

CAPÍTULO 3.1.5.

FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA–CONGO

RESUMEN

El virus de la fiebre hemorrágica de Crimea–Congo (VFHCC), del género Nairovirus, que pertenece a la familia Bunyaviridae, causa una enfermedad zoonótica en muchos países de Asia, África, Oriente Medio y el sureste de Europa. Dado que la distribución del VFHCC coincide con la de su principal vector, que es una garrapata del género Hyalomma, la diseminación de garrapatas infectadas hacia zonas nuevas, previamente no afectadas, facilita la propagación del virus. El virus circula en un ciclo de garrapata-vertebrado-garrapata, pero también puede transmitirse horizontal y verticalmente dentro de la población de garrapatas. Las garrapatas del género Hyalomma infestan gran variedad de especies de fauna salvaje, como ciervos y liebres, y especies pecuarias criadas en libertad, como cabras, ganado vacuno y ovejas. Muchas aves son resistentes a la infección, pero los avestruces parecen ser más susceptibles. En el ganado, la viremia es corta, y de baja intensidad. Estos animales desempeñan un papel fundamental en el ciclo de vida de las garrapatas, y en la transmisión y amplificación del virus, de tal modo que constituyen el foco de atención de la salud pública veterinaria. Dado que los animales no desarrollan signos clínicos, las infecciones por el VFHCC no repercuten en la carga económica de la producción pecuaria. Contrariamente a lo que ocurre en los animales, las infecciones humanas pueden dar lugar a una enfermedad grave: la fiebre hemorrágica de Crimea–Congo (FHCC).

Cada año, se notifican más de 1000 casos de FHCC humana con tasas de mortalidad un 5-80% (en Turquía), dependiendo de la cepa vírica y de otros factores locales. La patogenia de la enfermedad en el ser humano no se conoce del todo. La mayoría de las personas que resultan infectadas contraen la enfermedad por picaduras de garrapatas y por aplastamiento de garrapatas infectadas, pero la infección también es posible por contacto con la sangre y otros líquidos corporales de los animales virémicos, por ejemplo, en mataderos. Dado que el VFHCC también puede transmitirse directamente entre personas, se han descrito brotes nosocomiales.

No existe ninguna vacuna autorizada contra la FHCC, y el tratamiento es meramente sintomático. La formación en materia de salud y la información relativa a las medidas de prevención y de comportamiento es lo más importante para mejorar la percepción del riesgo para la salud pública y, por lo tanto, para disminuir la probabilidad de que se produzcan infecciones. Así pues, identificar las zonas endémicas es fundamental para implementar las medidas de salud pública de manera concentrada y dirigida. El cribado de los rumiantes con pruebas serológicas permite identificar las zonas afectadas por el VFHCC, porque el nivel de anticuerpos en los animales es un buen indicador de la circulación del virus a nivel local. El tratamiento con repelentes de garrapatas puede ser bastante efectivo para reducir la infestación de los animales por garrapatas. Para proteger al personal de laboratorio, la manipulación de materiales infectados por el VFHCC solo debe llevarse a cabo si el nivel de biocontención es el adecuado.

Detección e identificación del agente: Hasta ahora solo se conoce un serotipo del virus, pero el análisis mediante secuenciación ha puesto de manifiesto una diversidad genética considerable. El VFHCC tiene propiedades morfológicas y físico-químicas típicas de la familia Bunyaviridae, y un genoma de ARN monocatenario de polaridad negativa que consiste en tres segmentos: L (grande), M (mediano) y S (pequeño), cada uno de los cuales está contenido en una nucleocápsida independiente dentro del virión. El virus puede aislarse de muestras de suero o plasma obtenidas durante la fase febril o virémica de la infección, o del hígado de animales infectados. Los aislamientos primarios se llevan a cabo mediante inoculación de varios cultivos tisulares, habitualmente células de riñón de mono verde africano (Vero). Para identificar y caracterizar el virus, puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcripción inversa convencional o en tiempo real.

Dado que las infecciones de los animales se mantienen subclínicas, la probabilidad de aislar el virus de un animal virémico es muy baja.

Pruebas serológicas: Pueden ponerse de manifiesto anticuerpos específicos de tipo mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta o por ELISA sándwich de detección de IgG y ELISA de captura de IgM. Se comercializan sistemas analíticos para sanidad animal; además, se han publicado algunos sistemas internos o se utilizan kits que sustituyen el conjugado suministrado en el kit por otro adecuado para la especie animal en la que se desee determinar si tiene anticuerpos específicos contra el VFHCC.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de ninguna vacuna para animales.

A. INTRODUCCIÓN

La fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) es una enfermedad enzoótica causada por el virus de la FHCC (VFHCC), que se transmite principalmente por garrapatas y pertenece al género *Nairovirus*, en la familia Bunyaviridae. El VFHCC posee un genoma de ARN de polaridad negativa que consiste en tres segmentos, L (grande), M (mediano) y S (pequeño), cada uno de los cuales está contenido en una nucleocápsida independiente dentro del virión. Se considera que todos los nairovirus se transmiten por garrapatas de las familias *Ixodidae* y *Argasidae*, y solo se conocen tres que sean patógenos para el ser humano, el virus de la FHCC, el virus Dugbe y el virus de la enfermedad ovina de Nairobi (Swanepoel y Burt, 2004; Swanepoel y Paweska, 2011; Whitehouse, 2004). El VFHCC se puede cultivar en varias líneas celulares de garrapatas derivadas tanto de un vector natural (*Hyalomma anatolicum*) como de otras especies de garrapatas no implicadas en la transmisión natural (Bell-Sakyiet et al., 2012).

El virus de un brote de la “fiebre hemorrágica de Crimea” que tuvo lugar la península de Crimea en 1944 no se aisló ni caracterizó hasta 1967. En 1969, se observó que el virus de la “fiebre hemorrágica del Congo”, aislado de un paciente del antiguo Zaire (la actual República Democrática del Congo) en 1956, era el mismo virus. Como consecuencia, se han utilizado los nombres de ambos países para describir la enfermedad (Hoogstraal, 1979). La distribución del virus refleja la amplia distribución de las garrapatas del género *Hyalomma*, el principal vector del virus (Avsic-Zupanc, 2007; Grard et al., 2011; Papa et al., 2011; Swanepoel y Paweska, 2011).

El ciclo natural del VFHCC incluye la transmisión transovárica y la transtadial entre garrapatas y un ciclo de garrapata-vertebrado-garrapata en el que interviene una gran variedad de animales salvajes y domésticos. La infección también puede transferirse entre garrapatas infectadas y no infectadas cuando se alimentan al mismo tiempo en un hospedador; de ahí el denominado fenómeno de la “trasmisión no virémica”. Las garrapatas del género *Hyalomma* se alimentan en gran variedad de rumiantes domésticos (ovejas, cabras y ganado vacuno) y en herbívoros salvajes, liebres, erizos y ciertos roedores. La infección por el VFHCC en animales fue revisada por Nalca et al., (2007). Spengler et al. (2016) publicaron una revisión sobre infecciones experimentales de animales salvajes y del ganado por el VFHCC. Aunque las infecciones de los animales en general son subclínicas, los niveles de viremia relacionados son suficientes para permitir la transmisión del virus a garrapatas no infectadas (Swanepoel y Burt, 2004; Swanepoel y Paweska, 2011). Muchas aves son resistentes a la infección, pero los avestruces parecen ser más susceptibles que otras especies aviares (Swanepoel et al., 1998). Aunque no parecen convertirse en virémicas, las aves que se alimentan en el suelo pueden actuar como vehículo para la propagación de garrapatas infectadas por el VFHCC. Los resultados de estudios serológicos realizados en África y Eurasia indican una extensa circulación del virus en el ganado y en vertebradas salvajes (Swanepoel y Burt, 2004).

El ser humano contrae la infección por picaduras de garrapatas, o por el contacto con sangre o tejidos infectados de especies pecuarias o de pacientes humanos. Tras la incubación, el ser humano puede presentar una enfermedad grave con una fase pre-hemorrágica, una fase hemorrágica y un periodo de convalecencia. Los signos hemorrágicos pueden oscilar entre petequias y grandes hematomas. Puede observarse sangrado en la nariz, el tracto gastrointestinal, el útero y el tracto urinario, y en el tracto respiratorio, con una tasa de mortalidad que oscila entre el 5% y el 80% (Ergonul, 2006; Yen et al., 1985; Yilmaz et al., 2008). La gravedad de la FHCC en el ser humano destaca el efecto de esta enfermedad zoonótica en la salud pública. Aunque el VFHCC no tiene consecuencias económicas para la producción pecuaria, es muy importante realizar un cribado serológico de muestras de suero de los animales respecto a anticuerpos específicos del VFHCC. Dado que la seroprevalencia en los animales es un buen indicador de la circulación de virus a nivel local, estos estudios permiten identificar zonas de riesgo alto de infección humana (Mertens et al., 2013). El personal de los mataderos, los veterinarios, los ganaderos y demás personas relacionadas con la industria ganadera deben conocer bien la enfermedad. Deben emprender los pasos necesarios para reducir o evitar la exposición directa de la piel a sangre u otros tejidos frescos de los animales, y evitar las picaduras y la manipulación de garrapatas. En estudios realizados en Sudáfrica se ha observado que el

uso de repelentes en los animales antes del sacrificio podría reducir la cantidad de trabajadores del matadero que resultan infectados (Swanepoel *et al.*, 1998). El tratamiento del ganado en general puede reducir la densidad de garrapatas en estos animales y, por lo tanto, reducir el riesgo de picadura de garrapata en el personal que los manipula (Mertens *et al.*, 2013). Este tipo de control de las garrapatas mediante acaricidas es posible hasta cierto punto, pero puede ser difícil de implementar en la ganadería extensiva. En Europa del este y la antigua URSS se ha utilizado a pequeña escala una vacuna inactivada derivada de cerebro de ratón para la prevención de la infección humana (Swanepoel y Paweska, 2011). Se está avanzando en el desarrollo de la vacuna contra el VFHCC con varios métodos diferentes que se están probando para superar los retos actuales (Dowall *et al.*, 2017).

La infectividad del VFHCC se destruye por ebullición o esterilización en autoclave y con concentraciones bajas de formalina o beta-propiolactona. Es un virus sensible a los disolventes lipídicos. Es lábil en tejidos infectados tras la muerte, supuestamente por la caída del pH, pero la infectividad se mantiene durante unos días a temperatura ambiente en el suero, y hasta 3 semanas a 4°C. La infectividad es estable a temperaturas inferiores a los -60°C (Swanepoel y Paweska, 2011). El VFHCC debe manipularse con las medidas apropiadas de biocontención, que vendrán determinadas por un análisis del riesgo, según se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales* (Palmer, 2011; Whitehouse, 2004).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Formatos de las pruebas de diagnóstico de infecciones por el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea–Congo en animales

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente^(a)						
RT-PCR en tiempo real	–	+++	–	+++ ^(c)	+ ^(b)	–
Aislamiento del virus en cultivo celular	–	–	–	+ ^(c)	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
ELISA de IgG	+++	+	–	+	+++	–
ELISA de competición	+++	+	–	+	+++	–
ELISA de IgM	–	++	–	++	–	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito

ELISA = enzimoimmunoanálisis; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con reacción inversa.

^(a)Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

^(b)La RT-PCR se utiliza para el cribado de poblaciones de garrapatas en el contexto de estudios de vigilancia.

^(c)Las pruebas moleculares/aislamiento se pueden utilizar para confirmar infección aguda en casos muy infrecuentes en animales que presenten signos clínicos, puesto que la viremia tiende a ser transitoria.

En animales vertebrados domésticos y salvajes, la infección por el VFHCC causa solo una fiebre leve con una viremia detectable de hasta 2 semanas de duración (Gonzalez *et al.*, 1998; Gunes *et al.*, 2011). De forma similar, los avestruces infectados presentan solo una viremia baja y de corta duración, sin signos clínicos (Swanepoel & Burt,

2004). Por lo tanto, en los animales casi nunca se diagnostican infecciones recientes, y los métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el aislamiento vírico en cultivo celular y la detección de IgM mediante enzoinmunoanálisis (ELISA) se utilizan principalmente para el diagnóstico de la FHCC en el ser humano, o en el caso especial de que un animal tenga que clasificarse como libre del VFHCC. Para el análisis de la prevalencia y para determinar si el VFHCC está circulando en un país, son preferibles los métodos de detección de anticuerpos IgG (Tabla 1). Si existe alguna posibilidad o sospecha de que las muestras para el diagnóstico pudieran estar contaminadas por el VFHCC, deben manipularse al nivel apropiado de bioseguridad y todas las personas que traten con dichas muestras deben ser conscientes del posible riesgo y de deben utilizar equipo de protección personal para evitar infecciones humanas.

1. Detección e identificación del agente

Para realizar pruebas de viremia en animales, puede lograrse un diagnóstico rápido por detección de ácido nucleico vírico en el suero o el plasma empleando una PCR con transcripción inversa (RT) convencional (Burt *et al.*, 1998) o en tiempo real (Drosten *et al.*, 2002; Duh *et al.*, 2006; Koehler *et al.*, 2018; Negredo *et al.*, 2017; Sas *et al.*, 2018; Wölfel *et al.*, 2007), o bien poniendo de manifiesto el antígeno vírico (Shepherd *et al.*, 1988). Las muestras que deben enviarse al laboratorio para confirmar la FHCC son sangre e hígado. Debido al riesgo de contracción de infecciones en el laboratorio, el trabajo con el VFHCC debe llevarse a cabo en instalaciones de bioseguridad adecuadas.

El virus se puede aislar de suspensiones de suero y de órganos en gran variedad de cultivos celulares, como células Vero, LLC-MK2, SW-13, BSR-T7/5, CER y BHK21, y puede identificarse mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos. El aislamiento y la identificación del virus se logran en 1-5 días, pero los cultivos celulares carecen de sensibilidad y normalmente solo detectan concentraciones altas del virus en la sangre.

1.1. Aislamiento del virus en cultivo celular

El VFHCC se puede aislar en cultivos de células de mamífero. Las células Vero se utilizan mucho, y normalmente dan una cepa a los 1-5 días post-inoculación (p.i.). El VFHCC es poco citopático y, por lo tanto, la infectividad se titula por observación de inmunofluorescencia en las células infectadas (Shepherd *et al.*, 1986). La línea celular SW-13 también se ha utilizado mucho para aislar el virus, y produce placas en un plazo máximo de 4 días (p.i.). La identificación de una cepa del VFHCC debe confirmarse mediante inmunofluorescencia o técnicas moleculares (Burt *et al.*, 1998; Shepherd *et al.*, 1986).

1.1.1. Procedimiento analítico

- i) Las líneas celulares susceptibles son Vero-E6, BHK-21, LLC-MK2 y SW-13. Se inocula la muestra a un 80% de la superficie de monocapas confluentes de la línea celular escogida. El volumen de muestra a utilizar dependerá del tamaño del recipiente de cultivo (es decir, de si es un frasco de cultivo de 25 cm² o una placa de cultivo tisular de 6 o 24 pocillos). El volumen de muestra debe ser suficiente como para cubrir la monocapa celular. Pueden diluirse muestras de volúmenes suficientes con medio de cultivo tisular para preparar un volumen de inoculación suficiente.
- ii) Se adsorbe la muestra durante 1 hora a 37°C.
- iii) Se retira el inóculo. Se añade medio de cultivo nuevo que contenga suero fetal bovino al 2% y demás aditivos necesarios, según el medio específico y la línea celular.
- iv) Se incuban a 37°C con un 5% de CO₂ durante 4–7 días.
- v) Se comprueba si el sobrenadante contiene ARN del VFHCC mediante una RT-PCR entiempos real, según se describe a continuación, o con una prueba de inmunofluorescencia en raspados celulares.
- vi) En la mayoría de estas líneas celulares las cepas del VFHCC de muestras clínicas no causan efectos citopáticos (ECP) detectables al microscopio.

1.2. Detección de ácido nucleico

Las pruebas de diagnóstico moleculares, como la RT-PCR, sirven de herramienta de primera línea para el diagnóstico de la FHCC, y de otras fiebres hemorrágicas víricas (Drosten *et al.*, 2003). La ventaja de las pruebas de diagnóstico moleculares es su rapidez en comparación con el cultivo vírico, ya que a menudo permiten contar con un diagnóstico provisional apenas unas horas tras la recepción de la muestra (Burt *et*

al., 1998). La RT-PCR es un método de diagnóstico sensible, pero dada la diversidad genética del VFHCC, podría haber algunas dificultades en el diseño de cebadores o sondas que permitan la detección de todas las cepas circulantes del virus. De hecho, en función del origen geográfico y de los análisis filogenéticos del segmento del gen S, el VFHCC se ha clasificado previamente en nuevo clados geográficos – cuatro difundidos principalmente en África, tres en Europa y dos en Asia. Se han evaluado varias RT-PCR en tiempo real que detectan cepas de distintas ubicaciones geográficas (Gruber et al., 2019). Aunque se ha observado que algunas son muy sensibles, y que pueden llegar a detectar apenas 10 copias de ARN vírico por ml de plasma, es necesario combinar al menos dos pruebas moleculares para asegurarse de detectar los distintos clados del VFHCC (Gruber et al., 2019). Las mejores combinaciones de pruebas en cuanto a la eficacia para la detección de cada clado del VFHCC, teniendo en cuenta las secuencias del VFHCC que se conocían en el momento del estudio, se indican en la Tabla 2. Asimismo, se ha validado extensamente en muestra clínicas obtenidas de casos confirmados de FHCC a lo largo de 20 años por parte de un laboratorio de referencia de la OMS. Se ha observado que permite detectar apenas 6,3 copias del genoma por reacción (Wölfel et al., 2009).

Tabla 2. Combinaciones de pruebas moleculares para la detección de ácido nucleico específico del VFHCC

Clado	Combinaciones de pruebas moleculares	Nombres de cebadores y sondas (secuencia 5' → 3')
África 1	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCRealP1(TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2(GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
	Real-time RT-PCR	Dir. CCRealP1(TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2(GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
África 2	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCHF-SF2(GGA-VTG-GTG-VAG-GGA-RTT-TG) Inv. CCHF-SR2(CAD-GGT-GGR-TTG-AAR-GC) Dir. CCHF-N2 (CAA-RGG-CAA-RTA-CAT-MAT)
	RT-PCR anidada	Dir. CCHF1(CTG-CTC-TGG-TGG-AGG-CAA-CAA) Inv. CCHF2_5(TGG-GTT-GAA-GGC-CAT-GAT-GTA-T) Anidada Dir. CCHFn15(AGG-TTT-CCG-TGT-CAA-TGC-AAA) Anidada Inv. CCHFn25(TTG-ACA-AAC-TCC-CTG-CAC-CAG-T)
África 3	RT-PCR anidada	Dir. CrCon1+ (RWA-AYG-GRC-TTR-TGG-AYA-CYT-TCA-C) Inv. CrCon1- (TRG-CAA-GRC-CKG-TWG-CRA-CWA-GWG-C) Anidada Dir. CriCon2+ (ART-GGA-GRA-ARG-AYA-TWG-GYT-TYC-G) Anidada Inv. CriCon2- (CYT-TGA-YRA-AYT-CYC-TRC-ACC-ABT-C)
	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCRealP1 (TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2 (GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
África 4	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCHF-III (CAA-GAG-GTA-CCA-AGA-AAA-TGA-AGA-AGG-C) Inv. CCHF-III-r (GCC-ACG-GGG-ATT-GTC-CCA-AAG-CAG-AC) Sonda CCHFprobe-1 (ATC-TAC-ATG-CAC-CCT-GCY-GTG-YTG-ACA) Sonda CCHFprobe-2 (TTC-TTC-CCC-CAC-TTC-ATT-GGR-GTG-CTC-A)
	RT-PCR anidada	Dir. CCF-115F (AAR-GGA-AAT-GGA-CTT-RTG-GA) Dir. CCF-131F (TGG-AYA-CYT-TCA-CAA-ACT-CC) Inv.CCF-759R (GCA-AGG-CCT-GTW-GCR-ACA-AGT-GC)
Asia 1	RT-PCR en tiempo real	Dir. CC1a_for (GTG-CCA-CTG-ATG-ATG-CAC-AAA-AGG-ATT-CCA-TCT) Inv.CC1a_rev (GTG-CCA-CTG-ATG-ATG-CAC-AAA-AGG-ATT-CCA-TCT) Sonda CCHF-01 (CAA-CAG-GCT-GCT-CTC-AAG-TGG-AG)
	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCHF-SF2 (GGA-VTG-GTG-VAG-GGA-RTT-TG) Inv. CCHF-SR2 (CAD-GGT-GGR-TTG-AAR-GC) Sonda CCHF-N2 (CAA-RGG-CAA-RTA-CAT-MAT)

Clado	Combinaciones de pruebas moleculares	Nombres de cebadores y sondas (secuencia 5' → 3')
Asia 2	RT-PCR anidada	Dir. CCF-115F (AAR-GGA-AAT-GGA-CTT-RTG-GA) Dir. CCF-131F (TGG-AYA-CYT-TCA-CAA-ACT-CC) Inv. CCF-759R (GCA-AGG-CCT-GTW-GCR-ACA-AGT-GC)
	RT-PCR en tiempo real Sybrgreen	Dir. (GAT-GAG-ATG-AAC-AAG-TGG-TTT-GAA-GA) Inv. (GTA-GAT-GGA-ATC-CTT-TTG-TGC-ATC-AT)
	RT-PCR	Dir. CCS (ATG-CAG-GAA-CCA-TTA-ART-CTT-GGG-A) Inv.1 CCAS1 (CTA-ATC-ATA-TCT-GAC-AAC-ATT-TC) Inv.2 CCAS2 (CTA-ATC-ATG-TCT-GAC-AGC-ATC-TC)
Europa 1	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCRealP1 (TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2 (GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
	RT-PCR anidada	Dir. CCF-115F (AAR-GGA-AAT-GGA-CTT-RTG-GA) Dir. CCF-131F (TGG-AYA-CYT-TCA-CAA-ACT-CC) Inv. CCF-759R (GCA-AGG-CCT-GTW-GCR-ACA-AGT-GC)
Europa 2	RT-PCR anidada	Dir. CrCon1+ (RWA-AYG-GRC-TTR-TGG-AYA-CYT-TCA-C) Inv. CrCon1- (TRG-CAA-GRC-CKG-TWG-CRA-CWA-GWG-C) Dir. CriCon2+ (ART-GGA-GRA-ARG-AYA-TWG-GYT-TYC-G) Inv. CriCon2- (CYT-TGA-YRA-AYT-CYC-TRC-ACC-ABT-C)
Europa 3	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCRealP1 (TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2 (GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
Todos	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCRealP1 (TCT-TYG-CHG-ATG-AYT-CHT-TYC) Inv. CCRealP2 (GGG-ATK-GTY-CCR-AAG-CA) Sonda (ACA-SRA-TCT-AYA-TGC-AYC-CTG-C)
	RT-PCR anidada	Dir. CrCon1+ (RWA-AYG-GRC-TTR-TGG-AYA-CYT-TCA-C) Inv. CrCon1- (TRG-CAA-GRC-CKG-TWG-CRA-CWA-GWG-C) Inv. Dir. CriCon2+ (ART-GGA-GRA-ARG-AYA-TWG-GYT-TYC-G) Anidada Inv. CriCon2- (CYT-TGA-YRA-AYT-CYC-TRC-ACC-ABT-C)
	RT-PCR en tiempo real	Dir. CCHF-SF2 (GGA-VTG-GTG-VAG-GGA-RTT-TG) Inv. CCHF-SR2 (CAD-GGT-GGR-TTG-AAR-GC) Sonda CCHF-N2 (CAA-RGG-CAA-RTA-CAT-MAT)
	RT-PCR	Dir. CCS (ATG-CAG-GAA-CCA-TTA-ART-CTT-GGG-A) Inv.1 CCAS1 (CTA-ATC-ATA-TCT-GAC-AAC-ATT-TC) Inv.2 CCAS2 (CTA-ATC-ATG-TCT-GAC-AGC-ATC-TC)
	RT-PCR en tiempo real	Dir. CC1a_for (GTG-CCA-CTG-ATG-ATG-CAC-AAA-AGG-ATT-CCA-TCT) Inv. CC1a_rev (GTG-CCA-CTG-ATG-ATG-CAC-AAA-AGG-ATT-CCA-TCT) Sonda CCHF-01 (CAA-CAG-GCT-GCT-CTC-AAG-TGG-AG)

(Datos y tabla de Gruber et al. 2019 modificados)

2. Pruebas serológicas

Las pruebas de neutralización vírica, que en general se consideran muy específicas, casi nunca se utilizan para diagnosticar el VFHCC. Los miembros del género *Orthonairovirus* en general inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes más débil que miembros de otros géneros de la familia *Nairoviridae*. Otro inconveniente es la necesidad de llevar a cabo esta prueba a un nivel alto de biocontención para la bioseguridad, porque se utiliza virus vivo (Burt et al., 1994; Rodriguez et al., 1997).

Actualmente, solo existen algunos kits comerciales de detección del VFHCC basados en ELISA de IgM o IgG o en inmunofluorescencia (IFA). Están diseñados para el mercado de diagnóstico en el ser humano, pero es posible adaptar estos ELISA e IFA a la detección serológica en los animales. Además, se han publicado algunos ELISA internos para la detección de anticuerpos específicos del VFHCC en los animales.

Se ha comparado el rendimiento diagnóstico en humanos entre los distintos métodos empleando en función de la sensibilidad, la especificidad, la concordancia y el grado de acuerdo, con especial atención a la fase de la infección (Emmerich *et al.*, 2021). Los sistemas analíticos serológicos existentes detectan anticuerpos IgM e IgG anti-VFHCC con precisión, pero su rendimiento diagnóstico varía según la fase de la infección. Con ELISA, entre las fases temprana y convaleciente, se observó una sensibilidad distinta para detectar anticuerpos IgG específicos contra el VFHCC. En cuanto a los dos sistemas de inmunofluorescencia, mostraron una sensibilidad idéntica, en las fases aguda y convaleciente de la infección, para la detección de anticuerpos IgM anti-VFHCC.

Los anticuerpos IgM del ganado (ovejas, cabras y ganado vacuno) pueden detectarse con un ELISA de captura de IgM. Los anticuerpos IgG se pueden detectar mediante un ELISA de sándwich de IgG o indirecto, y los anticuerpos totales pueden detectarse mediante un ELISA de competición. La ventaja del ELISA de competición es la capacidad de investigar distintas especies animales, porque son independientes de la especie hospedadora. Se comercializan kits para la detección de anticuerpos específicos del VFHCC o para la detección de antígeno vírico. El factor limitante para la replicación de estos protocolos en otros laboratorios es la disponibilidad de los antígenos y (cuando corresponde) de los anticuerpos monoclonales especificados. La mayor parte de las pruebas descritas para el ganado y los animales salvajes no ha pasado por un proceso formal de validación (Mertens *et al.*, 2013). Uno de los principales retos de estos estudios de validación es la disponibilidad de un número suficiente de muestras control positivas bien caracterizadas.

Para más información sobre la disponibilidad de reactivos de referencia para su uso en laboratorios veterinarios de diagnóstico, contacte con los Centros Colaboradores de la OMSA para Zoonosis de Europa y de la región de Asia-Pacífico.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de vacuna para animales.

BIBLIOGRAFÍA

AVSIC-ZUPANC T. (2007). Epidemiology of Crimean–Congo hemorrhagic fever in the Balkans. *In: Crimean–Congo Hemorrhagic Fever, a Global Perspective*, Ergonul O. & Whitehouse C.A., eds. Springer: Dordrecht, Netherlands, 75–88.

BELL-SAKYI L., KOHL D., BENTE D.A. & FAZAKERLEY J.F. (2012). Tick cell lines for study of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus and other arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **12**, 769–781.

BURT F.J., LEMAN P.A., ABBOTT J.C. & SWANEPOEL R. (1994). Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol. Infect.*, **113**, 551–562. Doi: 10.1017/s0950268800068576

BURT F.J., LEMAN P.A., SMITH J.F. & SWANEPOEL R. (1998). The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean–Congo haemorrhagic fever. *J. Virol. Methods*, **70**, 129–37.

DROSTEN C., GOTTING S., SCHILLING S., ASPER M., PANNING M., SCMITZ H. & GUNTER S. (2002). Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2323–2340.

DROSTEN C., KUMMERER B.M., SCMITZ H. & GUNTER S. (2003). Molecular diagnosis of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.*, **57**, 61–87.

- DUH D., SAKSIDA A., PETROVEC M., DEDUSHAJ I. & AVSIC-ZUPANC T. (2006). Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean–Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. *J. Virol. Methods*, **133**, 175–179.
- EMMERICH P., MIKA A., VON POSSEL R., RACKOW A., LIU Y., SCHMITZ H., GÜNTHER S., SHERIFI K., HALILI B., JAKUPI X., BERISHA L., AHMETI S. & DESCHERMEIER C. (2018). Sensitive and specific detection of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV)-Specific IgM and IgG antibodies in human sera using recombinant CCHFV nucleoprotein as antigen in μ -capture and IgG immune complex (IC) ELISA tests. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **12**(3):e0006366. doi:10.1371/journal.pntd.0006366.
- EMMERICH P., VON POSSEL R., DESCHERMEIER C., AHMETI S., BERISHA L., HALILI B., JAKUPI X., SHERIFI K., MESSING C. & BORCHARDT-LOHÖLTER V. (2021). Comparison of diagnostic performances of ten different immunoassays detecting anti-CCHFV IgM and IgG antibodies from acute to subsided phases of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **15** (3):e0009280.
- ERGONUL O. (2006). Crimean–Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.*, **6**, 203–214.
- GONZALEZ J.-P., CAMICAS J.-L., COMET J.-P. & WILSON M.L. (1998). Biological and clinical responses of West African sheep to Crimean–Congo haemorrhagic fever virus experimental infection. *Res. Virol.*, **149**, 445–455.
- GUNES T., POYRAZ O., VATANSEVER Z. (2011). Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from humans, livestock, and picnic sites in the hyperendemic region of Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**, 1411–1416.
- GRARD G., DREXLER J.F., FAIR J., MUYEMBE J.-J., WOLFE N.D., DROSTEN C. & LEROY E.M. (2011). Re-emergence of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in Central Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**(10): e1350. doi:10.1371/journal.pntd.0001350.
- GRUBER C., BARTOLINI B., CASTILLETI C., MIRAZIMI A., HEWSON R., CHRISTOVA I., AVŠIČ T., GRUNOW R., PAPA A., SÁNCHEZ-SECO M. P., KOPMANS M., IPPOLITO G., CAPOBIANCHI M. R., REUSKEN C. & DI CARO A. (2019). Geographical Variability Affects CCHFV Detection by RT-PCR: A Tool for *In-Silico* Evaluation of Molecular Assays. *Viruses*, **11**, 953.
- GULCE-İZ S., ELALDI N., CAN H Şahar E.A., Karakavuk M., Gül A., Kumoğlu G.Ö., Döşkaya A.D., Gürüz A.Y., Özdarendeli A., Felgner P.L., Davies H. & Döşkaya M.. (2021). Development of a novel recombinant ELISA for the detection of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus IgG antibodies. *Sci. Rep.*, **11**, 5936. doi:10.1038/s41598-021-85323-1.
- HOOGSTRAAL H. (1979). The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo haemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J. Med. Entomol.*, **15**, 307–417.
- KOEHLER J.W., DELP K.L., HALL A.T., OLSCHNER S.P., KEARNEY B.J., GARRISON A.R., ALTAMURA L.A., ROSSI C.A. & MINOGUE T.D. (2018). Sequence Optimized Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **98**, 211–215.
- MERTENS M., SCHMIDT K., OZKUL A. & GROSCUP M.H. (2013). The impact of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res.*, **98**, 248–260.
- NALCA A. & WHITEHOUSE C.A. (2007). Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infection among animals. *In: Crimean–Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*, Ergonul O. & Whitehouse C.A., eds. Springer: Dordrecht, Netherlands, 155–165.
- 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., MARTINEZ DE LA GÁNDARA A., LÓPEZ PEREZ L., DIAZ-DIAZ D., LÓPEZ-GARCÍA M.A., DELGADO-JIMENEZ P., MARTÍN-QUIRÓS A., TRIGO E., FIGUEIRA J.C., MANZANARES J., RODRIGUEZ-BAENA E., GARCIA-COMAS L., RODRÍGUEZ-FRAGA O., GARCÍA-ARENZANA N., FERNÁNDEZ-DÍAZ M.V., CORNEJO V.M., EMMERICH P., SCHMIDT-CHANASIT J., ARRIBAS J.R., CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER@MADRID WORKING GROUP (2017). Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N. Engl. J. Med.*, **377**, 154–161. 10.1056/NEJMoa1615162.
- PALMER S. (2011). Deliberate release of zoonotic agents. *In: Oxford Textbook of Zoonosis: Biology, Clinical Practise and Public Health Control*, Second Edition, Palmer S.R., Soulsby L., Torgerson P.R. & Brown D.W.G., eds. Oxford University Press, UK, p. 1214.

- PAPA A., TZALA E. & MALTEZOU H. (2011). Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Northeastern Greece. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 141–143.
- RODRIGUEZ L.L., MAUPIN G.O., KSIAZEK T.G., ROLLIN P.E., KHAN A.S., SCHWARZ T.F., LOFTS R.S., SMITH J.F., NOOR A.M., PETERS C.J. & NICHOL S.T. (1997). Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean–Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **57**, 512–518.
- SAS M.A., VINA-RODRIGUEZ A., MERTENS M., EIDEN M., EMMERICH P., CHAINTOUTIS S.C., MIRAZIMI A. & GROSCHUP M.H. (2018). A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes. *J. Virol. Methods*, **255**, 38–43.
- SHEPHERD A.J., SWANEPOEL R. & GILL D.E. (1988). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and reversed passive hemagglutination for detection of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus antigen. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 347–353.
- SHEPHERD A.J., SWANEPOEL R., LEMAN P.A. & SHEPHERD S.P. (1986). Comparison of methods for isolation and titration of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **24**, 654–656.
- SPENGLER J.R., ESTRADA-PEÑA A., GARRISON A.R., SCHMALJOHN C., SPIROPOULOU C.F., BERGERON É. & 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 Res.*, **135**, 31–47. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.09.013.
- SWANEPOEL R & BURT F.J. (2004). Crimean–Congo haemorrhagic fever. Second Edition. *In: Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa*, Coetzer J.A.W, Tustin R.C., eds. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa, pp. 1077–1085.
- SWANEPOEL R., LEMAN P.A., BURT, F.J., JARDINE J., VERWOERD D.J., CAPUA I., BRUCKNER G.K. & BURGER W.P. (1998). Experimental infection of ostriches with Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol. Infect.*, **121**, 427–432.
- SWANEPOEL R. & PAWESKA J.T. (2011). Crimean–Congo hemorrhagic fever. *In: Oxford Textbook of Zoonosis: Biology, Clinical Practise and Public Health Control*, Second Edition. Palmer S.R., Soulsby L., Torgerson P.R. & Brown D.W.G., eds. Oxford University Press, UK, pp. 287–293.
- WHITEHOUSE C.A. (2004). Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antivir. Res.*, **64**, 145–160.
- WOLFEL R., PAWESKA J.T., PETERSEN N., GROBBELAAR A.G., LEMAN P.A., HEWSON R., GEORGES-COURBOT, M., PAPA, A., GÜNTER S. & DROSTEN C. (2007). Virus detection and monitoring of viral load in Crimean–Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 1097–1100.
- WOLFEL R., PAWESKA J.T., PETERSEN N., GROBBELAAR A.G., LEMAN P.A., HEWSON R., GEORGES-COURBOT M., PAPA, A., HEISER V., PANNING M., GUNTER S. & DROSTEN C. (2009). Low-density microarray for rapid detection and identification of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1025–1030.
- YEN Y.C., KONG L.X., LEE L., ZHANG Y.Q., LI F., CAI B.J. & GAO S.Y. (1985). Characteristics of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**, 1179–1182.
- YILMAZ G.R., BUZGAN T., TORUNOGLU M.A., SAFRAN A., IRMAK H., COM S., UYAR Y., CARHAN A., OZKAYA E. & ERTEK M. (2008). A preliminary report on Crimean–Congo haemorrhagic fever in Turkey, March–June 2008. *Euro Surveill.*, **13**.

*
* *

NB: En la actualidad (2022) no se dispone de ningún Laboratorio de Referencia de la OMSA para la fiebre hemorrágica de Crimea–Congo (puede consultarse la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2023.