extracción de material genético de las garrapatas, revisión. Morel, Nicolás: recolección de las garrapatas, revisión. Nava, Santiago: revisión. Maidana, Silvina S: adquisición de fondos, metodología, escritura/revisión y edición.

Declaración de conflicto de interés

No existe conflicto de interés.

Financiamientos

Este trabajo fue financiado con fondos de proyectos de la cartera de investigación INTA 2023-2026-PD114.

Referencias

- Chothe SK, Sebastian A, Thomas A, Nissly RH, Wolfgang D, Byukusenge M, Mor SK, Goyal SM, Albert I, Tewari D, Jayarao BM, Kuchipudi SV. 2018. Whole-genome sequence analysis reveals unique SNP profiles to distinguish vaccine and wild-type strains of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1). *Virology*. 522:27-36. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.015>
- de la Fuente J, Kocan KM, Almazan C, Blouin EF. 2008. Targeting the tick-pathogen interface for novel control strategies. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 13:6947-56. <https://doi.org/10.2741/3201>
- Ergunay K, Mutinda M, Bourke B, Justi SA, Caicedo-Quiroga L, Kamau J, Mutura S, Akunda IK, Cook E, Gakuya F, Omondi P, Murray S, Zimmerman D, Linton YM. 2022. Metagenomic investigation of ticks from Kenyan wildlife reveals diverse microbial pathogens and new country pathogen records. *Frontiers in Microbiology*. 13:932224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.932224>
- Favier PA, Marin MS, Morán PE, Odeón AC, Verna AE, Pérez SE. 2014. Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. *Veterinary Journal*. 202(1):134-40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.017>
- Hall TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-8.
- Jones C. 2019. Bovine herpesvirus 1 counteracts immune responses and immune-surveillance to enhance pathogenesis and virus transmission. *Frontiers in Immunology*. 10(1008):1-8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01008>
- Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E. 2020. Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 33(2):e00083-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>
- Molina-Hoyos K, Montoya-Ruiz C, Aguilar PV, Pérez-Doria A, Díaz FJ, Rodas J D. 2024. Virome analyses of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus microplus* ticks collected in Colombia. *Acta Tropica*. 253(107158):1-35. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107158>
- Nava S, Venzal JM, González-Acuña, D, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the southern cone of America. Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. London, Academic Press, Elsevier Inc.
- Romera SA, Puntel M, Quattrocchi V, Del Médico Zajac P, Zamorano P, Blanco Viera J, Carrillo, C, Chowdhury S, Borca MV, Sadir AM. 2014. Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. *BMC Veterinary Research*. 10(8):1-12. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-8>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38(7):3022-27. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thiry J, Widén F, Grégoire F, Linden A, Belák S, Thiry E. 2007. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Veterinary Research*. 3(26):1-11. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-26>