



# Ecología del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo en la interfaz hospedador-vector-ambiente en el Parque Nacional de Doñana

## Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Investigación  
Básica y Aplicada en Recursos Cinegéticos  
(MUIBARC)

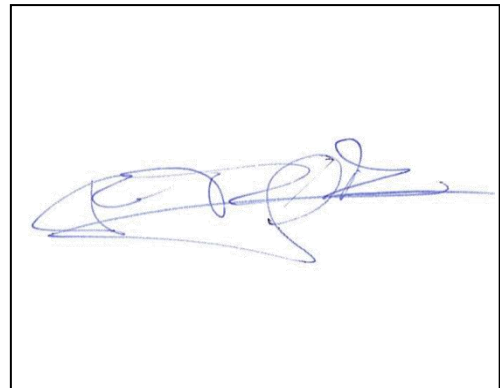
Autora: Gloria Herrero García

Tutor: José Francisco Ruiz Fons

2020/2021

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a black rectangular box. The signature is stylized and appears to be 'GH' followed by some less legible characters.

Autora: Gloria Herrero García

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a black rectangular box. The signature is highly stylized and cursive, appearing to be 'JFR' followed by some less legible characters.

Tutor: José Francisco Ruiz Fons

Ciudad Real, 13 de octubre de 2021

## **Agradecimiento**

Quería transmitir mi más sincero agradecimiento a mi tutor Francisco Ruiz Fons por haber confiado en mí en la realización de este Trabajo Fin de Máster, por la paciencia, labor y dedicación que ha demostrado conmigo durante todo el proceso.

A Sara, Laia, Raúl y Mario por ayudarme siempre y haber hecho que me sintiese tan integrada en el equipo.

A Marinela, Alberto, Rubén y Marta, por echarme una mano en todo momento, siempre con una sonrisa, y hacer los días de laboratorio tan amenos. A Isabel, por solucionarme cualquier problema con tanta paciencia y dulzura.

A Marta, Lucía, Rachele, Alfonso, Jon Ander, Tote y Sito por el apoyo moral incondicional y lo maravilloso que ha sido este año con ellos.

Y, por supuesto y siempre, a mis padres, Alicia y Juan; a mis hermanos, Diego y Bruno; y a Lida.

## Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	1
Palabras clave: .....	2
1. Introducción .....	3
1.1. Fiebre hemorrágica de Crimea Congo .....	3
1.2. Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo.....	4
1.3. <i>Hyalomma</i> como vector del VFHCC .....	6
1.4. VFHCC en España.....	8
1.5. Espacio Natural de Doñana .....	10
1.6. Justificación y objetivos.....	11
3. Material y métodos .....	11
3.1. Zona de estudio .....	11
3.2. Muestreo .....	12
3.3. Identificación de garrapatas.....	12
3.4. Modelización de abundancia de garrapatas .....	13
3.5. Detección de presencia de anticuerpos frente al VFHCC.....	14
3.6. Análisis molecular.....	14
3.6.1. Purificación de ARN de garrapatas.....	14
3.6.2. PCR .....	15
3.6.3. Purificación para secuenciación .....	17
3.6.4. Secuenciación.....	18
3.7. Análisis estadístico .....	18
4. Resultados .....	19
4.1. Modelización de la abundancia de garrapatas.....	19
4.2. ELISA de doble antígeno .....	20
4.3. Análisis molecular.....	23
4.3.1. Selección de garrapatas .....	23
4.3.2. PCR .....	24
4.3.4. Purificación y secuenciación .....	27
4.4. Análisis estadístico .....	30
5. Discusión.....	31
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía.....	36
8. Agradecimientos.....	44
9. Anexo 1.....	44

## Resumen

La fiebre hemorrágica de Crimea Congo (FHCC) es la enfermedad vírica transmitida por garrapatas (Orden Ixodida) más extendida mundialmente. Está causada por un *Orthonairovirus*, cuyo ciclo de vida incluye garrapatas (principalmente *Hyalomma*), como vectores y reservorios, y animales como amplificadores del agente infeccioso u hospedadores/dispersores de los vectores. Los humanos son los únicos que padecen la enfermedad.

Es posible que, siendo la abundancia de garrapatas variable en espacio y tiempo, la transmisión del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (VFHCC) también esté sujeta a esta variación espaciotemporal y, por ello, ser un proceso dinámico.

España, y más concretamente el Parque Nacional de Doñana (PND), es una zona con gran riesgo de entrada del virus debido a las condiciones adecuadas que presenta (ambiente, amplia presencia de garrapatas, gran variedad de mamíferos silvestres y zona esencial de parada de millones de aves migratorias), y por tanto ideal para la realización de este estudio, donde se buscó comprender la dinámica espaciotemporal del VFHCC y se trató de estimar la relación entre la abundancia de garrapatas vectores y el riesgo de exposición/infección al virus.

El 60% de los ungulados silvestres analizados entre 2006 y 2019 resultaron seropositivos al VFHCC, mientras que el 12,8% de las garrapatas alimentadas analizadas entre 2015 y 2019 resultaron positivas a la PCR, detectándose tanto genotipo III (africano) como V (europeo), y observándose una variación temporal entre las muestras positivas. Se encontró además un efecto potencial de la abundancia predicha de *Hyalomma lusitanicum* sobre el riesgo de exposición al virus de los ungulados silvestres. Sin embargo, no se pudo confirmar tal efecto sobre la prevalencia de infección al VFHCC en garrapatas alimentadas.

## Abstract

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is the most widespread viral disease transmitted by ticks (Order Ixodida). It is caused by an *Orthonairovirus*, which life cycle includes ticks (mainly *Hyalomma*), as vectors and reservoirs, and animals as amplifiers of the infectious agent or as hosts/dispersers of the vectors. Humans are the only ones who suffer from the disease.

Since tick abundance varies in space and time, it is possible that the transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) also follows this spatiotemporal variation, and, therefore, it is a dynamic process.

Spain, and more specifically Doñana National Park (PND), is considered an area under high risk of CCHFV circulation due to the favourable conditions it displays (environment, wide presence of ticks, a wide variety of wild mammals, and being an essential stopover for millions of migrating birds), and therefore ideal for the realization of this study. We tried to understand the spatiotemporal dynamics of the virus and we attempted to estimate the relationship between the abundance of the tick vectors and the risk of exposure/infection to the virus, all within the PND.

The 60% of the wild ungulates analyzed between 2006 and 2019 were seropositive to CCFHV, while 12,8% of the fed ticks analyzed between 2015 and 2019 were PCR positive, detecting both genotype III (African) and genotype V (European), and observing a temporal variation among the positive samples. An effect of the predicted abundance of *Hyalomma lusitanicum* over the risk of exposure of the wild ungulates to the virus was also found, however, an effect over the prevalence of infection to VFHCC in fed ticks could not be confirmed.

### **Palabras clave:**

Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo, garrapata, Parque Nacional de Doñana, ungulado silvestre, abundancia, riesgo de exposición/infección.

## 1. Introducción

### 1.1. Fiebre hemorrágica de Crimea Congo

La fiebre hemorrágica de Crimea Congo (FHCC) es la enfermedad vírica transmitida por garrapatas (Orden Ixodida) más extendida mundialmente, presentándose desde el oeste de China, a través del sur de Asia y el Medio Oriente, hasta el sureste de Europa y la mayor parte de África (Bente *et al.*, 2013). Recientemente la FHCC se ha detectado en España, demostrando aún más su propagación por Europa occidental (Estrada-Peña *et al.*, 2012) (Figura 1).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el siglo XII en Tayikistán, presentándose como una enfermedad humana hemorrágica con presencia de sangre en orina, recto, encías, vómito, esputo y cavidad abdominal (Hoogstraal, 1979; Whitehouse, 2004). En 1944-1945 se produjo un brote de una enfermedad febril con complicaciones hemorrágicas entre las tropas soviéticas que reocupaban la península de Crimea (Ucrania), aunque no fue hasta 1967 cuando Chumakov *et al.*, (1968) consiguieron aislar el virus. Fue entonces cuando Casals (1969) demostró que este virus era antigénicamente indistinguible del agente que él había aislado en el Congo Belga en 1956 y que había sido descrito como el virus del Congo, proponiéndose entonces la designación de virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (VFHCC) (Hoogstraal, 1979).

La FHCC es una enfermedad que afecta principalmente a aquellas regiones carentes de infraestructura médica moderna (Serretiello *et al.*, 2020), destacando Irán y Turquía como países con brotes continuos. En este último, la enfermedad se describió por primera vez en 2002 y su prevalencia aumentó en los años siguientes, alcanzando un pico en 2008-2009 (Yilmaz *et al.*, 2009).

Cabe destacar que entre los años 1995 y 2001, por razones de seguridad, el gobierno turco restringió la agricultura, la ganadería y la caza en las zonas rurales de la provincia de Tokat (Anatolia), lo que provocó un aumento en el número de pequeños mamíferos y animales salvajes en estas zonas, incluidos los jabalíes (*Sus scrofa*). Después de reabrir esta área para su uso y aprovechamiento en 2001, aumentó el contacto entre las poblaciones de garrapatas y las del ser humano y de ganado (Mertens *et al.*, 2013), pudiendo ser ésta una de las razones por las cuales el número de casos en esta región fue tan alto. Algo parecido ocurrió en el primer brote de la enfermedad. Tras la Segunda Guerra Mundial en 1944, las tropas soviéticas reocuparon la

península de Crimea, dónde la liebre europea (*Lepus europaeus*) había aumentado, así como los pastos. Esto había permitido el aumento de garrapatas y la exposición al virus (Ergonul, 2012).

Por otro lado, tanto la tendencia anual de los casos humanos con FHCC como las tasas de letalidad han aumentado gradualmente en las últimas décadas. La tasa media de mortalidad humana por FHCC es del 22,0 % en África; 33,5% en Asia y 33,8% en Europa, y entre las ocupaciones humanas más prevalentes involucradas en esta enfermedad destacan ganaderos, personal sanitario y agricultores (Nasirian, 2020). En Europa, los países con mayores seroprevalencias son aquellos situados en Europa central y occidental, mientras que países como Grecia y España tienen bajos niveles de endemismo (Monsalve *et al.*, 2020).

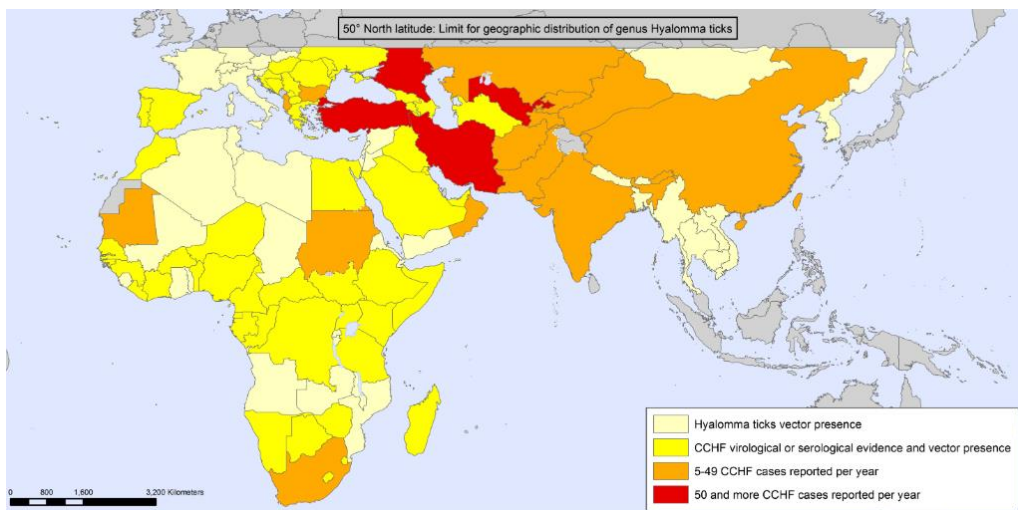


Figura 1. Distribución de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo en 2017 (WHO, 2017).

## 1.2. Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo

El virus que causa la FHCC fue reclasificado recientemente por el Comité Internacional de Virus (ICTV), incluyéndolo en el orden de los Bunyvirales, familia Nairoviridae, género *Orthonairovirus* (Nasirian, 2020). Se trata de un virus de ARN monocatenario negativo, cuyo genoma está dividido en tres segmentos: el segmento pequeño (S), que codifica la nucleocápside del virus; el segmento mediano (M), que codifica el precursor de la glicoproteína de la membrana; y el segmento grande (L), que codifica la ARN polimerasa que inicia la transcripción y replicación del genoma en la célula huésped. Es un virus esférico de unos 80-100 nm de diámetro, con una envoltura lipídica que contiene glicoproteínas GN y GC, responsables de la unión del virus a los receptores celulares (Bente *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Esta segmentación del genoma permite la combinación y generación de nuevas variantes genéticas contribuyendo así a la gran variabilidad genética del virus, lo que puede tener



consecuencias patogénicas y epidemiológicas importantes (Carroll *et al.*, 2010). Se han descrito además, siete genotipos diferentes del virus: genotipo I (distribuido principalmente por África); genotipo II (República Democrática del Congo); genotipo III (Sudáfrica y África occidental); genotipo IV (Asia y Medio Oriente); genotipo V (Europa y Turquía); genotipo VI (Grecia); y genotipo VII (detectado en Mauritania) (Deyde *et al.*, 2006).

El agente causal se mantiene en el ambiente mediante la transmisión vertical y horizontal en diferentes géneros de garrapatas, que a su vez transmiten el virus a mamíferos silvestres y domésticos que desarrollan una viremia transitoria sin signos clínicos (Figura 2) (Bente *et al.*, 2013). Los humanos se infectan mediante la picadura de una garrapata infectada o por contacto con pacientes o animales virémicos, provocando fiebres, coagulopatías y hepatitis, entre otros (Ugleva *et al.*, 2017).

Estas garrapatas se consideran el vector y el reservorio natural del VFHCC, mientras que los mamíferos, al ser infectados por las garrapatas, actúan como amplificadores del virus. Las aves son predominantemente refractarias a la infección (Hoogstraal, 1979). Es por esto que el acceso a nuevos territorios por parte del virus ocurre mediante el transporte pasivo de las formas inmaduras de la garrapata a través de aves migratorias o mediante el movimiento de ganado con las formas adultas (Zeller *et al.*, 1994).

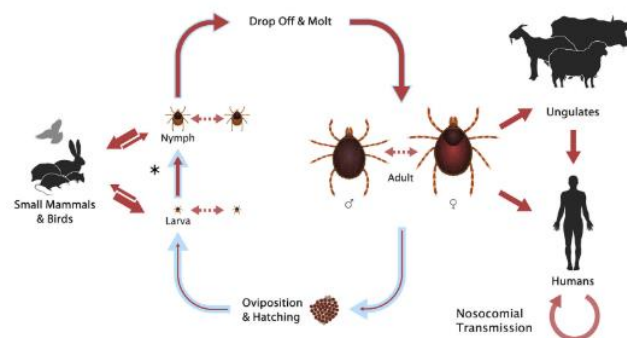


Figura 2. Ciclo de vida de *Hyalomma* spp. y transmisión vertical y horizontal del VFHCC (Bente *et al.*, 2013).

De este modo, la enfermedad sólo se manifiesta en humanos, pero el ciclo de vida del virus incluye garrapatas como vectores y reservorios y animales como amplificadores del agente infeccioso u hospedadores/dispersores de los vectores (Palomar *et al.*, 2013; Ugleva *et al.*, 2017). Es decir, para que el virus se pueda asentar en un territorio es necesaria la coexistencia entre vertebrados susceptibles de infectarse con niveles de viremia suficientes como para transmitir el virus y garrapatas vectorialmente competentes (Sierra *et al.*, 2019).

Existen muchos factores que están contribuyendo a la propagación del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo, entre los que destacan programas ineficaces de control de garrapatas, saneamiento deficiente de granjas, falta de personal sanitario capacitado, transporte antihigiénico y mala gestión de los animales tras el sacrificio (Mazzola & Kelly-Cirino, 2019).

Se trata por tanto de una amenaza muy importante para la salud pública debido a su alta letalidad, limitadas intervenciones terapéuticas, amplia distribución del virus y alto potencial de transmisión interpersonal junto a la amplia gama de huéspedes de sus vectores (Mertens *et al.*, 2013).

### 1.3. *Hyalomma* como vector del VFHCC

Las garrapatas son artrópodos hematófagos, con alrededor de 900 especies en el mundo, divididas principalmente en dos grandes familias, las Argasidae (garrapatas blandas) y las Ixodidae (garrapatas duras). Las garrapatas duras tienen cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, ninfa y adulto; mientras que las Argasidae pueden tener, además, hasta nueve etapas en estado de ninfa. Las Ixodidae pueden alimentarse durante días sobre su correspondiente hospedador tras finalizar su proceso de anclaje, sin embargo, las Argasidae se alimentan durante 20-70 min. La evidente diferencia entre ciclos hace que existan variaciones en la circulación de microorganismos en ambas familias (Estrada-Peña & de la Fuente, 2014). Debido al comportamiento hematófago de estos parásitos y a la amplia variedad de vertebrados que pueden usar como huéspedes, las garrapatas son adecuados vectores de patógenos. Esto hace que la posibilidad de transmisión de diferentes agentes infecciosos a humanos y animales (a través de una picadura de garrapata) sea enorme (Gargili *et al.*, 2017).

Las garrapatas de la familia Ixodidae son reconocidas como los vectores transmisores del VFHCC, mientras que las Argasidae no son biológicamente significativas en el ciclo de vida del virus (Gargili *et al.*, 2017). Se trata por tanto de un virus transmitido principalmente por garrapatas del género *Hyalomma*, particularmente *Hyalomma marginatum* en grandes zonas de África y del este de Europa, coincidiendo la incidencia de FHCC encontrada en Europa, Asia y África con la distribución global de este género (Ergonul, 2006). La presencia del VFHCC ha sido demostrada en ejemplares de *H. marginatum*, *H. lusitanicum*, *H. anatolicum*, *H. rufipes* y *H. truncatum*, entre otros. Se ha detectado este virus también en otros géneros (*Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Ixodes*) (Estrada-Peña *et al.*, 2012; Gargili *et al.*, 2017; Moraga-Fernández *et al.*, 2020). Estudios de laboratorio y campo sugieren que estos otros géneros de garrapatas podrían ser también responsables de la circulación del virus (Spengler & Estrada-Peña, 2018).

El virus se mantiene en las poblaciones de garrapatas por vía transestadial (entre estados) y transovárica (vertical de la hembra a los huevos y a la siguiente generación). Las larvas y las ninfas se alimentan de un mismo huésped, normalmente pequeños mamíferos (liebres, roedores, erizos, ...) y aves (Randolph & Rogers, 2007), mientras que los adultos se alimentan de grandes mamíferos (ciervos, jabalíes, ...) (Ruiz-Fons *et al.*, 2006). La vía de transmisión venérea también ha sido demostrada (Whitehouse, 2004), así como la transmisión por co-alimentación, resultante de la propagación del virus a través de la saliva de las garrapatas y de los fluidos linfáticos de los hospedadores (Bente *et al.*, 2013). Estrada-Peña *et al.* (2013) sugieren que tanto la transmisión transovárica como la alta transmisión sistémica entre hospedadores y garrapatas son las vías más efectivas de circulación del virus en la naturaleza, esperándose por tanto altas tasas de prevalencia del VFHCC en aquellos lugares donde las garrapatas se concentran en ungulados infectados y donde las condiciones climáticas favorecen la supervivencia de los huevos de la garrapata (transmisión transovárica).

La tendencia temporal de aparición de FHCC sigue un patrón estacional, que coincide con el pico de actividad de las garrapatas, entre primavera y principios de otoño (Ansari *et al.*, 2014). Los casos positivos suelen aumentar a partir de abril, alcanzando su máximo en junio y julio, y disminuyendo hacia diciembre. Durante este periodo, las posibilidades de que personas entren en contacto con garrapatas, animales domésticos o alguna otra fuente de infección del VFHCC aumentan considerablemente (Nasirian, 2020). Vatensever *et al.* (2007) estudiaron en detalle las notificaciones de casos y análisis espaciales de los patrones de la FHCC y usaron diferentes datos climáticos para desarrollar un modelo predictivo de idoneidad de hábitat para *H. marginatum* en Turquía, encontrando una fuerte correlación espacial entre las características ambientales favorables para las poblaciones de garrapatas y los casos de FHCC. En un estudio realizado por Cuadrado-Matías *et al.* (2021) los autores pudieron demostrar que la exposición del VFHCC mostraba un patrón temporal.

Es por tanto esencial comprender los determinantes de los patrones demográficos de estas garrapatas, ya que son éstas las principales transmisoras del virus a los humanos.

#### 1.4. VFHCC en España

España es un país con gran riesgo de entrada del VFHCC debido a las condiciones adecuadas que ofrece. Es un país muy próximo a África, haciéndolo lugar de tránsito para las aves migratorias que transportan grandes números de garrapatas en sus viajes de ida y vuelta entre Europa y África (Hoogstraal *et al.*, 1961; Palomar *et al.*, 2013), y con un clima muy favorable, lo que permite una amplia presencia de garrapatas y gran variedad de vertebrados.

Los grandes mamíferos que podemos encontrar en este país, y especialmente en ambientes mediterráneos, son hospedadores clave de muchas especies de garrapatas epidemiológicamente relevantes (Ruiz-Fons *et al.*, 2006, 2012). *Hyalomma* se encuentra distribuida ampliamente por el centro y suroeste peninsular, particularmente *H. marginatum* y *H. lusitanicum* (Estrada-Peña *et al.*, 2004), donde se pueden encontrar importantes poblaciones de ungulados silvestres (Acevedo *et al.*, 2008) que mantienen altas cargas de *H. lusitanicum* (Ruiz-Fons *et al.*, 2006, 2013).

La primera detección del VFHCC en España se realizó en ciervos de Cáceres durante 2010, concretamente en la garrapata *H. lusitanicum* (Estrada-Peña *et al.*, 2012). Posteriormente fue demostrada su presencia en garrapatas provenientes de animales de Extremadura, Madrid, Castilla y León y Castilla-La Mancha. La gran mayoría de las garrapatas que resultaron positivas en los estudios fueron *H. lusitanicum* y provenían de fauna silvestre. Además, se identificó el virus en garrapatas capturadas en vegetación en las zonas de Cádiz y Córdoba (Sierra *et al.*, 2019).

Recientemente el virus se ha detectado en garrapatas de nuevas áreas del centro y sur del país (Moraga-Fernández *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado la circulación del VFHCC en ciervos (*Cervus elaphus*) provenientes del norte, centro y sur de la península desde años anteriores a su primera detección en 2010 (Figura 3) (Cuadrado-Matías *et al.*, en prensa), y en cabras montesas (*Capra pyrenaica*), ciervos y jabalíes del este peninsular (Cataluña) (Espunyes *et al.*, 2021), evidenciando aún más la presencia enzoótica del virus en España.

Hasta la fecha, se han reportado diez casos de FHCC en humanos en España, tres de ellos mortales. En 2016 se comunicaron dos casos autóctonos de FHCC en un episodio de transmisión por garrapatas y otro de transmisión nosocomial. El primero de ellos fue un paciente que adquirió la enfermedad por una picadura de garrapata en el sur de Ávila, mientras que el segundo se produjo en una trabajadora sanitaria que atendió al primer caso durante su estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (Negredo *et al.*, 2017).

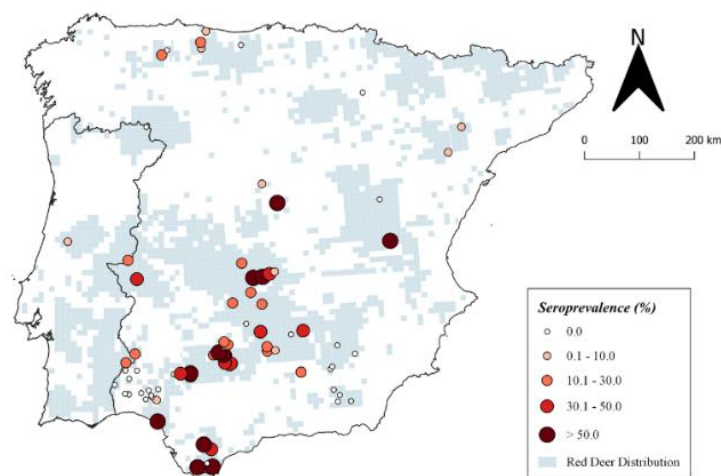


Figura 3. Resultados del estudio serológico del VFHCC en ciervos realizado por Cuadrado-Matías *et al.* (en prensa). Reproducido con permiso de los autores.

Más adelante, en 2018, se confirmó un caso en un hombre que muy probablemente contrajese la enfermedad durante un día de caza en el noroeste de Badajoz. En 2019, mediante *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se confirmó de forma retrospectiva un caso en una persona que fue ingresada en agosto de 2018 y cuyo diagnóstico en ese momento fue de enfermedad vírica no filiada (Sierra *et al.*, 2019). En 2020 se diagnosticaron tres nuevos casos de FHCC (Monsalve *et al.*, 2021), notificados por la Comunidad Autónoma de Castilla y León, en tres hombres de Salamanca (Secretaría de Estado de Sanidad, 2020). Por último, recientemente se ha confirmado de forma retrospectiva un caso de una mujer que sufrió un episodio de fiebre hemorrágica del que se recuperó en 2013 (Negredo *et al.*, 2021) y Sanidad ha confirmado otros dos casos, el de un ganadero en Salamanca y el de una mujer de El Bierzo (León) que había practicado senderismo.

Monsalve *et al.* (2020) publicaron un estudio donde realizaron diagnósticos serológicos en Castilla y León a 516 donantes, entre mayo de 2017 y mayo de 2018, encontrando una prevalencia del 0,6-1,2% del VFHCC, sugiriendo así una posible circulación del virus en individuos asintomáticos. Sin embargo, en un estudio realizado en Ciudad Real a 1.387 donantes, no se ha obtenido ningún resultado positivo (Frías-Casas *et al.*, en preparación).

Cabe destacar que en España se han descrito diferentes genotipos. En garrapatas se ha descrito la presencia de los genotipos III, IV y V (Moraga-Fernández *et al.*, 2020; Negredo *et al.*, 2019), mientras que en aquellos casos humanos en los que se ha podido analizar la secuencia completa se han detectado también los genotipos III (casos de 2016), IV (caso de 2018) y V (caso de 2018 diagnosticado de forma retrospectiva en 2019) (Secretaría de Estado de Sanidad, 2020).

### 1.5. Espacio Natural de Doñana

El Espacio Natural de Doñana (END) es una de las áreas protegidas más importantes de Europa en términos de biodiversidad, con una superficie de 122.487 ha, de las que 54.251 son Parque Nacional (PND) y 68.236 son Parque Natural. El END posee principalmente zonas de marisma, áreas forestales y de matorral y complejos lagunares, además de gran diversidad de fauna (Landi *et al.*, 2011). Está situado en el sur de la península ibérica en las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (Andalucía) y es un punto fundamental en la ruta de muchas especies de aves migratorias entre Europa y África. El END alberga además especies amenazadas como el linco ibérico (*Lynx pardinus*) o el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*). El acceso está restringido, y como parte de la gestión del área se practica la caza selectiva de ungulados como medida de control poblacional y gestión para la conservación de la biodiversidad ante la ausencia de grandes depredadores naturales. La alimentación suplementaria de animales y la caza comercial están prohibidas (Gortázar *et al.*, 2008).

Los ungulados silvestres presentes son el ciervo, el gamo (*Dama dama*) y el jabalí y los ungulados domésticos son la vaca (*Bos taurus*), el caballo (*Equus ferus caballus*) y la oveja (*Ovis gmelini aries*). La abundancia del gamo en el parque ha ido disminuyendo a lo largo de los años a diferencia de la del ciervo y del jabalí, cuyas tendencias poblacionales son crecientes (Carpio *et al.*, 2021; Díaz-Delgado *et al.*, 2016). Este aumento progresivo a lo largo de los años se debe, entre otras cosas, a la ausencia de depredadores naturales y a la prohibición de su caza (Barasona *et al.*, 2014).

La parasitación por parte de garrapatas es evidente en esta zona (Peralbo-Moreno *et al.*, 2021) y las altas densidades de poblaciones de hospedadores y vectores hacen que aumente el riesgo de transmisión de patógenos a la población humana que se mueve por esta área protegida (destaca la Romería del Rocío, celebrada en mayo, donde decenas a cientos de miles de personas cruzan el parque todos los años).

Como se ha comentado previamente, el END es el área de invernada, dentro de la región mediterránea, más importante para las aves acuáticas migratorias (Rendón *et al.*, 2008). Éstas, además, proporcionan un método de dispersión de garrapatas infectadas, contribuyendo así a la propagación de enfermedades, y pudiendo ser esta área un importante núcleo de introducción del VFHCC en Europa (Palomar *et al.*, 2013). Estas aves migratorias invernan en África y en abril migran hacia Europa y Asia occidental (Hoogstraal *et al.*, 1961), volviendo a África a principios de

otoño, dando a entender la posible bidireccionalidad de propagación del virus entre continentes vecinos.

### 1.6. Justificación y objetivos

La justificación y el interés de este trabajo están basados en la relevancia de realizar un estudio que permita comprender mejor la dinámica temporal del VFHCC y así poder mostrar el riesgo de exposición del virus, de infección y de sufrir FHCC. El PND puede ser un punto importante de introducción y circulación del VFHCC, por su situación y óptimas condiciones (abundancia de garrapatas, ungulados y ambiente), resultando ideal para la realización del estudio como zona de riesgo esperable elevado.

Los objetivos de este trabajo son: (i) comprender la dinámica espaciotemporal del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo en garrapatas para determinar si hay diferencias en la transmisión a escalas espaciales (<3 km) y temporales (anual) pequeñas y (ii) estimar la relación entre la abundancia de garrapatas vectoras y el riesgo de exposición/infección al VFHCC. La hipótesis de trabajo en este estudio es que, siendo la abundancia de garrapatas variable en espacio y tiempo, la transmisión del VFHCC también estará sujeta a esta variación espaciotemporal y, por ello, será un proceso dinámico.

## 3. Material y métodos

### 3.1. Zona de estudio

Este estudio se ha llevado a cabo en el PND, en un territorio dividido en 5 áreas de gestión ganadera: Coto del Rey (CR), Los Sotos (SO), Reserva Biológica de Doñana (RBD), El Puntal (PU) y Marismillas (MA), en orden de norte a sur (Figura 4). Cada una de las áreas está separada por una malla ganadera que la fauna silvestre atraviesa sin problemas pero que retiene a vacas y caballos. La ganadería se distribuye por todo el parque, excepto en CR, donde, como medida de conservación del lince ibérico, no se permite la presencia de ganado.



Figura 4. Área de estudio, ubicación en la Península ibérica y delimitación de las zonas de muestreo: (CR) Coto del Rey, (SO) Los Sotos, (RBD) Reserva Biológica de Doñana, (PU) El Puntal y (MA) Marismillas.

Debido a la escasez de depredadores y a las elevadas densidades de ungulados silvestres que se encuentran en el PND (y a los problemas que esto podría ocasionar), se llevan a cabo controles poblacionales mediante caza selectiva. Esto lo lleva a cabo la guardería del parque en el marco de su gestión, lo que incluye un programa de vigilancia sanitaria (Gortázar *et al.*, 2008).

### 3.2. Muestreo

Entre octubre y enero, principalmente, del periodo comprendido entre 2006 y 2019, se llevó a cabo en el parque un muestreo de ungulados silvestres a partir de animales abatidos (ciervos, gamos y jabalíes). La toma de muestras se realizó sobre los animales que nunca fueron abatidos específicamente para este estudio. Las muestras tomadas de estos animales han sido usadas posteriormente para diferentes estudios sanitarios y proyectos de investigación (Barroso *et al.*, 2020; Peralbo-Moreno *et al.*, 2021).

Se recopilaron una serie de datos de los animales abatidos: i) coordenadas geográficas, registradas por GPS portátiles; ii) fecha; iii) especie; iv) sexo; v) edad, determinada por patrones de erupción dentaria (Boitani, 1992; Matschke, 1967), y clasificada en tres categorías: (1) juveniles (<12 meses); (2) sub-adultos (entre 12 y 24 meses) y (3) adultos (> 24 meses); vi) estima de la carga de garrapatas total en cada animal (a partir de la revisión de las zonas genital, inguinal, abdominal, torácica ventral, axilar, cervical ventral y craneal del cuerpo de los animales); y vii) se recolectó el total de garrapatas cuando la parasitación de estos animales era menor de 10-15 garrapatas o de una muestra de 10-30 cuando la parasitación era mayor. De esta forma, de cada animal se obtuvo una muestra representativa de las garrapatas. Los animales fueron necropsiados por personal veterinario investigador para la toma de muestras de sangre y diversos tejidos que posteriormente fueron conservados apropiadamente, al igual que las garrapatas, en las instalaciones del IREC.

### 3.3. Identificación de garrapatas

Las garrapatas recolectadas se conservaron para su identificación morfológica hasta nivel de especie en base a claves taxonómicas (Estrada-Peña *et al.*, 2004). De cada ejemplar se diferenció la fase del ciclo de vida o etapa de desarrollo (larva, ninfa o adulto). La identificación se hizo bajo estereomicroscopio y posteriormente se congelaron a -80°C para evitar interferencias con el diagnóstico de la infección por el VFHCC.



### 3.4. Modelización de abundancia de garrapatas

La abundancia atemporal de *H. lusitanicum* en el PND fue modelizada a partir de las estimas de la carga de garrapatas en los ungulados silvestres (Peralbo-Moreno *et al.*, 2021). Para ello se consideraron las estimas de parasitación en un total de 1.965 animales (ciervos, jabalíes y gamos capturados entre los años 2010 y 2020). Se consideró una zona de influencia de radio de 2 km alrededor de las coordenadas geográficas de ubicación de captura de cada ungulado para estimar las variables potencialmente influyentes en la carga de *H. lusitanicum* y, así, poder considerar el espacio geográfico y las condiciones ambientales que probablemente afectaron a éstas en la zona en la que contactaron con el ungulado hospedador. El buffer se eligió teniendo en cuenta los movimientos de los animales, información obtenida por telemetría en estudios previos (Triguero-Ocaña *et al.*, 2019).

Para la modelización de la carga de garrapatas se seleccionaron algunas variables como: año, unidad de manejo del ganado, y especie, sexo y edad del animal hospedador. También se estimó el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) promedio del mes anterior a la captura del animal (en base a los patrones temporales de alimentación de *H. lusitanicum*), el NDVI promedio de la primavera y la varianza en el NDVI del año anterior, todo ello de MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer). Se calculó la temperatura de la superficie terrestre del mes anterior a la captura y se caracterizaron los usos del suelo (bosque, matorral denso, matorral disperso, pastizal herbáceo, marisma, puntos de agua y dunas), así como la distancia a la toma de agua más cercana, la densidad de puntos de agua en la zona de influencia, la distancia a la vera y los índices de abundancia poblacional de los hospedadores en el PDN, domésticos y silvestres. Por otro lado, la proyección de las abundancias predichas de *H. lusitanicum* adultas se hizo en cuadrículas UTM de 250 x 250 m.

Se usó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) con una distribución binomial negativa cero-inflada debido a los altos niveles de sobredispersión y el gran número de ceros en los datos. La variable respuesta fue el conteo de *H. lusitanicum* por individuo huésped. Los factores de efectos aleatorios considerados fueron año, mes y unidad de manejo del ganado. El modelo final se obtuvo utilizando un sistema de regresión progresiva hacia delante y, en base al criterio de información de Akaike (AIC), se seleccionó el modelo con menor valor de AIC (Akaike, 1974).

### 3.5. Detección de presencia de anticuerpos frente al VFHCC

Se obtuvo suero a partir de las muestras de sangre recolectadas de los ungulados silvestres abatidos, de los cuales se seleccionaron una serie de ciervos y jabalíes, todos ellos distribuidos homogéneamente por el PND entre los años 2006 y 2019. La presencia de anticuerpos específicos contra el VFHCC en estos sueros fue analizada utilizando un ELISA comercial (ID Screen® CCHF Double Antigen Multi-Species, IDvet, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante y en base a protocolos publicados (Sas *et al.*, 2018).

En este estudio se les dio mayor importancia a los ejemplares jóvenes, ya que solo en esta clase de edad la presencia de anticuerpos frente al VFHCC indica que la exposición/infección ha sido reciente (al menos dentro del primer año de vida del animal). Se hizo, así, un muestreo ligeramente sesgado a juveniles en relación con la proporción de esa categoría de edad en las poblaciones de estos ungulados. En el caso de los animales adultos, no se puede asegurar que la presencia de anticuerpos se deba a una exposición/infección reciente o que realmente se deba a la presencia de anticuerpos por infecciones en años anteriores ya que los anticuerpos frente al VFHCC son de larga duración y la técnica ELISA utilizada presenta elevada sensibilidad (Comtet, 2021). Por otro lado, para la clase de edad ‘juvenil’, tanto en los ciervos como en los jabalíes, se descartaron todos aquellos animales menores de 6 meses ya que en estos ejemplares no sería posible descartar que un resultado positivo en el ELISA se debiera a la transferencia pasiva de anticuerpos de origen materno a través de la lactancia.

### 3.6. Análisis molecular

Para el análisis molecular de este estudio se hizo una selección de las garrapatas identificadas (n=615) entre los años 2015-2019, teniendo en cuenta el ungulado del que provenían (jabalí, ciervo y gamo) y área del PND (CR, SO, RBD, PU y MA). Se obtuvieron entre 110 y 130 garrapatas por año, todas adultas, la gran mayoría *Hyalomma lusitanicum* (588/615) y unas pocas *Hyalomma marginatum* (27/615).

#### 3.6.1. Purificación de ARN de garrapatas

La extracción o purificación de ácidos nucleicos de las garrapatas seleccionadas se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad de nivel 3 (Minerva Cabinet, Labogene, Dinamarca), en el laboratorio de microbiología de las instalaciones del IREC. Cada una de las garrapatas fue cortada en dos mitades longitudinales con un bisturí estéril bajo placa de frío y en presencia de hielo seco para

evitar la descongelación de la muestra. Con la ayuda de unas pinzas y unas agujas, ambas estériles, se separaban las mitades y se introducían los tejidos internos de una de las mitades en el reactivo Tri Reagent® (Sigma-Aldrich, Merck Life Science, Madrid, España). Siguiendo las instrucciones del fabricante se consiguió purificar el ARN de la garrapata, mientras que la otra mitad se conservó a -80°C para posteriores análisis. El producto obtenido a partir de la extracción también se guardó a -80°C hasta su posterior análisis mediante PCR.

Por cada 10 muestras sometidas a purificación se incluyó una muestra negativa (agua libre de RNAases y DNAases, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) para así poder confirmar la ausencia de contaminación cruzada durante este proceso, debido a la elevada sensibilidad del protocolo de PCR utilizado. Además, al finalizar cada extracción, se hacía uso de un espectrofotómetro NanoDrop One© (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) para poder cuantificar la concentración de ARN de cada una de las muestras. Una parte de la muestra se alicuotó en 3 réplicas a una concentración de ARN homogénea (50ng/ul). En aquellas muestras con una concentración de ARN superior a 80ng/ul la homogeneización se llevó a cabo ajustando la concentración con agua estéril de PCR, libre de nucleasas.

### 3.6.2. PCR

Para detectar la presencia de ARN viral del VFHCC en las muestras de garrapatas, tras la purificación del ARN, se usó una RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) anidada convencional, dirigida a un fragmento del segmento S del VFHCC (Midilli *et al.*, 2009). La PCR anidada comprende dos rondas de amplificación, cada una con distintos pares de cebadores. Se usaron Access RT-PCR System y PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), con los primers Eecf F1/Eecf R1 y Eecf F2/Eecf R2 (Tabla 1), respectivamente. La PCR se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar vertical nivel 2 (Biological Safety Cabinet, Haier, Qingdao, Shandong, China) en el laboratorio de genómica, espacio diferente de donde se realizó la purificación de ARN.

Primers	Secuencia
Eecf-F1	TTG TGT TCC AGA TGG CCA GC
Eecf-R1	CTT AAG GCT GCC GTG TTT GC
Eecf-F2	GAA GCA ACC AAR TTC TGT GC
Eecf-R2	AAA CCT ATG TCC TTC CTC C

Tabla 1. Secuencias de los primers usados en la RT-PCR del estudio.

Las condiciones de esta PCR incluyen un primer paso de retrotranscripción inversa a 45°C durante 45' para transformar el ARN en ADN copia. Tras esto, hay un siguiente paso de desnaturalización del ADN complementario de 2' a 95°C para separar las dos cadenas de la molécula de ADN, seguido de 44 ciclos (30'' a 94°C (desnaturalización), 45'' a 60 °C (anillamiento) y 45'' a 68°C (extensión)). El paso final fue de 10' a 68°C para la extensión o elongación final de los amplicones.

La segunda amplificación comienza con una desnaturalización inicial de 2' a 95°C, seguido de otros 44 ciclos (30'' a 94°C (desnaturalización), 45'' a 57°C (anillamiento) y 45'' a 72°C (extensión)). Al igual que en el caso anterior, una extensión final de 10' a 72°C.

Se usaron tubos Eppendorf de 1,5ml donde hacer la mezcla de los diferentes reactivos (Tabla 2) y tubos Eppendorf de 0,2ml, individuales, donde se añadía la mezcla y la muestra a analizar (así se evitaban contaminaciones cruzadas entre muestras). En la primera PCR se añadía 1 µL de ARN extraído a 19 µL de mezcla de reactivos, mientras que en la segunda amplificación se añadían 2 µL del ADN obtenido en la primera PCR, a 18 µL de mezcla de reactivos (Tabla 2).

1ª PCR		2ª PCR	
Reactivos	1 muestra (µL)	Reactivos	1 muestra (µL)
H <sub>2</sub> O	12,2	H <sub>2</sub> O	12,2
Eecf F 1	0,4	2xM.Mix	5
Eecf R 1	0,4	Eecf F 2	0,4
Buffer	4	Eecf R 2	0,4
Dntps	0,4	H <sub>2</sub> O	12,2
MgSo <sub>4</sub>	0,8		
RT polymerase	0,4		
DNA polymerase	0,4		
ARN (extracciones)	1	ADN (1ª PCR)	2
Total= 19 µL de mix 1 + 1 µL de ARN	<b>20</b>	Total= 18 µL de mix 2 + 2 µL de ADN	<b>20</b>

Tabla 2. Concentraciones de reactivos usados en la RT-PCR.

El producto de la primera PCR se esperaba que fuese de 307 pares de bases, mientras que el producto de la segunda PCR debía ser de 212 pares de bases. Como control negativo de PCR se usó agua libre de nucleasas y como control positivo una secuencia sintética de 307 pb del segmento S del VFHCC (GenScript, Leiden, Países Bajos). En todos los análisis de PCR se controlaron potenciales contaminaciones cruzadas durante el proceso de purificación desde la garrapata incluyendo numerosos controles negativos de extracción. Además de realizar todo bajo cabina de flujo laminar vertical de nivel de bioseguridad 2, se extremaron las precauciones en el manejo del

control positivo de PCR por tratarse de una secuencia sintética de ADN de tamaño muy pequeño que fácilmente podría contaminar las muestras. Para la inclusión del control positivo se usó doble guante, material fungible específico y se realizaron las reacciones de PCR en tubos en lugar de en placas para poder mantenerlos cerrados durante la inclusión del control positivo.

Por último, para visualizar los productos de la amplificación se sometieron las muestras a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, el cual se dejaba correr durante 45' a 120 V y 400 mA. Este era teñido con GelRed (Biotum, Inc., Fremont, EUA) y se visualizaba bajo transiluminación ultravioleta. Los productos de PCR de aquellas muestras que habían resultado positivas se guardaron a -20°C.

Llegados a este punto, se hizo de nuevo una selección de garrapatas en co-alimentación con ejemplares que resultaron positivos en la PCR con la finalidad de asesorar sobre la tasa de transmisión por co-alimentación del VFHCC. De aquellos animales en los que se había detectado una garrapata positiva, se extrajeron los ácidos nucleicos de todas las garrapatas que se habían recolectado del mismo y se analizaron mediante PCR (314 garrapatas adicionales). Para todos los animales se cogían todas sus garrapatas en el caso de que el número fuese menor de 15, y un máximo de 15 garrapatas en el caso de que fuese mayor. Además, se analizaron más especies de garrapatas, no solo *Hyalomma lusitanicum*.

### 3.6.3. Purificación para secuenciación

Las muestras positivas obtenidas a partir de las PCR se purificaron utilizando dos kits diferentes. De forma previa a la purificación, los productos de la primera PCR de las muestras positivas que fueron conservados a -20°C se emplearon para amplificar el producto de la 2ª PCR en un volumen final de 50 µL. Los amplificados fueron visualizados de nuevo por electroforesis en gel de agarosa. Aquellas muestras cuya amplificación se veía muy nítida y limpia bajo transiluminación UV, es decir, con una banda clara y única del tamaño de 212 pb esperado, se purificaban mediante el kit de QIAquick® PCR Purification (Qiagen, Madrid, España), mientras que aquellas muestras positivas que bajo transiluminación UV no se veían tan limpias (múltiples bandas) se purificaron usando el kit de QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Madrid, España) para conseguir un ADN más limpio y libre de impurezas. En el primer caso,

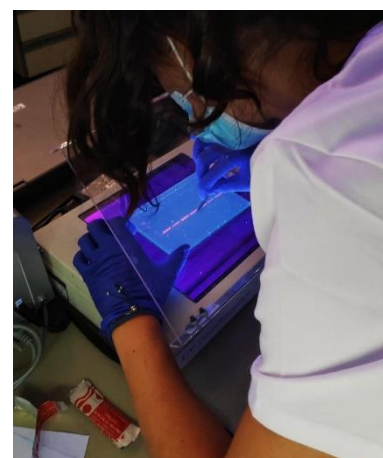


Figura 5. Purificación de las muestras usando el kit de QIAquick Gel Extraction.

partimos de los amplificados de la segunda ronda de la PCR para la purificación. En el segundo caso, el total de volumen amplificado de cada muestra se sometió a electroforesis en gel y bajo iluminación UV se cortaron las bandas específicamente para purificar únicamente la banda de 212 pb (Figura 5).

Los amplicones purificados fueron preparados y se enviaron refrigerados para su secuenciación a Eurofins (Alemania), utilizándose la secuenciación bidireccional de Sanger de los amplicones de la PCR anidada para analizar la secuencia del segmento S.

#### 3.6.4. Secuenciación

Para el análisis filogenético se hizo uso de ClustalW. Para ello se alinearon las secuencias de referencia obtenidas de GenBank (que incluye genotipos de Europa, Asia y África), con las secuencias del segmento S del VFHCC obtenidas a partir de las garrapatas positivas al virus en este estudio (segmento S del VFHCC parcial, de 212 pb).

Se generó un árbol filogenético, utilizando MEGA versión 10 (<http://www.megasoftware.net>), estimado con el modelo de Kimura de 2 parámetros. Los intervalos de confianza de re-muestreo (Bootstrap) se calcularon sobre la base de 1.000 réplicas y los números en las ramas del árbol son indicativos de los resultados del re-muestreo. Los genotipos fueron nombrados según Carroll *et al.* (2010). Se generaron árboles específicos para genotipos III y V con las secuencias más próximas descritas en GeneBank (Moraga-Fernández *et al.*, 2020).

#### 3.7. Análisis estadístico

El primer objetivo del trabajo persigue comprender la dinámica espaciotemporal de la transmisión del VFHCC. Para evaluar la relación potencial, espacial y temporal, entre la prevalencia de infección por el virus en garrapatas (proporción de garrapatas infectadas) y el riesgo de exposición de los animales (proporción de animales seropositivos), y por ende de las personas, se modelizó la probabilidad de presencia de anticuerpos en ungulados silvestres de menos de 1 año de edad en relación con la prevalencia anual de infección por el VFHCC en el set de 615 garrapatas del género *Hyalomma* analizadas mediante PCR. Se modelizó de forma conjunta el riesgo para juveniles de ciervo y jabalí, considerando que el riesgo de exposición anual está en relación con la presión de infección para ambas especies en su primer año de vida. Para ello se construyó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM), ajustado con máxima verosimilitud, considerando una distribución de probabilidad binomial y una función de enlace logit e incorporando al modelo la variable "Año"

como factor aleatorio. Se repitió este modelo, pero incorporando la variable “Área de gestión ganadera” como factor aleatorio para modelizar el riesgo espacial de exposición al virus a esa escala espacial. Para este último modelo se estimó la proporción de *Hyalomma* spp. infectadas por el VFHCC en las cinco áreas de gestión ganadera en las que se divide el PND. En estos análisis se asumió que la prevalencia de infección por el VFHCC en garrapatas del género *Hyalomma* seleccionadas al azar cuando estaban alimentándose sobre un hospedador es indicativa de la presión de infección del virus por picadura de garrapatas. Esta asunción se realizó en base a que se seleccionó una sola garrapata del género *Hyalomma* por ungulado muestreado en la mayoría (85,9%) de las garrapatas analizadas. Tan sólo en 20 casos tuvimos que seleccionar 2 *Hyalomma* del mismo animal y en 11 casos tuvimos que seleccionar entre 3 y 15 *Hyalomma* del mismo hospedador.

Por otro lado, con la finalidad de valorar la relación esperada entre la abundancia de garrapatas vectores sobre el riesgo de exposición al VFHCC en los ungulados (presencia/ausencia de anticuerpos) y en las garrapatas (presencia/ausencia de ARN viral), se construyó un modelo lineal generalizado (GLM), considerando una distribución binomial utilizando los indicadores de exposición/infección al virus como variable respuesta. Para ello se consideró como variable explicativa la abundancia predicha de *H. lusitanicum* por los modelos de abundancia en la zona donde se muestreó cada animal (y sus garrapatas). En el modelo realizado con los datos de exposición de los ungulados se incorporó la edad como predictor en el modelo debido a las diferencias observadas en la probabilidad de exposición con la edad y a la persistencia de los anticuerpos frente al VFHCC en sangre periférica en los animales expuestos. Se analizaron los jabalíes y los ciervos por separado y de forma conjunta para ver el efecto especie.

Los análisis se realizaron con el programa libre R versión 4.1.1 (R Core Team, 2021).

## 4. Resultados

### 4.1. Modelización de la abundancia de garrapatas

Se contó con un total de 20.501 garrapatas de la especie *H. lusitanicum* registradas sobre los 1.965 animales muestreados entre 2010 y 2020 en el PND (Peralbo-Moreno *et al.*, 2021). El modelo que mejor explicó la abundancia de *H. lusitanicum* en los hospedadores seleccionó como variables influyentes la especie de hospedador (siendo el ciervo el hospedador con mayores cargas de *H. lusitanicum* frente a jabalí y gamo); la edad del hospedador (mayores cargas de *H. lusitanicum* en

ungulados adultos) y las variables ambientales (NDVI promedio en primavera, proporción de cobertura por dunas de arena, densidad de puntos de agua, abundancia de jabalí, distancia a vera y el porcentaje del uso de bosque). El NDVI promedio de primavera, la distancia a vera y la densidad de puntos de agua en el buffer de 2 km alrededor de donde se muestrearon los animales se relacionaron positivamente con la abundancia de *H. lusitanicum*. La abundancia de jabalíes, sin embargo, se relacionó negativamente con la abundancia de *H. lusitanicum*, mientras que la relación con la proporción de cobertura por dunas de arena y por bosques no resultó significativa.

Con este modelo se obtuvo el mapa de abundancia predicha de *H. lusitanicum* adultas en el PND para todo el periodo considerado, es decir, de forma atemporal, que se ha representado en cuadrículas UTM de 250 x 250 m (Figura 6).

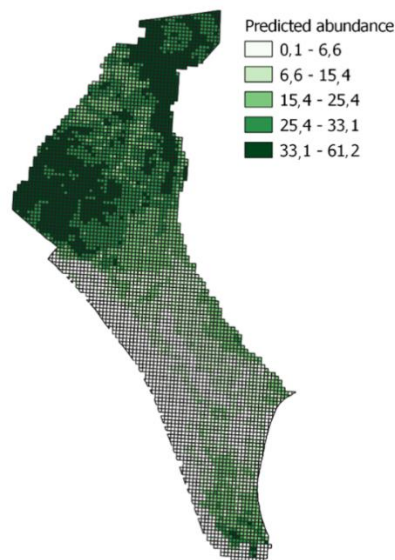


Figura 6. Representación cartográfica de la abundancia de *H. lusitanicum* en el área de estudio, en cuadrículas UTM de 250x250 m. Cada cuadrícula muestra las unidades de garrapatas predichas para ese espacio (Peralbo-Moreno et al., 2021).

## 4.2. ELISA de doble antígeno

Se contó con 527 sueros de ciervo (Tabla 3). La mayor prevalencia de animales seropositivos al VFHCC se encontró en los adultos (83,5%), siendo la prevalencia en gabatos de 27,8% y en sub-adultos de 54,7%. La prevalencia total fue de 76,1%, observándose cierta variación en función del año de muestreo. Cabe destacar que, para el ciervo en los años 2008, 2009, 2012, 2013 y 2014, no se pudieron obtener resultados serológicos de gabatos.



Año	Juveniles			Sub-adultos			Adultos			Total		
	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia
2006	1	4	25,0	8	10	80,0	45	46	97,8	54	60	90,0
2007	1	1	100,0	1	1	100,0	22	30	73,3	24	32	75,0
2008	-	-		-	-	-			-			-
2009	-	-		-	-	-			-			-
2010	0	1	0,0	1	1	100,0	19	26	73,1	21	29	72,4
2011	1	3	33,3	2	3	66,7	21	27	77,8	24	33	72,7
2012	-	-		0	1	0,0	19	26	73,1	19	27	70,4
2013		-		0	2	0,0	7	7	100,0	7	9	77,8
2014	-	-		1	1	100,0	22	26	84,6	23	27	85,2
2015	5	6	83,3	2	4	50,0	49	50	98,0	56	60	93,3
2016	0	1	0,0	4	7	57,1	46	52	88,5	50	60	83,3
2017	0	3	0,0	4	8	50,0	37	49	75,5	41	60	68,3
2018	0	6	0,0	1	7	14,3	22	27	81,5	38	60	63,3
2019	2	11	18,2	5	8	62,5	34	45	75,6	44	70	62,9
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>36</b>	<b>27,8</b>	<b>29</b>	<b>53</b>	<b>54,7</b>	<b>343</b>	<b>411</b>	<b>83,5</b>	<b>401</b>	<b>527</b>	<b>76,1</b>

Tabla 3. Resultados del análisis serológico en los ciervos por años y edad (N=527).

En el caso de los jabalíes, se analizaron por técnica ELISA 453 individuos, cuyos resultados aparecen en la Tabla 4. La mayor prevalencia se volvió a encontrar en los adultos (62,5%), aunque el resultado no fue tan alto como en los ciervos. En juveniles la prevalencia fue de 22,9% y en sub-adultos de 38,2%. La prevalencia total en los jabalíes fue de 40,6%. Cabe señalar también la ausencia de muestras de jabalíes en el año 2007 dentro de la serie 2006-2019.

Año	Juveniles			Sub-adultos			Adultos			Total		
	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia
2006	4	6	66,7	8	10	80,0	10	15	66,7	22	31	71,0
2007	-	-		-	-	-			-			-
2008	1	7	14,3	4	8	50,0	6	8	75,0	11	23	47,8
2009	2	10	20,0	2	10	20,0	5	7	71,4	9	27	33,3
2010	0	1	0,0	4	15	26,7	3	9	33,3	7	25	28,0
2011	8	19	42,1	6	10	60,0	6	10	60,0	20	39	51,3
2012	2	21	9,5	3	8	37,5	5	10	50,0	10	39	25,6
2013	2	10	20,0	1	7	14,3	16	22	72,7	19	39	48,7
2014	0	6	0,0	7	15	46,7	9	18	50,0	16	39	41,0
2015	4	20	20,0	5	10	50,0	6	9	66,7	15	39	38,5
2016	8	18	44,4	4	7	57,1	9	14	64,3	21	39	53,8
2017	2	13	15,4	4	13	30,8	8	12	66,7	14	38	36,8
2018	2	19	10,5	2	10	20,0	7	10	70,0	11	39	28,2
2019	4	20	20,0	0	8	0,0	5	8	62,5	9	36	25,0
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>170</b>	<b>22,9</b>	<b>50</b>	<b>131</b>	<b>38,2</b>	<b>95</b>	<b>152</b>	<b>62,5</b>	<b>184</b>	<b>453</b>	<b>40,6</b>

Tabla 4. Resultados del análisis serológico en los jabalíes por años y edad (N = 453).

Teniendo en cuenta el total de los animales (1.007), se obtuvo una prevalencia del 23,8% en aquellos animales de un año de edad, de 42,9% en los juveniles y de 77,8% en los adultos, siendo el total de la prevalencia de todos los años de 60% (Tabla 5; Figura 7).

Año	Juveniles			Sub-adultos			Adultos			Total		
	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia	Positivos	Ejemplares	Prevalencia
2006	5	10	50,0	16	20	80,0	55	61	90,2	76	91	83,5
2007	1	1	100,0	1	1	100,0	22	30	73,3	24	32	75,0
2008	1	7	14,3	4	8	50,0	6	8	75,0	11	23	47,8
2009	2	10	20,0	2	10	20,0	5	7	71,4	9	27	33,3
2010	0	2	0,0	5	16	31,3	22	35	62,9	29	55	52,7
2011	9	22	40,9	8	13	61,5	27	37	73,0	44	72	61,1
2012	2	21	9,5	3	9	33,3	24	36	66,7	29	66	43,9
2013	2	10	20,0	1	9	11,1	23	29	79,3	26	48	54,2
2014	0	6	0,0	8	16	50,0	31	44	70,5	39	66	59,1
2015	9	26	34,6	7	14	50,0	55	59	93,2	71	99	71,7
2016	8	19	42,1	8	14	57,1	55	66	83,3	71	99	71,7
2017	2	16	12,5	8	21	38,1	45	61	73,8	55	98	56,1
2018	2	25	8,0	3	17	17,6	29	37	78,4	64	119	53,8
2019	6	31	19,4	5	16	31,3	39	53	73,6	56	112	50,0
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>206</b>	<b>23,8</b>	<b>79</b>	<b>184</b>	<b>42,9</b>	<b>438</b>	<b>563</b>	<b>77,8</b>	<b>604</b>	<b>1.007</b>	<b>60,0</b>

Tabla 5. Resultados del análisis serológico del total de jabalíes y ciervos por años y edad.

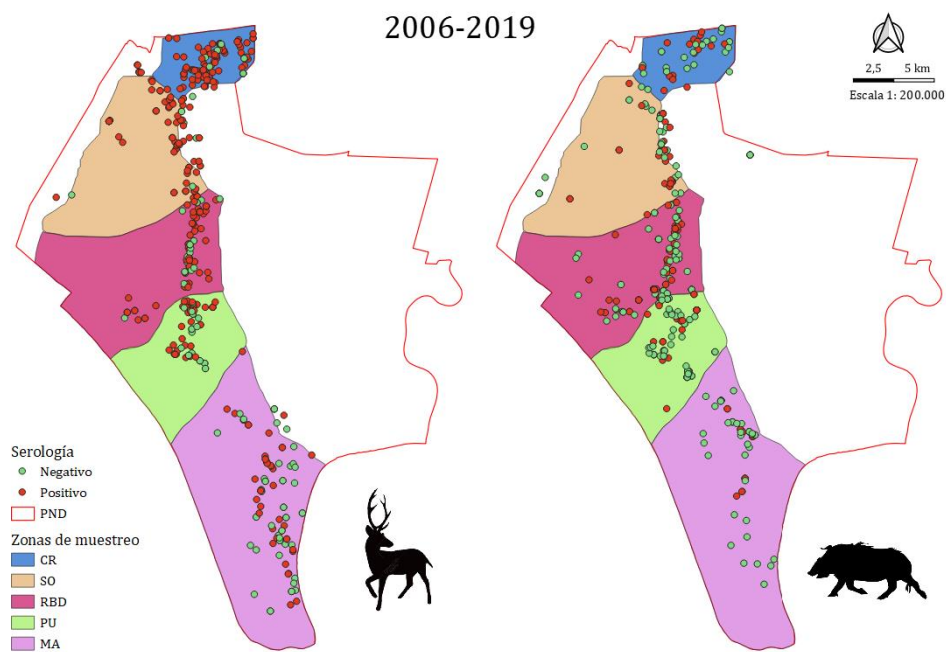


Figura 7. Representación gráfica de la distribución de todos los animales positivos (rojo) y negativos (verde) a la prueba ELISA frente al VFHCC a lo largo de los años 2006 a 2019 y su distribución en el PND. A la izquierda resultados de la serología de ciervos, a la derecha, resultados de la serología de jabalíes.

### 4.3. Análisis molecular

#### 4.3.1. Selección de garrapatas

Inicialmente, se seleccionaron un total de 615 garrapatas del género *Hyalomma* (ver Tabla 6), distribuidas de forma equitativa por las cinco zonas de muestreo del PND, y provenientes tanto de jabalíes como de ciervos y gamos, si bien las cargas de *Hyalomma* en los gamos fueron mucho más bajas (Peralbo-Moreno *et al.*, 2021).

Año	Ungulado	Zona de muestreo					% Garrapatas por ungulado/año	Total de garrapatas
		CR	SO	RBD	PU	MA		
2019	Jabalí	10	10	12	13	11	56/128 (43,8%)	128
	Ciervo	10	11	9	11	12	53/128 (41,4%)	
	Gamo	5	3	4	5	2	19/128 (14,8%)	
2018	Jabalí	10	14	12	12	11	59/128 (46,1%)	128
	Ciervo	12	11	11	10	15	59/128 (46,1%)	
	Gamo	3	2	2	3	0	10/128 (7,8%)	
2017	Jabalí	12	13	19	23	15	82/134 (61,2%)	134
	Ciervo	12	10	6	6	7	41/134 (30,1%)	
	Gamo	1	3	2	3	2	11/134 (8,2%)	
2016	Jabalí	8	17	18	12	16	71/108 (65,7%)	108
	Ciervo	0	7	7	12	6	32/108 (29,6%)	
	Gamo	0	1	0	1	3	5/108 (4,6%)	
2015	Jabalí	0	21	17	25	22	85/117 (72,6%)	117
	Ciervo	13	4	8	0	4	29/117 (24,8%)	
	Gamo	0	1	2	0	0	3/117 (2,6%)	
<b>Total</b>		<b>96</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>136</b>	<b>125</b>		<b>615</b>

Tabla 6. Selección de garrapatas para el estudio, ungulado y zona de la que provenían. (CR) Coto del Rey, (SO) Los Sotos, (RBD) Reserva Biológica de Doñana, (PU) El Puntal, (MA) Marismillas.

La mayoría de las garrapatas fueron seleccionadas de animales diferentes (528 animales, de los cuales se obtuvieron 615 garrapatas) (Figura 8). En 2018 hubo cinco animales de los que se seleccionaron al menos dos garrapatas de cada uno. En 2017 hubo dos animales en esta situación. En 2016 hubo tres y, finalmente, en 2015 hubo 16.

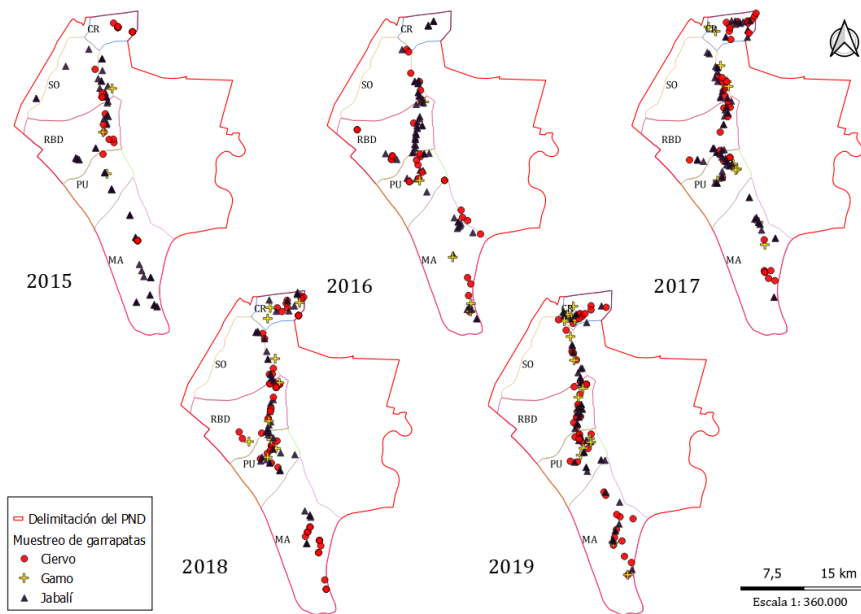


Figura 8. Localización de las garrapatas seleccionadas para el estudio y ungulado del que procedían.

#### 4.3.2. PCR

Se detectaron 66 garrapatas positivas al VFHCC de las 615 garrapatas seleccionadas inicialmente (12,8%), 64 de ellas *H. lusitanicum* y 2 *H. marginatum* (Figura 9 y Tabla 7).

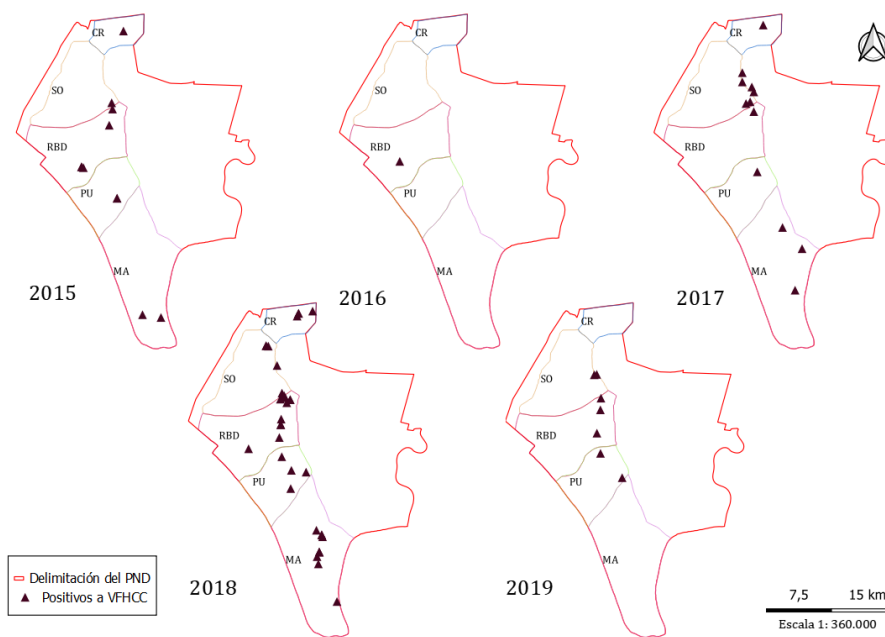


Figura 9. Representación de la distribución de los positivos por año y zona.

Año	Zona de muestreo	Ungulado			% positivos por zona/año	Total positivos/Total analizados (%)
		Jabalí	Ciervo	Gamo		
2019	CR	-	-	-	-	7/128 (5,5%)
	SO	1	1	1	3/7 (42,9%)	
	RBD	-	2	-	2/7 (28,6%)	
	PU	1	-	-	1/7 (14,3%)	
	MA	1	-	-	1/7 (14,3%)	
2018	CR	2	2	-	4/34 (11,8%)	34/128 (26,6%)
	SO	6	4	-	10/34 (29,4%)	
	RBD	3	2	1	6/34 (17,6%)	
	PU	2	-	1	3/34 (8,8%)	
	MA	6	5	.	11/34 (32,4%)	
2017	CR	-	1	-	1/12 (8,3%)	12/134 (8,96%)
	SO	2	3	2	7/12 (58,3%)	
	RBD	-	-	-	-	
	PU	1	-	-	1/12 (8,3%)	
	MA	2	1	-	3/12 (25%)	
2016	CR	-	-	-	-	1/108 (1%)
	SO	1	-	-	1/1 (100%)	
	RBD	-	-	-	-	
	PU	-	-	-	-	
	MA	-	-	-	-	
2015	CR	-	1	-	1/12 (8,3%)	12/117 (10,3%)
	SO	2	-	-	2/12 (16,7%)	
	RBD	4	-	-	4/12 (33,3%)	
	PU	3*	-	-	3/12 (25%)	
	MA	2	-	-	2/12 (20%)	
<b>Total</b>		<b>39</b>	<b>22</b>	<b>5</b>		<b>66/615 (12,8%)</b>

Tabla 7. Ejemplares positivos por zona, ungulado y año. \* 2 de los 3 ejemplares provienen del mismo animal.

Por otro lado, y con la finalidad de aproximar la tasa de transmisión del VFHCC por co-alimentación, se analizaron 314 garrapatas adicionales que estaban co-alimentándose sobre el mismo hospedador que las *Hyalomma* PCR positivas (teniendo en cuenta todos aquellos animales de los cuales se habían analizado más de una garrapata y al menos una de éstas había resultado positiva). Estas garrapatas procedían de 60 animales diferentes (Tabla 8). En 12 de los 60 animales (20%) se detectó más de una garrapata positiva al VFHCC. Entre las garrapatas positivas en PCR encontramos *H. lusitanicum*, *Rhipicephalus annulatus*, *Ixodes ricinus* y *R. bursa*.

Año	Nº de ungulados analizados	Nº de ungulados   Nº garrapatas analizadas, especie (Nº PCR+)			Nº de animales con más de 1 garrapata PCR+ / Total analizados (%)		
		Jabalí	Ciervo	Gamo			
2019	7	3	10 <i>H. lusitanicum</i> (1)	4 <i>H. lusitanicum</i> (1) 7 <i>R. annulatus</i> (0)	1	9 <i>H. lusitanicum</i> (1) 2 <i>R. annulatus</i> (0)	1/7 (14,3%)
			10 <i>H. lusitanicum</i> (1)	12 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>I. ricinus</i> (0)			
			12 <i>H. lusitanicum</i> (3)	6 <i>H. lusitanicum</i> (1) 6 <i>R. annulatus</i> (0)			
2018	29	15	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>I. ricinus</i> (0)	8 <i>H. lusitanicum</i> (1) 3 <i>R. annulatus</i> (0)	2	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>I. ricinus</i> (1) 11 <i>R. annulatus</i> (3)	5/29 (17,2%)
			2 <i>H. lusitanicum</i> (1)	3 <i>H. lusitanicum</i> (1) 7 <i>R. annulatus</i> (0)			
			2 <i>H. lusitanicum</i> (2)	2 <i>H. lusitanicum</i> (1) 7 <i>R. annulatus</i> (3)			
			3 <i>H. lusitanicum</i> (1)	2 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>R. annulatus</i> (0)			
			4 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>H. marginatum</i> (0)	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 4 <i>R. annulatus</i> (0)			
			4 <i>H. lusitanicum</i> (1)	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 6 <i>R. annulatus</i> (0)			
			2 <i>H. lusitanicum</i> (1)	5 <i>H. lusitanicum</i> (5) 6 <i>R. annulatus</i> (2)			
			4 <i>H. lusitanicum</i> (1)	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 4 <i>R. annulatus</i> (0)			
			1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>I. ricinus</i> (0)	4 <i>H. lusitanicum</i> (2) 1 <i>R. annulatus</i> (0)			
			2 <i>H. lusitanicum</i> (1)	1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 3 <i>R. annulatus</i> (0)			
			6 <i>H. lusitanicum</i> (1)	2 <i>H. lusitanicum</i> (1) 7 <i>I. ricinus</i> (0) 4 <i>R. annulatus</i> (0) 1 <i>R. bursa</i> (0)			
			6 <i>H. lusitanicum</i> (1)	7 <i>H. lusitanicum</i> (1) 2 <i>I. ricinus</i> (0) 4 <i>R. annulatus</i> (0)			
			6 <i>H. lusitanicum</i> (1)				
			4 <i>H. lusitanicum</i> (1)				
			2 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>D. marginatus</i> (0)				
2017	12	5	1 <i>H. marginatum</i> (1) 3 <i>H. lusitanicum</i> (0) 1 <i>R. turanicus</i> (0)	4 <i>H. lusitanicum</i> (1) 2 <i>I. ricinus</i> (0) 1 <i>R. annulatus</i> (0)	2	2 <i>H. lusitanicum</i> (1)	3/12 (25%)
			1 <i>I. ricinus</i> (0) 3 <i>H. lusitanicum</i> (1)	4 <i>H. lusitanicum</i> (1) 7 <i>R. annulatus</i> (0)			
			8 <i>H. lusitanicum</i> (1)	5 <i>H. lusitanicum</i> (1) 3 <i>R. annulatus</i> (0)			
			7 <i>H. lusitanicum</i> (2)	5 <i>H. lusitanicum</i> (1)			
			8 <i>H. lusitanicum</i> (2)				

Año	Nº de ungulados analizados	Nº de ungulados   Nº garrapatas analizadas, especie (Nº PCR+)						Nº de animales con más de 1 garrapata PCR+ / Total analizados (%)
		Jabalí		Ciervo		Gamo		
					1 <i>H. lusitanicum</i> (1) 11 <i>R. annulatus</i> (0)			
2016	1	1	2 <i>H. lusitanicum</i> (1) 2 <i>I. ricinus</i> (0)	-	-	-	-	0/1 (0%)
2015	11	10	4 <i>H. lusitanicum</i> (1) 2 <i>R. bursa</i> (0)	1	6 <i>H. lusitanicum</i> (1)	-	-	3/11 (27,3%)
			15 <i>H. lusitanicum</i> (2)					
			5 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
			3 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
			1 <i>H. marginatum</i> (1) 6 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>I. hexagonus</i> (0)					
			8 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
			5 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
			6 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
			3 <i>H. lusitanicum</i> (1) 1 <i>R. bursa</i> (1)					
			7 <i>H. lusitanicum</i> (1)					
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>34</b>	<b>188 garrapatas (7 animales)</b>	<b>21</b>	<b>182 garrapatas (4 animales)</b>	<b>5</b>	<b>39 garrapatas (1 animales)</b>	<b>12/60 (20%)</b>

Tabla 8. Garrapatas y animales seleccionados para el estudio de la co-alimentación. Resaltados en gris los casos de posible co-alimentación.

#### 4.3.4. Purificación y secuenciación

De las 88 garrapatas consideradas finalmente positivas (teniendo en cuenta la selección original y la selección para el estudio de la tasa aparente de transmisión por co-alimentación), se pudieron purificar y enviar a secuenciar 54 muestras. De estas se secuenciaron finalmente 51 muestras. En 2/51 se obtuvo una secuencia correspondiente con el genotipo III (Sudáfrica) y en las otras 49 se obtuvo una secuencia correspondiente con el genotipo V (Europa y Turquía) (Tabla 9; Figura 10). En líneas generales las secuencias identificadas en el fragmento amplificado del segmento S presentaron una homología muy alta (Figura 11; Anexo 1, Figura 1).

Año	Zona de muestreo	Genotipo		Total secuencias (Genotipo)
		V	III	
2019	CR	-	-	2 (V)
	SO	-	-	
	RBD	1	-	
	PU	-	-	
	MA	1	-	
2018	CR	4	-	27 (V) 1 (III)
	SO	10	-	
	RBD	2	-	
	PU	5	-	
	MA	6	1	
2017	CR	1	-	10 (V) 1 (III)
	SO	3	1	
	RBD	-	-	
	PU	-	-	
	MA	6	-	
2016	-	-	-	-
2015	CR	-	-	10 (V)
	SO	1	-	
	RBD	4	-	
	PU	3	-	
	MA	2	-	
<b>Total</b>		<b>49</b>	<b>2</b>	<b>51 (49 V, 2 III)</b>

Tabla 9. Distribución por zona y año de las muestras secuenciadas.

Parque Nacional de Doñana

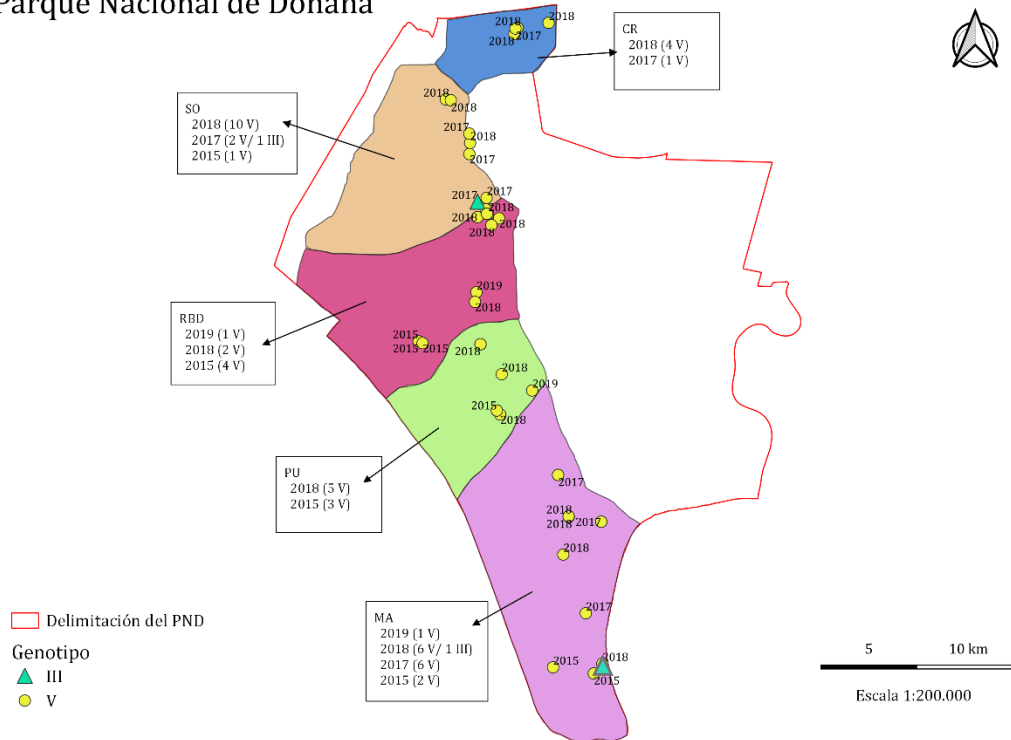


Figura 10. Localización y año de las diferentes secuencias analizadas. Con el III se indican las secuencias correspondientes con el genotipo III, V para el genotipo V. (CR) Coto del Rey, (SO) Los Sotos, (RBD) Reserva Biológica de Doñana, (PU) El Puntal, (MA) Marismillas.





### 4.4. Análisis estadístico

El efecto potencial (relación), en relación con el año de muestreo, de la prevalencia de garrapatas sobre el riesgo de exposición al virus (presencia de anticuerpos) en animales de menos de 1 año y resultó ser estadísticamente significativo, pero negativo (Tabla 10).

	$\beta$	p	Correlación de efectos fijos	Animales en el análisis	Gráfica
elisa ~ prvg + (1   a)	-0,06862	0,0446 *	-0,756	De menos 1 año (n=117)	

Tabla 10. Modelos GLMM estimados para evaluar temporalmente el posible efecto de la prevalencia de infección en garrapatas (prvg) sobre el riesgo de exposición al virus (elisa), con el año (a) como factor aleatorio.

Por otro lado, cuando se estudió el efecto de forma espacial, y teniendo en cuenta las fincas y no los años, el modelo señala que no hay relación entre las prevalencias de infección en garrapatas alimentadas sobre ungulados y la probabilidad de exposición al VFHVC en los ungulados menores de 1 (p=0,850) (Tabla 11).

	$\beta$	p	Correlación de efectos fijos	Animales en el análisis	Gráfica
elisa ~ prvgf + (1   fin)	-0,01401	0,850	-0,906	De menos 1 año (n=114)	

Tabla 11. Modelos GLMM estimados para evaluar espacialmente el posible efecto de la prevalencia de infección en garrapatas (prvg) sobre el riesgo de exposición al virus (Elisa), con la finca (fin) como factor aleatorio.

El efecto potencial de la abundancia predicha de *H. lusitanicum* sobre la probabilidad de infección de las garrapatas alimentadas resultó no significativo (p=0,761) (Tabla 12).

	$\beta$	p	Animales en el análisis	Gráfica
prvg ~ ab	0,003531	0,761	Todos (n=521)	

Tabla 12. Modelo GLM estimado para evaluar la relación espacial entre la abundancia predicha atemporal de *H. lusitanicum* (ab) y el riesgo de las Hyalomma de animales de ser PCR+ (prvg).

Por último, el efecto potencial de la abundancia predicha de *H. lusitanicum* sobre el riesgo de exposición al virus de los ungulados silvestres (de todas las edades), en todos los casos resultó significativo y positivo. Por tanto, estos modelos asumen una relación positiva entre la seroprevalencia de infección de los ungulados y la abundancia de *H. lusitanicum* (Tabla 13).

	$\beta$	p	Animales en el análisis	Gráficas
elisa ~ abhl + ed	0,061216	3,39e-14 ***	Todos (n=786)	

Tabla 13. Modelo GLM estimado para evaluar la relación espacial entre abundancia predicha atemporal de *H. lusitanicum* y el riesgo de exposición del total de los ungulados al virus del VFHCC. 0 '\*\*\*'

## 5. Discusión

La composición de la comunidad de garrapatas encontrada en el PND se corresponde con la esperada para este área mediterránea, ya que *H. lusitanicum* está ampliamente distribuida en el suroeste de la península ibérica (Estrada-Peña *et al.*, 2004). Además, las variables que se relacionaron positivamente con la abundancia de *H. lusitanicum* (NDVI de primavera y la densidad de los puntos de agua) pueden ser indicativas de los condicionantes de la supervivencia de las garrapatas en el medio, ya que éstas necesitan mantenerse hidratadas, así como de la dependencia de la agregación espacial de sus hospedadores (Ruiz-Fons *et al.*, 2006, 2013), que en el PND suele estar condicionada por la escasez de agua en épocas específicas del año.

La prevalencia frente al VFHCC encontrada en los ciervos se encuentra entre las más altas descritas en vida silvestre (Espunyes *et al.*, 2021; Sierra *et al.*, 2019; Cuadrado-Matías *et al.*, en prensa), viéndose cierta diferencia con la observada en jabalíes, aunque escasamente visible en animales menores de un año donde la diferencia fue mínima. En ambos casos se observa una clara variación interanual en la proporción de animales menores de un año que se infectan. La diferencia entre ambas especies se ve reflejada también en la relación negativa entre la abundancia de jabalíes y la de garrapatas, posiblemente relacionado con los baños de barro que suelen realizar los jabalíes y con los que controlan los ectoparásitos, o también con el hecho de que su menor tamaño condiciona cargas de garrapatas menores y un menor riesgo de exposición (Ruiz-Fons *et al.*, 2013). En ambas especies, los animales con menores prevalencias de exposición al VFHCC fueron los animales de menos de un año, seguidos por los sub-adultos. Este resultado puede estar relacionado tanto con el tamaño de los animales, donde a mayor tamaño, mayor superficie para poder alimentar más garrapatas y, por tanto, mayor probabilidad de infectarse con el VFHCC (Ruiz-Fons *et al.*, 2013), como con la creciente probabilidad de exposición a garrapatas infectadas con el paso del tiempo. El total de los animales (ciervos y jabalíes) que fueron positivos al ELISA resultaron en una elevada prevalencia, la cual puede deberse a la alta densidad de

ungulados silvestres y ganado que existe en el PND (Carpio *et al.*, 2021; Landi *et al.*, 2011), los cuales mantienen grandes cargas de garrapatas, así como favorecen la transmisión del VFHCC (Cuadrado-Matías *et al.*, en prensa). La diversidad de potenciales hospedadores de los estados inmaduros de *H. lusitanicum*, como pequeños mamíferos y aves, también puede jugar a favor de la abundancia de garrapatas y de la prevalencia del VFHCC para el que todos los mamíferos son hospedadores amplificadores (Spengler *et al.*, 2016).

Todas las garrapatas en las que se detectó el VFHCC en este estudio (*H. lusitanicum*, *H. marginatum*, *R. annulatus*, *I. ricinus* y *R. bursa*) habían sido descritas previamente como portadoras (Gargili *et al.*, 2017). En los cinco años en los que se ha podido analizar el virus en estos ectoparásitos, se ha podido apreciar cierta variación temporal, habiéndose detectado el menor número de garrapatas positivas en 2016, y encontrándose la mayor prevalencia en 2018. Esto difiere con el estudio publicado por Palomar *et al.* (2019), donde todas las garrapatas que capturaron de la vegetación en el año 2018 en el PND resultaron ser negativas al VFHCC. Por otro lado, no parece que haya ningún patrón espacial en cuanto a la distribución de las garrapatas positivas en el PND, ya que todas aquellas que fueron detectadas en los años 2015, 2017 y 2018 estaban homogéneamente repartidas por el PND. El primer objetivo del estudio perseguía estimar la dinámica de transmisión temporal del VFHCC y, para ello, se seleccionaron de forma aleatoria una garrapata del género *Hyalomma* por animal muestreado (salvo excepciones, principalmente en 2015) en función del año y zona del PND. Esta selección se hizo bajo la hipótesis de que la prevalencia de infección en estas garrapatas recolectadas al azar en los animales y seleccionadas al azar sería indicativa de la prevalencia de infección anual en las garrapatas de vida libre, que constituyen el riesgo principal de transmisión viral. Sin embargo, la ausencia de relación entre la presión de infección observada anualmente en los ungulados silvestres de menos de un año (indicadores de la presión de infección en la población) y la prevalencia del virus en estas garrapatas alimentadas, es quizás indicativo de que la prevalencia del virus de garrapatas alimentadas no corresponde con la real en la población de garrapatas de vida libre. Esto quizás viene además reflejado en la ausencia de asociación espacial entre la abundancia predicha de *H. lusitanicum* y la prevalencia en las *Hyalomma* alimentadas (ver más adelante).

La gran mayoría de las muestras secuenciadas (provenientes de garrapatas de 2015, 2017, 2018 y 2019) fueron correspondientes con el genotipo V, el cual está distribuido principalmente por Europa y Turquía (Deyde *et al.*, 2006), y había sido detectado recientemente (2017) en el suroeste

del país (Moraga-Fernández *et al.*, 2020). El genotipo III (África) sin embargo, se describió en 2015 en garrapatas de la provincia de Cáceres (Negredo *et al.*, 2019), fue el causante de dos casos primarios en 2016 y 2018 que resultaron en la muerte de los pacientes (Negredo *et al.*, 2017; Sierra *et al.*, 2019), y fue detectado en este estudio en un número muy reducido de garrapatas. Algo que no se había citado anteriormente en España eran secuencias provenientes de garrapatas del mismo año y zona, con genotipos III y V próximas entre sí.

Las aves migratorias han podido tener un papel importante en la introducción de garrapatas infectadas con el VFHCC al END y por tanto en la propagación del virus en el país (Palomar *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los casos secuenciados recientemente (2017-2020) se han correspondido con el genotipo V europeo, tanto en garrapatas como en humanos (Secretaría de Estado de Sanidad, 2020) y no con el genotipo III africano, algo que se ha podido corroborar en este estudio. Esto puede sugerir, tal y como vienen afirmando varios estudios (Spengler & Bente, 2017; Cuadrado-Matías *et al.*, 2021), que el VFHCC es enzoótico en la península ibérica y, por lo tanto, que hay una menor participación en su dinámica de las aves migratorias como transportadoras intercontinentales y un mayor papel por parte del ganado y los ungulados silvestres en la propagación del virus a escala local y/o europea (Moraga-Fernández *et al.*, 2020).

La transmisión del virus en garrapatas por co-alimentación ha sido previamente demostrada (Bente *et al.*, 2013) y se ha tratado de estudiar en este trabajo. En el 20% de los ungulados en los que se había detectado inicialmente al menos una garrapata positiva al VFHCC, se detectó más de una garrapata positiva al virus, y en varios de ellos se detectó el virus en un género diferente a *Hyalomma*, dando a entender que muy probablemente estas garrapatas hayan contraído el virus por co-alimentación, ya que no se ha demostrado, ni siquiera sugerido, su papel como vectores competentes del virus (Bente *et al.*, 2013). El estudio de la tasa de co-alimentación planteado puede tener cierto sesgo ya que se eligieron tan sólo aquellos animales en los que se había detectado al menos una garrapata positiva inicialmente y estas fueron seleccionadas al azar con preferencias de selección de una por animal. Esta selección inicial podría, por tanto, sesgar ligeramente el resultado obtenido como indicador de la tasa de co-alimentación. Además, la detección del genoma viral en garrapatas en co-alimentación no siempre es indicativo de transmisión por co-alimentación, ya que descartar la presencia de infección en las garrapatas antes de alimentarse en el animal no ha sido posible con esta aproximación. Sin embargo, la confirmación de un gran porcentaje de ellas con genotipos y secuencias similares señala que los

porcentajes detectados deben aproximarse con bastante fidelidad a la tasa de transmisión por co-alimentación real (datos no mostrados).

El resultado de la modelización estadística en este estudio enfocado al segundo objetivo confirmó el papel influyente de la abundancia de *H. lusitanicum* sobre el riesgo de exposición al VFHCC en ciervos y jabalíes (medido a través de la seroprevalencia), algo que concuerda con el patrón temporal que existe en la exposición del VFHCC (Cuadrado-Matías *et al.*, 2021). De modo que la abundancia de estas garrapatas puede configurar espacialmente el riesgo de infección al VFHCC en estos ungulados. Sin embargo, no se pudo confirmar que la abundancia de *H. lusitanicum* tuviese un papel en la prevalencia de infección por el VFHCC en las garrapatas alimentadas. La única vía descrita de infección en animales es a través de la picadura de una garrapata infectada vector del virus (Bente *et al.*, 2013), por lo que la mayor prevalencia de exposición debe necesariamente ser indicativa de una mayor prevalencia de garrapatas infectadas. La ausencia de relación entre la prevalencia del virus en garrapatas alimentadas y la incidencia de nuevos casos de infección en animales de menos de un año de vida, se ve reflejada igualmente en el componente de relación espacial, señalando el escaso valor de esta prevalencia como indicador de la presión de infección real y, por ello, del riesgo real de transmisión, al menos a esta escala espacial. De este modo, se demuestra que la abundancia de garrapatas podría ser un buen indicador para predecir el riesgo de exposición del VFHCC en ungulados, lo cual podría ayudar a predecir el riesgo de transmisión a humanos, pero también se demuestra que no es asumible que la prevalencia en garrapatas alimentadas refleje la prevalencia real de infección en la población de garrapatas de vida libre y, por lo tanto, no es indicativa del riesgo de infección en contra de lo que previamente se había sugerido (Moraga-Fernández *et al.*, 2020).

En este estudio se ha podido confirmar la presencia del virus en las garrapatas de esta zona, pero debería considerarse completar el presente estudio con garrapatas capturadas en la vegetación, así como ampliar la escala temporal y la zona de estudio. Al tratarse de un virus donde existen varias especies de garrapatas implicadas como potenciales vectores (Sierra *et al.*, 2019; Randolph & Rogers, 2007), hay una amplia gama de huéspedes reservorio, tanto para la etapa inmadura como para la etapa adulta de las garrapatas (Bente *et al.*, 2013; Hoogstraal, 1979) que pueden modular la prevalencia de infección y la transmisión del virus. Además, los condicionantes climáticos (meteorológicos) y los cambios asociados a los usos del suelo en el paisaje y la vegetación determinan variaciones en la dinámica poblacional de los vectores y de los

hospedadores que, necesariamente, deben repercutir en la dinámica de transmisión del VFHCC. En este estudio tanto las condiciones climáticas como las poblaciones de los hospedadores fueron ciertamente estables por el intervalo corto en que se ha realizado (5 años), pero las condiciones meteorológicas cambiantes entre años podrían tener efecto en las garrapatas y la transmisión del virus (Cuadrado-Matías *et al.*, 2021). En relación al riesgo de transmisión del virus a humanos, no sólo estos cambios ambientales son determinantes de variaciones en el riesgo, sino que además hay que considerar aspectos sociales determinantes (Ansari *et al.*, 2014; Ergonul, 2006; Vatensever *et al.*, 2007), por lo que, en este sentido, es complicado llegar a conclusiones sólidas sobre la inferencia de riesgo de transmisión a humanos con los resultados del estudio. Por ello, se requieren estudios posteriores, tanto en la exposición del virus en los ungulados silvestres, como en la prevalencia de las garrapatas en fase de vida libre, lo que permitirá una mejor comprensión de la ecología del virus y predecir futuros riesgos.

## 6. Conclusiones

1. Se confirma la presencia del VFHCC en el PND desde el año 2006 en ungulados silvestres y desde 2015 en garrapatas alimentadas, en las cuales predomina el genotipo V europeo.
2. La prevalencia frente al VFHCC encontrada en los ciervos del PND se encuentra entre las más altas descritas en vida silvestre.
3. Estudiar la prevalencia de infección al VFHCC en garrapatas alimentadas no tiene por qué ser un buen indicador del riesgo de infección temporal del virus.
4. La abundancia de los vectores principales del VFHCC es un buen indicador del riesgo espacial de exposición al virus.

## 7. Bibliografía

- Acevedo, P., Vicente, J., & Alzaga, V. (2008). Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology*, 276 (1), 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00464.x>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19 (6), 716-723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705
- Ansari, H., Shahbaz, B., Izadi, S., Zeinali, M., Tabatabaee, S. M., Mahmoodi, M., Holakouie-Naieni, K., & Mansournia, M. A. (2014). Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relationship with climate factors in southeast Iran: A 13-year experience. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(6), 749–757. <https://doi.org/10.3855/jidc.4020>
- Barasona, J. A., Latham, M. C., Acevedo, P., Armenteros, J. A., Latham, A. D. M., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R. C., & Vicente, J. (2014). Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Veterinary research*, 45(1), 1–11.
- Barroso, P., Barasona, J. A., Acevedo, P., Palencia, P., Carro, F., Negro, J. J., Torres, M. J., Gortázar, C., Soriguer, R. C., & Vicente, J. (2020). Long-term determinants of tuberculosis in the ungulate host community of Doñana National Park. *Pathogens*, 9(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060445>
- Bente, D. A., Forrester, N. L., Watts, D. M., McAuley, A. J., Whitehouse, C. A., & Bray, M. (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*, 100(1), 159–189. <http://0-ovidsp.ovid.com.wam.city.ac.uk/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013741328>
- Boitani, L., Mattei, L. (1992). Aging Wild Boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. *Ongulés/Ungulates* 91. F. Spitz, G. Janeau, G. González and S. Aulagnier. Paris - Toulouse, S.F.E.P.M. - I.R.G.M. 419-421.
- Carpio, A. J., Apollonio, M., & Acevedo, P. (2021). Wild ungulate overabundance in Europe: contexts, causes, monitoring and management recommendations. *Mammal Review*, 51(1), 95–108. <https://doi.org/10.1111/mam.12221>



- Carroll, S. A., Bird, B. H., Rollin, P. E., & Nichol, S. T. (2010). Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1103–1110. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.006>
- Casals J. (1969). Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 131(1),233-236. doi:10.3181/00379727-131-33847
- Chumakov, M.P., Butenko, A.M., Shalunova, N.V., Mart'yanova, L.I., Smirnova, W.E., Bashkirtsev, V.N., Zavodova, T.I., Rubin, S.G., Tkachenko, E.A., Karmy-Sheva, V.Ya, Reingold, V.N., Popov, G.V., & Savinov, A.P. (1968). New data on the virus causing Crimean hemor- rhagic fever (CHF). *Voprosy virusologii*, 13(3), 377.
- Comtet, L. (31 de agosto-2 de septiembre de 2021) [Póster]. 69<sup>th</sup> WDA, 14<sup>th</sup> EWDA, Managing Wildlife Disease for Sustainable Ecosystems, Cuenca, España.
- Cuadrado-Matías, R., Casades-Martí, L., Balseiro, A., Baz-Flores, S., Triguero-Ocaña, R., Barroso, P., Jiménez-Ruiz, S., Palencia, P., Laguna, E., Peralbo-Moreno, A., Ruiz-Fons, F. (31 de agosto-2 de septiembre de 2021) [Póster]. 69<sup>th</sup> WDA, 14<sup>th</sup> EWDA, Managing Wildlife Disease for Sustainable Ecosystems, Cuenca, España.
- Deyde, V. M., Khristova, M. L., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., & Nichol, S. T. (2006). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genomics and Global Diversity. *Journal of Virology*, 80(17), 8834–8842. <https://doi.org/10.1128/jvi.00752-06>
- Díaz-Delgado, R., Carro, F., Quirós, F., Osuna, A., & Baena, M. (2016). Contribución del seguimiento ecológico a largo plazo a la investigación y la gestión en la plataforma LTSER-Doñana. *Ecosistemas*, 25(1), 9–18.
- Ergonul, O. (2006). Crimean-congo hemorrhagic fever. *International journal of infectious diseases*, 6, 203–214. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-60-67>
- Ergonul, O. (2012). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: New outbreaks, new discoveries. *Current Opinion in Virology*, 2(2), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.001>
- Espunyes, J., Cabezón, O., Pailler-García, L., Dias-Alves, A., Lobato-Bailón, L., Marco, I., Ribas, M. P., Encinosa-Guzmán, P. E., Valldeperes, M., & Napp, S. (2021). Hotspot of Crimean-Congo

- Hemorrhagic Fever Virus Seropositivity in Wildlife, Northeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 27(9), 2480–2484. <https://doi.org/10.3201/eid2709.211105>
- Estrada-Peña, A., & de la Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, 108, 104–128. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., & Walker, A. R. (2004). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region A guide to identification of species. Universidad de Zaragoza.
- Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M. Á., Portillo, A., Romero, L., & Oteo, J. A. (2012). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *BMC Infectious Diseases*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-90>
- Estrada-Peña, A., Ruiz-Fons, F., Acevedo, P., Gortázar, C., & De la Fuente, J. (2013). Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 278–286. <https://doi.org/10.1111/jam.12039>
- Gargili, A., Estrada-Peña, A., Spengler, J. R., Lukashev, A., Nuttall, P. A., & Bente, D. A. (2017). The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies. *Antiviral Research*, 144, 93–119. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.05.010>
- Gortázar, C., Torres, M. J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., & Aznar-Martín, J. (2008). Bovine Tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The Role of Wild Ungulates as Disease Reservoirs in the Last Iberian Lynx Strongholds. *PLoS One*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002776>
- Hoogstraal, H., Kaiser, M. N., Traylor, M. A., Gaber, S., & Guindy, E. (1961). Ticks (Ixodoidea) on birds migrating from Africa to Europe and Asia. *Bulletin of the World Health Organization*, 24, 197–212.
- Hoogstraal, H. (1979). the Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic. *Journal of Medical Entomology*, 15(4), 307–417.

- Landi, V., Negro, J. J., Vega-Pla, J. L., Gortázar, C., García-Aznar Navajas, J. M., Delgado Bermejo, J. V., & Martínez Martínez, A. (2011). Caracterización genética del jabalí de la estación biológica de doñana. *Arch. Zootec*, 60(231), 373-376.
- Matschke, G. (1967). Aging European wild hogs by dentition. *Journal of Wildlife Management* 31(1): 109-113.
- Mazzola, L. T., & Kelly-Cirino, C. (2019). Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a widespread tickborne disease. *BMJ Global Health*, 4. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001114>
- Mertens, M., Schmidt, K., Ozkul, A., & Groschup, M. H. (2013). The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Research*, 98(2), 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.02.007>
- Midilli, K., Gargili, A., Ergonul, O., Elevli, M., Ergin, S., Turan, N., Şengöz, G., Ozturk, R., & Bakar, M. (2009). The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus and a field survey. *BMC Infectious Diseases*, 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-90>
- Monsalve Arteaga, L., Alonso Sardón, M., Muñoz Bellido, J. L., Vicente Santiago, M. B., Vieira Lista, M. C., López Abán, J., Muro, A., & Belhassen-Garcia, M. (2020). Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in humans in the World Health Organization European region: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(3) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094>
- Monsalve Arteaga, L., Muñoz Bellido, J. L., Negredo, A. I., García Criado, J., Vieira Lista, M. C., Sánchez Serrano, J. Á., Vicente Santiago, M. B., López Bernús, A., de Ory Manchón, F., Sánchez Seco, M. P., Leralta, N., Alonso Sardón, M., Muro, A., & Belhassen-García, M. (2021). New circulation of genotype V of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in humans from Spain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009197>
- Moraga-Fernández, A., Ruiz-Fons, F., Habela, M. Á., Royo-Hernández, L., Calero-Bernal, R., Gortázar, C., De La Fuente, J., & Fernández de Mera, I. G. (2020). Detection of new

- Crimean – Congo haemorrhagic fever virus genotypes in ticks feeding on deer and wild boar, Spain. *Transbound Emerg Dis* 68(3), 993–1000. <https://doi.org/10.1111/tbed.13756>
- Nasirian, H. (2020). New aspects about Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) cases and associated fatality trends: A global systematic review and meta-analysis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101429>
- Negredo, A., de la Calle-Prieto, F., Palencia-Herrejón, E., Mora-Rillo, M., Astray-Mochales, J., Sánchez-Seco, M. P., Bermejo Lopez, E., Menárguez, J., Fernández-Cruz, A., Sánchez-Artola, B., Keough-Delgado, E., Ramírez de Arellano, E., Lasala, F., Milla, J., Fraile, J. L., Ordobás Gavín, M., Martínez de la Gándara, A., López Perez, L., Díaz-Díaz, D., ... Arribas, J. R. (2017). Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 154–161. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1615162>
- Negredo, A., Habela, M. Á., Arellano, E. R. De, Díez, F., Lasala, F., López, P., Sarriá, A., Labiod, N., Calero-bernal, R., Arenas, M., Tenorio, A., Estrada-peña, A., & Sánchez-seco, M. P. (2019). Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Focus, Spain, 2011–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1177–1184.
- Negredo, A., Sánchez-Ledesma, M., Llorente, F., Pérez-Olmeda, M., Belhassen-García, M., González-Calle, D., Sánchez-Seco, M. P., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2021). Retrospective Identification of Early Autochthonous Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1754–1756.
- Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Arizaga, J., Crespo, A., Gutiérrez, Ó., Cuadrado, J. F., & Oteo, J. A. (2013). Crimean-congo hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2), 260–263. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121193>
- Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, S., San José, C., Rayas, E., Talavera, V., Mallofret, E., Migens, E., & Oteo, J. A. (2019). Distribución y prevalencia de microorganismos transmitidos por garrapatas en el espacio natural doñana (huelva) y en el parque natural los alcornocales (cádiz). XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Cl. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(1), 36–37. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas->

## microbiologia-clinica-28

- Peralbo-Moreno, A., Cuadrado-Matías, R., Baz-Flores, S., Barroso, P., Triguero-Ocaña, R., Jiménez-Ruiz, S., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F. (31 de agosto-2 de septiembre de 2021) [Presentación oral]. 69<sup>th</sup> WDA, 14<sup>th</sup> EWDA, Managing Wildlife Disease for Sustainable Ecosystems, Cuenca, España.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Randolph, S.E., & D.J. Rogers, (2007): Ecology of tick-borne disease and the role of climate. In: Ergonul, O., and C.A. Whitehouse (eds), Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Springer, Dordrecht, 167-186.
- Rendón, M. A., Green, A. J., Aguilera, E., & Almaraz, P. (2008). Status, distribution and long-term changes in the waterbird community wintering in Doñana, south-west Spain. *Biological conservation*, 141, 1371-1388. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.03.006>
- Ruiz-Fons, F., Acevedo, P., Sobrino, R., Vicente, J., Fierro, Y., & Fernández-de-Mera, I. G. (2013). Sex-biased differences in the effects of host individual, host population and environmental traits driving tick parasitism in red deer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00023>
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Gortázar, C., & de la Fuente, J. (2012). Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2669–2676. <https://doi.org/10.1128/AEM.06564-11>
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., & Gortázar, C. (2006). Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Veterinary Parasitology*, 140(1–2), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.033>
- Sas, M. A., Comtet, L., Donnet, F., Mertens, M., Vatansever, Z., Tordo, N., Pourquier, P., & Groschup, M. H. (2018). A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-

- independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. *Antiviral Research*, 151, 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.006>
- Secretaría de Estado de Sanidad, D. G. de S. P. (2020). Evaluación rápida de riesgo. Detección de casos de Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo en Salamanca. Resumen de la situación y conclusiones. 1–8.
- Serretiello, E., Astorri, R., Chianese, A., Stelitano, D., Zannella, C., Folliero, V., Santella, B., Galdiero, M., Franci, G., & Galdiero, M. (2020). The emerging tick-borne Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: A narrative review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 37, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101871>
- Sierra, M. J., García San Miguel, L., García, M., Vila, B., Suárez, B., Monge, S., Fernández, S., Palmera, R., Pérez, J., Simón, F., Romero, L. J., García Villacieros, E., Estrada-Peña, A., Sánchez-Seco, M. P., Negro, A. I., de Ory, F., Molina, R., Jiménez, M., Fernández, B., Antonio Oteo, J., Portillo, A., Agüero, M., Olmeda, S., & Valcárcel, F. (2019). Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión del virus de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) en España. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; Secretaria General de Sanidad y Consumo; Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, 40.
- Spengler, J. R., & Estrada-peña, A. (2018). Host preferences support the prominent role of *Hyalomma* ticks in the ecology of Crimean- Congo hemorrhagic fever. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1–17.
- Spengler, J.R., & Bente, D.A. (2017) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Spain – New arrival or silent resident? *The New England Journal of Medicine*, 377,106-108.
- Spengler, J.R., Estrada-Peña, A., Garrison, A.R., Schmaljohn, C., Spiropoulou, C.F., Bergeron, E., & Bente, D.A. (2016) A chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral Research*, 135, 31-47.
- Triguero-Ocaña, R., Barasona, J. A., Carro, F., Soriguer, R. C., Vicente, J., & Acevedo, P. (2019). Spatio-temporal trends in the frequency of interspecific interactions between domestic

- and wild ungulates from Mediterranean Spain. *PLoS ONE*, 14(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211216>
- Ugleva S.V., Kuznetsov S.D., Shabalina S.V. Crimean–Congo hemorrhagic fever. (2017). *Infekc. bolezni (Infectious diseases)*. 15(4),60–67. <http://dx.doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-60-67>
- Vatansever, Z., Uzun, R., Estrada-Pena, A., & Ergonul, O. (2007). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. In *Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Springer, Dordrecht, 59-74.
- Whitehouse, C. A. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 64(3), 145–160.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.001>
- WHO. (2017). World Health Organization. Geographic distribution of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. [Internet]. Disponible en:  
[https://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congohaemorrhagic-fever/Global\\_CCHFRisk\\_2017.jpg?ua=1](https://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congohaemorrhagic-fever/Global_CCHFRisk_2017.jpg?ua=1)
- Yilmaz, G. R., Buzgan, T., Irmak, H., Safran, A., Uzun, R., Cevik, M. A., & Torunoglu, M. A. (2009). The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 380–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.07.021>
- Zeller, H. G., Cornet, J. P., & Camicas, J. L. (1994). Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in birds: field investigations in Senegal. *Research in Virology*, 145, 105–109.  
[https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(07\)80012-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(07)80012-4)
- Zhang, Y., Shen, S., Fang, Y., Liu, J., Su, Z., Liang, J., Zhang, Z., Wu, Q., Wang, C., Abudurexiti, A., Hu, Z., Zhang, Y., & Deng, F. (2018). Isolation, Characterization, and Phylogenetic Analysis of Two New Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains from the Northern Region of Xinjiang Province, China. *Virologica Sinica*, 33(1), 74–86. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0020-7>

### 8. Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto del Plan Estatal de I+D+I cuyo acrónimo es Wild Driver y su título “Entender y cuantificar el efecto de la densidad de ungulados silvestres como determinante de patógenos emergentes multi-hospedador bajo una perspectiva de Salud Global”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y por el Fondo Social Europeo, con referencia CGL2017-89866-R.

Gloria Herrero García fue beneficiaria de la “Beca de Iniciación a la investigación para estudiantes de másteres oficiales de la Universidad de Castilla La Mancha (UCLM)”, curso 2020-2021, durante 6 meses (marzo a agosto 2021).

### 9. Anexo 1

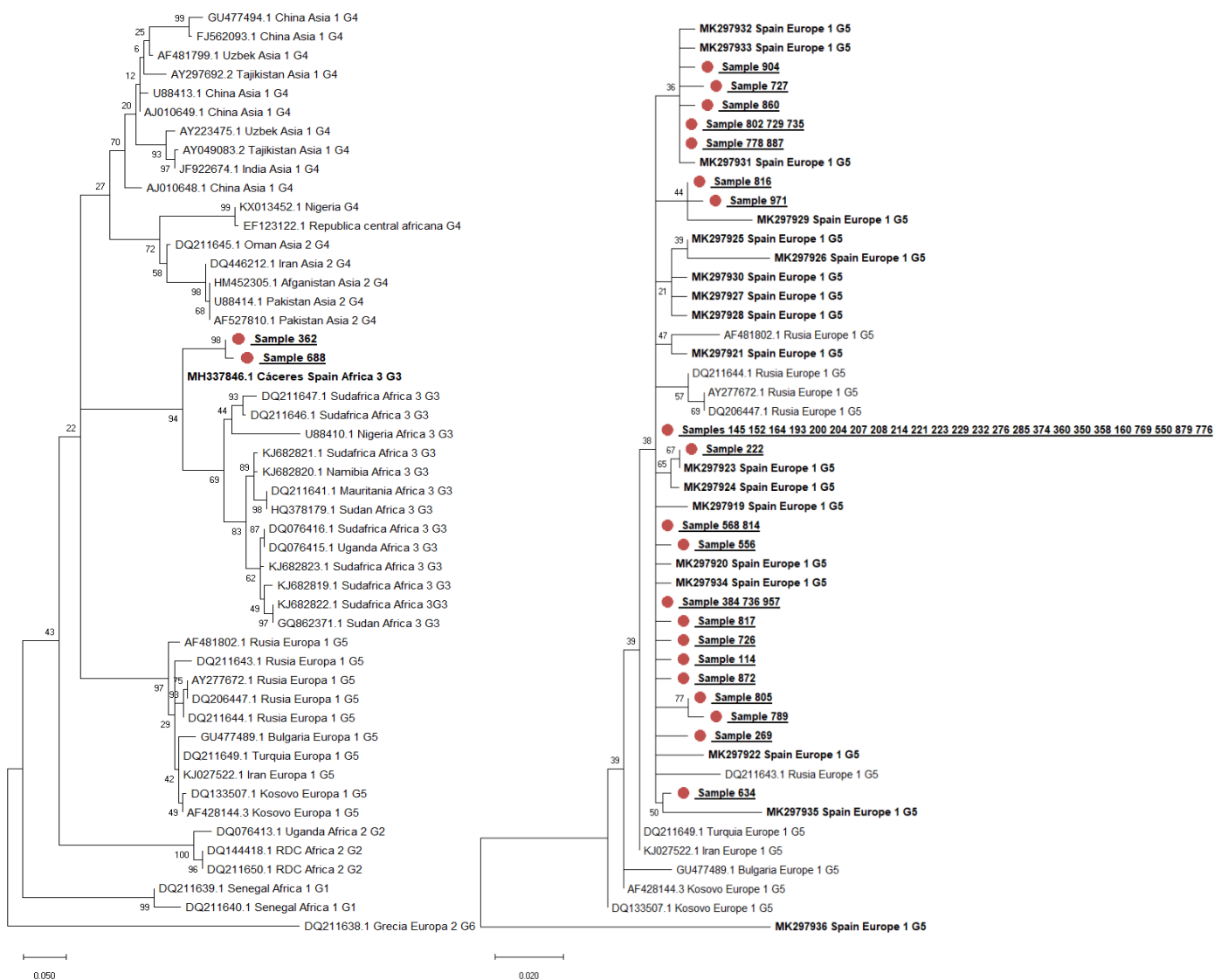


Figura 1. Análisis filogenético de las secuencias del segmento S del VFHCC analizadas. Las muestras están identificadas con su número de extracción correspondiente y un punto rojo. Las secuencias se agruparon en dos clados diferentes, respectivos a dos genotipos diferentes, a la izquierda genotipo V (Europa) y a la derecha genotipo III (África).