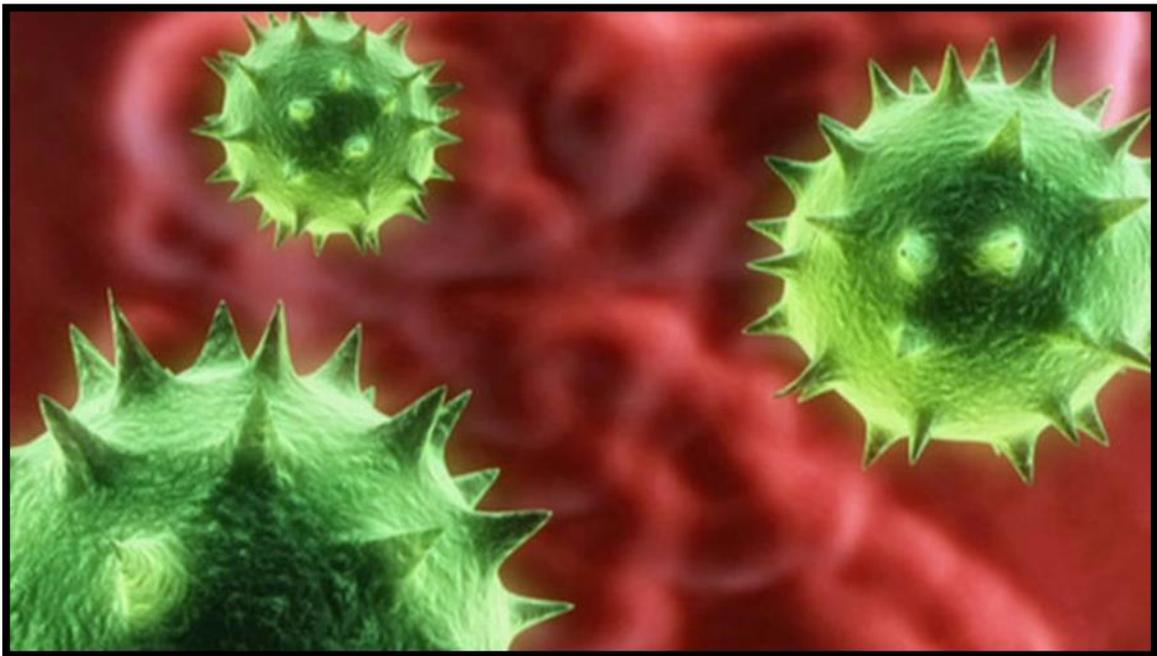




FIEBRE HEMORRÁGICA DEL VIRUS CRIMEA-CONGO



**Departamento de Microbiología y Parasitología
de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla
Realizado por M^a Eloísa Martínez Romero**



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

Trabajo fin de Grado

Grado de Farmacia

Título: Fiebre hemorrágica del virus Crimea-Congo.

(Revisión bibliográfica)

Realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia

Estudiante:

M^a Eloísa Martínez Romero

Tutora:

Dra. Eloísa Pajuelo Domínguez

Lugar y fecha de presentación:

Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

07/07/2017

ÍNDICE	Página
Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
2. Objetivos de la revisión.....	8
3. Metodología.....	9
4. Resultados y discusión.....	9
4.1. Estructura e información genética del virus.....	9
4.2. Epidemiología de la fiebre hemorrágica del virus Crimea-Congo..	12
4.3. Patología de la enfermedad.....	19
4.4. Nivel de bioseguridad del virus.....	20
4.4.1. Laboratorio de contención máxima.....	20
4.4.2. Manejo post-mortem.....	23
4.5. Diagnóstico clínico.....	24
4.6. Tratamiento y profilaxis.....	25
4.7. Desarrollo de vacunas.....	26
4.8. Perspectivas de futuro.....	27
5. Conclusiones.....	27
6. Bibliografía.....	28
6.1. Reseñas aparecidas en medios de comunicación.....	31

Abreviaturas

FHCC: Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo

cRNP: complejo ribonucleoproteico

GTP-asa: guanosina trifosfatasa

DEET: N,N-dietil-m-toluamida

IFI: inmunofluorescencia indirecta

RDT: test rápido de diagnóstico

MVB: cuerpos multivesiculares

NAT: técnica de detección de ácidos nucleicos

ISCIII: Instituto de Salud Carlos III

ECDC: European Center for Disease Control

CDC: Center for Disease Control and Prevention

OMS: Organización Mundial de la Salud

OIE: Organización Internacional para la Salud Animal

BOE: Boletín Oficial del Estado

RESUMEN

La fiebre hemorrágica del virus Crimea-Congo es una enfermedad producida por un Nairovirus, dentro de la familia Bunyaviridae, cuyo índice de morbi-mortalidad en las zonas endémicas es alto, alrededor del 30%, habiendo alcanzado hasta el 70-80% en determinados brotes particulares. El tamaño de este virus es entre 90-100 nm, con unas proyecciones glucoproteicas en su superficie (Gn y Gc). Contiene ARN monocatenario de polaridad negativa dividido en tres segmentos: uno pequeño llamado “S”, otro mediano llamado “M” y otro grande llamado “L” y una enzima ARN-polimerasa dependiente de ARN que sintetiza la copia de ARNm a partir de hebra de polaridad negativa. Las zonas de mayor incidencia son el Este y Sur de Europa, junto a toda la cuenca mediterránea, así como África y Oriente Medio, hasta Asia Central. El virus se transmite por garrapatas del género *Hyalomma* que infectan a animales salvajes y domésticos, e incluso a personas. Las personas con mayor probabilidad de contagio son aquellas que trabajan en el sector agrícola, ganadero, y los veterinarios y personal sanitario hospitalario. El tratamiento disponible es básicamente de sostén ya que no existe actualmente un tratamiento específico curativo o preventivo que radique o disminuya la morbi-mortalidad. Debido a esto está incluido en el grupo 4 de riesgo biológico, por tanto, se requieren condiciones de contención máxima para manipular el virus. Está en estudio la búsqueda de fármacos y el desarrollo de vacunas que sean eficaces frente a la letalidad del virus.

Palabras claves: Fiebre hemorrágica, virus Crimea-Congo, ARN, garrapatas *Hyalomma*

1. Introducción

La fiebre hemorrágica provocada por el virus de Crimea-Congo (FHCC) es una de las más graves en zonas endémicas, como África, Asia, Europa del Este y Medio Oriente con alto índice de mortalidad-morbilidad (Appannanavar *et al.*, 2011). Se trata de un virus perteneciente al género *Nairovirus* de la familia *Bunyaviridae*, incluido en el grupo 4 de riesgo biológico (Surtees *et al.*, 2016).

En la península de Crimea en 1944 tuvo lugar un brote de la “fiebre hemorrágica de Crimea”, pero no es hasta 1967 cuando se aisló. En 1969, se observó que el virus de la “fiebre hemorrágica del Congo”, aislado en un paciente de 13 años antes, era el mismo. De ahí que se hayan usado ambos nombres de países para denominar la enfermedad (OIE, 2014).

La distribución del virus (Figura 1) está relacionada con la distribución de su principal vector, las garrapatas del género *Hyalomma*. En general, todos los nairovirus se transmiten por las familias de garrapatas *Ixodidae* y *Argasidae*, aunque sólo se conocen tres tipos de nairovirus que sean patógenos para el ser humano: el virus de la FHCC, el virus Dugbe y el virus de la enfermedad ovina de Nairobi (OIE, 2014).

En España nunca se habían dado casos. Sin embargo, en 2010 se aisló una cepa similar al 98% a las cepas registradas en Mauritania y Senegal en la garrapata *Hyalomma*. De modo que se sospecha de la entrada del virus procedente de estos países, aunque no se puede descartar la posibilidad de su preexistencia anteriormente (Sargianou *et al.*, 2014). El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad del Gobierno de España, en 2011 publicó un informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de este virus, ya que se observó su presencia en garrapatas en ciervos de la provincia de Cáceres. En 2016 se realizó la actualización del informe debido al primer caso humano en España (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2016).

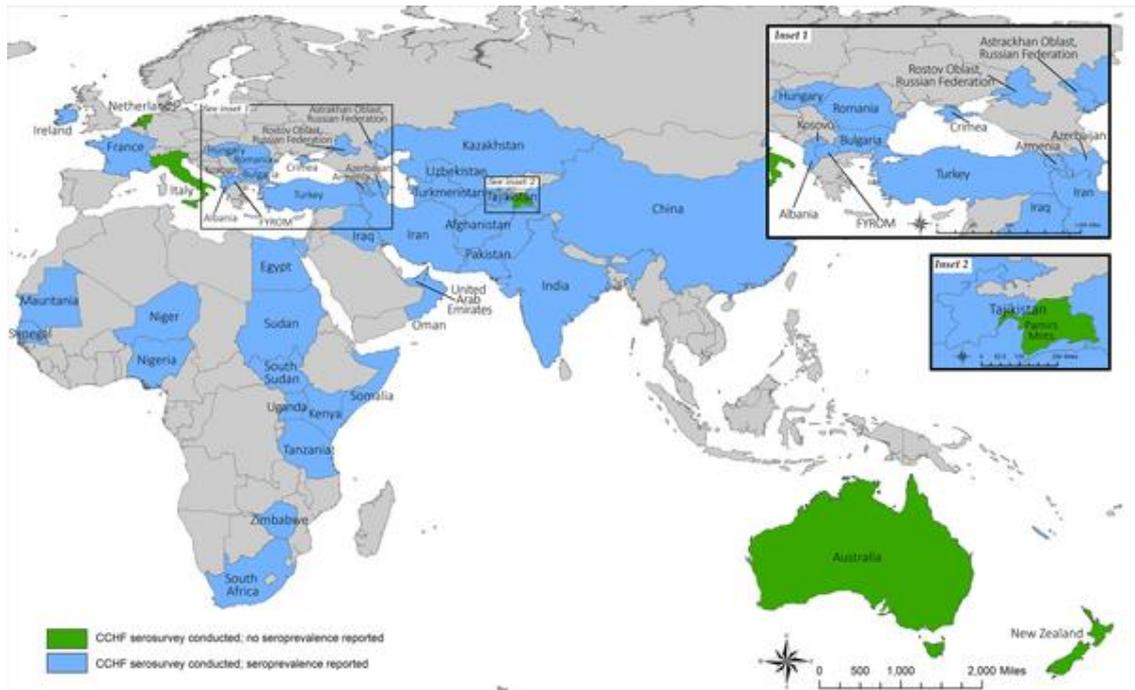


Figura 1. Mapa de la epidemiología de la fiebre hemorrágica del virus Crimea-Congo. En verde se indican los países donde no se ha presentado prevalencia seroepidemiológica, y en azul, aquellos países donde sí se ha presentado prevalencia seroepidemiológica del virus (Spengler *et al.*, 2016).

2. Objetivos de la revisión

El objetivo es la realización de una revisión bibliográfica sobre la fiebre hemorrágica causada por el virus de Crimea-Congo. Se ha elegido este tema ya que es la enfermedad transmitida por garrapatas con mayor distribución geográfica a nivel mundial. Aun así, España se considera fuera de rango de esta enfermedad, pero desde 2010 se ha detectado la presencia del virus Crimea-Congo en garrapatas en la provincia de Cáceres, Extremadura. El pasado mes de septiembre de 2016 se ha diagnosticado el primer caso humano, asociado al contacto con una garrapata en la provincia de Ávila.

En este proyecto se abordará los siguientes objetivos:

- La descripción del virus. Tanto su clasificación taxonómica, sus características, cuál o cuáles son los reservorios y las vías de transmisión del virus.
- Conocer la epidemiología de la fiebre hemorrágica causada por el virus de Crimea-Congo.

- Describir la patología de la enfermedad.
- Revisar la metodología que se utiliza para el diagnóstico microbiológico de este virus, así como las medidas de bioseguridad que se deben adoptar para la manipulación de las muestras clínicas sospechosas de contenerlo.
- Revisar los fármacos disponibles, su mecanismo de acción y sus resultados, así como los descubrimientos en cuanto a terapias disponibles, y los resultados obtenidos en animales de laboratorio.
- Conocer las medidas profilácticas y la vigilancia establecida para el control de la enfermedad.

3. Metodología

Para la realización de este artículo de revisión bibliográfica se ha consultado las siguientes bases de datos: PubMed y Web of Science. Además de la información disponible en organizaciones oficiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Center for Disease Control and Prevention (CDC) y World Organization for Animal Health (OIE), y en el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad del Gobierno de España. Para la búsqueda en español se ha usado como palabras claves: ‘Crimea’, ‘Congo’, ‘fiebre’, ‘hemorrágica’, ‘España’, ‘epidemiología’, ‘diagnóstico’; y para la búsqueda en inglés: ‘Crimean’, ‘Congo’, ‘fever’, ‘hemorrhagic’, ‘epidemiology’, ‘replication’, ‘structure’, ‘bunyavirus’, ‘diagnostic’.

4. Resultados y discusión

4.1. Estructura e información genética

El virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) pertenece al género *Nairovirus* de la familia *Bunyaviridae*. Según los estudios realizados mediante microscopía electrónica, los nairovirus son esféricos y con un tamaño aproximadamente de 90-100 nm, y presentan proyecciones en la superficie semejantes a puntas (Zivcec *et al.*, 2016).

El genoma de los nairovirus está compuesto por una cadena de ARN con polaridad negativa. El ARN monocatenario consta de tres segmentos (Figura 2). Estos tres segmentos son: pequeño (S), mediano (M) y grande (L). El segmento S codifica la proteína de la nucleocápside (N). El segmento M codifica las glicoproteínas víricas G_n y G_c que protegen la superficie del virus y facilitan la unión del virus a la célula hospedadora. Así mismo, el segmento L codifica el ARN-polimerasa dependiente de ARN necesaria para la replicación viral y en consecuencia, para la síntesis de ARN mensajero (Carter *et al.*, 2012). Al igual que otros virus con cadena ARN de sentido negativo, el material genético se encuentra envuelto por la proteína N formando complejos ribonucleoproteicos (cRNP). Este hecho es importante para la replicación del virus y la envoltura del genoma de los viriones (Wang *et al.*, 2012).

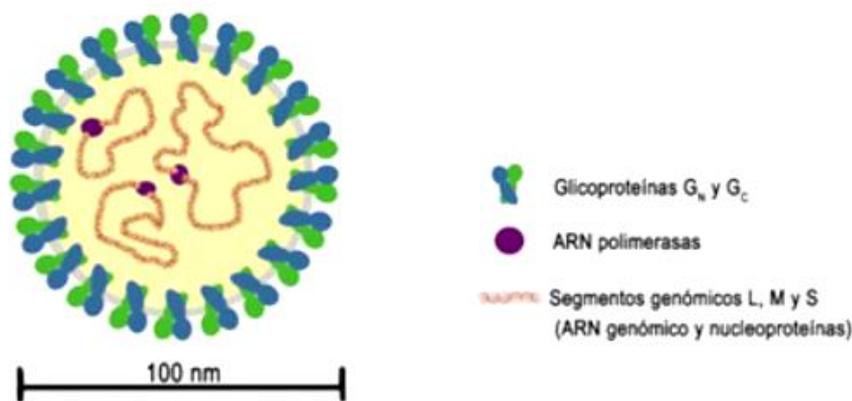


Figura 2. Estructura del virus Crimea-Congo (Oteo, 2016). El ARN de cadena negativa se encuentra repartido en tres segmentos y empaquetado con la proteína N formando la nucleocápside. En cada fragmento hay una proteína L, ANR-polimerasa dependiente de ARN que sintetiza la cadena de ARN positiva que constituye el ARNm. Las licoproteínas G_n y G_c se encuentran en la envoltura y están implicadas en la adhesión y reconocimiento de la célula hospedadora, así como en la internalización del virus, pudiendo constituir dianas de vacunas.

Al compararse la información disponible sobre la interacción celular específica entre la proteína N y la célula hospedadora, es menor la que se tiene sobre los nairovirus respecto al resto de géneros de la familia de los bunyavirus. Se han identificado dos proteínas celulares del hospedador que interactúan en el ciclo de replicación del virus, la

actina y la guanosina trifosfatasa (GTPasa) MxA, aunque las consecuencias funcionales no se encuentran dilucidadas al completo (Surtees *et al.*, 2016).

Se conoce que la unión entre la célula hospedadora y nairovirus está mediada por las glucoproteínas de superficie, Gn y Gc, pero los detalles de la implicación en la fijación, internalización y fusión aún no se han esclarecido completamente. A pesar de ello, se sospecha que Gc es el causante de la unión a los receptores celulares, debido a que los anticuerpos monoclonales anti-Gc neutralizan la infección en células de mamíferos (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2005), con lo que, como se verá en el último apartado de este trabajo, podrían constituir una diana adecuada para el desarrollo de vacunas. En cuanto a la fusión, existe una similitud significativa con el virus de la fiebre del Valle del Rift (género *Phlebovirus* que pertenece a la familia *Bunyaviridae*), de modo que se cree que el Gc también participa en la fusión (Dessau *et al.*, 2013). A pesar de que los receptores celulares aún no han sido identificados (Xiao *et al.*, 2011), se ha sugerido una interacción funcional entre la glucoproteína Gc del virus y la fosfoproteína nucleolina de superficie celular, ya que favorece la entrada de otros virus como del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus sincitial respiratorio entre otros (Tayyari *et al.*, 2011; Thongtan *et al.*, 2012; Tajrishi *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2004).

Tal como se observa en la Figura 3, tras unirse a la superficie de la célula hospedadora, entra en la célula por endocitosis mediada por clatrina. Se transporta a los endosomas y luego a los cuerpos multivesiculares (MVB) en un proceso dependiente de Rab5 (Garrison *et al.*, 2013; Shtanko *et al.*, 2014). Si se interfiere con la formación de MVB funcionales disminuyen los niveles de infección por CCHFV, por ejemplo, mediante el agotamiento de los componentes de los complejos endosomales requeridos para el transporte, lo que lleva a pensar que el orgánulo principal de envoltura para la fusión con la membrana de la célula hospedadora son los MVB. A continuación, los segmentos víricos son desenvueltos y transcritos por la proteína L (ARN-polimerasa dependiente de ARN) en el ARNm viral, y posteriormente se importan caperuzas de guanina, también llamadas caps, desde la célula hospedadora al extremo 5' de los ARN recién transcritos para que puedan ser traducidos en sus ribosomas. Los ARNm se traducen en proteínas Np y L por los ribosomas citoplasmáticos, mientras que el precursor de las glucoproteínas es traducido por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico. Para la replicación del ARN genómico se utiliza un fragmento de la proteína Np y L recién sintetizadas, formándose el cRNP que contiene un antígeno. El precursor de

glicoproteínas se somete a procesamiento y maduración en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, dando lugar a las glicoproteínas Gn y Gc. Tras la acumulación de las glicoproteínas y de cRNP genómicos se piensa que se producen nuevas partículas de CCHFV en el aparato de Golgi, seguido por la liberación del virión en las vesículas de Golgi (Zivcec *et al.*, 2016).

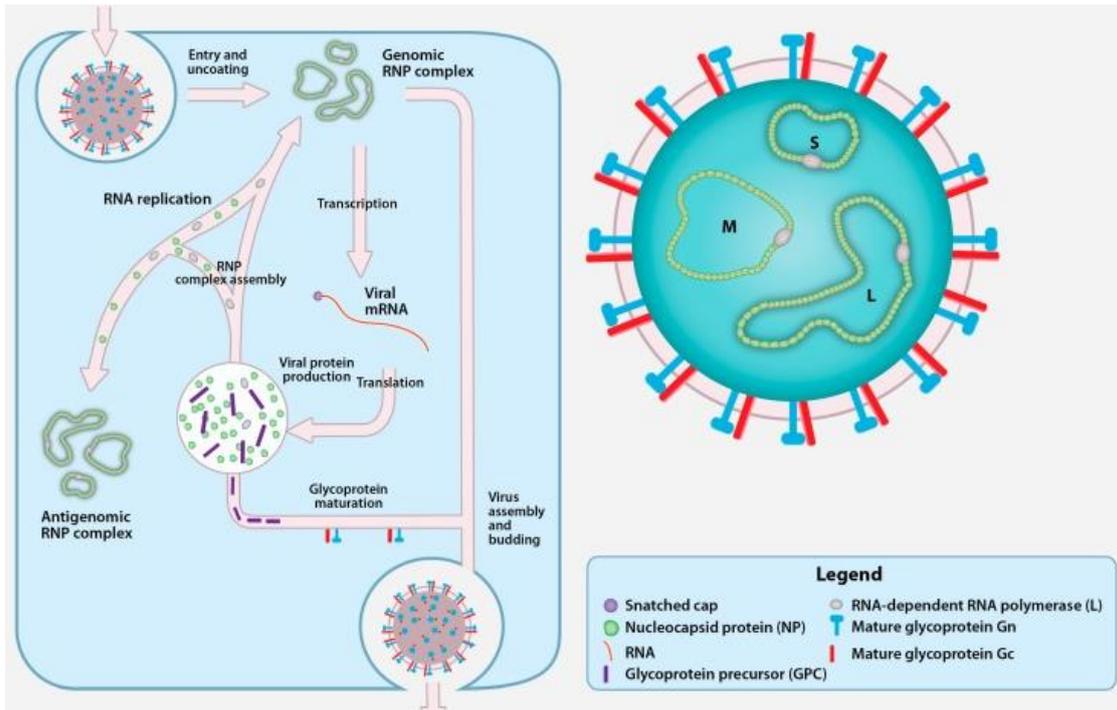


Figura 3. Virión y ciclo de replicación del virus de la Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo (Abreviaturas: NP: proteína de la nucleocápside; RNA: ácido ribonucleico de sentido negativo; RNP: ribonucleoproteína; mRNA: ácido ribonucleico mensajero; S: segmento pequeño de ARN; M: segmento mediano de ARN; L: segmento grande de ARN; GPC: precursor de glicoproteínas) (Zivcec *et al.*, 2016).

4.2. Epidemiología

La FHCC es endémica en muchas regiones, como Asia, Europa, África y Oriente Medio (Tabla 1). La distribución geográfica tiene el rango más amplio de las enfermedades virales transmitidas por garrapatas, que además coincide con la distribución geográfica de las garrapatas del género *Hyalomma* (Al-Abri *et al.*, 2017). Mientras que en Europa

el principal vector es *Hyalomma marginatum*, en Asia es más frecuentemente transmitida por garrapatas de la especie *H. asiaticum* (Figura 4).

Tabla 1. Países en los cuales se ha informado de la presencia del virus en garrapatas y/o de la enfermedad (Elaborado a partir de Al-Abri *et al.*, 2017).

Continente	Países	Vector principal
Asia	China Kazajistán Tajikistán Uzbekistán Afganistán Pakistán India	<i>Hyalomma asiaticum</i>
Europa	Rusia Bulgaria Kosovo Turquía Grecia España	<i>Hyalomma marginatum</i>
África	República Democrática del Congo Uganda Mauritania Nigeria Sudan Senegal Sudáfrica	Distintos vectores
Oriente medio	Iraq Irán Kuwait Arabia Saudí Omán Emiratos Árabes Unidos	Distintos vectores



Figura 4. Garrapatas del género *Hyalomma*. A la izquierda se encuentra la garrapata de la especie *H. marginatum* y a la derecha *H. asiaticum*, predominantes en Europa y Asia respectivamente (ECDC, 2017; Hosseini, 2010)

En la Figura 5 se muestra la distribución geográfica de la especie *H. marginatum* en Europa, de modo que esas zonas expuestas al vector tienen mayor riesgo y probabilidad de transmisión de la enfermedad (ECDC, 2017). Los factores climáticos también ejercen un papel influyente en la vida de las garrapatas y en consecuencia de la incidencia de la enfermedad, pues en las estaciones en las cuales se reproducen más aumenta la cantidad de éstas y por tanto la probabilidad de infección del virus (Al-Abri *et al.*, 2017).

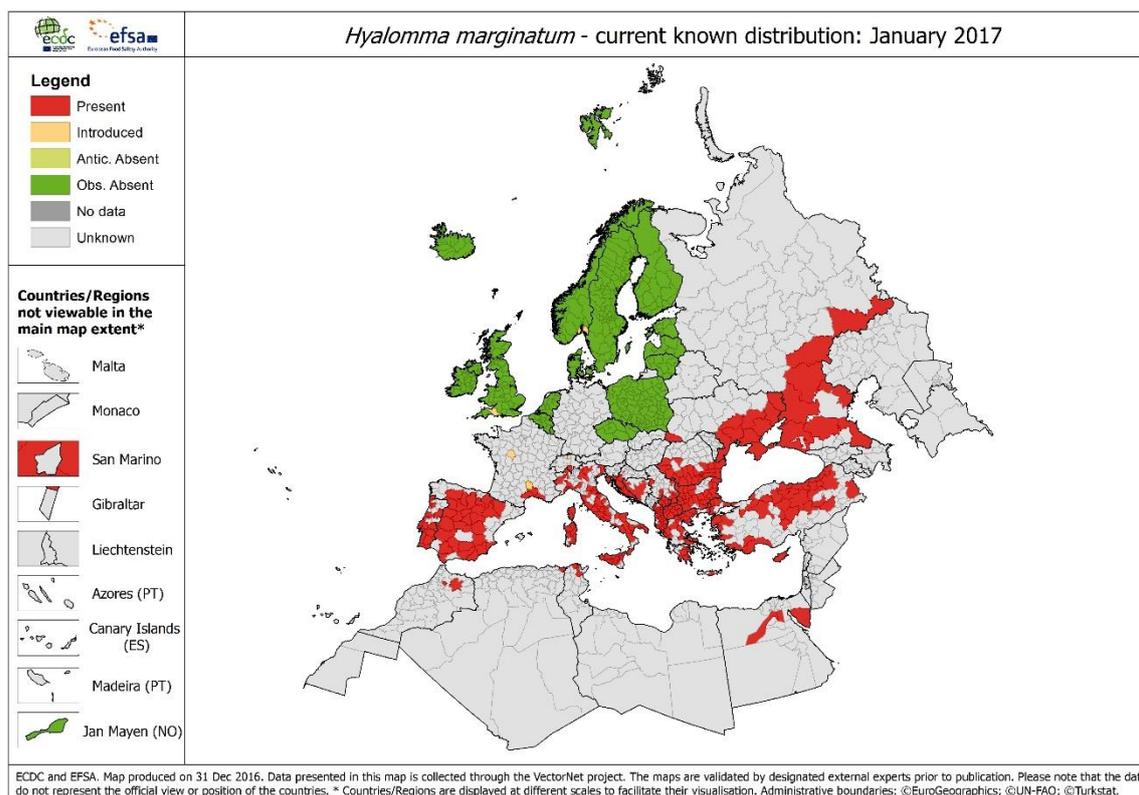


Figura 5. Mapa de la presencia del vector *Hyalomma marginatum* en Europa. En rojo se destaca aquellas zonas donde existe esta especie de garrapata, y en verde donde no existe. En Europa, esta especie se concentra en el Sur y en el Este, principalmente en la zona mediterránea, hasta llegar a Turquía y el sur de Rusia (ECDC, 2017).

La enfermedad de la FHCC se da con mayor frecuencia en animales y personas relacionadas con el sector agrario, como los productores y trabajadores agrícolas. Además de veterinarios que traten con animales posiblemente infectados mediante las garrapatas, trabajadores de laboratorios y personal hospitalario. También forma parte de población de riesgo aquella que practica actividades al aire libre rurales (Center for Food Security & Public Health, 2010). En la Figura 6 se muestra el ciclo del virus tanto en el vector, como en animales y personas, señalando las posibles vías de infección (CDC, 2014).

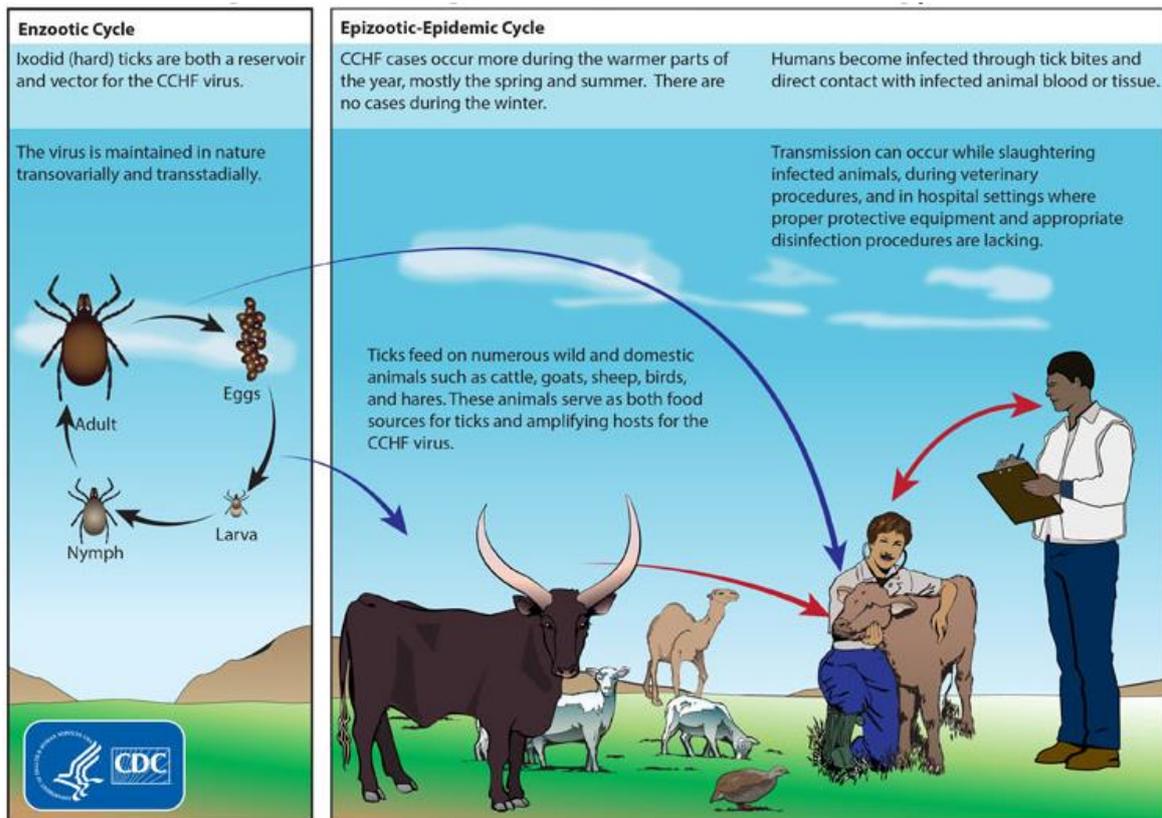


Figura 6. Ciclo de vida del virus de FHCC. En la imagen de la izquierda se observa la parte del ciclo endozoótico, que se da en las garrapatas que actúan como reservorios y vectores del virus de FHCC. Por otro lado, en la imagen de la derecha se describe el ciclo epizoótico-epidémico, en el que se representa cómo son infectados los animales salvajes y domésticos, y las personas. Las larvas de garrapata se alimentan de estos animales ampliando los reservorios u hospedadores del virus. Sin embargo, el hombre puede infectarse a través de dos vías, o bien mediante la picadura de la garrapata adulta que contiene el virus, o bien por contacto con fluidos de animales infectados (CDC, 2014).

La tasa de mortalidad promedio es del 40 % (OMS, 2013) y el índice de mortalidad es más alto en infecciones nosocomiales (asociadas a la manipulación de las muestras clínicas) que aquellas producidas tras la picadura de garrapata, posiblemente debido a la concentración del virus es mayor en los enfermos hospitalizados que en el vector. El factor geográfico puede influir en el índice de mortalidad, pues se han notificado altos índices de mortalidad en los Emiratos Árabes Unidos con un 73% en ciertos brotes y un 80% en China. Además, influye la economía y disponibilidad sanitaria de tratamientos de sostén en los hospitales. En los países con menos accesibilidad a éstos, el índice de mortalidad será mayor (Center for Food Security & Public Health, 2009).

En la Figura 7 se muestran los países con mayor área de alto riesgo. Se observa mayor probabilidad en los países del sureste de Europa junto con Asia central y Oriente medio, y África subsahariana y del Sur. Además, se aprecia la similitud entre las zonas de mayor probabilidad de riesgo y las de mayor incidencia de la enfermedad mostrada en la Figura 8 (Messina et al., 2015).

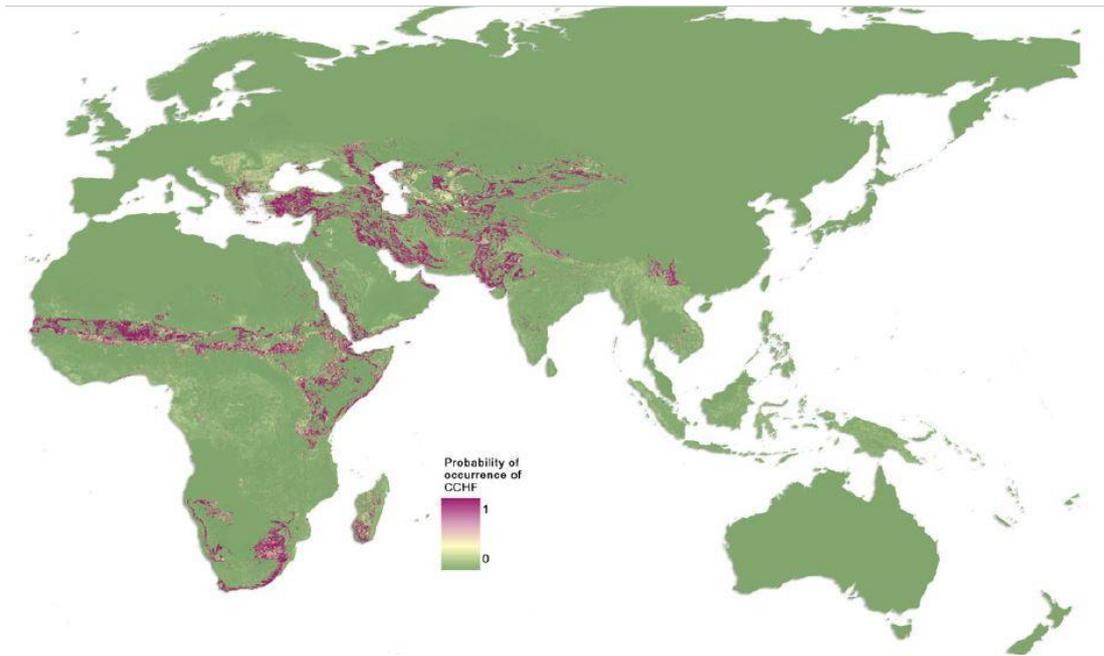


Figura 7. Mapa de la probabilidad de ocurrencia de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo. La probabilidad es una variable estadística teórica que se calcula teniendo en cuenta la presencia del vector, climatología, presencia de ganado, densidad de población, etc. El área en color verde indica las zonas donde se va a dar menor probabilidad de aparición de la enfermedad. Por el contrario, las zonas en morado son aquellas con mayor probabilidad de infección (Modificado de Messina *et al.*, 2015).

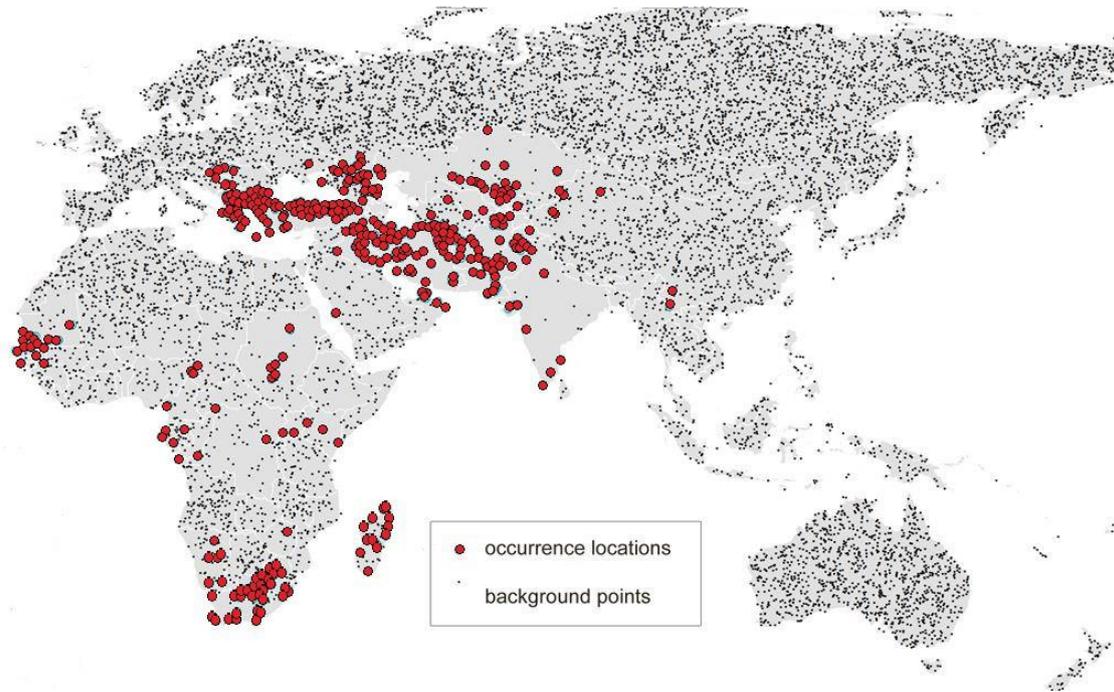


Figura 8. Mapa de incidencia registrada de la fiebre hemorrágica del virus Crimea-Congo. A diferencia de la Figura anterior, ésta muestra los casos reales registrados. (Modificado de Messina et al, 2015).

España se trata de un país con potencial riesgo debido a su ubicación geográfica, debido a su cercanía a África, lugar de tránsito de aves migratorias, la presencia del vector con una amplia distribución por el país y el clima, similar al de las zonas endémicas. En septiembre de 2016, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad del Gobierno de España realizó un informe de situación y evaluación de riesgo de FHCC en España, ya que en 2010 se detectó la presencia del virus en garrapatas de la provincia de Cáceres. Sin embargo, no fue hasta septiembre de 2016 que se diagnosticó el primer caso humano, asociado al contacto con una garrapata en la provincia de Ávila, a más de 200 kilómetros del único foco detectado. El 1 de septiembre de 2016 el Centro Nacional de Microbiología confirmó el virus de Crimea-Congo en dos casos humanos detectados en la Comunidad de Madrid. Primero se dio el caso de un hombre de 62 años, sin haber viajado fuera de España, comenzó con síntomas a mediados de agosto 2016, informó de haber estado en el campo en un municipio de Ávila y que encontró en su piel una garrapata; 9 días más tarde de la aparición de los síntomas, falleció. El segundo caso se dio en una trabajadora sanitaria que atendió al hombre infectado durante su estancia en

UCI, desarrolló síntomas varios días después, sin embargo, en este caso hubo recuperación (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2016).

En conclusión, se considera que la probabilidad de infección en España es baja, aunque no se descarta la posibilidad de que se dé algún caso autóctono más. Debido a ello, se consideró oportuno realizar una revisión de la situación epidemiológica de la FHCC y una actualización de la evaluación del riesgo para España (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2016).

4.3. Patología de la fiebre hemorrágica por el virus Crimea-Congo

La FHCC tiene un periodo de incubación que varía según la vía de transmisión. Si el contagio se ha producido mediante la picadura de una garrapata, este periodo oscila entre uno y tres días, como máximo nueve días. Sin embargo, si el contagio se ha producido por contacto con sangre o tejidos infectados es de cinco o seis días, con un máximo de 13 días (OMS, 2013).

La sintomatología de esta enfermedad puede dividirse en dos fases: fase prehemorrágica y fase hemorrágica. Tras el periodo de incubación comienza la fase prehemorrágica, los primeros síntomas aparecen súbitamente en forma de fiebre alta, mareo, mialgia, dolor del cuello, cefalea, fotofobia. Además, pueden presentarse síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea no sanguinolenta y dolor abdominal. También se han descrito casos de cambios bruscos de humor y confusión (OMS, 2013; Center for Food Security & Public Health, 2010).

Varios días después, comienza la fase hemorrágica repentinamente, y ésta dura dos o tres días. El primer síntoma es una erupción petequial, a la cual se le suma equimosis y grandes superficies de la piel y mucosas cubiertas de hematomas. Además de hematemesis, melena, epistaxis, hemoptisis, hematuria y hemorragias. En algunos pacientes se produce hepatitis dando lugar a ictericia y hepatoesplenomegalia. Durante el padecimiento de la enfermedad, se han observado otros síntomas como sudoración, sequedad de boca, disnea, pérdida de memoria, polineuritis y dificultad visual (OMS, 2013; Center for Food Security & Public Health, 2010).

Tiene una tasa de mortalidad de hasta el 40% y la muerte suele darse durante la segunda semana de padecimiento de la enfermedad. Por otro lado, los pacientes que se

recuperan, se produce la mejoría aproximadamente al décimo día. En general, la recuperación es completa pero lenta, con posibilidad de duración de un año (OMS, 2013; Center for Food Security & Public Health, 2010; El País, 2016; El Español, 2016).

4.4. Nivel de bioseguridad de FHCC

El virus de Crimea-Congo pertenece al grupo 4 de riesgo biológico (Surtees *et al.*, 2016), es decir, aquellos que causan infecciones graves o muy graves, frente a las cuales no existe tratamiento eficaz actualmente, además de presentar un alto riesgo de difusión (OMS, 2005). El aislamiento de este tipo de microorganismos ha de llevarse a cabo en laboratorios de contención máxima (BSL-4), aunque también podría realizarse en un BSL-3 adaptado (Center for Food Security & Public Health, 2010). En la mayoría de países endémicos se han realizado las pruebas diagnósticas por necesidad con un nivel de bioseguridad bajo, BSL-2 o BSL-3, de forma segura, de modo que cabría la posibilidad de revisión del nivel de bioseguridad para un BSL-2 con condiciones mejoradas con un equipo de laboratorio adecuado y equipo de protección del personal según los protocolos estándar de los países afectados (Weidmann *et al.*, 2016). En África del Sur durante un brote en el hospital, un 33% del personal con lesiones por pinchazos con agujas se infectaron por el virus, y el 9% de los que estuvieron en contacto con sangre infectada también enfermaron (Center for Food Security & Public Health, 2010).

4.4.1. Laboratorio de contención máxima

Los microorganismos de grupo de riesgo 4, como se ha dicho anteriormente, deben manipularse en un BSL-4, o como mínimo en BSL-3. Los BSL-4 incluyen la bioseguridad de los BSL-1, BSL-2 y BSL-3, con ciertas modificaciones que se indican en la Figura 8. Los BSL-1 y -2 son los laboratorios con medidas básicas de seguridad: buena técnica en el laboratorio, acceso limitado, símbolo de riesgo biológico en los aparatos, trabajar en cabinas, presión negativa en el área de trabajo y eliminación correcta de residuos entre otros. Así pues, los BSL-3 incluirán los requisitos anteriores más (OMS, 2005):

- El símbolo de riesgo biológico estará visiblemente en las puertas de acceso al laboratorio, además de en los aparatos.
- Vestimenta protectora adecuada: batas sin abertura delantera, trajes de dos piezas de tipo pijama, monos, gorros y protección para el calzado, mascarilla y gafas.
- El diseño del laboratorio debe incluir presión negativa en todo el laboratorio y salida del aire por filtros HEPA. Las ventanas deben estar cerradas herméticamente y de un material resistente a roturas.
- Se trabaja en cabinas CSB 2 o CSB 3.
- Dentro de la sala debe haber autoclave para la esterilización de los residuos antes de eliminarlo.
- El acceso al laboratorio está restringido al personal de laboratorio. Además, el personal estará sometido a reconocimiento médico obligatorio.

Por su parte, los laboratorios de máxima seguridad, BSL4, deben cumplir, además de todo lo expuesto anteriormente, las normas que se indican en la Figura 9.

- Debe haber dos trabajadores a la vez en el laboratorio, especialmente si llevan trajes especiales.
- Es obligatorio el cambio completo de la vestimenta al entrar y salir del laboratorio. Al entrar el personal se cambiará de ropa completamente, y al salir se duchará antes de ponerse la ropa de calle.
- Debe establecerse un método de comunicación entre el personal de dentro y fuera del laboratorio.
- Trabajo en cabinas CSB 3 y/o con trajes especiales.
- El aire de entrada y salida del laboratorio es filtrado por filtros HEPA.
 - En CSB 3, el aire de salida pasará por dos filtros HEPA, la cámara debe funcionar siempre a presión negativa y requiere un sistema de ventilación propio que no haga recircular el aire para el laboratorio.
 - En los laboratorios que se utilicen los trajes especiales, la sala deberá estar en presión negativa, además de tener sistema de ventilación exclusivo y que el aire de entrada y salida pase por doble filtro HEPA.
- Esterilización del material y desechos en autoclave de doble puerta.
- Deben existir líneas de suministro eléctrico exclusivas y de emergencia.

Figura 9. Características y requisitos de los laboratorios de contención máxima, BSL-4 (Elaborado a partir de OMS, 2005).

En el caso de que los laboratorios no dispongan del nivel de contención adecuado, se deben enviar las muestras a un laboratorio de referencia. En España, el laboratorio de referencia es el Instituto de Salud Carlos III, el cual ha publicado un protocolo de vigilancia para la FHCC donde se indica cómo se debe actuar. Las muestras deben enviarse según el procedimiento de muestras biológicas como se muestra en la Figura 10, dentro de un recipiente impermeable y éste a su vez dentro de doble embalaje impermeable para evitar contaminación tanto de la muestra como del medio externo. Finalmente, dentro de un embalaje externo que indique el nombre, dirección y número de teléfono del remitente y la etiqueta con el signo de Riesgo Biológico (ISCIII, 2017).

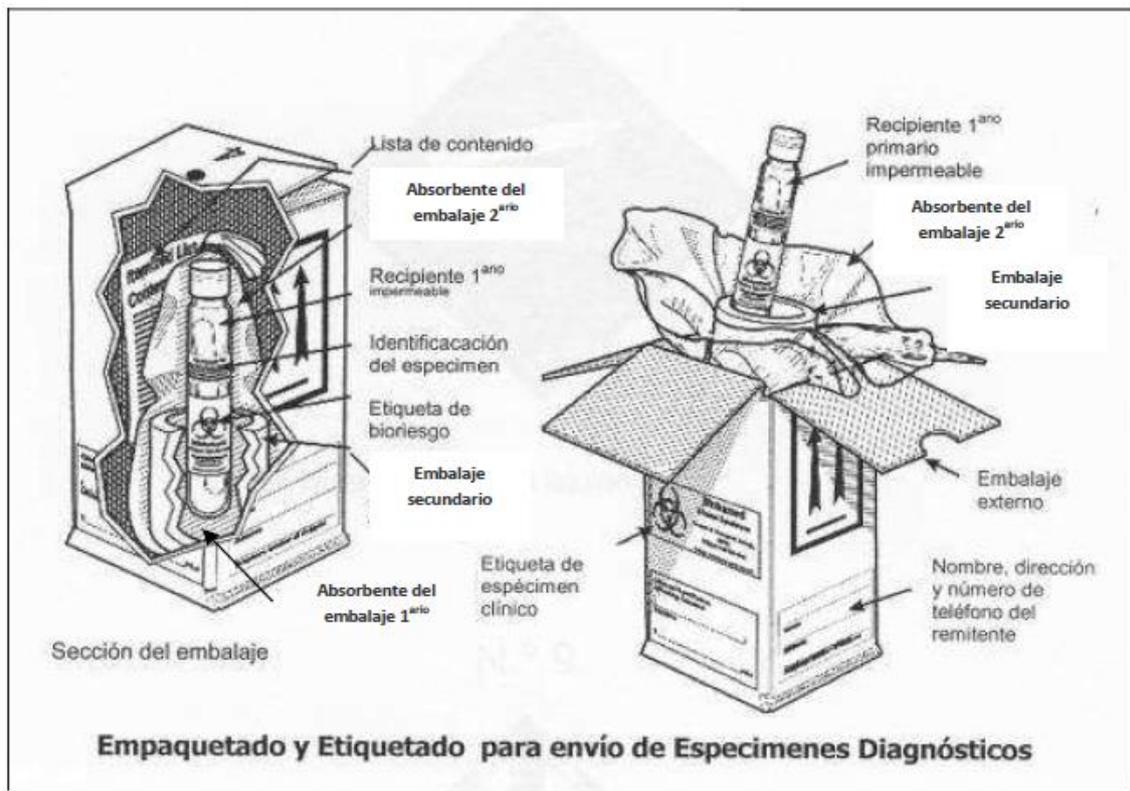


Figura 10. Empaquetado y etiquetado para el envío de Especímenes Diagnósticos (ISCIII, 2016).

4.4.2. Manejo post-mortem

Según el protocolo de vigilancia para la FHCC, en caso de sospecha de que algún enfermo ha fallecido por dicha enfermedad no se realizará autopsia debido a la elevada carga viral. Si fuera necesario realizarla, debe extremarse las medidas de precaución, además sólo estará accesible el contacto al personal formado y entrenado. No se pueden realizar procedimientos de preparación del difunto. El cadáver se considera del grupo 1 (ISCIII, 2016), es decir, aquellas personas cuya etiología de su defunción sea un peligro sanitario, como los microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo biológico 4, y aquellos contaminados por productos radiactivos (BOE, 1974).

4.5. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se puede realizar a partir de muestras de sangre, de plasma y/o de tejido. El aislamiento del virus ha de llevarse a cabo en un laboratorio BSL-4, como se mencionó en el apartado anterior; y para ello, se inoculan en cultivos celulares, como Vero, BHK-21, SW-13, con el defecto de que sólo detectan altas concentraciones del virus, siendo más eficaz en los primeros 5 días de la infección. También se utiliza la inoculación en ratones recién nacidos, siendo esta técnica más sensible y capaz de detectar el virus durante más tiempo (Center for Food Security and Public Health, 2010). Como se ha comentado previamente, estas técnicas que suponen la infección de células o de animales vivos requieren que el virus esté activo, por lo que deben realizarse en las condiciones de máxima seguridad y en laboratorios del máximo nivel de contención.

Por consiguiente, las técnicas más empleadas para la identificación del virus son, principalmente, RT-PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) como se muestra en la Figura 11. En este caso, se trabaja con virus inactivados, bien por rayos gamma, por tratamiento con virucidas, por formaldehído o por calor, con lo cual se pueden manejar estas muestras en laboratorios de nivel de contención inferior (OMS, 2013). Mediante IFI y ELISA se detecta un IgM específico frente a la proteína de la nucleocápside N del virus, cuando la infección es reciente, o un incremento de IgG, junto la presencia de IgM, indicativo del padecimiento de la enfermedad desde una semana aproximadamente (Samudzi *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2016; Center for Food Security & Public Health, 2010).

Mediante RT-PCR se amplifican los fragmentos S, M y L (Yadav *et al.*, 2016). Se trata de una técnica altamente sensible, sin embargo, se encuentra con algunos inconvenientes. Debido a la variabilidad genética entre distintas cepas se complica la detección de todas las variantes del virus; y otro problema es el tiempo en estar disponible los resultados, pues tardan entre 3 y 5 días. Es importante que haya una detección del virus temprana, dado que la muerte puede producirse en unos días, y por ello, existe la necesidad de desarrollar un Test rápido de diagnóstico (RDT) o una técnica de detección de ácidos nucleicos (NAT) del virus (Al-Abri *et al.*, 2017).

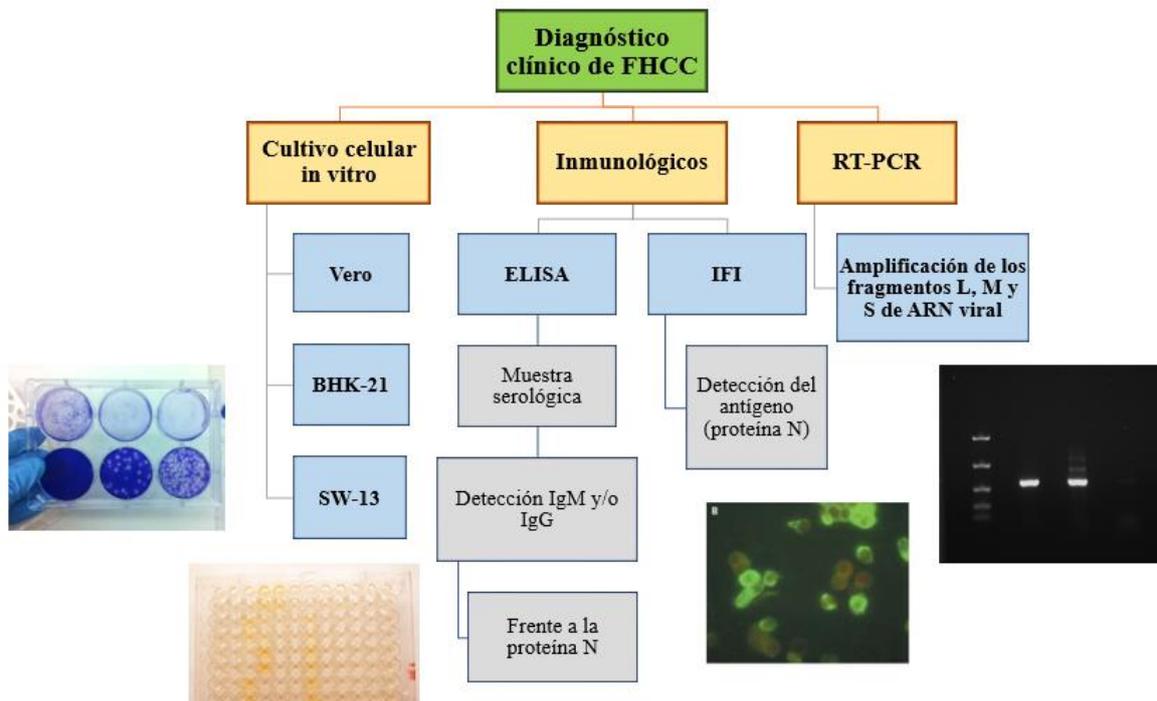


Figura 11. Esquema del diagnóstico clínico de la Fiebre Hemorrágica del virus Crimea-Congo.

4.6. Tratamiento y profilaxis

Según el CDC el tratamiento de FHC es principalmente de apoyo. Atendiendo cuidadosamente al equilibrio hidroelectrolítico, oxigenación adecuada y el apoyo hemodinámico, además del tratamiento específico para infecciones secundarias concomitantes (CDC, 2014). La ribavirina es sensible *in vitro*, sin embargo, la ribavirina no tiene un papel importante como tratamiento de la enfermedad, puesto que no se dio una respuesta significativa en los pacientes tratados respecto a pacientes no tratados con este antiviral (Kalin *et al.*, 2013).

Ya que no existe tratamiento específico para combatir la enfermedad, hay que mostrar especial atención y cuidado a las medidas profilácticas. La prevención debe realizarse cuidadosamente, y especialmente aquellas personas de mayor riesgo, como lo son los ganaderos y veterinarios. El CDC recomienda dentro de las medidas profilácticas: (CDC, 2014):

- Evitar zonas que abunden garrapatas y el periodo en el que abundan más.

- El uso de repelentes de insectos sobre la piel y sobre la ropa. El repelente de N,N-dietil-m-toluamida (DEET) es el más eficaz frente a las garrapatas, por lo tanto, sería el de elección.
- El uso de guantes y otras prendas de protección, como gorro, mascarilla, ... para evitar el contagio a través de la sangre y los fluidos de los animales. Mejor si son de color claro para ver el contraste de la garrapata.
- Evitar contacto con fluidos corporales y sangre del ganado u otros seres humanos que muestren síntomas. Lavarse las manos en cuanto sea posible, tras estar tratando con animales o personas enfermas.
- Y administrar vacuna preventiva a los animales. Se trata de una vacuna inactivada derivada del cerebro de ratón contra FHCC, se está usando en Europa del Este. Sin embargo, no hay vacuna segura y efectiva disponible para uso humano.

4.7. Desarrollo de vacunas

Actualmente no existe ninguna vacuna comercializada específica frente al virus de la FHCC. Sin embargo, en la ex Unión Soviética y Bulgaria se ha desarrollado una vacuna preventiva para animales que sólo se ha usado allí (Center for Food Security & Public Health, 2010). Aunque hay estudios de vacunas en vía de desarrollo. En 2015 se realizó un estudio de una vacuna usando como vector un poxvirus atenuado y usando como antígeno la nucleoproteína del virus Crimea-Congo. A pesar de que hubo respuesta inmunológica en los animales experimentados, la vacuna no es eficaz frente a la letalidad de la enfermedad (Dowall *et al.*, 2016). Más tarde se ha desarrollado otra vacuna que ha demostrado una clara inmunidad preventiva y un 100% de eficacia contra la letalidad de la FHCC. Se trata de una vacuna de ADN que codifica ubiquitina unida a una versión de las proteínas Gc, Gn y N de CCHFV (Hinkula *et al.*, 2017).

4.8. Perspectivas de futuro

Con finalidad de mejorar la detección temprana para una respuesta rápida a los casos de la enfermedad, a continuación, se indica algunas medidas a conseguir (Al-Abri et al., 2017):

- Desarrollo de ensayos rápidos, precisos, de fácil manejo y accesibilidad para la cuantificación del ARN del virus de FHCC.
- Desarrollo de un algoritmo que ayude a establecer rápidamente un diagnóstico clínico presuntivo y/o inicial sobre las manifestaciones clínicas, epidemiológicas, ocupacionales y demográficas. Las manifestaciones clínicas de FHCC al principio son muy similares a otras fiebres hemorrágicas, por tanto, este algoritmo permitiría diferenciarla de otras.
- Actualización de estudios seroepidemiológicos tanto en humanos como en animales, incluso en países no endémicos.
- Estudios para el desarrollo de vacunas para animales y/o contra las garrapatas del género *Hyalomma*. Supondría un gran avance y medida de prevención frente la enfermedad.

5. Conclusiones

1- La FHCC es una enfermedad ampliamente distribuida con un alto índice de morbilidad-mortalidad en las zonas endémicas.

2- El virus de Crimea-Congo, agente etiológico de esta enfermedad, se transmite por garrapatas *Hyalomma* preferentemente a animales, aunque también a personas. Estas garrapatas al existir en una gran extensión en el mundo, aumentan las probabilidades de infección en otras zonas que no son endémicas, como España.

3- No existe tratamiento específico frente al virus, sino tratamiento de sostén. Por ello es importante la prevención en las zonas endémicas y no endémicas frente a las garrapatas, aportando protección a los animales y a las personas.

4- Se encuentra en estudio la búsqueda de posibles fármacos y vacunas que consigan disminuir la letalidad de la enfermedad.

6. Bibliografía

1. Al-Abri S. S., Al Abaidani I., Fazlalipour M., et al. Current status of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region: issues, challenges, and future directions. *International Journal of Infectious Diseases*, 2017. 58, 82–89.
2. Appannanavar S. B. y Mishra B. An Update on Crimean Congo Hemorrhagic Fever. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2011. 3 (3), 285-292.
3. Bertolotti-Ciarlet A., Smith J., Strecker K., *et al.* Cellular localization and antigenic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Journal of Virology*, 2005. 79(10), 6152-6161.
4. BOE Boletín Oficial del Estado. Decreto 2263/1974, 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Policía Sanitaria Mortuoria. Sección I- Disposiciones generales. Artículo 8- Clasificación Sanitaria de los Cadáveres según las causas de defunción.
5. Carter S. D., Surtees R., Walter C. T., *et al.* Structure, Function and Evolution of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein. *Journal of Virology*, 2012. 86(29), 10914-10923.
6. Center for Disease Control and Prevention. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF). 2014. Consultado por última vez el 14/04/2017. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vhf/crimean-congo/resources/virus-ecology.html>
7. Center for Food Security & Public Health and Institute for International Cooperation in Animal Biologics, of Iowa State University, College of Veterinary Medicine, 2009. Fiebre Hemorrágica del virus Crimea-Congo. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/crimean_congo_hemorrhagic_fever-es.pdf
8. Dessau M. y Modis Y. Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2013. 110(5), 1696-1701.
9. Dowall S. D., Buttigieg K. R., Findlay-Wilson S. J. D., *et al.* A Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viral vaccine expressing nucleoprotein is immunogenic but fails to confer protection against lethal disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016. 12(2), 519—527.
10. Europe Center for Disease Control and Prevention. Ticks maps. 2017. Consultado por última vez el 13/05/2017. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET-maps-tick-species.aspx>

11. Garrison A. R., Radoshitzky S. R., Kota, K. P., *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin- and early endosome-dependent entry pathway. *Virology*, 2013. 444(1-2), 45-54.
12. Hinkula J., Devignot S., Åkerström S., *et al.* Immunization with DNA Plasmids Coding for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Capsid and Envelope Proteins and/or Virus-Like Particles Induces Protection and Survival in Challenged Mice. *Journal of Virology*, 2017. 91(10), e02076-16.
13. Hosseini A. Imagen de *Hyalomma asiaticum*. 2010. Consultado por última vez 07/06/2017. Disponible en: <https://archive.org/details/HyalommaAsiaticum>
14. ISCIII. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Alertas de Salud Pública. Protocolo de Vigilancia de la Fiebre Hemorrágica por virus Crimea-Congo. Instituto de Salud Carlos III, 2016. Consultado por última vez el 07/06/2017. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/pdf_2016/Protocolo_vigilancia_FHCC_2016.pdf
15. Kalin G., Metan G., Demiraslan H., *et al.* Do we really need ribavirin in the treatment of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever? *Journal of Chemotherapy*, 2014. 26(3), 146-149.
16. Messina J. P., Pigott D. M., Golding N., *et al.* The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015; 109 (8), 503-513.
17. Organización Internacional para la Salud Animal (OIE) Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2014. Manual Terrestre de la OIE, 2014. Capítulo 2.1.5.
18. Organización Mundial de la Salud (OMS). Fiebre Hemorrágica del virus Crimea-Congo. Centro de prensa de la OMS, 2013. Nota descriptiva N°208. Consultado por última vez el 07/06/2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/es/>
19. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª Edición. Realizado por un grupo de científicos de la OMS; Ginebra; 2005. ISBN 92 4 354650 3
20. Oteo JA. Conocimientos básicos sobre la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, 2016. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2016-conocimientos_basicos_fiebre_hemorragica_Crimea-Congo.pdf
21. Samudzi R. R., Leman P. A., Paweska J. T., *et al.* Bacterial expression of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus nucleoprotein and its evaluation as a

- diagnostic reagent in an indirect ELISA. *Journal of Virology Methods*, 2012. 179(1), 70-76.
22. Sargianou M y Papa A. Epidemiological and behavioral factors associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in humans. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2013. 11(9), 897-908.
 23. Schuster I., Mertens M., Köllner B., *et al.* A competitive ELISA for species-independent detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus specific antibodies. *Antiviral Research*, 2016. 134, 161–166.
 24. Shtanko O., Nikitina R. A., Altuntas C. Z., *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry into host cells occurs through the multivesicular body and requires ESCRT regulators. *PLoS Pathogens.*, 2014. 10, e1004390.
 25. Spengler J., Bergeron E. y Rollin P. Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Domestic and Wild Animals. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2016. 10(1), e0004210.
 26. Suárez A., Romero L. J., Estrada-Peña A., *et al.* Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad de España. Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) en España, 2016. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/Crimea_Congo/docs/Informe_situacion_evaluacion_CrimeaCongo_sep2016.pdf
 27. Surtees R., Dowall S. D., Shaw A., *et al.* Heat Shock Protein 70 Family Members Interact with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Hazara Virus Nucleocapsid Proteins and Perform a Functional Role in the Nairovirus Replication Cycle. Lyles DS, ed. *Journal of Virology*, 2016. 90(20), 9305-9316.
 28. Tajrishi M. M., Tuteja R. y Tuteja N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.*, 2011. 4(3), 267-275.
 29. Tayyari F., Marchant D., Moraes T. J., *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, 2011. 17(9), 1132-1135.
 30. Thongtan T., Wikan N., Wintachai P., *et al.* Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *Journal Medicine and Virology*, 2012. 84(4), 615-623.
 31. Ueno T., Tokunaga K., Sawa H., *et al.* Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiology and Immunology*, 2004. 48(2), 111-118.

32. Wang Y., Dutta S., Karlberg H., *et al.* Structure of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein: Superhelical Homo-Oligomers and the Role of Caspase-3 Cleavage. *Journal of Virology*, 2012. 86 (22), 12294-12303.
33. Yadav P. D., Patil D. Y., Shete A. M., *et al.* Nosocomial infection of CCHF among health care workers in Rajasthan, India. *BMC Infectious Diseases*, 2016. 16, 624. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094004/>
34. Xiao X., Feng Y., Zhu Z., *et al.* Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 2011. 411(2), 253-258.
35. Zivcec M., Scholte F. E. M., *et al.* Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses*, 2016. 8(4), 106.

6.1. Reseñas aparecidas en medios de comunicación

1. Periódico El Español. Sanidad alertó en 2011 de que la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo podía llegar a España. 2016. Consultado por última vez el 11/04/2017. Disponible en: http://www.elespanol.com/ciencia/salud/20160901/152235674_0.html
2. Periódico El País. La fiebre hemorrágica de Crimea-Congo. Síntomas de la enfermedad y cómo se contagia a humanos por la picadura de garrapatas. 2016. Consultado por última vez el 11/04/2016. Disponible en: http://elpais.com/elpais/2016/09/01/media/1472760888_697775.html