



DEPARTAMENTO DE FARMACIA

VIRUS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA CONGO: Evaluación en zona endémica

Lia Carolina Monsalve Arteaga

Salamanca, 2020



DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Facultad de Medicina
Campus Miguel de Unamuno
37007 SALAMANCA

Se presenta este documento de Tesis Doctoral en la modalidad de Tesis por compendio de artículos para optar al Título de “*Doctor en Medicina*” por la Universidad de Salamanca, aportando dos artículos publicados y un en fase de publicación en revistas científicas del ámbito de la especialidad del trabajo desarrollado en la Tesis e indexadas en el *Science Citation Reports*, que en conjunto adquieren una adecuada relevancia, originalidad y excelencia, siendo la Doctoranda primera autora de los tres trabajos:

ARTÍCULO PRIMERO

Título: SEROPREVALENCE OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER IN HUMANS IN THE WORLD HEALTH ORGANIZATION EUROPEAN REGION: A SYSTEMATIC REVIEW

Revista: Plos Neglected Tropical Diseases

Autores: L. Monsalve Arteaga¹, M. Alonso Sardón², J.L. Muñoz Bellido³, B. Vicente Santiago¹, C. Vieira Lista¹, J. López Abán¹, A. Muro Álvarez¹ y M. Belhassen García⁴

Afiliación:

¹Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca, Instituto Biosanitario de Salamanca, Salamanca.

²Área de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Salamanca, Salamanca.

³Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca,

⁴Servicio de Medicina Interna, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Instituto Biosanitario de Salamanca, Salamanca.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094>

ARTÍCULO SEGUNDO

Título: CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER (CCHF) VIRUS-SPECIFIC ANTIBODY DETECTION IN BLOOD DONORS, CASTILE-LEÓN, SPAIN, SUMMER 2017 AND 2018

Revista: Eurosurveillance

Autores: Lía Monsalve Arteaga¹, Juan Luis Muñoz Bellido², María Carmen Vieira Lista¹, María Belén Vicente Santiago¹, Pedro Fernández Soto¹, Isabel Bas³, Nuria Leralta³, Fernando de Ory Manchón³, Ana Isabel Negredo³, María Paz Sánchez Seco³, Montserrat Alonso Sardón⁴, Sonia Pérez González⁵, Ana Jiménez del Bianco⁵, Lydia Blanco Peris⁵, Rufino Alamo Sanz⁶, Roger Hewson⁷, Moncef Belhassen⁸, Antonio Muro¹.

Afiliación:

¹Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca, Instituto Biosanitario de Salamanca, Salamanca.

²Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca.

³Instituto de Investigación Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

⁴Área de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Salamanca, Salamanca.

⁵Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, Valladolid, España.

⁶Observatorio de Salud Pública en Junta de Castilla y León. Junta de Castilla y León. Valladolid, España.

⁷Instituto Porton Down. Salud Pública, Inglaterra.

⁸Servicio de Medicina Interna, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Instituto Biosanitario de Salamanca, Salamanca.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.1900507>

ARTÍCULO TERCERO

Título:

NEW CIRCULATION OF GENOTYPE V OF CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER VIRUS IN HUMANS FROM SPAIN

Revista: Pendiente publicación

Autores: Lía Monsalve Arteaga¹, Juan Luis Muñoz Bellido², Fernando de Ory Manchón³, Ana Isabel Negredo³, María Paz Sánchez Seco³, Montserrat Alonso Sardón⁴, María Carmen Vieira Lista¹, María Belén Vicente Santiago¹, Amparo López-Bernús⁵, Jorge García Criado⁵, Jesús Sánchez Serrano⁵, Rufino Alamo Sanz⁶, Moncef Belhassen-Garcia⁵, Antonio Muro¹

Afiliación:

¹Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca, Instituto Biosanitario de Salamanca, Salamanca.

²Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca.

³Instituto de Investigación Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

⁴Área de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Salamanca, Salamanca.

⁵Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Observatorio de Salud Pública en Junta de Castilla y León. Junta de Castilla y León. Valladolid, España.



DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Facultad de Medicina
Campus Miguel de Unamuno
37007 SALAMANCA

D. MONCEF BELHASSEN GARCÍA, PROFESOR ASOCIADO DEPARTAMENTO DE MEDICINA, Facultad de Medicina **Dña. MONTSERRAT ALONSO SARDÓN**, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO, Facultad de Medicina **D. JUAN LUIS MUÑOZ BELLIDO**, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO, Facultad de Medicina Y **D. ANTONIO MURO ÁLVAREZ**, CATEDRÁTICO DE PARASITOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO BIOLOGÍA ANIMAL, ECOLOGÍA, PARASITOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA. Facultad de Farmacia.

CERTIFICAN:

Que **Dña. LIA CAROLINA MONSALVE ARTEAGA**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina la Tesis Doctoral titulada “VIRUS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA CONGO: EVALUACIÓN CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA EN ZONA ENDÉMICA”, y que dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, originalidad, contenidos, evidencias científicas, calidad y méritos académicos suficientes para ser presentado en la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones ante el Tribunal correspondiente para optar al GRADO DE DOCTOR por la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

Y para que conste, firman el presente certificado en Salamanca, a 21 de octubre de 2020.

Fdo.: M. Belhassen García

Fdo.: J.L. Muñoz Bellido

Fdo.: M. Alonso Sardón

Fdo.: A. Muro Álvarez

Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud a todas las personas que me han ayudado, apoyado y mostrado su confianza en la elaboración del presente trabajo. De manera especial, a mis directores, al Prof. Juan Luis Muñoz Bellido, por todas las tardes que se pasó conmigo en el laboratorio de Microbiología del hospital, por venir a ayudarme incluso durante sus vacaciones de verano, por estar pendiente de los resultados, poner a la disposición de la investigación los equipos del laboratorio del hospital; a la Prof^a. Montserrat Alonso Sardón también, por tantas mañanas en su despacho haciendo la revisión sistemática, por pasar tanto tiempo haciendo cálculos y su disposición admirable, teniendo todo al día y perfectamente organizado; y a los Profesores Moncef Belhassen y Antonio Muro, quienes con su actitud optimista y sus amplios conocimientos en investigación han contribuido en suscitar en mí, una motivación y un estímulo que valoro y que me ha permitido lograr esta ansiada meta.

Debo incluir en mi agradecimiento también al personal del laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de Salamanca, el personal del Banco de Sangre de Castilla y León y del laboratorio del CIETUS.

Del CIETUS debo dar un especial agradecimiento a Esther y al super jefe Miguel Cordero, ambos han sido un apoyo muy importante desde mi llegada a Europa, ayudándome no solo en temas académicos, sino personales; a Julio, por su gran esfuerzo con la revisión sistemática, por querer impulsar siempre mi investigación. a Carmen por su trabajo con las garrapatas infectadas y por ser la que ha estado trabajando en este tema durante muchos años; a Belén por su organización y disposición; a Natalia, por enseñarme todos sus pequeños trucos de organización y de uso del laboratorio, desde cómo utilizar una pipeta a cómo organizar mi plan de trabajo, a que todo se debe dejar en orden y por tantas cosas más; a Loli por estar muchas tardes conmigo en el laboratorio de Microbiología del hospital que a pesar de parecer de carácter muy fuerte es más buena que el pan; a las otras asistentes del laboratorio (no recuerdo el nombre de todas, pero sí recuerdo que todas fueron muy amables conmigo); a Esther, la señora del personal de limpieza que trabaja por las tardes en Microbiología que siempre estaba muy pendiente de mí y me hacía sentir muy a gusto; a Tália que me ayudó con todo y por ser mi amiga incondicional; a Alicia por pasar horas explicándome como utilizar el equipo de extracciones y por rotular junto con Antonio y Laura una gran parte de las muestras que utilicé; a Elena por ser una compañera de América Latina con los pies bien puestos sobre la tierra, quien me acompañó en el duro camino de la

inmigración; en fin a tanta gente buena que me encontré en el hospital, la universidad y el banco de sangre, sin quienes nada de esto se hubiera podido llevar a cabo.

A mis compañeros de residencia cuando vivía en Salamanca (Higinia, Gaby, Elenita, Diego, Xi, Paul...) por hacer mi vida más amena y compartir tan buenos momentos.

Por último, a los más importantes... Mi esposo Christophe que ha sido un motor imparable de ánimos, consejos, compañía y por enseñarme disciplina; a mi abuela Carmen que nos dejó cuando yo estaba empezando mi tesis; a mi madre, quien a pesar de estar la mayor parte de esta tesis tras el Skype y tras el teléfono ha sido la tele-mamá más presente que pueda existir, haciéndome sentir que nunca he estado sola y que estoy tan acompañada como cuando aún vivía con ella; a mi familia esparcida un poco por todos lados y a mi nueva familia francesa por lo increíbles y acogedores que sois haciendo de mí la venezolana más francesa de Toulouse.

A todos ellos, a los que no he mencionado, a los que vendrán y los que ya no están, ¡gracias!

Lía Monsalve Arteaga
Salamanca, 2020

INDICE DE CONTENIDOS

<u>1.</u>	INTRODUCCIÓN	7
<u>2.</u>	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
<u>3.</u>	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	64
<u>4.</u>	RESULTADOS	67
5.	CONCLUSIONES	112
5.	ANEXOS	114

ABREVIATURAS

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

ARN: Ácido ribonucleico.

ALT: Alanina aminotransferasa.

AST: Aspartato aminotransferasa

BUN: Nitrógeno uréico sanguíneo

CAUSA: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca

CD: Células dendríticas

CE: Células endoteliales

CID: Coagulación intravascular diseminada

CPK: Creatinin-fosfoquinasa

EAU: Emiratos Árabes Unidos

FHCC: Fiebre hemorrágica de Crimea Congo.

FHV: Fiebre(s) hemorrágica(s) viral(es)

FHSR: Fiebre hemorrágica con síndrome renal producida por hantavirus

GGT: Gamma glutamiltranspeptidasa

IF: Inmunofluorescencia

LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

LDH: Lactato deshidrogenasa

ND: No descrito

NK: Células natural killer

NP: Nucleoproteína

OCEBM: Oxford Centre for Evidence Based Medicine

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTU: Deubiquitinasa tipo tumor de ovario

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PICO: Estrategia de pregunta de investigación en revisiones sistemáticas. Paciente, intervención, comparación y resultados

PICOS: Estrategia de pregunta de investigación en revisiones sistemáticas similar a PICO, incluyéndose además el diseño del estudio.

PRISMA: Guía de publicación de la investigación diseñada para mejorar la integridad del informe de revisiones sistemáticas y metaanálisis

RCA: República Centroafricana

RDC: República Democrática del Congo

RIG-I: Gen inducible por el ácido retinoico tipo I.

RT-PCR: 1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa. 2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

TLR: Receptores Toll-Like

TP: Tiempo de protrombina

URSS: Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

VFHCC: Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTUALIZACIÓN DEL TEMA

La fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) es una zoonosis transmitida por garrapatas, principalmente aquellas del género *Hyalomma* spp. Está producida por un arbovirus, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (VFHCC) (1) y representa la enfermedad viral transmitida por garrapatas con mayor extensión a nivel mundial. Produce brotes cada año en Europa, Asia y África (2), con predominio en el hemisferio norte durante los meses más calurosos del año (de mayo a octubre) (3).

El espectro clínico de esta enfermedad oscila desde sintomatología leve o inespecífica hasta la aparición de fiebre hemorrágica con elevado riesgo de mortalidad (10-40 %) (1,3,4). El riesgo potencial de su utilización como arma biológica es una de las razones por la cual el VFHCC ha sido incluido como un patógeno prioritario para la investigación y el desarrollo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos años (5,6).

Específicamente en España, el virus ha sido encontrado desde hace aproximadamente 10 años circulando en garrapatas del género *Hyalomma* spp. recuperadas de ciervos en la provincia occidental de Cáceres (7,8). Cinco años más tarde, en 2016, se describieron los primeros casos humanos. Uno de ellos con desenlace fatal (un hombre en la quinta década de la vida que había realizado actividades de recreación al aire libre en la provincia de Ávila), y otro caso asociado a transmisión nosocomial del caso mencionado previamente (9). Aun cuando se había demostrado esta circulación del virus en el territorio español, los estudios de seroprevalencia en humanos realizados no habían demostrado la presencia de anticuerpos en la población humana (10).

La presente tesis doctoral tiene como principales objetivos: i) la descripción epidemiológica del virus en Europa. ii) la evaluación de la potencial circulación del VFHCC en Castilla y León y iii) la valoración de la incidencia de FHCC en individuos que acuden a urgencias en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, presentando fiebre de origen desconocido sin foco aparente (11).

1.2 ANTECEDENTES

Historia de las fiebres hemorrágicas virales

Las fiebres hemorrágicas virales (FHV) son un grupo de enfermedades caracterizadas por la presencia de fiebre y trastornos hemorrágicos. Éstas, son causadas principalmente por diferentes virus pertenecientes a cuatro familias de virus ARN (11).

- *Arenaviridae*: Fiebre hemorrágica argentina, por el virus de Junín; fiebre hemorrágica boliviana, por el virus de Machupo; fiebre de Lassa, por el virus homónimo; fiebre hemorrágica venezolana, por el virus de Guanarito; fiebre hemorrágica brasileña, por el virus de Sabia; fiebre hemorrágica de Chapare, por el virus homónimo; fiebre de Lujo también por el virus homónimo
- *Filoviridae*: Virus del Ébola, virus de Marburg.
- *Nairoviridae*: De importancia médica, el VFHCC.
- *Flaviviridae*: Transmitidos por mosquitos como la fiebre amarilla, dengue, West Nile virus. Así mismo, hay otro grupo transmitido por garrapatas entre los que se encuentran el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, el virus de la fiebre hemorrágica de Alkhurma y la fiebre hemorrágica del bosque Kyasanur

Algunos de estos agentes causan enfermedades relativamente leves, como el virus de la nefropatía escandinava (un hantavirus); mientras que otros, como el virus del Ébola son altamente letales.

Fue Čumakov Mihail Petrovič quien acuñó por primera vez durante el siglo XX, cuando describió la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) y la fiebre hemorrágica de Omsk (12).

Más tarde, Daniel Carleton Gajdusek reconoció que, basado en los vectores y los hospedadores que podían transmitir las FHV, se podían distinguir tres grupos:

- FHV transmitidas por roedores: FHSR producida por hantavirus y la fiebre hemorrágica argentina (FHA) producida por el virus de Junín.
- FHV transmitidas por garrapatas: FHCC, fiebre hemorrágica de Omsk.
- FHV transmitidas por mosquitos: Dengue, fiebre amarilla.

El concepto más actualizado que se tiene hasta ahora de FHV fue introducido por Alexis Shelokov en 1970: “el cuadro clínico de las FHV se caracteriza por una enfermedad febril complicada con diversos fenómenos hemorrágicos, shock, y en algunas oportunidades muerte. Ecológicamente cada enfermedad hemorrágica ocurre cuando el humano perturba de alguna manera el nicho ecológico donde el virus circula en vertebrados, habitualmente con la ayuda de artrópodos”.

Aunque esta definición fue bastante acertada, algunas FHV como el dengue y la fiebre amarilla no podían ser consideradas completamente dentro de la misma, ya que ambas son transmitidas por mosquitos *Aedes*, que habitualmente se alimentan de humanos. Asimismo, producen brotes urbanos importantes en zonas tropicales y subtropicales extensas que no pueden ser definidas como un foco (13,14).

Como ya fue mencionado en las primeras descripciones sobre las FHV, las personas pueden verse afectadas cuando se introducen en el ecosistema en el que el virus y su artrópodo vector circulan habitualmente, o cuando se producen cambios en el ecosistema que aloja al virus y al artrópodo, vinculados a modificaciones sociales, geopolíticas, climáticas, etc. (15). Este fenómeno está asociado a varios factores como un aumento de la temperatura media anual global (16,17), los desplazamientos migratorios humanos con un aumento de la densidad de población en determinadas zonas vulnerables, el comercio legal e ilegal de animales y productos animales y los sistemas de uso de la tierra para la agricultura (18,19).

Durante el siglo XXI se han reportado algunos brotes importantes asociados a FHV como se describe en la **tabla 1** (20):

Tabla 1: Brotes asociados a FHV

Fiebre hemorrágica	País	Zona afectada	Año del brote	Número de casos	Mortalidad
Fiebre de Marburg	República Democrática del Congo	Ciudades de Durba y Watsa	1998 - 2000	154	128
Fiebre de Marburg	Angola	Provincia de Uíge	2004 - 2005	252	227
Ébola	República Democrática del Congo	Provincia Occidental Kasai	2007	260	186
Ébola	Guinea Conakry, Liberia y Sierra Leona	Diseminado entre pueblos y aldeas rurales y entre capitales nacionales densamente pobladas	2013 - 2016	28616	11310
Virus de Lujo	Zambia, Sudáfrica	No descrito	2008	5	4

Historia del VFHCC

La FHCC fue descrita por primera vez entre los años 1944-1945 en la Península de Crimea (21). Alrededor de 200 militares de Rusia presentaron síntomas de fiebre hemorrágica (22). En ese momento, se desconocía la etiología y se planteó la posibilidad de que se tratase de un brote asociado a un agente vírico probablemente relacionado con la picadura de garrapatas (23). Se estableció el nombre como virus de Crimea. Epidemias similares ocurrieron también años más tarde, en zonas de la antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas y Bulgaria (1953–1973) (22).

Años más tarde, en 1956, se comunicaron también los primeros casos en África, un niño y su médico, ambos procedentes de Zaire (actual República Democrática del Congo). Estos pacientes presentaron un cuadro de fiebre hemorrágica, denominándose al agente etiológico sospechoso virus del Congo (24).

En 1967, se utilizó por primera vez la técnica de inoculación en ratón para el aislamiento y estudio del agente de los mencionados brotes de fiebre hemorrágica (25) y una vez constatado que el virus Congo y el virus de la fiebre de Crimea eran el mismo agente se decidió adoptar el nombre actual de VFHCC (26).

1.3 MARCO TEÓRICO

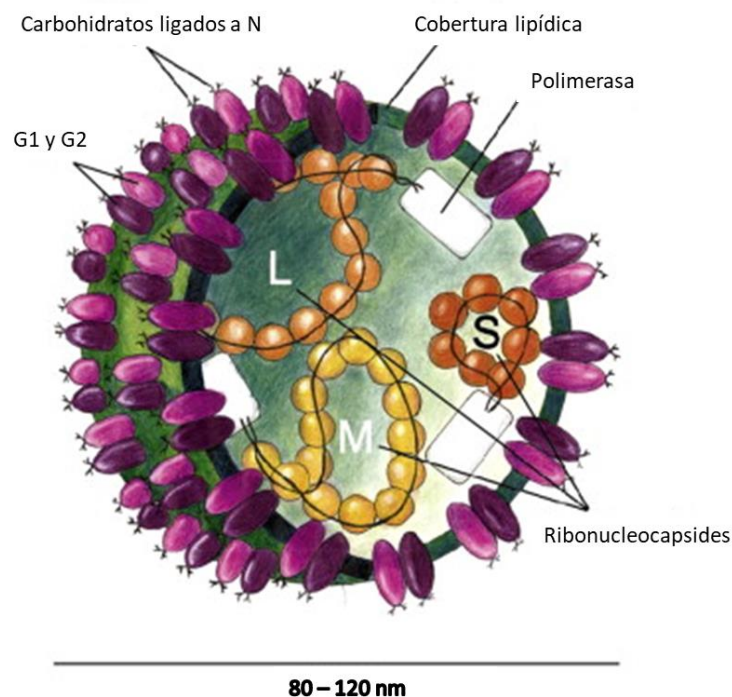
Morfología, estructura y genoma

El VFHCC es un virus cubierto de simetría icosaédrica con un diámetro de 80 a 100 nm. Pertenece al género *Orthonairovirus*, dentro de la familia *Nairoviridae*, orden *Bunyavirales*, (11,27). Posee una envoltura lipídica con un grosor de 5 a 7 nm y unas glicoproteínas de superficie que tienen una longitud de 8–10 nm (28).

El genoma del virus está compuesto por un ARN monocatenario de polaridad negativa. Este ARN puede ser dividido en 3 segmentos, S, M, L (pequeño, mediano y grande, de acuerdo con sus siglas en inglés) (**Figura 1**). Estos segmentos del genoma codifican respectivamente las siguientes proteínas estructurales: la nucleocápside viral (N), el precursor de la glicoproteína (GPC) y la polimerasa viral (L) (29).

Basados en las secuencias del segmento S, se pueden distinguir siete grupos genéticos principales del virus. Dos de ellos son prevalentes en Asia, tres en África y dos en Europa (30).

Figura 1: Morfología del VFHCC (Tomado de Ergönül et al. *Creamean Congo Haemorrhagic Fever. The Lancet Infectious Diseases*, 2016) (3)



Los virus ARN habitualmente se caracterizan por poseer una acumulación progresiva de mutaciones debida a una tendencia a una codificación errada de su polimerasa viral. Sin embargo, los virus ARN transmitidos por artrópodos, como el VFHCC, habitualmente ofrecen poca diversidad genética. Este hecho puede ser explicado a que la evolución de estos virus está restringida a la necesidad de mantener una elevada capacidad replicativa «*fitness*» del virus tanto en el artrópodo (en nuestro caso la garrapata) como en el animal que sirve como amplificador.

Se ha observado que la mayor acumulación de mutaciones se encuentra en el segmento M (una diferencia de 31% a nivel de nucleótidos y 27% a nivel de aminoácidos). Esto puede deberse a la adaptación de virus a diferentes tipos de artrópodos y células de vertebrados dependiendo de las zonas geográficas, ya que el virus se encuentra circulando en ciclos naturales distintos dada su vasta extensión geográfica, lo que se traduce en importantes diferencias naturales, incluyendo distintos tipos de garrapatas del género *Ixodes* implicadas (29), distintas preferencias de alimentación que dependen de los vertebrados disponibles y las condiciones climatológicas locales.

Habitualmente la región que codifica la polimerasa viral es considerada la zona mejor conservada en los virus ARN. Sin embargo, esto no siempre sucede de la misma manera en el VFHCC donde se ha encontrado una cierta diversidad genética en la región del segmento L que codifica la polimerasa.

Diversidad genética

La comparación de 15 genomas completos de VFHCC y la secuenciación individual de 32 segmentos S, 32 M y 18 L ha revelado que existen siete cepas del virus (31): Grupo I (África 3), África occidental y España; II (África 2), República Democrática del Congo (RDC); III (África 1), Sudáfrica y África occidental 2; IV (Asia 1 y Asia 2), Asia y Medio Oriente, V (Según ciertos autores Europa 1 y según otros Europa 1 y 2), Europa y Turquía, VI (Europa 2), Grecia; y VII, Mauritania (detectado solo con el segmento M) (29) (**Figura 2**).

Esta agrupación demuestra que los diferentes linajes del VFHCC se mueven alrededor de largas distancias geográficas, por ejemplo, es posible encontrar virus genéticamente muy similares en Sudáfrica y África occidental o en China e Irak. Así mismo, es posible encontrar más de un linaje viral circulando en una misma zona, como es el caso del Grupo I y el Grupo III que se encuentran circulando en África occidental (31).

Existen múltiples explicaciones para este movimiento de los linajes virales. Una viene dada por el comercio del ganado infectado o no infectado, pero portador de garrapatas infectadas. Otra explicación, sobre todo asociada a desplazamientos a distancias mayores, se explica por el viaje de estadios prematuros de las garrapatas en aves u otros animales migratorios (31).

Para adaptarse a estas diferencias ecológicas, el virus ha sufrido diversos cambios atribuidos a fenómenos de reordenamiento y recombinación genética. El reordenamiento se refiere a un fenómeno que se ha observado en los árboles filogenéticos del segmento M y que a efectos prácticos se ha traducido en una elevación de la capacidad de replicación viral. El reordenamiento entre virus de diferentes grupos geográficos y su dependencia de la coinfección refuerza el punto de que el movimiento y la mezcla de virus a través de grandes distancias geográficas ocurren con cierta frecuencia. Parece probable que el reordenamiento genético pueda ocurrir principalmente durante la coinfección de garrapatas, debido a la naturaleza transitoria de las infecciones de vertebrados en relación con las infecciones víricas persistentes a largo plazo observadas en las garrapatas y su necesidad obligada de obtener alimentos de sangre en las uniones metamórficas.

Por su parte, la recombinación ha sido un fenómeno que ha afectado predominantemente al segmento S y se ha planteado que la naturaleza del mosaico observado en el segmento L del grupo IV sea debida a este tipo de evolución genética (31).

Figura 2: Ubicación geográfica de los subtipos virales del VFHCC

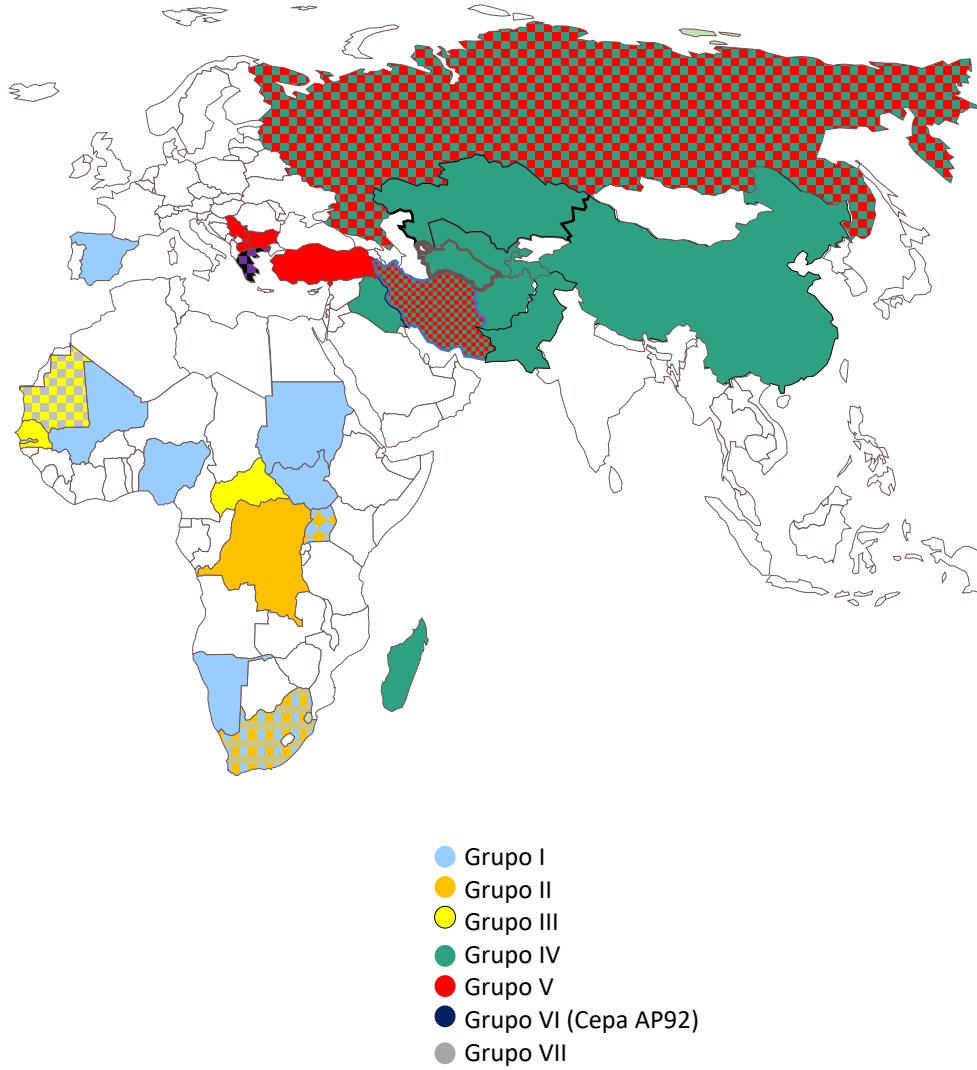


Tabla 2: Linajes del VFHCC y su distribución geográfica

Países donde se ha aislado	Carroll <i>et al.</i> (32)	Atkinson <i>et al.</i> (33)	Sherifi <i>et al.</i> (34)
Irán, Sudáfrica, Senegal, Mauritania, España	I	África 3	África 3
Sudáfrica, Namibia, RDC, Uganda	II	África 2	África 2
Sudáfrica, Namibia, Emiratos Árabes Unidos (EAU), Senegal, Mauritania, Nigeria, Burkina Faso, República Centro Africana (RCA)	III	África 1	África 1
Irán, Pakistán, EAU, Madagascar, Omán, Iraq, China, Uzbekistán, Kazajistán, Tayikistán	IV	Asia 1, Asia 2	Asia 1, Asia 2
Irán, Turquía, Grecia, Rusia, Bulgaria, Kosovo, Albania	V	Europa 1	Europa 1, Europa 2
Turquía, Grecia	VI	Europa 2	Europa 2
Mauritania *	VII		

Los linajes se han establecido por diferencias en el segmento S (pequeño). Excepto el linaje VII.

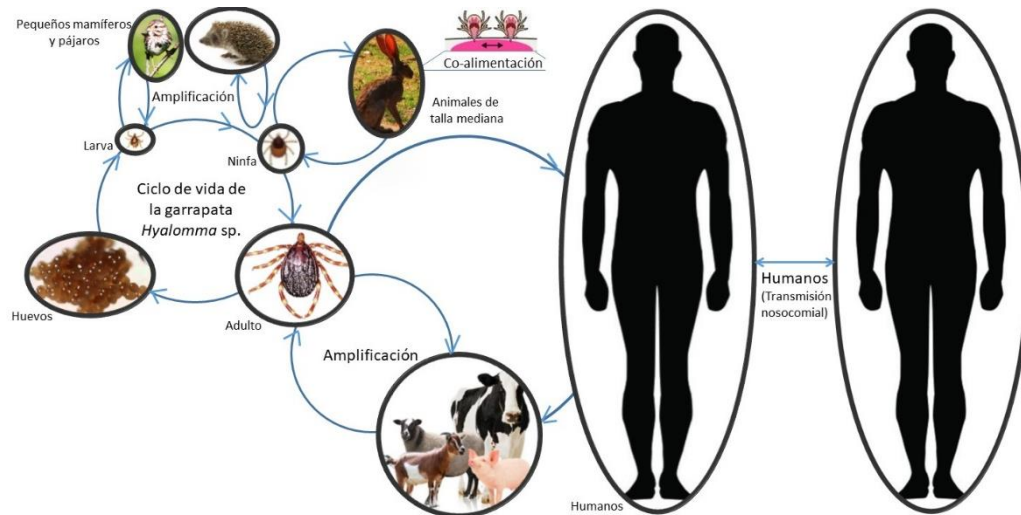
*Caracterizado de acuerdo con diferencias en el segmento M.

Ciclo biológico

El ciclo de transmisión está caracterizado por el paso del virus desde la garrapata a un ungulado y del ungulado infectado a una nueva garrapata susceptible (35). Dichos ungulados pueden adquirir la infección y presentar viremia sin ningún síntoma de enfermedad.

El hombre adquirirá la infección, por lo general, por la picadura de una garrapata adulta infectada, aunque también puede adquirirla por contacto directo con sangre u otros fluidos corporales de animales infectados y/o de pacientes hospitalizados por FHCC y por transmisión vertical (**Figura 3**) (3,36–38)

Figura 3: Ciclo biológico del VFHCC. (Modificado de Hawman DW, Feldmann H. Recent advances in understanding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. F1000Research 2018 (39)



EPIDEMIOLOGÍA

Vectores: Garrapatas: Vector y hospedador

La transmisión de este virus a los humanos se asocia principalmente con la picadura de garrapatas de cuerpo duro (familia *Ixodidae*), predominantemente las que pertenecen al género *Hyalomma* (Figura 4) (40). Otras garrapatas distintas al género *Hyalomma*, como *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Boophilus* spp. pueden estar también involucradas.

Figura 4: *Hyalomma* spp., principal vector de la FHCC



Imagen facilitada por Carmen Vieira, investigadora del laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIETUS), Universidad de Salamanca

Una vez dentro de la garrapata, el virus se replica dentro de la pared intestinal y se propaga a los tejidos, alcanzando los títulos más altos en las glándulas salivares y los órganos reproductores (41). Las garrapatas hembra pueden transmitir el virus de modo vertical a su descendencia, durante sus diversas etapas de maduración, por vía transovárica. Una hembra puede producir varios miles de óvulos, por lo que incluso una baja tasa de transmisión transovárica es capaz de mantener una población relativamente grande de garrapatas infectadas.

La transmisión horizontal se produce cuando varias garrapatas se encuentran alimentándose de un mismo animal. En este caso si una o varias se encuentran infectadas, estas son capaces de introducir el virus en el torrente sanguíneo del animal, produciendo así la infección del resto de garrapatas susceptibles (41,42).

El hecho de que algunas garrapatas de la especie *Hyalomma marginatum* sean portadoras del virus a lo largo de las distintas etapas de su vida las convierte en verdaderos reservorios naturales del VFHCC. Las ninfas de las garrapatas infectadas pueden vivir en animales como aves o mamíferos pequeños, representando una fuente de diseminación geográfica del virus (9). De hecho, se les ha asociado a la introducción de cepas africanas en el sudoeste europeo en los últimos años (8,43–45).

Reservorios animales: Amplificadores

El espectro de huéspedes naturales para las garrapatas infectadas por el VFHCC incluye una amplia variedad de animales como bovinos, caprinos, ovinos, aves y liebres, (46). Las aves, por ejemplo, no adquieren la infección (a excepción de los avestruces) (4), pero representan una fuente importante de diseminación geográfica del virus, como se ha descrito previamente (43). Este hecho se ha asociado, entre otras diseminaciones a grandes distancias geográficas, a la introducción de cepas africanas en el sudoeste europeo durante la última década (8,43–45).

Por su parte, los vertebrados pequeños como las liebres o los erizos pueden representar poblaciones ecológicas importantes para mantener el virus, dado a que a menudo estos animales están infestados con garrapatas en estado larvario, que luego son capaces de transmitir el virus verticalmente a sus estados más avanzados del ciclo biológico que son aquellas que van a infestar predominantemente los grandes vertebrados salvajes, que permiten el establecimiento y difícil erradicación del virus una vez establecido en una determinada área geográfica como los ciervos, corzos o jabalíes o por otra parte el ganado doméstico que se encuentra en constante intercambio

con humanos (aquellos que están implicados en su cuidado y aquellos que están implicados en la matanza) ya que en los periodos de infección asintomática (que duran aproximadamente 2 semanas) son capaces de transmitir del virus a través de sus fluidos corporales (1,36). Desde el punto de vista de la Salud Pública, la presencia de anticuerpos específicos contra VFHCC en animales domésticos indica la circulación de VFHCC en un área geográfica y, por tanto, un riesgo importante para los habitantes de la zona (47).

Por otra parte, los grandes vertebrados como ciervos, corzos, jabalíes, o el mismo ganado doméstico tienen un papel importante en el ciclo del virus una vez que adquieren la infección ya que, durante los periodos de viremia (56), suponen una fuente de amplificación viral, siendo capaces de transmitir el virus a las garrapatas no infectadas que se encuentran co-parasitando al animal generando poblaciones de nuevas garrapatas infectadas.

Existen diversos fenómenos ecológicos que se han asociado también a la amplificación del virus, Entre estos, la fragmentación agrícola intercalada entre la vegetación crea hábitats favorables para la supervivencia de las garrapatas, cuando en la zona se realiza pastoreo de ganado (**Figura 5**). Asimismo, los cambios en las prácticas de caza pueden afectar a la proliferación del virus, y es de esta manera donde se observó que, en Kosovo cuando la caza se prohibió en ciertas zonas a partir de 1990, se tradujo en un aumento de las poblaciones de liebres, lobos y jabalíes y por ende en el número de garrapatas *Hyalomma*, lo cual influyó en un aumento en el número de casos de FHCC en la región durante la década de 2000.

Figura 5: Ejemplo de fragmentación de la vegetación. La proximidad del ganado a las zonas de matorrales que albergan garrapatas contribuye al mantenimiento y la propagación del VFHCC (Tomado de Leblebicioglu H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral research*. 2016 Feb 1;126:21-34 (48)



Transmisión a trabajadores sanitarios

Después de los granjeros y los trabajadores de mataderos, el mayor riesgo de infección por el VFHCC lo tienen los trabajadores sanitarios (médicos, veterinarios, enfermeras...), así como los trabajadores de laboratorio (9,37,49–51). En estos grupos de riesgo, la infección se adquiere habitualmente a través del contacto directo con sangre y otros fluidos corporales de humanos o animales infectados, principalmente aquellos con una alta carga vírica. Históricamente, se han descrito casos de transmisión nosocomial en Europa, África y Asia, como se muestra en la **Tabla 3**.

En estos contextos, la principal forma descrita de transmisión del virus es por accidentes biológicos con agujas contaminadas, seguido por el contacto con mucosas con sangre u otros fluidos corporales de pacientes hospitalizados por FHCC (52). El riesgo de transmisión descrito se eleva hasta un 25% tras un pinchazo, mientras el riesgo por el contacto con mucosas es mucho menor.

Estudios realizados en Rusia han descrito casos de infección en trabajadores sanitarios que no han estado expuestos a pinchazos o contactos mucosos. Se plantea la posibilidad de que el virus

pueda propagarse además por vía aérea (53). Esta forma de transmisión ocurre durante las fases más avanzadas de la enfermedad durante la fase hemorrágica y se requieren más estudios para afirmar que este riesgo realmente existe.

Recientemente, Tsergouli *et al.* (54) describieron como grupos de riesgo de transmisión nosocomial a los trabajadores sanitarios, los visitantes y pacientes hospitalizados, concluyendo que el mayor riesgo lo habían tenido los trabajadores sanitarios, y dentro de estos, las enfermeras seguidas de los médicos. Así mismo, se describe que las unidades de cuidados intensivos, seguidas por los servicios de urgencias, enfermedades infecciosas y los laboratorios fueron los Servicios de mayor riesgo.

La OMS recomienda la profilaxis postexposición (55) y se describe como una parte de la atención integral del trabajador sanitario expuesto al VFHCC. En este sentido, algunos expertos recomiendan realizar profilaxis con ribavirina en personas que hayan tenido un contacto de riesgo (56). Sin embargo, no existe evidencia suficiente de que este tipo de actuación reduzca el riesgo de desarrollo de enfermedad clínica.

Tabla 3: Brotes nosocomiales de FHCC ocurridos durante el S.XXI (Modificado de Tsergouli K, Karampatakis T, Haidich AB, Metallidis S, Papa A. Nosocomial infections caused by Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Journal of Hospital Infection.* 2020 May 1;105(1):43-52 (54)

País	Año	Caso índice, pronóstico	Casos secundarios (Casos fatales)	Casos terciarios (Casos fatales)	Total (Casos fatales)	Referencias
Albania	2001	1, ND	1 (0)		1 (0)	(57,58)
Alemania	2009	1, fatal	2 (0)		2 (0)	(59)
Bulgaria	2008	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(60,61)
España	2016	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(9)
India	2011	1, fatal	3 (2)	4 (1)	7 (3)	(62,63)
	2012	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(64)
	2015	1, fatal	4 (2)		4 (2)	(65)
Irán	2001	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(66)
	2008	6, 1 fatal	1 (0)		1 (0)	(67)
	2009	1, fatal	1 (1)	4 (0)	5 (1)	(68)
	2011	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(66)
	2012	1, fatal	3 (1)		3 (1)	(51,69)

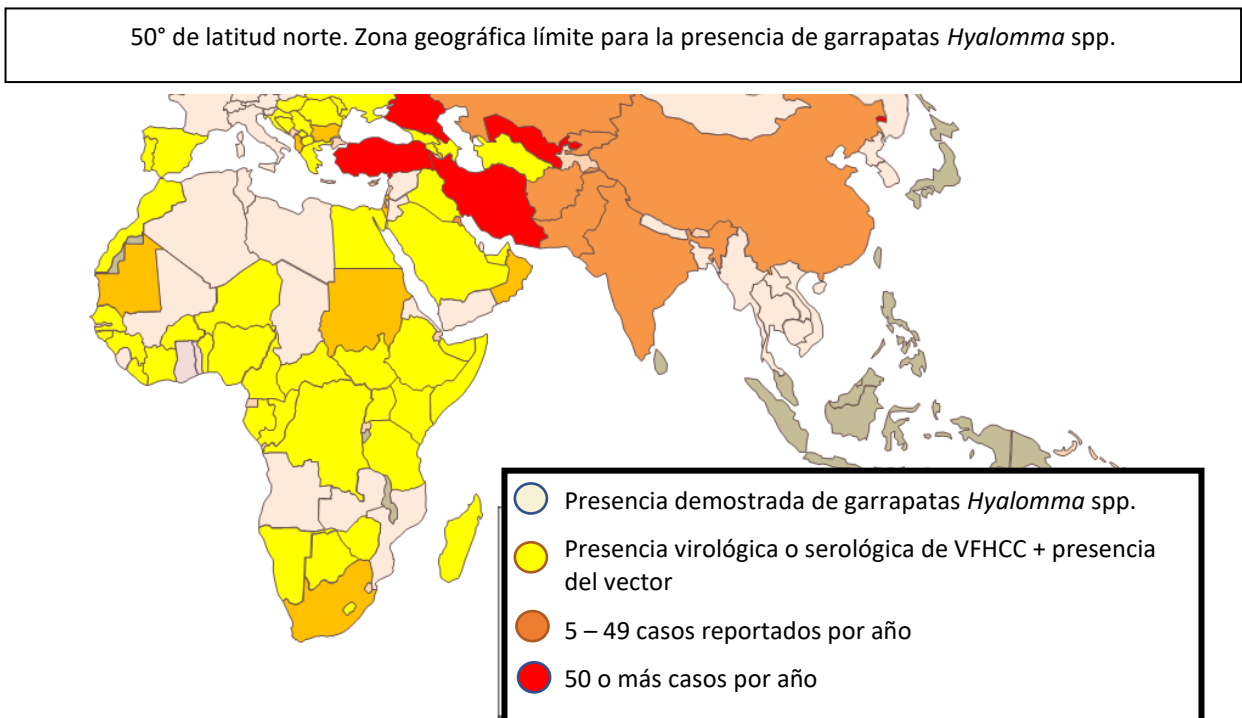
Kazajistán	2009	1, fatal	4 (2)		4 (2)	(70,71)
	2009	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(70,71)
	2010	1, fatal	1 (ND)		1 (ND)	(71)
Kosovo	2001	1, ND	4 (ND)	3 (ND)	7 (ND)	(72)
Mauritania	2003	1, fatal	15 (6)		15 (6)	(73)
Pakistán	2000	1, ND	1 (1)		1 (1)	(74)
	2000	1, ND	1 (0)		1 (0)	(74)
	2000	Laboratorio	1 (1)		1 (1)	(75)
	2000	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(75)
	2002	1, fatal	2 (1)		2 (1)	(76)
	2011	1, ND	2 (1)		2 (1)	(77)
	2016	1, fatal	2 (1)		2 (1)	(78)
Rusia	2005	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(71)
	2011	1, fatal	8 (0)		8 (0)	(53)
Serbia	2001	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(79)
Sudáfrica	2006	Laboratorio	1 (1)		1(1)	(80)
Sudán	2008	1, fatal	4 (4)	1 (1)	5 (5)	(81)
	2010	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(81,82)
Tayikistán	2001	1, fatal	3 (1)	1 (0)	4 (1)	(83)
	2009	1, ND	6 (1)		6 (1)	(83)
Turquía	2003	1, ND	1 (1)		1 (1)	(84)
	2005	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(85)
	2005	1, fatal	3 (0)		3 (0)	(85)
	2006	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(86)
	2006	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(85)
	2007	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(85)
	2008	1, fatal	3 (0)		3 (0)	(85)
	2008	1, fatal	3 (0)		3 (0)	(85)
	2002- 2008	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(87)
	2011	1, fatal	1 (0)		1 (0)	(88)
	2008- 2012	1, alta por mejoría	1 (0)		1 (0)	(89)
	2014	1, fatal	7 (0)	1 (1)	8 (1)	(90)
	2015	1, fatal	4 (0)		4 (0)	(91)
	2016	1, fatal	1 (1)		1 (1)	(92)

Distribución geográfica

La FHCC se produce en áreas que se encuentran al sur del paralelo 48º, donde viven sus vectores principales, las garrapatas del género *Hyalomma* (4). Se han descrito casos en más de treinta países (**Figura 6**):

- África: República Democrática del Congo, Sudáfrica, Nigeria, Senegal, Uganda, Tanzania, Mauritania, Kenia (93).
- Asia: Pakistán, Afganistán, Tayikistán, Uzbekistán, Kazajstán, China, India. Oriente Medio: Irán, Iraq, Emiratos Árabes Unidos, Arabia Saudita, Omán (93,94).
- Europa: Rusia, Bulgaria, Albania, Kosovo, Turquía, Grecia y España (93,94).

Figura 6: Mapa que muestra la distribución geográfica de FHCC, zonas en las que se ha reportado casos y zonas donde se encuentra el vector, las garrapatas del género *Hyalomma* spp. Tomado de World Health Organization. Crimean-Congo haemorrhagic fever 2017 (95)



Impacto mundial

Desde el punto de vista de su incidencia, anualmente se registran alrededor de 1000 casos entre el oeste asiático y el sudeste europeo (17). Es por este motivo que este virus ha sido considerado durante los últimos 3 años por la OMS como uno de los ocho patógenos emergentes prioritarios que requieren atención urgente en investigación y desarrollo, dado su elevado riesgo de generar una potencial epidemia en el futuro próximo (96,97)

Los principales brotes del siglo XX y XXI se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Principales brotes de FHCC

	País	Brote	Zona endémica	Referencia
Asia (región centro-sur)				
	China	6 casos/año	Oeste	(98)
	Kazajistán	12.5 – 16.2 casos/año	Sur	(99)
	India	4 casos/año	Suroeste	(62,63)
	Tayikistán	1 a 6 casos/año	Oeste	(83)
	Afganistán	6 – 60 casos/año	Oeste	(100,101)
	Pakistán	25 a 100 casos/año	Noroeste	(102,103)
Asia (región de Medio Oriente)				
	Irán	Casos esporádicos y un gran brote de 120 casos en 2008	Todo el territorio	(104,105)
	Turquía	150 – 1300 casos/año	Noreste	(104–106)
África				
	Kenia	1 solo caso en 2000	No descrita	(107)
	Senegal	Dos casos, uno en 2003 y otro en 2007	No descrita	(108)
	Mauritania	Un brote que afectó a 35 personas en el año 2003	No descrita	(73)
	Uganda	Brotos de 1-2 casos en 2013, 2017 y enero de 2020	No descrita	(109)
	Sudán	Casos probables registrados (escasa información disponibles)	No descrita	(110)
	Sudáfrica	1-2 casos/año	No descrita	(111)
Este de Europa				
	Rusia	Alrededor de 1000 casos/año	Sur	(112)
	Kosovo	1 – 40 casos/año	Centro - Sudoeste	(2,113)
	Albania	Casos probables registrados (escasa información disponible)	Noreste	(2)
	Bulgaria	5 a 20 casos/año desde 2000	Sudoeste	(114,115)
	Grecia	Un solo brote con un caso mortal en 2008	No descrito	(110)
	Georgia	1 – 20 casos/año	No descrito	(116)
Sudoeste de Europa				
	España	1-2 casos/año desde 2016	Centro-occidente del país	(9,117)

Patogenia

Estudios serológicos extensos han permitido demostrar que el VFHCC puede infectar una gran variedad de especies de vertebrados, incluyendo tanto animales domésticos como salvajes. Hasta la fecha, el humano es el único que puede sufrir una enfermedad potencialmente mortal. Aun cuando un grupo de humanos puede presentar este tipo de infecciones potencialmente mortales, todavía se desconoce por qué otro grupo de humanos presentan infecciones asintomáticas o pauci-sintomáticas.

Barreras naturales y respuesta inmune innata:

El VFHCC debe superar el epitelio y atravesar la membrana basolateral de las células epiteliales para establecer la infección (118). Se replica en el sitio de la inoculación, las células epiteliales, células dendríticas y macrófagos residentes de los tejidos afectados. Las glicoproteínas virales Gn y Gc están involucradas en la unión inicial del virus a la membrana plasmática celular. También se ha sugerido que Gc es la responsable de unirse a los receptores celulares, mediando posteriormente la fusión. Posteriormente, las partículas del VFHCC se transportan a los primeros endosomas y a los cuerpos multivesiculares donde se produce la fusión de la envoltura del virus con las membranas celulares (40). La infección de células endoteliales y monocitos de la sangre periférica da como resultado la extravasación en diversos tejidos parenquimatosos, lo que permite que el virus interactúe con los receptores de las células en los órganos diana (118). La replicación secundaria en estos órganos facilita la propagación sistémica del virus. Esta teoría está respaldada por estudios en modelos animales, que demostraron que, en el primer día de la infección la replicación viral ocurre en la sangre y en el segundo día en el bazo y el hígado, para luego diseminarse sistémicamente a los pulmones, riñones y cerebro (119).

El virus ingresa al torrente sanguíneo superando la barrera de la superficie del endotelio vascular y las uniones endoteliales. Las células endoteliales son atacadas directamente por el virus o indirectamente por mediadores solubles derivados del huésped inducidos por virus que causan activación endotelial (120). Hasta la fecha, se desconoce cómo el VFHCC causa inestabilidad microvascular, lo más probable que esté mediado indirectamente por niveles elevados de citocinas proinflamatorias o por una combinación de infección por virus y tormenta de citocinas. El daño endotelial es responsable del fallo hemostático al estimular la agregación y desgranulación de las plaquetas y la activación de la cascada de coagulación intrínseca (121).

Hasta el momento, no se conoce la razón por la que algunos pacientes desarrollan enfermedad grave y otros, asintomática. Estudios realizados en ratones deficientes en interferón tipo I sugiere una elevada importancia del sistema inmune innato en la limitación de la diseminación del virus. Más específicamente, algunos estudios *in-vitro* han identificado que el gen inducible por el ácido retinoico tipo I (RIG-I) es el sensor genético de la respuesta inmune innata, y que el virus es capaz de procesar su ARN para evadir este sensor.

En humanos se han identificado algunos polimorfismos en los receptores *Toll-Like* (TLR) que se han asociado a la gravedad de la infección. Esto sugiere que estos receptores representan una vía de señalización importante en el control de la infección por el VFHCC. Asimismo, los polimorfismos en el factor nuclear kappa B también se han asociado con un aumento de la gravedad en esta enfermedad.

Las vías apoptóticas del huésped pueden restringir la replicación del virus, así como el hecho de que la replicación del virus, en sí, induce la apoptosis celular. Así mismo, la caspasa 3 activada por la apoptosis es capaz de fraccionar las nucleoproteínas del VFHCC y con ello, también, frenar la replicación del virus.

El VFHCC también es capaz de antagonizar la respuesta inmune innata. El segmento L codifica un dominio de desubiquitinasa tipo tumor de ovario (OTU) que ha sido recientemente identificado como capaz de bloquear las respuestas inmunes innata a través de la desubiquitinación de proteínas implicadas en sus cascadas de señalización.

Respuesta inmune adaptativa:

El rol de la respuesta inmune adaptativa es menos claro. Se describe que la ausencia de desarrollo de anticuerpos se asocia a mayor gravedad en la infección por este virus. De esta manera, el nivel de desarrollo de anticuerpos puede usarse como un predictor de gravedad.

Hasta la fecha, poco se conoce sobre la respuesta inmune adaptativa durante la infección por el VFHCC, esto es debido a la poca disponibilidad de modelos animales sostenibles. Los modelos realizados con ratones deficientes en interferón I han exhibido una rápida respuesta letal, lo que ha impedido evaluar la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, estudios realizados en ratones deficientes en STAT1 han demostrado una activación temprana de linfocitos CD4 y CD8. Sin embargo, dichos linfocitos eran destruidos en el bazo al tercer día después de la infección con muerte temprana de los ratones, antes del desarrollo de anticuerpos detectables (119).

Clínica

Estudios de seroprevalencia realizados en diferentes zonas endémicas han demostrado que un porcentaje considerable de personas a las que se detectó anticuerpos tipo IgG, nunca habían presentado síntomas de fiebre hemorrágica. Se puede establecer que esta enfermedad es asintomática en un rango comprendido entre el 88% en Turquía (122) y el 100% en Grecia (38,123,124).

Por otra parte, los individuos que presentan síntomas pasan por una serie de fases:

1. Período de incubación, de 1 a 13 días. El tiempo se correlaciona directamente con la carga vírica y el tipo de transmisión (125).
 - a) Tras picadura de la garrapata, de uno a tres días.
 - b) Tras el contacto con sangre y fluidos corporales es habitualmente de tres a siete días. Se han descrito períodos de incubación más cortos en casos de infección nosocomial durante las etapas tardías de la enfermedad, que se asocian con altas cargas virales, así como diarrea, vómitos y hemorragia (51,52).
2. Fase prehemorrágica, de 1 a 7 días. Esta etapa es el período ideal para la toma de muestra para PCR, y se caracteriza por la aparición de síntomas inespecíficos como mialgias, fiebre, náuseas y vómitos.
3. Fase hemorrágica, en la que comienza a disminuir la viremia y empiezan a aparecer los anticuerpos tipo IgM, y poco tiempo después los de tipo IgG. En esta fase el paciente puede experimentar una serie de síntomas graves como son la aparición de hematemesis y melenas, petequias y equimosis **Figura 7**. Con frecuencia se asocia, además, a una alteración del estado de consciencia. Los fallecimientos asociados a la FHCC se producen durante esta fase. Los síntomas más comunes se resumen en la **Tabla 5**. Los hallazgos analíticos característicos de esta fase se caracterizan por la presencia de trombocitopenia (<50.000 plaquetas), leucopenia (<3000 leucocitos), elevación de transaminasas (>4 veces el límite superior), prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) (>42.7 seg), tiempo de protrombina (TP) (>18.4 seg).

Figura 7: Manifestaciones hemorrágicas asociadas a la FHCC (Tomado de Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. Antiviral Res. 2013 y Leblebicioglu H. Crimean-Congo hemorrhagic fever - UpToDate . 2019 (4,126)



Tabla 5: Frecuencia de los principales síntomas de la fase hemorrágica de la FHCC

	Yilmaz 2009 (127)	Sharifi- Mood 2008 (128)	Çevic 2008 (125)	Karakeçili 2008 (129)	Elaldi 2009 (130)
País	Turquía	Irán	Turquía	Turquía	Turquía
Número de pacientes	1600	34	69	206	218
Síntomas y signos (%)					
Fiebre	89	82.3	85.5	89.8	ND
Manifestaciones hemorrágicas	23	58.8	36.2		41.7
Malestar general/pérdida de apetito	ND	ND	82.6	97.5	ND
Náuseas	65	ND	50.7	62.1	36.7
Vómitos	43	ND			
Mialgias	70	ND	87	92.2	81.2
Cefalea	68	ND	65.2		76.6
Diarrea	25	ND	20.3	28.1	ND
Dolor abdominal	53	ND	ND	ND	ND
Erupción maculopapular	-	ND	10.1	6.8	28.4
Esplenomegalia	ND	32.4	17.9	ND	8.2
Hepatomegalia	ND	14.7	18.8	ND	20.6
Petequias	ND	58.8	20.3	ND	ND
Epistaxis	ND	44.1	26.1	ND	ND
Hematuria	ND	23.5	5.8	ND	ND
Gingivorragia	ND	ND	15.9	ND	ND
Hematemesis	ND	41.2	13	ND	ND
Melena	ND	26.5	17.4	ND	ND

ND: No descrito

- Convalecencia: En los individuos que superan la fase clínica, tras 10-14 días de sintomatología, se produce el período de convalecencia que generalmente dura hasta cuatro semanas y finaliza sin secuelas a largo plazo (126). Este período es caracterizado serológicamente por la presencia de anticuerpos tipo IgM hasta el cuarto mes y de anticuerpos tipo IgG que permanecen hasta 5 años tras la infección.

Diagnóstico diferencial

Se debe realizar diagnóstico diferencial con otras fiebres hemorrágicas como dengue, Ébola, Marburg, Lassa o fiebre amarilla. Todas estas entidades son capaces de producir fallo multiorgánico acompañado de hemorragia. Es por ello por lo que, el primer paso para establecer una diferencia entre estas entidades radica en la diferenciación epidemiológica y posteriormente en establecer un diagnóstico confirmatorio, a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o serología dependiendo del período evolutivo de la enfermedad.

Asimismo, debe hacerse diagnóstico diferencial con otras infecciones relacionadas con el cuidado de animales como brucelosis, tularemia, fiebre Q o tifus exantemático (también relacionado con la picadura de garrapatas).

Otras entidades infecciosas como la malaria (sobre todo aquella producida por *Plasmodium falciparum*), la meningococemia o las hepatitis víricas también deben ser incluidas en el diagnóstico diferencial (**Tabla 6**) debido a que estas entidades se pueden presentar como *purpura fulminans*, presentándose como patologías que pueden poner en riesgo el pronóstico vital del paciente debido al riesgo de hemorragias generalizadas.

Tabla 6: Diagnóstico diferencial de patologías infecciosas que pueden dar un cuadro clínico similar al de la FHCC (Modificado de Burt FJ. Laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Future Virology.* ; 2011. p. 831–41 (131))

	Vector	Zona geográfica
Enfermedades transmitidas por garrapatas		
Rickettsiosis (particularmente <i>R. conorii</i> y <i>R. africae</i>)	Garrapatas del género <i>Rhipicephalus</i>	En todo el mundo
Ehrlichiosis	Garrapatas del género <i>Rhipicephalus</i>	América, Asia, Medio Oriente, Europa
Babesiosis	Garrapatas del género <i>Ixodes</i>	En todo el mundo
Borreliosis	Garrapatas del género <i>Ixodes</i>	En todo el mundo
Síndrome de fiebre severa con trombocitopenia	Posiblemente garrapatas	China
Fiebres hemorrágicas virales		
Ébola	Desconocido	África, Filipinas
Fiebre de Marburg	Desconocido	África
Fiebre de Lassa	Contacto / transmisión por aerosol de orina y heces de roedores infectados	África occidental
Fiebre Lujo	Desconocido	Sur de África
Fiebre del valle del Rift	Mosquitos <i>Aedes</i> y <i>Culex</i>	África, Medio Oriente
Dengue	<i>Aedes aegypti</i>	Regiones tropicales y subtropicales
Fiebre amarilla	<i>Aedes aegypti</i>	África, centro y Sudamérica
Otros patógenos comunes		
Fiebre Q (<i>Coxiella burnetti</i>)	Transmisión zóotica	En todo el mundo
Septicemia bacteriana	No aplicable	En todo el mundo
Malaria	Mosquito <i>Anopheles</i>	Asia, África Subsahariana, Centro y Sudamérica
Leptospirosis	No aplicable	En todo el mundo
Hepatitis viral	No aplicable	En todo el mundo
Herpes viral	No aplicable	En todo el mundo

Desde un punto de vista más amplio la presencia de trombocitopenia y signos hemorrágicos deberá también hacer descartar patologías no infecciosas como la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) o la leucemia aguda.

Diagnóstico de confirmación

Para establecer el diagnóstico definitivo ante un caso de FHCC, se dispone de métodos indirectos como la serología y métodos directos como el aislamiento del virus y la biología molecular. Las muestras clínicas generalmente utilizadas para el diagnóstico son el suero y/o el plasma del individuo afectado. En infecciones fatales en las que no se dispone de muestras sanguíneas se pueden utilizar muestras de tejido hepático.

El virus se ha podido demostrar en otras muestras como las de orina y saliva de pacientes en la fase aguda de la infección, pero en un número limitado de casos, por lo que su uso y aplicabilidad en la práctica clínica no es rutinario.

Diagnóstico microbiológico

El cultivo es el método diagnóstico más fidedigno para el diagnóstico de la FHCC. Sin embargo, el mismo no suele utilizarse de rutina debido al elevado riesgo biológico asociado al aislamiento de este agente infeccioso, motivo por el cual en la actualidad se usa solamente con fines de investigación.

Por otra parte, debido a la importante labilidad del virus (22), su aislamiento está altamente condicionado a la evolución de la enfermedad (pacientes con síntomas hemorrágicos y elevada carga viral tendrán una probabilidad más alta de aislamiento viral que aquellos que tienen una enfermedad pauci o asintomática). Por otra parte también existe un condicionamiento al éxito del aislamiento del virus asociado al día en el que se toma la muestra clínica (presencia/ausencia de viremia), y con los métodos de conservación y transporte utilizados (132).

El VFHCC puede aislarse en cultivos de células de mamíferos susceptibles, o por inoculación intracerebral de ratones recién nacidos (de 1 día de vida). El VFHCC se replica en una amplia variedad de cultivos de células y líneas celulares primarias, incluidas las células Vero, las células embrionarias de pollo, riñón primario de ternera y las células BHK-21 (22); produciendo pocos

cambios citopáticos, haciendo necesaria la realización de una prueba de inmunofluorescencia (IF) para detectar e identificar el virus.

Diagnóstico serológico

La infección por FHCC se puede confirmar mediante la demostración de seroconversión, un aumento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos IgG en sueros emparejados, o la presencia de anticuerpos IgM en una sola muestra (1).

Actualmente, los métodos de ELISA e IF son los más usados para el diagnóstico de la infección por el VFHCC (131). La fijación del complemento, neutralización del virus, inmunodifusión en agarosa, inhibición de la hemaglutinación y pruebas de inhibición de la hemaglutinación pasiva inversa no se utilizan en la actualidad por su escasa sensibilidad (131,132). En contraste, la IF indirecta y el ELISA han demostrado ser técnicas rápidas y sensibles para detectar una respuesta inmune frente al VFHCC y pueden distinguir entre anticuerpos IgG e IgM (131).

El antígeno para las pruebas de IF indirecta generalmente se prepara a partir de cultivos celulares con VFHCC, donde se obtiene la detección posterior de la actividad de IgG e IgM usando conjugados de inmunoglobulina antihumana marcados con fluoresceína. Se ha descrito una línea celular HeLa que expresa continuamente nucleoproteína (NP) recombinante y un sistema de replicón de alfavirus que expresa NP recombinante en células BSR (un clon de BHK-21), útil para preparar antígeno para ensayos de IF indirecta. Como ya se ha mencionado, los cultivos de células infectadas con VFHCC requieren instalaciones de nivel de bioseguridad 4 para su preparación. Es por ello que el desarrollo de reactivos seguros utilizando estrategias recombinantes es un paso hacia el aumento de la capacidad de diagnóstico (131).

Se han descrito varias técnicas ELISA para detectar anticuerpos IgG e IgM. El antígeno extraído con sacarosa-acetona preparado a partir de una suspensión de cerebro de ratón infectado e inactivado con 0,1% de β -propiolactona se usa con frecuencia para ELISA, pero tiene también la desventaja de que se requieren instalaciones con nivel 4 de bioseguridad. Como alternativa segura, se han preparado varias NP recombinantes para su uso en ELISA (133). La NP recombinante expresada a partir de células de insecto, usando un sistema de baculovirus o expresado en células de mamífero a través de un replicón de alfavirus *Semliki Forest* recombinante, se ha descrito para detectar respuestas de anticuerpos en ELISA (134–136).

También se han descrito técnicas de ELISA con doble antígeno en una reacción tipo “sandwich”. Esta técnica también se basa en la detección de anticuerpos contra la nucleoproteína y sus antígenos también se obtienen por tecnología recombinante (137).

En la tabla 7 se resumen los principales métodos serológicos comerciales para la detección de anticuerpos tipo IgG y/o IgM con sus diferentes valores de sensibilidad y especificidad.

Tabla 7: Métodos de diagnóstico serológico comerciales actualmente disponibles (132)

Método diagnóstico	Nombre	Empresa comercial	Sensibilidad	Especificidad
IF IgM	Crimean-Congo Fever Mosaic 2	Euroimmun, Lubeca, Alemania	93,9	100
IF IgG	Crimean-Congo Fever Mosaic 2	Euroimmun, Lubeca, Alemania	86,1	100
ELISA IgM	VectoCrimea-CHF ELISA	Vector-Best, Novosibirsk, Rusia	87,8	98,9
ELISA IgG	VectoCrimea-CHF ELISA	Vector-Best, Novosibirsk, Rusia	80,4	100

Por otra parte, existen también disponibles métodos de ELISA de detección de antígeno diseñados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la NP y pruebas de hemaglutinación pasiva inversa que son ideales durante la fase aguda de la enfermedad (138).

Diagnóstico molecular

La primera técnica de RT-PCR para el diagnóstico del VFHCC se describió en 1996 usando un método convencional. Los cebadores oligonucleotídicos (designados F2 y R3) se diseñaron alineando el segmento S para siete cepas del virus geográficamente distintas e identificando una región conservada en todas las cepas (139). Los productos de la PCR se visualizaron después de la amplificación usando tinción con bromuro de etidio e hibridación por *Southern blot*

Años más tarde, se observó que la sensibilidad de la técnica podía mejorarse utilizando un par de *primers* internos (F3, R2), realizándose así una técnica anidada (*nested*) de RT-PCR. Asimismo, más recientemente se han descrito técnicas a tiempo real que permiten realizar la reacción a un

tiempo más corto que una RT-PCR convencional. En este procedimiento los productos de amplificación se visualizan durante la reacción utilizando un colorante que se intercala en el ADN o una tecnología de sonda específica de la secuencia. Los colorantes intercalantes detectan todo el ADN en la reacción, por lo tanto, la confirmación de amplicones específicos requiere un análisis de la curva de hibridación de los productos de PCR para discriminar entre productos de PCR específicos y secuencias de cebador-dímero. Por su parte, la tecnología de sonda específica de secuencia permite la detección específica del ácido nucleico y aumenta la sensibilidad del ensayo.

La detección del ARN vírico durante la fase aguda de la enfermedad se puede realizar mediante RT-PCR, la cual permite hacer un diagnóstico rápido y preciso de la infección con una elevada sensibilidad y especificidad (131). Este diagnóstico molecular se basa en la amplificación de zonas conservadas del ARN del VFHCC, el cual presenta una diversidad genética compleja que debe ser tomada en consideración cuando se diseñan los *primers*. Esta divergencia alcanza el 20%, 31% y 22% para los segmentos S, M y L, respectivamente (140).

La RT-PCR es un procedimiento que permite hacer el diagnóstico en laboratorios convencionales, ya que el ARN del virus es extraído de la muestra clínica (generalmente suero o plasma), a través de lisis utilizando sales de guanidina y, una vez extraído, el mismo ya no es infectivo por lo que, a partir de este paso, no requiere un laboratorio con nivel 4 de bioseguridad (131).

Recientemente, se ha desarrollado ensayos de tipo RT-PCR *multiplex* en los que se incluyen diversos agentes causantes de fiebre hemorrágica, entre los que se incluyen (aparte del VFHCC) los virus de Ébola, Marburg, virus del valle del Rift, dengue, fiebre amarilla y fiebre de Lassa (141,142)

Durante la presente década, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de técnicas que permitan el diagnóstico *in situ* (*point-of-care*), ya que en muchas oportunidades los brotes se producen en zonas donde no se dispone de equipamientos para realizar una RT-PCR. El ensayo *Reverse transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay* (RT-LAMP) debería facilitar la detección rápida y la diferenciación de una infección activa por VFHCC durante un brote de enfermedad en un entorno de escasos recursos en los trópicos. Por lo que, en 2013, científicos sudaneses describieron la primera técnica de RT-LAMP para la identificación de la cepa local (139). Los estudios de sensibilidad indicaron que este RT-LAMP detecta 10 fg de ARN de VFHCC utilizando la lectura de turbidez a simple vista (143). Asimismo, usando electroforesis en gel de agarosa, el ensayo RT-LAMP detecta una concentración de 0.1 fg de ARN del virus (equivalente a 50 partículas virales). Los estudios de especificidad indicaron que no se detecta reactividad cruzada con 1,0 pg

de ARN de los virus de fiebre hemorrágica relacionados, incluida fiebre del valle del Rift, dengue y fiebre amarilla. Asimismo, en 2019 un equipo de científicos rusos puso a punto otro kit para el diagnóstico molecular por RT-LAMP describiéndose que el mismo posee una elevada sensibilidad y especificidad, pero desconocemos los valores exactos de estos parámetros y cuáles cepas pueden ser detectadas por dicho kit (143).

Tratamiento específico y de soporte:

El enfoque actual para el tratamiento de la FHCC se basa en medidas de soporte, la vigilancia de la hemoglobina, el conteo plaquetario y los tiempos de coagulación del paciente, con transfusiones sanguíneas y de factores de la coagulación según sea necesario (como será descrito más adelante); así como el uso, aun controvertido de la ribavirina (56) a una dosis recomendada por la OMS de 30mg/Kg como dosis inicial, seguida de 15 mg/Kg cada 6 horas durante 4 días y luego 7,5 mg/Kg cada 8 horas durante 6 días.

El virus es sensible *in vitro* a este fármaco. Según los estudios publicados hasta la fecha (**Tabla 8**), la ribavirina se ha utilizado en el tratamiento de pacientes con FHCC con algún beneficio. Una revisión sistemática publicada dentro de la Cochrane (144) en el que se incluyeron un ensayo clínico con muestra obtenida aleatoriamente con 136 participantes y cuatro estudios no aleatorios con 612 participantes, concluyó que se desconoce realmente si la ribavirina reduce la mortalidad, la estancia hospitalaria, mejora el pronóstico o reduce la necesidad de administración de transfusiones plaquetarias. En cuanto a los efectos adversos, tampoco se logró determinar si la ribavirina se asocia o no a un incremento de la incidencia de anemia hemolítica o de otros efectos que lleven a la suspensión de la terapia.

Tabla 8: Estudios publicados, hasta la fecha sobre el uso de la ribavirina para la FHCC (144)

Estudio	Año	Número total de pacientes	Ribavirina		Sin ribavirina	
			Pacientes incluidos	Mortalidad	Pacientes incluidos	Mortalidad
Estudios clínicos aleatorizados controlados						
Koksal (146)	2010	144	64	4	72	4
Total		144	64	4	72	4
Estudios no aleatorizados						
Bodur (147)	2011	58	10	2	40	6
Dokuzoguz (148)	2013	304	235	18	46	5
Elaldi (131)	2009	238	126	9	11	92
Total		1032	563	41	313	115

La gammaglobulina hiperinmune puede disminuir la carga viral mediante la neutralización directa, aunque la variabilidad de la cepa vírica puede ser un determinante importante en el uso de esta terapia. Sin embargo, hasta la fecha, los datos son insuficientes para respaldar el uso rutinario de corticoides, inmunoglobulina intravenosa o plasmaféresis

Por todas estas razones, el tratamiento de soporte continúa siendo la piedra angular para el manejo de la FHCC. Se debe prestar especial atención al equilibrio hidroelectrolítico. Puede ser necesaria, además, la ventilación mecánica, la hemodiálisis, los vasopresores y los agentes inotrópicos, según el caso. El paracetamol puede usarse para controlar la fiebre y el dolor. Se debe evitar el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y la aspirina ya que estos agentes pueden afectar negativamente a la coagulación y aumentar el riesgo de sangrado.

La transfusión de un *pool* de plaquetas se debe instaurar con el fin de mantener el recuento de plaquetas > 50.000 en el contexto de sangrado y para pacientes con recuento de plaquetas < 20.000 en ausencia de sangrado. La necesidad de transfusión de sangre debe evaluarse en función del nivel de hemoglobina y del estado clínico general. Deben evitarse los procedimientos invasivos innecesarios para minimizar el riesgo de sangrado. En casos no graves, los síntomas generalmente se resuelven en 7 a 10 días. En ausencia de sangrado, las transaminasas y el recuento de plaquetas tienden a volver a los niveles normales después de 5 a 10 días.

Medidas de actuación hospitalaria

De acuerdo al protocolo del Ministerio de Sanidad español, se pueden clasificar los casos de la siguiente manera (145)

Caso sospechoso: Depende de los siguientes factores:

- Síntomas clínicos: Fiebre, mialgias, sangrado.
- Historia del paciente
- Procedencia de zona endémica
- Realización de actividades al aire libre: picnic, senderismo, escalada, ciclismo.
- Historia de picadura de garrapata.
- Exposición a un animal posiblemente infectado.
- Análisis de laboratorio: Trombocitopenia y leucocitosis, elevación de transaminasas, LDH, CK.

Medidas preventivas: Si se tiene un caso sospechoso deben ponerse en marcha una serie de medidas preventivas que incluyen:

- Aislamiento del paciente.
- Informar y educar al personal sanitario.
- Uso de medidas de barreras.

Confirmación de un caso: La positividad de la serología para demostrar la presencia de anticuerpos de la clase IgM y/o la positividad de la PCR confirma el diagnóstico.

Tratamiento específico y de soporte:

- Ribavirina (dosis recomendada por la OMS de 30mg/Kg como dosis inicial, seguida de 15 mg/Kg cada 6 horas durante 4 días y luego 7,5 mg/Kg cada 8 horas durante 6 días).
- No descuidar otras posibles causas del cuadro clínico. Se debe considerar iniciar doxiciclina o equivalente debido a la posibilidad de transmisión de borreliosis por la picadura de garrapata.
- Transfusión de plaquetas (se debe mantener un recuento de plaquetas $> 50.000 / \text{mm}^3$ en el contexto de sangrado y en pacientes con recuento de plaquetas inferior a $20.000 / \text{mm}^3$ en ausencia de sangrado)
- Transfusión de plasma fresco congelado (10-15 ml/Kg/día dividido en 2 dosis) si el TP/INR se encuentra por encima de 1,5 veces el límite superior o a PTT superior al límite de la normalidad (146).

- Reemplazo de fluidos con administración de cristaloides y transfusión eritrocitaria si existe una hemorragia con pérdida de >750 ml (>15 %).
- Paracetamol 10mg/Kg cada 4 - 6 horas para el manejo de la fiebre y el dolor. Otros medicamentos como el ibuprofeno y la aspirina deben ser evitados debido a que ambos pueden afectar el proceso de coagulación normal.
- Hemodiálisis, si insuficiencia renal, hiperpotasemia, acidosis metabólica, pericarditis urémica.
- Ventilación mecánica en caso de insuficiencia respiratoria $PaO_2 < 55\text{mmHg}$ con $FiO_2 > 60\%$, $PaCO_2 > 45\text{ mm Hg}$, $pH < 7,3$

Seguimiento: En vista de que no se produce una recaída después de la enfermedad, por lo tanto, no hay necesidad de seguimiento. Por su parte, los trabajadores de la salud expuestos a pacientes infectados con FHCC o a sus fluidos corporales deben ser seguidos con hemogramas completos y control de pruebas bioquímicas durante 14 días.

Factores pronósticos y riesgo de mortalidad

Se han validado varios marcadores para predecir el riesgo de mortalidad que, dependiendo de la puntuación del valor obtenido, determinan en porcentaje el riesgo de mortalidad que tiene el paciente. A continuación, describiremos los indicadores descritos por Dokuzoguz *et al.* (147) en 2013 (Tabla 9).

Tabla 9: Indicadores de gravedad de la FHCC (Tomado de Dokuzoguz B, Celikbas AK, Gök ŞE, Baykam N, Eroglu MN, Ergönül Ö. Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. Clinical infectious diseases. 2013 Nov 1;57(9):1270-4)) (147)

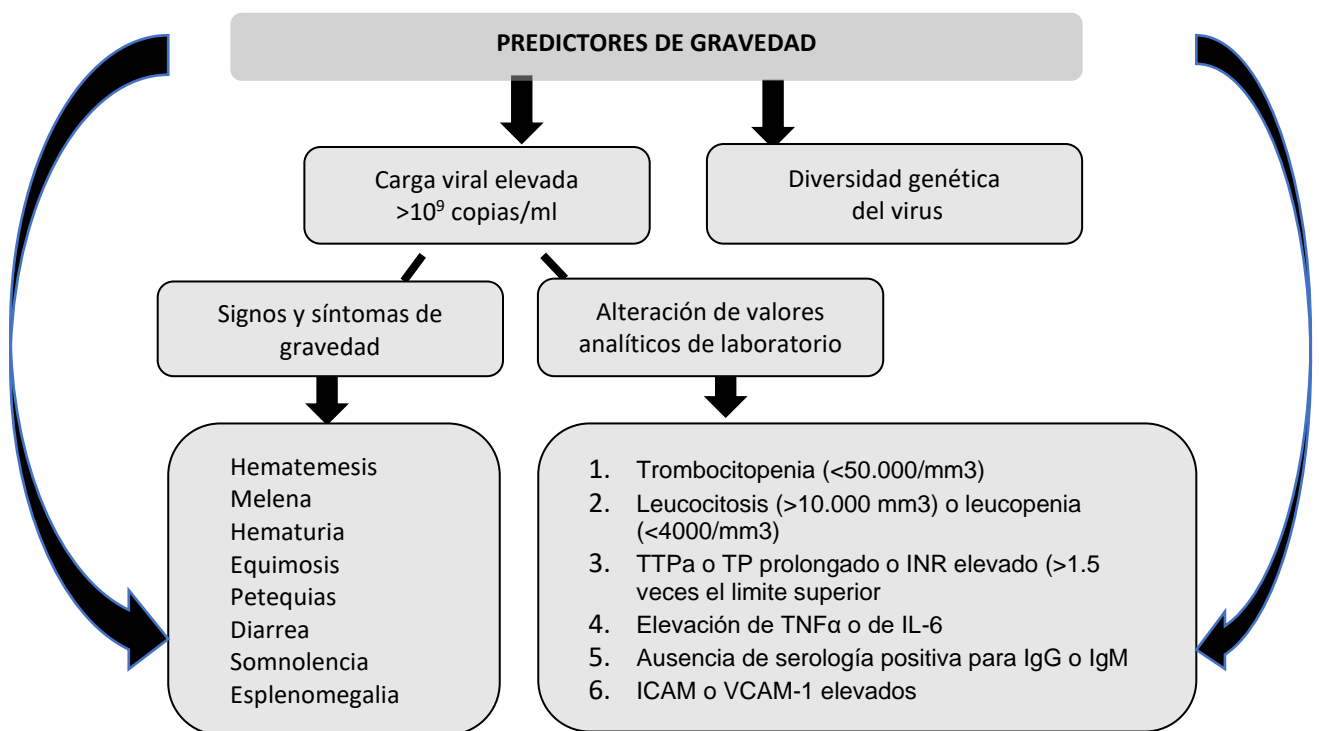
Magnitudes de gravedad	Score
Recuento plaquetario × 10³ plaquetas/mm³	
>150	0
150–50	1
49–20	2
<20	3
TTPa, segundos	
≤34	0
35–45	1
46–59	2
>60	3
Nivel de fibrinógeno, mg/dL	
≥180	0
179–160	1
159–120	2
<120	3
Sangrado	
No	0
Petequial	1
Equimosis	2
Sangrado evidente	3
Somnolencia	
No	0
Si	1

De acuerdo con este marcador podemos clasificar los pacientes en 3 grupos:

Puntaje	Riesgo de mortalidad
0 – 3	Riesgo leve de mortalidad
4- 10	Riesgo moderado
>10	Riesgo elevado

Así mismo, se describen otras magnitudes como el valor de la carga viral y la diversidad genética del virus como factores pronósticos, como se muestra en la **Figura 9**.

Figura 9: Principales predictores de gravedad de la FHCC (Modificado de Akinci E, Bodur H, Sunbul M, Leblebicioglu H. Prognostic factors, pathophysiology and novel biomarkers in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral research. 2016 Aug 1;132:233-43 (148)



Prevención y vacunas

La prevención consiste básicamente en evitar la exposición a las garrapatas y evitar el contacto con fluidos corporales animales. Los residentes y viajeros a zonas endémicas deben ser educados sobre las medidas de protección personal para evitar las picaduras de garrapatas (149,150) Asimismo, el uso de ropa de colores claros permite detectar fácilmente las garrapatas, y el uso de camisas de manga larga, pantalones y calcetines es útil para minimizar la exposición. El uso de N, N-dietil-m-toluamida (DEET) al 20-30% como repelente cutáneo proporciona cierta protección. Deben evitarse las áreas boscosas en las estaciones cálidas cuando las garrapatas están más

activas. Las garrapatas no deben manipularse con las manos sin guantes y no deben aplastarse ni exprimirse y una vez que una garrapata es retirada de una persona, la piel se debe limpiar con antisépticos.

Por su parte, el control de FHCC en animales es sumamente complejo, se deben establecer áreas restringidas para la matanza. Y, para reducir el riesgo de infección humana durante dicho sacrificio/matanza, los animales deberían permanecer en cuarentena durante 14 días antes del sacrificio (148). Otra medida sería el uso de acaricidas, los cuales son efectivos contra las garrapatas en el ganado y deben aplicarse a los animales antes de ingresar a los mataderos. En cuanto a los trabajadores de mataderos, los mismos deberían usar ropa y guantes protectores impermeables durante el sacrificio, la carnicería y la manipulación de animales.

En cuanto al uso de vacunas, hasta la fecha no se dispone de una vacuna autorizada para el VFHCC (151). Desde 1970, se ha desarrollado un modelo de vacuna inactivada derivada del cerebro de ratón lactante. La misma, se administra en tres dosis con una dosis de refuerzo después de cinco años y ofrece protección variable (152). Dicha vacuna está autorizada en Bulgaria y se usa a pequeña escala en Europa del Este, pero es poco probable que obtenga la aprobación regulatoria internacional debido a ciertas dudas sobre su eficacia y riesgo alérgico.

Las vacunas veterinarias pueden ser un enfoque alternativo o complementario a las vacunas humanas. Vacunar al ganado contra el VFHCC podría desempeñar un papel importante en la prevención de la infección humana al controlar la exposición durante la matanza de animales, así como también la interrupción del ciclo del vector durante la alimentación de las garrapatas. Sin embargo, el control de la infección por VFHCC en las poblaciones de vida silvestre seguirá siendo un desafío ya que actualmente no hay vacunas disponibles para su uso en animales.

Banco de Sangre y su importancia en el cribado del VFHCC

Los protocolos de la Organización Mundial de Transfusión Avanzada y Terapias Celulares no han establecido, hasta la actualidad, la necesidad de detectar VFHCC en sangre u otros productos derivados de la sangre, ni la necesidad de diferir una donación de sangre o algún otro hemoderivado por esta causa (153). Esto es debido a que los datos disponibles son insuficientes para hacer una recomendación para excluir un producto de donación de sangre en zonas de endemicidad.

La realización de estudios de seroprevalencia en donantes permitiría estudiar la incidencia en zonas determinadas donde la enfermedad pudiera estar progresando de manera silente.

INVESTIGACIÓN SOBRE EL VFHCC: SITUACIÓN ACTUAL

Situación en España

En 1985 Filipe *et al.* (154) habían demostrado la presencia de anticuerpos anti-VFHCC en centro-este de Portugal, en la frontera con España. Posteriormente, en 2013, se publicó el primer estudio que demostró la circulación del virus en garrapatas obtenidas de ciervos en las márgenes del río Tajo, a su paso por la provincia de Cáceres. Se planteó que esta introducción del virus se realizó a través de aves migratorias provenientes del norte de África.

Durante el verano de 2016 se identificó el primer caso autóctono de FHCC en España (9). Este primer caso se describió en un hombre de 62 años que sufrió una picadura de garrapata en la provincia de Ávila, y que posteriormente falleció por una FHCC en un centro hospitalario de Madrid (9)

Días después se describió un segundo caso en una enfermera que había atendido al primer paciente (7). Estos dos pacientes representan los primeros casos autóctonos descritos en el sudoeste europeo, demostrando así que el virus, que previamente había sido solo identificado en garrapatas en las márgenes del río Tajo, en Cáceres, está ya circulando en humanos. Durante el verano de 2017 y 2018 se describieron otros 2 casos, en la provincia de Badajoz y en la provincia de Salamanca, respectivamente (117). Durante el verano de 2020, las Autoridades Sanitarias han notificado dos nuevos casos de FHCC en la provincia de Salamanca incluyendo el fallecimiento de uno de ellos.

Posteriormente a este surgimiento de la enfermedad, se comenzaron a realizar estudios más exhaustivos para determinar mejor la epidemiología del VFHCC en la España peninsular. Un estudio en el que se analizaron 228 sueros de personas de Cáceres y La Rioja, en el período 2010-2014, no demostró la presencia de anticuerpos tipo IgG en ninguno de los individuos estudiados (8). Este resultado pudo deberse a que la muestra analizada no es significativa de la población de dichas comunidades autónomas.

En 2019, se publicó un estudio en el que se evaluó la presencia de VFHCC en garrapatas que se encontraban parasitando animales domésticos y salvajes, durante el período 2011 – 2015. Se demostró la presencia de garrapatas infectadas parasitando ganado no solo salvaje, sino doméstico en zonas del centro-oeste del territorio (155). Este hecho es de gran relevancia ya que, como se ha

mencionado previamente, esto implica un riesgo aumentado para los habitantes expuestos en dichas zonas y zonas aledañas.

En cuanto a la diversidad genética encontrada en el territorio español, hasta 2020 se había reportado la circulación solo de la cepa África III (genotipo I de la clasificación de Carroll *et al.* (32)). Según los estudios realizados (43,155,156), la misma se introdujo a través de aves migratorias provenientes del norte de África. Recientemente, un estudio demostró la presencia del genotipo V en garrapatas *Hyalomma* spp. y *Dermacentor* spp. extraídas de animales salvajes (32)) con lo que se concluye que este genotipo del este de Europa, también se encuentra circulando de manera silvestre en zonas del oeste de España.

Sería de interés realizar estudios serológicos en animales domésticos para determinar mejor las zonas de mayor riesgo de adquisición del VFHCC. En dicho estudio sería de interés además incluir animales provenientes del centro-oeste de Portugal para aumentar el conocimiento sobre la epidemiología del virus en toda la península Ibérica.

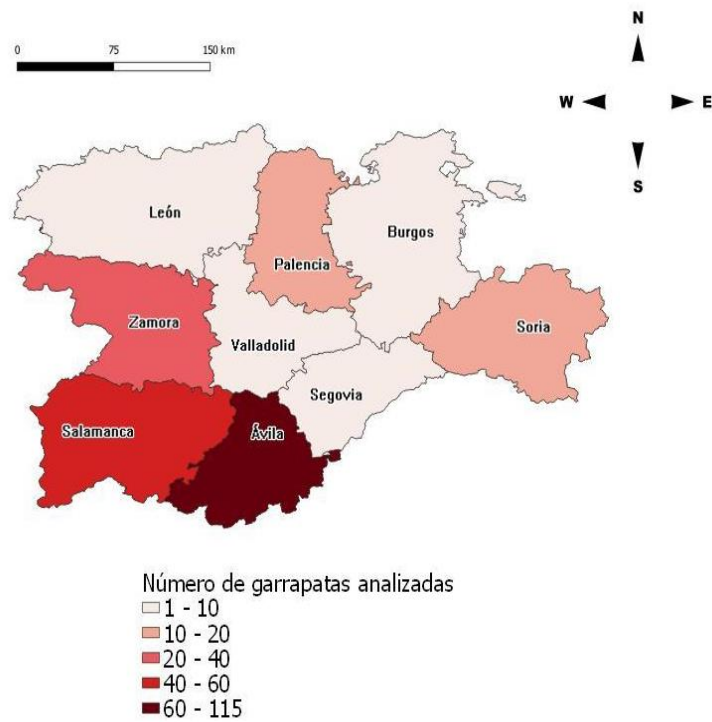
Programa de detección de virus en garrapatas

La Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, a través de la Dirección General de Salud Pública desarrolla un conjunto de actividades para la prevención y el control de las antropozoonosis transmitidas por garrapatas. Las garrapatas son transportadas desde los centros de salud de Castilla y León al laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Tropicales perteneciente al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), el cual sirve como principal centro diagnóstico para la investigación de otras infecciones transmitidas por garrapatas como *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. y *Borrelia* spp., etc.

En el laboratorio se procede a la extracción del material genético. Posteriormente, se envían las muestras al Centro Nacional de Microbiología en Majadahonda, Madrid donde se procede a realizar la RT-PCR para VFHCC, a través de un procedimiento *in-house* descrito por Negro *et al.* en 2016 (9).

Hasta 2018, se habían estudiado 242 garrapatas del género *Hyalomma*, la mayoría de dichas garrapatas provenía de la provincia de Ávila donde se produjo el primer caso autóctono (Figura 10). Durante el estudio no se encontró presencia de ARN para el VFHCC en ninguna de las garrapatas estudiadas (155).

Figura 10: Distribución por provincias de Castilla y León del género *Hyalomma* spp. estudiadas para la detección del VFHCC (157)



2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitehouse CA. Crimean Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2004 Dec;64(3):145–60
2. Dreshaj S, Ahmeti S, Ramadani N, Dreshaj G, Humolli I, Dedushaj I. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel Med Infect Dis.* 2016 Mar 1;14(2):81–91
3. Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 2006 Apr;6(4):203–14.
4. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 2013 Oct;100(1):159–89
5. World Health Organization. WHO List of blueprint priority pathogens. Geneva, Switzerland; 2017
6. World Health Organization. An R&D Blueprint for Action to Prevent Epidemics: Plan of Action Geneva, Switzerland; 2016
7. García Rada A. First outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in western Europe kills one man in Spain. *BMJ.* 2016 Sep 8;354:i4891
8. Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jan ;18(1):179–80
9. Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al. Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med* 2017 Jul 13;377(2):154–61
10. Palomar AM, Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Muñoz-Sanz A, Márquez FJ, et al. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013–2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(6):344–7.
11. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Changes to

- taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2017 Aug ;162(8):2505–38
12. Kuhn JH, Clawson AN, Radoshitzky SR, Wahl-Jensen V, Bavari S, Jahrling PB. Viral hemorrhagic fevers: history and definitions. In *Viral Hemorrhagic Fevers* 2016 Apr 19 (pp. 22-33). CRC Press
 13. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: A reemerging threat. *Clin Lab Med.* 2010 Mar;30(1):237–60
 14. Gubler DJ. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and Current Status. In: *New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases.*; 2008. p. 3–22.
 15. Shuman EK. Global Climate Change and Infectious Diseases. *N Engl J Med.* 2010 Mar 25;362(12):1061–3
 16. López R, Molina R. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev Esp Salud Publica.* 2005;79(2):177–90
 17. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res.* 2013 May ;98(2):248–60
 18. De La Rocque S, Balenghien T, Halos L, Dietze K, Claes F, Ferrari G, et al. A review of trends in the distribution of vector-borne diseases: Is international trade contributing to their spread? *Revue scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 30 (1): 119-130
 19. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Vol. 380, *The Lancet.* 2012;380: 1946–55
 20. Towner JS, Khristova ML, Sealy TK, Vincent MJ, Erickson BR, Bawiec DA, et al. Marburgvirus Genomics and Association with a Large Hemorrhagic Fever Outbreak in Angola. *J Virol.* 2006 Jul 1;80(13):6497–516
 21. Murphy FA. Historical perspective: what constitutes discovery (of a new virus)?. In *Advances in virus research* 2016 Jan 1 (Vol. 95, pp. 197-220). Academic Press.
 22. Hoogstraal H. The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol.* 1979 May 22;15(4):307–417

23. Chumakov MP. A new tick-borne virus disease—Crimean hemorrhagic fever. Crimean hemorrhagic fever (acute infectious capillary toxicosis). Simferopol, Moscow: Izd Otd Primorskoi Armii. 1945:13-45
24. Simpson DI, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbren MP, Kibukamusoke JW. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations--clinical notes. East Afr Med J. 1967 Feb;44(2):86–92
25. Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova N V, Mart'ianova LI, Smirnova SE, Bashkirtsev IN, et al. New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever. Vopr Virusol ;13(3):377.
26. Casals J. Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus. Proc Soc Exp Biol Med. 1969;131(1):233–6
27. Ballinger MJ, Medeiros AS, Qin J, Taylor DJ. Unexpected differences in the population genetics of phasmavirids (Bunyavirales) from subarctic ponds. Virus Evol. 2017 Jan;3(1):vex015
28. Marriott AC, Nuttall PA. Molecular biology of nairoviruses. In The Bunyaviridae 1996 (pp. 91-104). Springer, Boston, MA
29. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. J Virol. 2006 Sep 1;80(17):8834–42
30. Zhang Y, Shen S, Fang Y, Liu J, Su Z, Liang J, et al. Isolation, Characterization, and Phylogenetic Analysis of Two New Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains from the Northern Region of Xinjiang Province, China. Virol Sin. 2018 Feb 1;33(1):74–86
31. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genomics and Global Diversity. J Virol. 2006 Sep 1;80(17):8834–42
32. Carroll SA, Bird BH, Rollin PE, Nichol ST. Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Mol PhylogenetEvol. 2010 Jun;55(3):1103–10
33. Atkinson B, Chamberlain J, Jameson LJ, Logue CH, Lewis J, Belobrova EA, et al. Identification and analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from human sera in Tajikistan. Int J Infect Dis. 2013 Nov ;17(11):e1031-7
34. Sherifi K, Cadar D, Muji S, Robaj A, Ahmeti S, Jakupi X, Emmerich P, Krüger A. Crimean-

- Congo hemorrhagic fever virus clades V and VI (Europe 1 and 2) in ticks in Kosovo, 2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 25;8(9):e3168
36. Akuffo R, Brandful JAM, Zayed A, Adjei A, Watany N, Fahmy NT, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in livestock ticks and animal handler seroprevalence at an abattoir in Ghana. *BMC Infect Dis*. 2016 Dec 8 ;16(1):324
 37. Maltezou HC, Maltezos E, Papa A. Contact tracing and serosurvey among healthcare workers exposed to Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2009 Jan 18;41(11–12):877–80
 38. Sidira P, Nikza P, Danis K, Panagiotopoulos T, Samara D, Maltezou H, et al. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in Greek residents in the area where the AP92 strain was isolated. *Hippokratia*. 2013 Oct;17(4):322–5
 39. Hawman DW, Feldmann H. Recent advances in understanding Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *F1000Research*. 2018;7
 40. Papa A, Tsergouli K, Tsioka K, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: tick-host-virus interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017 May 26;7:213
 41. Fillâtre P, Revest M, Tattevin P. Crimean-Congo hemorrhagic fever: An update. *Medecine et maladies infectieuses*. 2019 Nov 1;49(8):574-85
 42. Spengler JR, Estrada-Peña A, Garrison AR, Schmaljohn C, Spiropoulou CF, Bergeron É, et al. 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*. 2016 Nov 1;135:31–47
 43. Leblebicioglu H, Eroglu C, Erciyas-Yavuz K, Hokelek M, Acici M, Yilmaz H. Role of Migratory Birds in Spreading Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2014 Aug;20(8):1331–4
 44. Pascucci I, Di Domenico M, Capobianco Dondona G, Di Gennaro A, Polci A, Capobianco Dondona A, et al. Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: An Italian experience. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019 Oct 1;10(6):101272
 45. Palomar AM, Portillo A, Santibáñez P, Mazuelas D, Arizaga J, Crespo A, et al. Crimean-congo

- hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):260–3.
46. Földes F, Madai M, Németh V, Zana B, Papp H, Kemenesi G, et al. Serologic survey of the Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection among wild rodents in Hungary. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Oct 1;10(6):101258
 47. Kasi KK, Sas MA, Sauter-Louis C, von Arnim F, Gethmann JM, Schulz A, et al. Epidemiological investigations of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in sheep and goats in Balochistan, Pakistan. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020 Mar 1;11(2):101324
 48. Leblebicioglu H, Ozaras R, Irmak H, Sencan I. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges *Antiviral Research.*; 2016(126):21–34
 49. Ftika L, Maltezou HC. Viral haemorrhagic fevers in healthcare settings. *J Hosp Infect.* 2013 Mar;83(3):185–92
 50. Richards GA. Nosocomial transmission of viral haemorrhagic fever in South Africa. *S Afr Med J.* 2015 Sep;105(9):709–12
 51. Naderi H, Sheybani F, Bojdi A, Khosravi N, Mostafavi I. Fatal nosocomial spread of Crimean-Congo hemorrhagic fever with very short incubation period. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Mar;88(3):469–71
 52. Leblebicioglu H, Sunbul M, Guner R, Bodur H, Bulut C, Duygu F, et al. Healthcare-associated Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, 2002-2014: A multicentre retrospective cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Apr 1;22(4):387.e1-387.e4
 53. Pshenichnaya NY, Nenadskaya SA. Probable Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission occurred after aerosol-generating medical procedures in Russia: nosocomial cluster. *Int J Infect Dis.* 2015 Apr 1;33:120–2
 54. Tsergouli K, Karampatakis T, Haidich AB, Metallidis S, Papa A. Nosocomial infections caused by Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. Vol. 105, *Journal of Hospital Infection.* 2020 (105):43–52
 55. Roth C, Formenty P. Application for Inclusion of Ribavirin in the WHO Model List of Essential Medicines. World Health Organisation. 2006:1-31

56. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008 Apr 1;78(1):125–31
57. Harxhi A, Pilaca A, Delia Z, Pano K, Rezza G. Crimean-Congo hemorrhagic fever: a case of nosocomial transmission. *Infection.* 2005 Aug 1;33(4):295
58. Papa A, Bino S, Papadimitriou E, Velo E, Dhimolea M, Antoniadis A. Suspected Crimean Congo Haemorrhagic Fever cases in Albania. *Scand J Infect Dis.* 2008 Jan 8;40(11–12):978–80
59. Conger NG, Paolino KM, Osborn EC, Rusnak JM, Günther S, Pool J, et al. Health Care Response to CCHF in US Soldier and Nosocomial Transmission to Health Care Providers, Germany, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):23–31
60. Christova I, Di Caro A, Papa A, Castilletti C, Andonova L, Kalvatchev N, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Southwestern Bulgaria. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jun;15(6):983–5
61. Kunchev A, Kojouharova M. Probable cases of Crimean-Congo-haemorrhagic fever in Bulgaria: a preliminary report. *Euro Surveill.* 2008 Apr 24;13(17):18845
62. Mishra AC, Mehta M, Mourya DT, Gandhi S. Crimean-Congo haemorrhagic fever in India. *The Lancet.* 2011 Jul 23;378(9788):372
63. Patel AK, Patel KK, Mehta M, Parikh TM, Toshniwal H, Patel K. First Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in India. *J Assoc Physicians India.* 2011 Sep;59(9):585–9
64. Yadav PD, Raut CG, Mourya DT. Re-occurrence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Ahmedabad, Gujarat, India (2012): a fatal case report. *The Indian journal of medical research.* 2013 Dec;138(6):1027
65. Yadav PD, Patil DY, Shete AM, Kokate P, Goyal P, Jadhav S, et al. Nosocomial infection of CCHF among health care workers in Rajasthan, India. *BMC Infect Dis.* 2016 Nov 3;16(1):624
66. Chinikar S, Shayesteh M, Khakifirouz S, Jalali T, Rasi Varaie FS, Rafigh M, et al. Nosocomial infection of Crimean-Congo haemorrhagic fever in eastern Iran: Case report. *Travel Med Infect Dis.* 2013 Jul 1;11(4):252–5
67. Pourahmad M, Raoofi R, Chinikar S, Mojtaba Ghiasi S, Ghalyanchi-Langeroudi A. Nosocomial transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever in a health care worker, Fars Province,

- Iran. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2011; 6(1):47-50
68. Naderi HR, Sarvghad MR, Bojdy A, Hadizadeh MR, Sadeghi R, Sheybani F. Nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect.* 2011 Jun;139(6):862–6.
 69. Zohourian P, Amini AS, Davoodi R, Shojaeian M. Analysis of the Root Causes of an Undesirable Incident in a Hospital in Mashhad, 2013. *Bangladesh Journal of Medical Science.* 2016;15(4):637-44
 70. Abuova G, Pshenichnaya N, Irsimbetova N, Apsatarov Z. Clinical and epidemiological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever in pregnant women in South Kazakhstan. *Int J Infect Dis.* 2012 Jun 1;16:e66
 71. Pshenichnaya NY, Leblebicioglu H, Bozkurt I, Sannikova IV, Abuova GN, Zhuravlev AS, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in pregnancy: A systematic review and case series from Russia, Kazakhstan and Turkey. *Int J Infect Dis.* 2017 May;58:58–64
 72. Tegnell A, Dannelun E, Andersson M, Elgh F. Crimean-Kongo hemorrhagic fever in Kosovo. *Lakartidningen.* 2001 Dec;98(49):5670-1
 73. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, Faye O, Vall IOM, Niang M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2143–9
 74. Smego RA, Sarwari AR, Siddiqui AR. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Prevention and Control Limitations in a Resource-Poor Country. *Clin Infect Dis.* 2004 Jun 15;38(12):1731–5
 75. Jamil B, Hasan RS, Sarwari AR, Burton J, Hewson R, Clegg C. Crimean-Congo hemorrhagic fever: experience at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 Aug 1;99(8):577–84
 76. Athar MN, Baqai HZ, Ahmad M, Khalid MA, Bashir N, Ahmad AM, et al. Short report: Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(3):284–7
 77. Hasan Z, Mahmood F, Jamil B, Atkinson B, Mohammed M, Samreen A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever nosocomial infection in a immunosuppressed patient, Pakistan: Case report and virological investigation. *J Med Virol.* 2013 Mar 1;85(3):501–4
 78. Syed MA, Jhatyal H. An epidemiological investigation of a multisource outbreak of Crimean-

- Congo hemorrhagic fever in Karachi, from January– 15th September 2016. *Int J Infect Dis* . 2016 Dec 1;53:9–10
79. Papa A, Bozovic B, Pavlidou V, Papadimitriou E, Pelemis M, Antoniadis A. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(8):852–4
 80. Weidmann M, Avsic-Zupanc T, Bino S, Bouloy M, Burt F, Chinikar S, Christova I, Dedushaj I, El-Sanousi A, Elaldi N, Hewson R. Biosafety standards for working with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*. 2016 Nov 10;97(11):2799-808
 81. Aradaib IE, Erickson BR, Mustafa ME, Khristova ML, Saeed NS, Elageb RM, et al. Nosocomial outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever, Sudan. *Emerg Infect Dis*. 2010 May;16(5):837–9
 82. Elata AT, Karsany MS, Elageb RM, Hussain MA, Eltom KH, Elbashir MI, et al. A nosocomial transmission of crimean-congo hemorrhagic fever to an attending physician in north kordufan, Sudan. *Virol J*. 2011 Jun 15;8(1):1–7
 83. Tishkova FH, Belobrova EA, Valikhodzhaeva M, Atkinson B, Hewson R, Mullojonova M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Tajikistan. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2012 Sep 1;12(9):722–6
 84. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* . 2004 Aug;10(8):1379–84
 85. Celikbas AK, Dokuzoğuz B, Baykam N, Gok SE, Eroğlu MN, Midilli K, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2014 Mar;20(3):477–9
 86. Gürbüz Y, Sencan I, Öztürk B, Tütüncü E. A case of nosocomial transmission of Crimean–Congo hemorrhagic fever from patient to patient. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009 May 1;13(3):e105-7
 87. Tütüncü EE, Gurbuz Y, Ozturk B, Kuscu F, Sencan I. Crimean Congo haemorrhagic fever, precautions and ribavirin prophylaxis: A case report. *Scand J Infect Dis* . 2009 Jan 8;41(5):378–80
 88. Ozsoy S, Gokmen A, Ozdemir M, Akduman B, Korkusuz I, Javan GT. Medical examiners and

- Crimean-Congo hemorrhagic fever contamination risk. *J Forensic Leg Med.* 2015 Nov 15;36:32–6
89. Guner R, Hasanoglu I, Tasyaran MA, Yapar D, Keske S, Guven T, et al. Is Ribavirin Prophylaxis Effective for Nosocomial Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever? *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2014 Aug 1;14(8):601–5
90. Parlak E, Koşan Z, Ertürk A, Parlak M, Özkut Z. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Microbiology & Infectious Diseases.* 2015 Mar 1;5(1)
91. Yildirmak T, Tulek N, Bulut C. Crimean–Congo haemorrhagic fever: transmission to visitors and healthcare workers. *Infection.* 2016 Oct 1;44(5):687–9
92. Sunbul M, Esen S, Fletcher TE, Dilek A, Guler N, Beeching NJ, et al. A fatal case of healthcare associated Crimean-Congo haemorrhagic fever with severe disease and multi-organ failure. *J Infect.* 2016 Feb;72(2):253-5
93. Nasirian H. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) seroprevalence: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2019 Aug;196:102–20
94. Leblebicioglu H. Crimean–Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int J Antimicrob Agents .* 2010 Nov;36:S43–6
95. World Health Organization. Crimean-Congo haemorrhagic fever. World Health Organization. Geneva, Switzerland; 2017
96. World Health Organization. Blueprint for R&D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens. Geneva, Switzerland; 2015
97. World Health Organization. An R&D blueprint action to prevent epidemics (Plan of Action). Geneva, Switzerland 2016
98. Liang G, Li X, Gao X, Fu S, Wang H, Li M, Lu Z, Zhu W, Lu X, Wang L, Cao Y. Arboviruses and their related infections in China: A comprehensive field and laboratory investigation over the last 3 decades. *Reviews in Medical Virology.* 2018 Jan;28(1):e1959
99. Nurmakhanov T, Sansyzbaev Y, Atshabar B, Deryabin P, Kazakov S, Zholshorinov A, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Kazakhstan (1948-2013). *Rev Med Virol.* 2018 Jan;28(1)

100. Mustafa ML, Ayazi E, Mohareb E, Yingst S, Zayed A, Rossi CA, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Afghanistan, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1940–1
101. Niazi AUR, Jawad MJ, Amirnajad A, Durr PA, Williams DT. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Herat Province, Afghanistan, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2019 Aug;25(8):1596-1598.
102. Athar MN, Khalid MA, Ahmad AM, Bashir N, Baqai HZ, Ahmad M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002: Contact tracing and risk assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Apr;72(4):471–3
103. Karim AM, Hussain I, Lee JH, Park KS, Lee SH. Surveillance of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Pakistan. *Lancet Infect Dis.* 2017 Aug;17(8):806
104. Chinikar S, Ghiasi SM, Hewson R, Moradi M, Haeri A. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran and neighboring countries. *J Clin Virol.* 2010 Feb 1;47(2):110–4
105. Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, Ghiasi SM, Mirahmadi R, Haeri A, et al. Surveillance and laboratory detection system of crimean-congo haemorrhagic fever in Iran. *Transbound Emerg Dis.* 2008 Aug;55(5–6):200–4
106. Keshtkar-Jahromi M, Sajadi MM, Ansari H, Mardani M, Holakouie-Naieni K. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Antiviral Res.* 2013 Oct;100(1):20-8
107. Dunster L, Dunster M, Ofula V, Beti D, Kazooba-Voskamp F, Burt F, et al. First documentation of human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):1005-6
108. Nabeth P, Thior M, Faye O, Simon F. Human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Sénégal. *Emerg Infect Dis.* 2004 Oct;10(10):1881-2
109. Kizito S, Okello PE, Kwesiga B, Nyakarahuka L, Balinandi S, Mulei S, Kyondo J, Tumusiime A, Lutwama J, Ario AR, Ojwang J. Notes from the field: Crimean-Congo Hemorrhagic fever outbreak—central Uganda, august–september 2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2018 Jun 8;67(22):646
110. Bower H, El Karsany M, Alzain M, Gannon B, Mohamed R, Mahmoud I, et al. Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever cases in a severe undifferentiated febrile illness outbreak in the Federal Republic of Sudan: a retrospective epidemiological and diagnostic cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Jul 10;13(7):e0007571

111. National Institute For Communicable Diseases. Crimean-Congo haemorrhagic fever case confirmed. Johannesburg, South Africa, 2019
112. Rakhmanova NA, Melnik V, Pshenichnaya N, Aslanov B. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) cases reported by Russian ProMED. *Int J Infect Dis.* 2018 Aug 1;73:188
113. Drosten C, Minnak D, Emmerich P, Schmitz H, Reinicke T. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Kosovo. *Journal of clinical microbiology.* 2002 Mar 1;40(3):1122-3
114. Papa A, Christova I, Papadimitriou E, Antoniadis A. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria. *Emerg Infect Dis.* 2004 Aug;10(8):1465–7
115. Ahmeti S, Berisha L, Halili B, Ahmeti F, von Possel R, Thomé-Bolduan C, et al. Crimean-congo hemorrhagic fever, Kosovo, 2013–2016. *Emerg Infect Dis.* 2019 Feb 1;25(2):321–4
116. Center for Disease Control and Prevention. Notes from the Field: Increase in Reported Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Cases — Country of Georgia, 2014. *MMWR.* 2015;4(08):228-229
117. Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social. Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo en España Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Madrid, Spain, 2019
118. Connolly-Andersen A-M, Magnusson K-E, Mirazimi A. Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Polarized MDCK-1 Cells. *J Virol.* 2007 Mar 1;81(5):2158–64
119. Bente DA, Alimonti JB, Shieh W-J, Camus G, Ströher U, Zaki S, et al. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *J Virol.* 2010 Nov;84(21):11089–100
120. Connolly-Andersen A-M, Moll G, Andersson C, Akerström S, Karlberg H, Douagi I, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells. *J Virol.* 2011 Aug;85(15):7766–74
121. Weber F, Mirazimi A. Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct-Dec 2008;19(5-6):395-404

122. Bodur H, Akinci E, Ascioğlu S, Öngürü P, Uyar Y. Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2012 Apr;18(4):640–2
123. Sidira P, Maltezou HCC, Haidich A-BA-B, Papa A. Seroepidemiological study of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, 2009–2010. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Feb;18(2):E16–9
124. Sargianou M, Panos G, Tsatsaris A, Gogos C, Papa A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: seroprevalence and risk factors among humans in Achaia, western Greece. *Int J Infect Dis*. 2013 Dec;17(12):e1160–5
125. Çevik MA, Erbay A, Bodur H, Gülderen E, Baştuğ A, Kubar A, et al. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis*. 2008;12(4):374–9
126. Leblebicioğlu H. Crimean-Congo hemorrhagic fever - UpToDate. 2019
127. Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Çevik MA, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. 2009 May 1;13(3):380–6
128. Sharifi-Mood B, Mardani M, Keshtkar-Jahromi M, Rahnavardi M, Hatami H, Metanat M. Clinical and epidemiologic features of Crimean-Congo hemorrhagic fever among children and adolescents from southeastern Iran. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Jun;27(6):561–3
129. Karakeçili F, Cikman A, Aydın M, Binay U, Kesik O, Özcicek F. Evaluation of epidemiological, clinical, and laboratory characteristics and mortality rate of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in the northeast region of Turkey. *J Vector Borne Dis*. 2018;55(3):215
130. Elaldi N, Bodur H, Ascioğlu S, Celikbas A, Ozkurt Z, Vahaboglu H, et al. Efficacy of oral ribavirin treatment in Crimean-Congo haemorrhagic fever: A quasi-experimental study from Turkey. *J Infect*. 2009 Mar;58(3):238–44
131. Burt FJ. Laboratory diagnosis of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infections. *Future Virology*. 2011 Jul;6(7):831-41
132. Tezer H, Polat M. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(5):555–66
133. Emmerich P, Mika A, von Possel R, Rackow A, Liu Y, Schmitz H, Günther S, Sherifi K, Halili B,

- Jakupi X, Berisha L. 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 neglected tropical diseases*. 2018 Mar 26;12(3):e0006366.
134. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, et al. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol*. 2005 Feb;75(2):295–9
135. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, Billecocq A, Hooshmand B, Crance JM, et al. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol*. 2006 Feb;35(2):154–9
136. Dowall SDD, Richards KSS, Graham VAA, Chamberlain J, Hewson R. Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen. *J Virol Methods*. 2012 Feb;179(2):335–41
137. Sas MA, Comtet L, Donnet F, Mertens M, Vatansever Z, Tordo N, et al. A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. *Antiviral Res*. 2018 Mar 1;151:24–6
138. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, et al. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol*. 2005 Sep 1;77(1):83–8
139. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. 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*. 1998 Feb;70(2):129–37
140. Mazzola LT, Kelly-Cirino C. Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: A widespread tickborne disease. *BMJ Glob Heal*. 2019 Feb 1;4(Suppl 2):e001114.
141. Das S, Rundell MS, Mirza AH, Pingle MR, Shigyo K, Garrison AR, Paragas J, Smith SK, Olson VA, Larone DH, Spitzer ED. A multiplex PCR/LDR assay for the simultaneous identification of category a infectious pathogens: agents of viral hemorrhagic fever and Variola virus. *PLoS One*. 2015 Sep 18;10(9):e0138484

142. Brinkmann A, Ergünay K, Radonić A, Tufan ZK, Domingo C, Nitsche A. Development and preliminary evaluation of a multiplexed amplification and next generation sequencing method for viral hemorrhagic fever diagnostics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 Nov 20;11(11):e0006075
143. Ternovoi VA, Kononova Y V., Zaykovskaya A V., Chub E V., Volynkina AS, Mikryukova TP, et al. Development and assessment of a reagent kit for RNA detection of CrimeanCongo hemorrhagic fever virus with using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Klin Lab Diagn*. 2019;64(9):571–7
144. Johnson S, Henschke N, Maayan N, Mills I, Buckley BS, Kakourou A, Marshall R. Ribavirin for treating Crimean Congo haemorrhagic fever. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(6)
145. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolo de Vigilancia de la Fiebre Hemorrágica por virus Crimea-Congo. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Madrid, Spain 2017
146. Leblebicioglu H, Bodur H, Dokuzoguz B, Elaldi N, Guner R, Koksal I, et al. Case management and supportive treatment for patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2012 Sep 1;12(9):805–11
147. Dokuzoguz B, Celikbas AK, Gök ŞE, Baykam N, Eroglu MN, Ergönül Ö. Severity scoring index for Crimean-Congo hemorrhagic fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clinical infectious diseases*. 2013 Nov 1;57(9):1270-4
148. Akinci E, Bodur H, Sunbul M, Leblebicioglu H. Prognostic factors, pathophysiology and novel biomarkers in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 2016 Aug 1;132:233-43
149. Leblebicioglu H, Ozaras R, Fletcher TE, Beeching NJ. Crimean-Congo haemorrhagic fever in travellers: A systematic review. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(2):73–80
150. Vorou R, Pierroutsakos IN, Maltezou HC. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Current opinion in infectious diseases*. 2007 Oct 1;20(5):495-500
151. Dowall SD, Carroll MW, Hewson R. Development of vaccines against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Vaccine*. 2017 Oct 20;35(44):6015-23
152. Papa A, Papadimitriou E, Christova I. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic

- fever virus strain. *Scand J Infect Dis*. 2011 Mar;43(3):225–9.
153. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 2009 Aug;49:1S-29S
 154. Filipe AR, Calisher CH, Lazuick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol*. 1985 Jul;29(4):324–8
 155. Negrodo A, Habela MÁ, Ramírez de Arellano E, Diez F, Lasala F, López P, et al. Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Focus, Spain, 2011–2015. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jun;25(6):1177–84
 156. Ramírez de Arellano E, Hernández L, Goyanes MJ, Arsuaga M, Cruz AF, Negrodo A, et al. Phylogenetic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(12):2078–80
 157. Vieira Lista MC, Monsalve-Arteaga L, Negrodo AI, Sánchez-Seco MP, Vicente Santiago MB, Fernández-Soto P, et al. Detección del virus de Crimea Congo en garrapatas del género *Hyalomma* retiradas de individuos en Castilla y León. In: XXI Congreso SOCEPA. Pontevedra; 2019

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los resultados de los estudios presentados ponen de manifiesto la amplia presencia del vector responsable de la transmisión en nuestro entorno, Castilla y León, lo que pone en evidencia la necesidad de realizar estudios que permitan actualizar la situación y evaluar el riesgo en nuestra Comunidad Autónoma, ante la posibilidad de que se produzcan nuevos casos esporádicos de transmisión del VFHCC. Como enfermedad emergente que es, el endemismo de la FHCC es desconocido en áreas geográficas consideradas libres de transmisión hasta el momento. De este modo, el estudio de seroprevalencia en la Comunidad de Castilla y León, donde se produjo el primer caso, permitirá evaluar el endemismo de esta enfermedad en el oeste de España. Además, se desconoce la situación epidemiológica en Castilla y León, por lo que los resultados de este trabajo tendrán una aplicación práctica desde el punto de vista de la Salud Pública, pues definirán las necesidades de políticas de detección de casos y cribado de pacientes durante los períodos de primavera-verano en esta comunidad autónoma y probablemente en el resto del territorio español, evitando retrasos en diagnóstico que elevan el riesgo de mortalidad, tanto por el riesgo para el personal sanitario como para el individuo ingresado con este diagnóstico.

Por todo lo anteriormente expuesto y dada la situación actual, se ha considerado pertinente realizar esta Tesis Doctoral que tiene como **objetivo principal** estudiar la situación epidemiológica de la FHCC y realizar una evaluación del riesgo en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, tras conocer la situación epidemiológica del VFHCC en Europa mediante una revisión inicial, amplia y sistemática. Los resultados de esta Tesis Doctoral pueden ser de gran utilidad como herramienta para la toma de decisiones de Salud Pública dirigidas a la vigilancia, prevención y control de la FHCC en nuestro entorno.

Para llevar a cabo el objetivo general expuesto, nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Realizar una revisión sistemática sobre seroprevalencia frente al VFHCC en la región europea con la finalidad de determinar las zonas con mayor índice de endemidad.
- 2.- Estudiar la seroprevalencia de VFHCC determinado la detección de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG en una muestra estadísticamente representativa de donantes de sangre procedentes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.
- 3.- Determinar las áreas con mayor prevalencia para FHCC en Castilla y León mediante la geolocalización de los individuos seropositivos.
- 4.- Identificar VFHCC como causa en individuos que acuden a urgencia hospitalaria con fiebre de origen desconocido sin focalidad aparente.
- 5.- Describir nuevos genotipos de VFHCC introducidos en nuestro país mediante secuenciación genómica a partir de las muestras positivas diagnosticadas por RT-PCR.

4. RESULTADOS

ARTÍCULO PRIMERO

OBJETIVO: Identificar y sintetizar la evidencia disponible sobre la prevalencia del VFHCC en la Región Europea de la OMS, a través de la revisión de estudios publicados sobre la seroprevalencia (anticuerpos IgG), con el fin de analizar y comparar aspectos cuantitativos y cualitativos.

METODOLOGÍA: Se realizó una revisión sistemática siguiendo el procedimiento estandarizado establecido en declaración PRISMA para responder a la pregunta planteada: *¿Cuál es la seroprevalencia de VFHCC en la Región Europea de la OMS? ¿Cuáles son los posibles factores de riesgo asociados?*

PRINCIPALES RESULTADOS: En el análisis se incluyeron 30 artículos (9 de Europa occidental, 18 de Europa central y 3 de Europa oriental). Todos los artículos fueron estudios transversales (descriptivos). La seroprevalencia más alta de anticuerpos IgG contra el VFHCC se encontró en los países de Europa central y oriental. Los países de Europa meridional y occidental, como Grecia y España, presentaron los niveles más bajos de endemidad.

Los factores de riesgo encontrados con más frecuencia fueron aquellos que estaban asociados a la ocupación, es decir aquellas personas que estaban encargadas de la cría de ganado (sobre todo ovino) presentaron mayor seroprevalencia. Asimismo, y como era de esperar, el antecedente de exposición a garrapatas también estuvo fuertemente asociado a la presencia de anticuerpos IgG en los individuos incluidos en los diferentes estudios. Por su parte, los trabajadores de salud también representaron un grupo de riesgo, pero en menor medida que los mencionados previamente.

CONCLUSIONES: Los valores más altos de seroprevalencia del VFHCC se encontraron en Turquía, Rusia y Kazajstán. Grecia tiene una alta seroprevalencia, aunque sólo se ha notificado una muerte asociada al VFHCC. Este hecho contrasta con los países vecinos, como los países balcánicos y Turquía, donde la tasa de infecciones graves parece ser mayor.

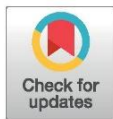
Asimismo, consideramos que deberían realizarse más estudios exhaustivos en los países europeos para determinar la situación epidemiológica real y adoptar medidas preventivas adicionales en el futuro.

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in humans in the World Health Organization European region: A systematic review

Lía Monsalve-Arteaga¹✉, Montserrat Alonso-Sardón²✉, Juan Luis Muñoz Bellido^{3,4,5},
María Belén Vicente Santiago¹, María Carmen Vieira Lista¹, Julio López Abán¹,
Antonio Muro¹, Moncef Belhassen-García^{1,6*}



1 Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, CIETUS, IBSAL, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **3** Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **5** Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, CSIC, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, **6** Servicio de Medicina Interna. Sección de Enfermedades Infecciosas. CAUSA. CIETUS. IBSAL. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

 OPEN ACCESS

Citation: Monsalve-Arteaga L, Alonso-Sardón M, Muñoz Bellido JL, Vicente Santiago MB, Vieira Lista MC, López Abán J, et al. (2020) Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in humans in the World Health Organization European region: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 14(3): e0008094. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094>

Editor: Claudia Munoz-Zanzi, University of Minnesota, UNITED STATES

Received: July 17, 2019

Accepted: January 27, 2020

Published: March 2, 2020

Copyright: © 2020 Monsalve-Arteaga et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET RD16/0027/0018 (AM), DTS16/00207 (AM), PI16/01784 (PFS), European Union co-financing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) 'Una manera de hacer

✉ These authors contributed equally to this work.
* belhassen@usal.es

Abstract

Background

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an emerging infectious disease caused by a *Nairovirus*. CCHF is a tick-borne disease that is predominantly associated with *Hyalomma* ticks and have a widespread distribution in Africa, Asia and Europe. CCHF usually presents as a subclinical disease, but in some cases, it may present as a hemorrhagic fever with a high mortality rate. This systematic review of the literature was performed to identify the available evidence on the prevalence of CCHF in the European Region of the World Health Organization, based on seroprevalence (IgG antibodies).

Methodology

A systematic review was performed following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement protocol. PubMed, Embase, and the Web of Science were used for the search (up to January 31, 2019), combining the following MeSH terms: ["Crimean-Congo haemorrhagic fever" OR "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus" OR "Congo-Crimea" OR "Crimea-Congo"] AND ["Europe"] AND ["epidemiology" OR "seroprevalence"]. The abstracts were screened. Subsequently, full-text articles were selected and reviewed based on the PICOS (Population-Intervention-Comparison-Outcomes-Study type) criteria by two independent reviewers for inclusion in the final analysis.

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

Europa. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The data were qualitatively synthesized without quantitative pooling due to the heterogeneity in the study populations and methodologies.

Principal findings

Thirty articles (9 from western Europe, 18 from central Europe and 3 from eastern Europe) were included in the analysis. All articles were cross-sectional studies (descriptive studies).

Conclusions

The highest seroprevalence of CCHF is found in central and eastern European countries. Southern and western Europe countries, such as Greece and Spain, have low levels of endemicity, but the spread of the infection, which is associated with climate change, is a possibility that we should keep in mind. Further studies, especially larger seroprevalence studies in humans and animals, are needed to establish the current status of the CCHF epidemiology and to generate standardized guidelines for action in the region.

Author summary

Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a widespread tick-borne viral disease caused by a Nairovirus of the *Nairoviridae* family. CCHF-virus (CCHFV) has been considered to be one of the eight priority emergent pathogens for the last 3 years by the World Health Organization (WHO), requiring urgent attention in Research, Development and Innovation (R&D&I) because of its epidemic potential in the near future. In this systematic review, we aimed to describe the epidemiological impact of CCHFV (seroprevalence for IgG antibodies and the associated risk factors) in the WHO European Region (WHO/Europe). In this systematic review suggests the following conclusions. i) The highest values of CCHFV seroprevalence are found in Turkey, the Russian Federation, and Kazakhstan. ii) Greece has a high seroprevalence, though only one death associated with CCHFV has been reported. This fact contrasts with the neighboring countries, such as Balkan countries and Turkey, where the rate of severe infections seems to be higher. iii) Extensive studies should be developed in European countries to establish the actual epidemiological situation and to take additional preventive measures for the future.

Introduction

Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a widespread tick-borne viral disease caused by CCHFV of the family *Nairoviridae* [1]. This disease was first described in 1944, during World War II, when an outbreak affected a group of Soviet soldiers in the Crimean Peninsula [2]. Twenty years later, in 1967, the virus was finally identified and was named Crimean-Congo virus, based on the similarities found with the virus that affected a febrile patient in the former Belgian Congo in 1956 [3].

Ninety percent of Crimean-Congo virus infections are oligosymptomatic or asymptomatic [4]. In the remaining 10%, the infections can present as a severe disease with a higher mortality rate [5–7]. Mortality is associated with different factors, such as age, viral strain, and endemicity [8–11].

The transmission of this virus to humans is mainly associated with the bite of hard-bodied ticks (*Ixodidae* family), predominantly those belonging to the genus *Hyalomma*, which are widely distributed in Asia, Africa and Europe. The infection can also be acquired through direct contact with blood and other bodily fluids from infected animals and humans, mainly those with a high viral load, including hospitalized patients with hemorrhagic fever. Thus, there is a high risk of transmission in healthcare environments [8,12–14]. Currently, the CCHF virus (CCHFV) is considered a level 4 biosecurity risk pathogen by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [15,16]. CCHFV has been considered to be one of the eight priority emergent pathogens for the last 3 years by the World Health Organization (WHO), requiring urgent attention in Research, Development and Innovation (R&D&I) because of its epidemic potential in the near future [17,18].

Almost 1000 cases of CCHFV infection are reported in the Middle East and eastern European countries yearly [11,19]. In Europe, human cases have been reported in Albania, Bulgaria, Kosovo, Russia, Serbia, Turkey, Ukraine, Greece, Georgia and Spain [1,20,21].

The aim of this study was to identify the epidemiological impact of CCHFV (seroprevalence for IgG antibodies and the associated risk factors) in the WHO European Region, through a systematic review, to address the research question: what is the seroprevalence of CCHFV infection in the different geographic areas of Europe, and what are the possible associated risk factors?

Material and methods

Study design

This systematic review was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement [22]. Study eligibility was defined according to the conventional PICOS (Population-Intervention-Comparison-Outcomes-Study type) criteria [23,24], which were determined *a priori*, including the following: Population (CCHFV-seropositive individuals); Intervention or Exposure, (risk factors, environmental determinants facilitating and inhibiting viral transmission); Comparators (three geographical regions of Europe, western/central/eastern Europe); Outcomes (seroprevalence data, IgG antibodies); and Study design (Observational studies, descriptive and analytical designs).

Search strategy and selection criteria

A systematic review of electronic bibliographic databases was performed for publications up to January 31, 2019. The following databases were searched for relevant studies to identify all the published studies about the seroprevalence of CCHFV in Europe: PubMed, Embase and the Web of Science, with the language restrictions of English, Spanish or French.

The electronic research was performed using the following Boolean operators and terms: ["Crimean Congo hemorrhagic fever" OR "Crimea Congo hemorrhagic fever" OR "Congo Crimea hemorrhagic fever" OR "Crimean Congo hemorrhagic fever virus" OR "Crimean Congo" OR "Crimea-Congo"] AND "Europe" AND ["seroprevalence" OR "epidemiology"].

Inclusion criteria: Published reports evaluating the epidemiology of CCHF in WHO/Europe were included when they fulfilled the following selection criteria, according to PRISMA guidelines. (1) Population: Human studies about the seroprevalence of CCHF. (2) Study design and interventions: We included observational studies. Randomized controlled trials were not included because these studies evaluate the efficacy of a treatment or an intervention. (3) Types of outcome measures: As the main outcome, we compared the seroprevalence of CCHF (defined as the number of individuals with evidence of IgG antibodies against CCHFV) in the 3 areas: western, central and eastern WHO/Europe.

Exclusion criteria: All nonhuman studies, intention-to-treat clinical trials, incidence data, editorial letters, letters to the editor, expert committees, author opinions and case reports (OCEBM Level of Evidence 5, Grade of Recommendation D) were excluded because they do not allow decision making or recommendation proposals and/or do not talk about an epidemiological observation. Finally, all studies about CCHF imported cases from an endemic to a nonendemic region were also excluded.

Selection of studies, data collection/extraction, and data synthesis/analysis

For the critical evaluation of the quality of the included studies, we applied a uniform checklist method to identify the internal validity and possible bias. To identify and select the studies, we classified them in a table following a systematic method. We evaluated the quality of each study, and the conclusions were based on the evidence levels according to the Oxford Centre for Evidence-Based Medicine (OCEBM) [25], which allow us to judge the strength of evidence. Also, we used the recommendations of the PRISMA declaration as a guide.

We prepared tables to make the systematic collection of the qualitative and quantitative data of each article. All the data were compiled by the last name of the first author, the year of publication, country, study design, objective, individuals or patients studied, population characteristics and other risk factors and the seroprevalence of anti-CCHFV IgG antibodies. First, the articles were evaluated based on the title and abstract, and afterwards they were evaluated based on the full text. All studies that did not fulfill the inclusion criteria were excluded from this systematic review.

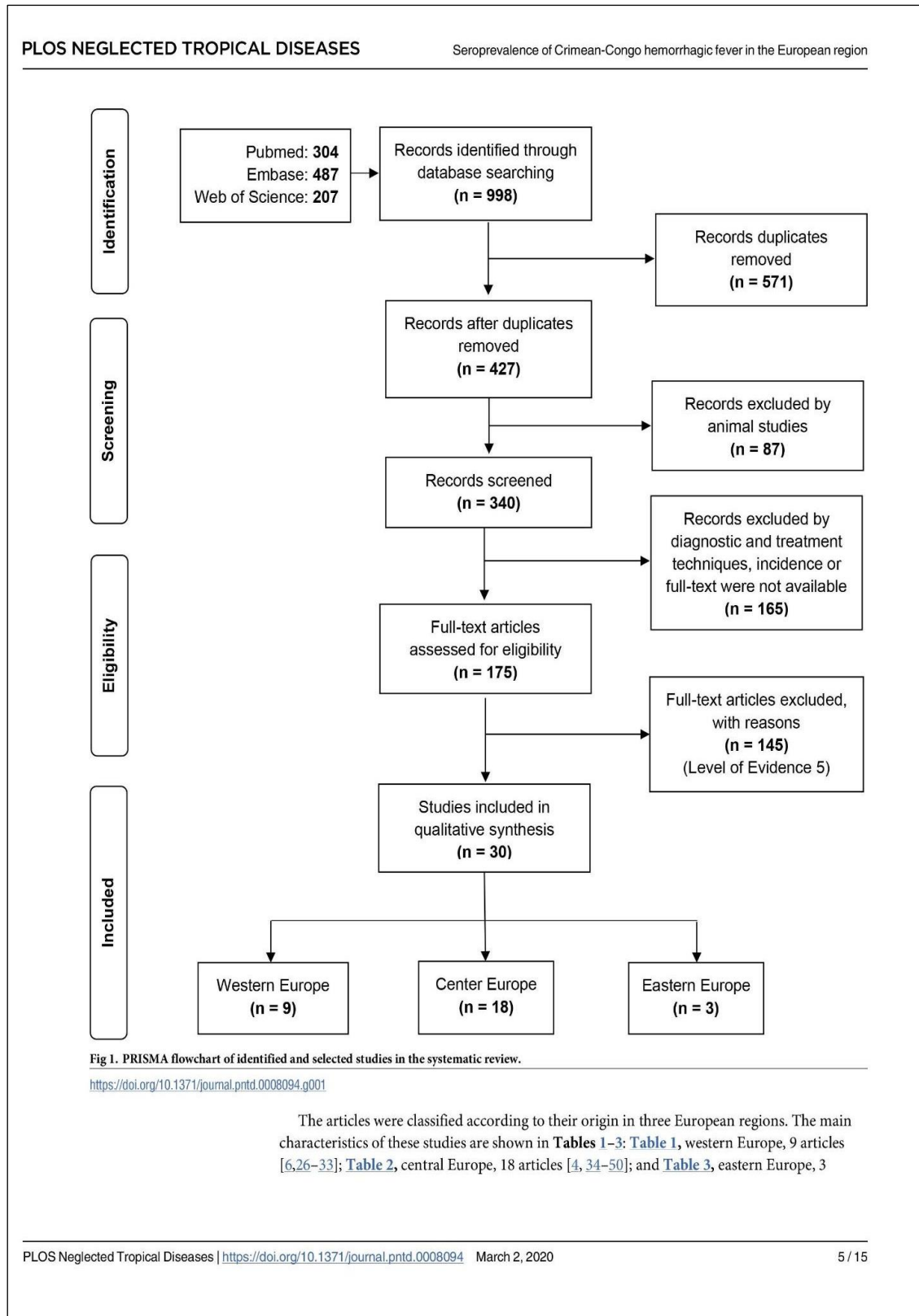
All the articles identified were revised by two review team members (LMA and MAS), which followed the methodological standards recommended by the Committee on Standards for Systematic Reviews of Comparative Effectiveness Research for finding and assessing individual study: worked independently, screened and selected studies and extracted quantitative and other critical data from included studies. Each eligible study was systematically appraised for risk of bias; relevance to the study's populations, and outcomes measures: seroprevalence. All the discrepancies were resolved by the rest of the study team.

We initially included all the countries of the WHO/European Region, and then we separated these studies into three different subgroups corresponding to three European regions, based on demographic and epidemiologic factors, and we made a qualitative comparison between these three European regions. The 53 countries of the WHO European Region were subdivided into three geographical areas, based on epidemiological considerations and in accordance with the division used by World Health Organization (WHO) and European Centre for Disease Control (ECDC) in others reports on surveillance in Europe: West (23 countries), Centre (15 countries) and East (15 countries).

Results

Summary of the included articles

The initial search identified a total of 998 references that met the inclusion criteria: 304 on PubMed, 487 on Embase and 207 on the Web of Science. We first removed 571 duplicated records and 87 animal studies. Then, 165 articles about diagnostic and treatment techniques, incidence data or whose full-text papers were not available were excluded; and, 175 full-text articles were assessed for eligibility. A total of 145 of these papers were excluded because they were mainly case reports (OCEBM Level of Evidence 5, Grade of Recommendation D). Finally, 30 studies met our inclusion criteria and were included in the qualitative synthesis. [Fig 1](#) shows the modified PRISMA flowchart with searching process.



PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

Table 1. Principal results of CCHF studies in western Europe.

Author	Publication year	Study years	Country	Objective (related to CCHF seroprevalence in humans)	N	Risk factors	Seroprevalence of IgG: Value (%)
Antoniadis <i>et al.</i> [26]	1982	1980–1981	Greece (rural area, Northern Greece)	To determine the prevalence of CCHFV antibodies in a rural population of Northern Greece	65	Farming Living in Northern Greece (CCHF isolated in this zone from <i>Rhipicephalus bursa</i> since 1978)	4 (6.2)
Filipe <i>et al.</i> [27]	1985	1980	Portugal	To establish the seroprevalence of CCHFV virus in Southern Portugal	190	Living in certain areas of Southern Portugal	2 (1.1)
Palomar <i>et al.</i> [28]	2017	2010–2014	Spain	To evaluate the presence of antibodies against the virus in individuals exposed to tick bites	228	No risk factors found	0 (0.0)
Papa <i>et al.</i> [29]	2014	2012	Greece	To make a small-scale serologic survey in humans and animals in the area where CCHFV-positive tick had been detected	100	Ageing	6 (6.0)
Papa <i>et al.</i> [30]	2013	2010–2012	Greece (Western, border to Albania and Ionian Sea Coast)	To check in more detail the CCHFV situation in Thesprotia prefecture (western region, border with Albania) and find out any risk factors associated with seropositivity	166	Ruminants husbandry Slaughtering Ageing	24 (14.4)
Papa <i>et al.</i> [31]	2011	2008–2009	Greece (Eastern, border to Bulgaria)	To determine the prevalence of CCHFV antibodies in the human population of Northeastern Greece	1178	Female sex Ageing Ruminants husbandry Slaughtering Tick exposure	37 (3.1)
Sargianou <i>et al.</i> [32]	2013	2012	Greece (Coast of the Gulf of Corinth)	To estimate the seroprevalence of CCHFV in humans in Achaia Prefecture, Greece, and to assess risk factors in seropositivity	207	Agropastoral occupation Ruminants (especially with sheep) Living at an altitude of $\geq 400\text{m}$	7 (3.4)
Sidira <i>et al.</i> [33]	2013	2010–2011	Greece (Northern coast of the Aegean Sea)	To estimate the CCHFV seroprevalence among humans residing in the prefecture of Imathia, and the neighbouring prefecture of Pella, and to investigate demographics and probable risk factors associated with the seropositivity	277	Tick exposure Residence in a hilly territory Ageing Agropastoral occupation	6 (2.2)
Sidira <i>et al.</i> [6]	2012	2009–2010	Greece	To estimate endemic areas CCHF in Greece	1611	Slaughtering Agropastoral occupation Ruminants husbandry	68 (4.2)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094.t001>

articles [51–53]. Even though the geographical origin was diverse, most studies were performed in Turkey (central Europe) (13 articles) [4,34,37–39,41–42,44–45,47–50] and in Greece (western Europe) (7 articles) [6,26,29–33].

The oldest article was published by Horvath *et al.* in 1979 [46], and the most recent was published by Abdiyeva *et al.* in 2019 [51]. All articles were cross-sectional studies (descriptive studies). The study design that was generally used was to assess the prevalence of a disease in a population (prevalence study), which has an OCEBM Level of Evidence 4, Grade of Recommendation C.

Seroprevalence

Fig 2 shows in a Map the seroprevalence of CCHFV in the different European Regions.

Table 4 summarizes the main quantitative data collected from the studies that were analyzed: the sample sizes and IgG antibody levels (seroprevalence).

The sample sizes varied from 3557 individuals in a study conducted in Turkey [4] to 65 individuals in a study conducted in Greece by Antoniadis *et al.* [26]. The reported

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

Table 2. Main data of CCHF in studies in center Europe.

Author	Publication year	Study years	Country	Objective (related to CCHF seroprevalence in humans)	N	Risk factors	Seroprevalence of IgG: Value (%)
Bayram <i>et al.</i> [34]	2017	2012	Turkey (Eastern region, border with Iran)	To determine the seroprevalence of CCHFV in individuals with a high risk of acquiring CCHF disease in Van province	368	No risk factors found	53 (14.4)
Bodur <i>et al.</i> [4]	2012	2009–2010	Turkey	To investigate the seroprevalence of CCHFV infection in a sufficiently large sample representative of the region affected during the outbreak of 2011 in Turkey	3557	Ageing Low level of education Agropastoral occupation Tick exposure	356 (10.0)
Christova <i>et al.</i> [35]	2017	2015	Bulgaria	To estimate the prevalence of IgG antibodies to CCHFV and hantaviruses, as stable and long persisting antibodies, in general human population of Bulgaria	1500	Living in southeastern Bulgaria (especially in the Haskovo district) Ageing Ruminant husbandry Tick exposure	55 (3.7)
Christova <i>et al.</i> [36]	2013	2011	Bulgaria	To estimate the situation on CCHFV seroprevalence in both disease-endemic and -nonendemic areas in Bulgaria	1018	Tick exposure Ageing Living in the Black Sea Coast (Burgas District)	28 (2.8)
Cikman <i>et al.</i> [37]	2016	Not specified	Turkey (North-Eastern region)	To determine the seroprevalence and risk factors associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in residents of North-Eastern, Turkey	372	Ruminant husbandry Living in rural areas Tick exposure	59 (15.8)
Ergönül <i>et al.</i> [38]	2006	2003	Turkey	To determine the seroprevalence of CCHFV, among veterinarians in a highly endemic and a non-endemic region for these infections in Turkey	83	Percutaneous injuries in veterinarians	1 (1.2)
Ertugrul <i>et al.</i> [39]	2012	Not specified	Turkey (Western region, Aegean Sea Coast)	To determine the rate of specific IgG seropositivity against the virus and the contributory factors	429	Age <34 years Tick exposure Ruminant husbandry Female sex	84 (19.6)
Fajsi <i>et al.</i> [40]	2014	2012	Kosovo (Serbia for the WHO)	To determine the prevalence of CCHF in Kosovo	1105	Living in the Southwestern Serbia (hyperendemic regions) Ageing Male sex	44 (4.0)
Gargili <i>et al.</i> [41]	2011	2008–2009	Turkey (Western Turkey, border with Bulgaria)	To estimate whether there is an immune-protection in the region as a result of a established infection and not a recent spread of infected ticks into the area	193	Male sex Ageing Living in the Black Sea Coast	21 (10.9)
Gazi <i>et al.</i> [42]	2016	2011–2013	Turkey (rural part of Western Turkey)	To determine the seroprevalence of CCHFV among the rural residents of Manisa region, Turkey, and to identify the associated risk factors	324	Ageing	12 (3.7)
Gergova <i>et al.</i> [43]	2014	2011–2012	Bulgaria (Southeastern region)	To determine the seroprevalence of CCHFV in endemic areas of Bulgaria	751	Tick exposure Ruminant husbandry	24 (3.2)
Gozel <i>et al.</i> [44]	2013	2012	Turkey (Research Hospital, Centre-North Turkey)	To analyze the serum seropositivity for CCHFV IgM and IgG of all healthcare workers at risk, and to determine the possible risk factors	190	Visiting an endemic region	1 (0.5)
Gunes <i>et al.</i> [45]	2009	2006	Turkey (Centre-North region)	To determine the seroprevalence of CCHFV in a high-risk population	782	Ageing Tick exposure Contact with livestock	100 (12.8)
Horváth <i>et al.</i> [46]	1976	1972–1975	Hungary	To determine the seroprevalence of CCHFV in Hungary	587	Living in the Eastern Hungary, border to Rumania (Hajdú-Bihar county)	17 (2.8)

(Continued)

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

Table 2. (Continued)

Author	Publication year	Study years	Country	Objective (related to CCHF seroprevalence in humans)	N	Risk factors	Seroprevalence of IgG: Value (%)
Koksal <i>et al.</i> [47]	2014	2004–2008	Turkey (Eastern Black Sea regions)	To determine the seroprevalence of CCHF infection and risk factors for disease in people living in the same environment with confirmed patients, either as household members or in the immediate neighbourhood, in the endemic area in the Black Sea region of Turkey	625	Ageing Ruminant husbandry Tick exposure Living rural areas	85 (13.6)
Tekin <i>et al.</i> [48]	2010	Not specified	Turkey (Northern region)	To determine the seroprevalence of CCHFV in humans in the province of Tokat (Centre-Northern region)	715	Contact with animals (not specified) Relatives of patients with CCHF (Airborne transmission?)	69 (9.6)
Temocin <i>et al.</i> [49]	2018	2016	Turkey (Centre region)	To determine the seroprevalence of CCHF disease among healthcare workers in a hospital in an endemic region, and to present the risk factors for healthcare workers	112	Percutaneous injuries in HCW	2 (1.8)
Yagci-Caglayik <i>et al.</i> [50]	2013	Not specified	Turkey	To estimate the CCHFV seroprevalence in apparently healthy adult population living in urban and rural areas of seven geographically representative provinces of Turkey and to find out the risk factors associated with the seropositivity	1066	Ageing Low level of education Male sex Farming Living in a house of adobe	25 (2.3)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094.t002>

seroprevalence was between 0% in Spain [28] and 19.6% in Turkey [39]. We analyzed each European region independently as follows.

Western Europe. The lowest seroprevalence was observed in Spain 0% [28] and Portugal 1.1% [27]. The seven included studies that were performed in different geographical areas of Greece obtained seroprevalence ranging between 2.2% [33] and 14.4% [30]. Nevertheless, six of the seven studies included a reported prevalence between 2.2% and 6.2% (2.2% [33], 3.1% [31], 3.4% [32], 4.2% [6], 6% [29], and 6.2% [26]).

Central Europe. The studies conducted in Turkey also showed high variability. Most studies showed a seroprevalence that ranged from low values (0.5% [44], 1.2% [38], 1.8% [49], 2.3% [50], and 3.7% [42]) to moderate values (9.6% [48], 10% [4], 10.9% [41], 12.8% [45], 13.6% [47], 14.4% [34], and 15.8% [37]). One study showed a much higher prevalence (19.6% [39]), but this study was performed in an endemic area in southwestern Turkey. Bulgarian

Table 3. Main data of CCHF in studies in eastern Europe.

Author	Publication year	Study years	Country	Objectives (related to CCHF seroprevalence in humans)	N	Risk factors	Seroprevalence of IgG: Value (%)
Abdiyeva <i>et al.</i> [51]	2019	2014–2015	Kazakhstan	To detect the seroprevalence of CCHFV in patients with fever of unknown origin in endemic and non-endemic oblasts of Kazakhstan	802	Agro-pastoral occupation Ruminant and other livestock (except pigs) husbandry Living in rural areas	102 (12.7)
Greiner <i>et al.</i> [52]	2016	2014	Georgia (12 rural affected communities)	To determine CCHF seroprevalence, identify risk factors, and document CCHF-related knowledge, attitudes, and practices	444	Agro-pastoral occupation Animal husbandry Tick exposure	12 (2.8)
Magnaval <i>et al.</i> [53]	2011	2007	Russian Federation (Northeastern Siberia)	To determine the seroprevalence of nine zoonoses in Viljujsk, a Northern city in the Republic of Sakha (Eastern Siberia)	90	No risk factors found	10 (11.1)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094.t003>

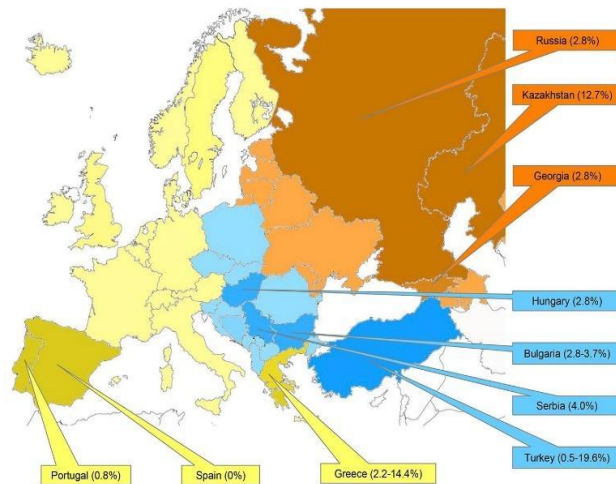


Fig 2. Seroprevalence of CCHFV in Western Europe (yellow), Center Europe (blue) and Eastern Europe (orange).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094.g002>

studies reported a similar seroprevalence: 2.8% [36], 3.2% [43], and 3.7% [35]. Additionally, Hungary (2.8% [46]) and Kosovo (4% [40]) reported a similar seroprevalence.

Russia and western Asia. Georgia shows a prevalence similar to that in eastern European countries (2.8%, [52]), while the Russian Federation (11.1%, [53]) and Kazakhstan (12.7%, [51]) show a prevalence closer to that found in Turkish areas, with a moderate/high prevalence.

Risk factors

Major risk factors, such as occupations associated with animal husbandry (especially of sheep and goats) [6,29,31,45,47–48,51–52] and agricultural and agropastoral activities [4,6,32,45,50,52] were identified in this study (no matter the geographical zone). Also another major risk

Table 4. Estimated seroprevalence of CCHFV in the European Regions*.

Western Europe		
Greece	3604	2.2–14.4 ± 1
Portugal	258	0.8 ± 3
Spain	228	0.0
Center Europe		
Bulgaria	3269	2.8–3.7 ± 1
Hungary	587	2.8 ± 1
Serbia	1105	4.0 ± 1
Turkey	8816	0.5–19.6 ± 1
Eastern Europe		
Georgia	444	2.8 ± 2
Kazakhstan	802	12.7 ± 2
Russian Federation	90	11.1 ± 6

*95% Confidence Intervals (CI) for a proportion.

* References in Tables 1, 2 & 3

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008094.t004>

factor was the tick exposure; tick exposure includes direct physical contact, tick bites, tick removal from people and animals and exposure to ticks around the working and home environments [12,31,33,35–37,39,43,45,47–48,52]. To a lesser extent, health care workers (physicians and nurses), veterinarians [38,44,48–49] and individuals with slaughtering-associated jobs [6,30,31] were also more likely to have the presence of CCHFV IgG antibodies.

Minor risk factors, such as gender and aging (risk markers) have been reported in some studies [4,29,31,33,35–36,39–42,45,47,50] in association with the presence of antibodies, but the heterogeneity of the studies and the populations that were evaluated prevent us from exhaustively affirming these results. Other risk factors that were evaluated were related to geographical aspects, such as residence in a hilly territory/living at an altitude [32–33], living in rural vs urban areas [26,37,47,50], in adobe houses [51], geographic regions as Black Sea Coast [36–41] and others [27,31,35,48] or endemic areas [40,43,47,49].

Some factors such as airborne transmission were also evaluated [48], but a causal association could not be determined, as the design of this study was not analytical.

Discussion

In the recent years, the epidemiology of vector-borne diseases is changing due to diverse factors, especially linked to the global warming phenomena [54–55]. In Europe, a rise on the prevalence of most important tick-borne infections are mainly due to tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Central and Eastern Europe [56,57], and the emergence of the CCHFV in Southwestern Europe [21].

In this systematic review, we have realized an exhaustive and comparative analysis about the human seroprevalence of CCHFV in the WHO European Region countries (<http://www.euro.who.int/en/countries>). We have established three different areas (Center, Western and Eastern Europe) in order to evaluate the progression of tick-borne infection in the continent and to estimate which geographical regions are particularly at risk. This topic has been the subject of other systematic reviews based in specific subgroups of patients, such as travelers or pregnant women [58–59]. Likewise, a recently published systematic review, realized by Nasirian H. [60] discusses some of the CCHF seroprevalence studies that we also present in this systematic review. Nasirian H. study [60] collects global CCHFV seroprevalence data (no IgG–IgM antibodies difference) in humans and animals from different areas of the world, while our study is limited to CCHF seroprevalence for IgG antibodies at the WHO European Regions.

The eastern region of Europe is well known as the first site where this infection was reported [2]. Currently, CCHF continues to be endemic in the Russian Federation and in other countries of the former Soviet Union, though the real prevalence of CCHF is difficult to estimate because of the low number of seroprevalence studies. Nevertheless, the studies included in the analysis found values above 10% in Kazakhstan [51] and in the north of Russia [53].

In the central European region, human seroprevalences above 5% were also seen. The northeast of Turkey, especially the areas surrounding the Black Sea (eastern Anatolia), are classically described as highly endemic (high prevalence and incidence rates) for this infection [37,47]. However, we found the highest seroprevalence (19.6%) in a study performed on the Aegean Sea coast, which is not considered a CCHFV endemic zone. Balkan countries are also considered endemic [35,40,43,61], but their seroprevalence is lower than that in Turkey. Other countries in central Europe, such as Hungary, are not considered endemic for this infection, though seropositivity for CCHFV antibodies has been described since 1976 [46]. Recent studies have shown that this zoonosis is also circulating in animals in countries such as Romania and the former Yugoslav Republic of Macedonia [62–64].

The Western region the WHO/European Region had the lowest seroprevalence values for this infection. The infection has been documented in this area since the 1980s, when Antoniadis *et al.* [26] and Filipe *et al.* [27] demonstrated seropositivity in healthy humans in Greece and Portugal, respectively. Nevertheless, it was not until 2010 that the first and only autochthonous case was reported in Greece [20]. Additionally in 2010, the epidemiological alert in southwestern Europe increased after evidence of virus circulation in ticks belonging to the *Hyalomma marginatum* species were retrieved from a wild red deer in western Spain [65], near the Portuguese border. Six years later, first human autochthonous case was reported in Spain, a 62-year-old man that, after traveling to a little village at Central-Western Spain, presented at the Emergency Department with a severe viral hemorrhagic fever and died on the ninth day of illness. Four days later, a secondary (non-fatal) case due to a nosocomial transmission was also reported [21,66]. Since then, other two cases have also been reported in the Western Spain [67], reflecting probably only the visible part of the iceberg. Even though a recent study found no seroprevalence in humans in Spain [28], larger studies of seroprevalence need to be carried out in humans to corroborate the existence of an undetected circulation occurring in other areas of Spain and in neighboring countries, like Portugal, France, Italy or Malta where the vector tick exists and the weather conditions are favorable for the dissemination of this vector-borne disease.

Major risk factors have been well documented to be associated to tick exposure [12,31,33,35–37,39,43,45,47–48,52] in endemic regions, especially in the individuals involved in ungulate husbandry [6,29,31,45,47–48,51–52] and/or agropastoral activities [4,6,32,45,50,52]. The outbreaks emerge mainly in the spring and summer (May to October) [1]. Nevertheless, global migratory human movements, bird migrations from Africa, weather changes, global warming [55], and the presence of the main vector, *Hyalomma marginatum* ticks, in most countries of Europe might result in a situation in which this infection appears in other periods, spreads to new areas, increases in incidence, and becomes a diagnosis to be ruled-out in patients with hemorrhagic fever, even when a tick bite history cannot be documented.

The main limitation of this study was the heterogeneity of the studies and the lack of published seroprevalence investigations of some regions with elevated endemicity, especially at Northeastern Europe (Russia, Ukraine, between others). For this reason, a meta-analysis could not be performed. However, an extensive research in the main databases was performed, only excluding studies with low level of evidence. Nevertheless, a qualitative review improves the current lack of information. More studies are necessary to obtain conclusive evidence. The risks of bias (methodological and clinical) may have affected the results of our qualitative review. Despite these limitations, this systematic review sought to analyze the available information to date related to the epidemiology of CCHF in WHO/ European Region.

This systematic review suggests the following conclusions. i) The highest values of CCHFV seroprevalence are found in Turkey, the Russian Federation, and Kazakhstan. ii) Greece has a high seroprevalence, though only one death associated with CCHFV has been reported [20]. This fact contrasts with the neighboring countries, such as Balkan countries and Turkey, where the rate of severe infections seems to be higher. iii) Extensive studies should be developed in European countries to establish the actual epidemiological situation and to take additional preventive measures for the future.

Supporting information

S1 Checklist. PRISMA checklist.
(DOC)

Author Contributions

Conceptualization: Lía Monsalve-Arteaga, Montserrat Alonso-Sardón, Juan Luis Muñoz Bellido, Antonio Muro, Moncef Belhassen-García.

Data curation: Montserrat Alonso-Sardón, María Belén Vicente Santiago, María Carmen Vieira Lista, Moncef Belhassen-García.

Formal analysis: Montserrat Alonso-Sardón, Antonio Muro, Moncef Belhassen-García.

Investigation: Lía Monsalve-Arteaga, Julio López Abán, Antonio Muro, Moncef Belhassen-García.

Methodology: Julio López Abán, Antonio Muro, Moncef Belhassen-García.

Supervision: Juan Luis Muñoz Bellido, Moncef Belhassen-García.

Validation: Moncef Belhassen-García.

References

1. Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:203–14. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70435-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70435-2) PMID: 16554245
2. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15:307–417. <https://doi.org/10.1093/jmedent/15.4.307> PMID: 113533
3. Simpson DJ, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbren MP, Kibukamusoke JW. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations—clinical notes. *East Afr Med J* 1967; 44:86–92. PMID: 6040759
4. Bodur H, Akinci E, Ascioglu S, Öngürü P, Uyar Y. Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:640–2. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111374> PMID: 22469474
5. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* 2013; 100:159–89. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006> PMID: 23906741
6. Sidira P, Maltezou HCC, Haidich A-BA-B, Papa A. Seroepidemiological study of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Greece, 2009–2010. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:E16–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03718.x> PMID: 22192082
7. World Health Organization. Crimean-Congo haemorrhagic fever. WHO 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/> (accessed February 23, 2017).
8. Akuffo R, Brandful JAM, Zayed A, Adjei A, Watany N, Fahmy NT, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in livestock ticks and animal handler seroprevalence at an abattoir in Ghana. *BMC Infect Dis* 2016; 16:324. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1660-6> PMID: 27392037
9. Sharifi-Mood B, Mardani M, Keshtkar-Jahromi M, Rahnavardi M, Hatami H, Metanat M. Clinical and epidemiologic features of Crimean-Congo hemorrhagic fever among children and adolescents from south-eastern Iran. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:561–3. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181673c28> PMID: 18434934
10. Tezer H, Sucakli IA, Sayli TR, Celikel E, Yakut I, Kara A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in children. *J Clin Virol* 2010; 48:184–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.04.001> PMID: 20444644
11. Leblebicioglu H. Crimean–Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: S43–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.020> PMID: 20810253
12. Yadav PD, Patil DY, Shete AM, Kokate P, Goyal P, Jadhav S, et al. Nosocomial infection of CCHF among health care workers in Rajasthan, India 2016; 16:624. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1971-7> PMID: 27809807
13. Ftika L, Maltezou HC. Viral haemorrhagic fevers in healthcare settings. *J Hosp Infect* 2013; 83:185–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.10.013> PMID: 23333147
14. Richards GA. Nosocomial transmission of viral haemorrhagic fever in South Africa. *S Afr Med J* 2015; 105:709–12. <https://doi.org/10.7196/SAMnew.8168> PMID: 26428962
15. Vanhomwegen J, Alves M, Avšič T, Bino S, Chinikar S, Karlberg H, et al. Diagnostic Assays for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever—Volume 18, Number 12—December 2012—Emerging Infectious Disease journal—CDC 2012; 18:1958–65. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120710> PMID: 23171700

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

16. Appannanavar SB, Mishra B. An Update on Crimean Congo Hemorrhagic Fever. *J Glob Infect Dis* 2011; 3:285–92. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.83537> PMID: 21887063
17. World Health Organization. Blueprint for R&D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens 2015.
18. World Health Organization. An R&D Blueprint for Action to Prevent Epidemics: Plan of Action [Internet]. Geneva, Switzerland; 2016. Available: http://www.who.int/csr/research-and-development/r_d_blueprint_plan_of_action.pdf?ua=1
19. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res* 2013; 98:248–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.02.007> PMID: 23458713
20. Papa A, Dalla V, Papadimitriou E, Kartalis GNN, Antoniadis A. Emergence of Crimean–Congo haemorrhagic fever in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:843–7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02996.x> PMID: 19845692
21. Negrodo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al. Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med* 2017; 377:154–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615162> PMID: 28700843
22. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *Int J Surg* 2010; 8:336–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2010.02.007> PMID: 20171303
23. Centre for Reviews and Dissemination. Systematic Reviews: CRD's guidance for undertaking reviews in health care [Internet]. York, United Kingdom: York Publishing Services Ltd; 2009. Available: https://www.york.ac.uk/media/crd/Systematic_Reviews.pdf
24. Methley AM, Campbell S, Chew-Graham C, McNally R, Cheraghi-Sohi S. PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC Health Serv Res* 2014; 14:579. <https://doi.org/10.1186/s12913-014-0579-0> PMID: 25413154
25. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. Levels of Evidence [Internet]. May 1 Oxford, England; 2011 p. 5653. Available: <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>
26. Antoniadis A, Casals J. Serological Evidence of Human Infection with Congo-Crimean Hemorrhagic Fever Virus in Greece *. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31:1066–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1066> PMID: 6812443
27. Filipe AR, Calisher CH, Lazuick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol* 1985; 29:324–8. PMID: 2864836
28. Palomar AM, Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Muñoz-Sanz A, Márquez FJ, et al. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013–2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35:344–7. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.009> PMID: 28291670
29. Papa A, Chaligiannis I, Kontana N, Sourba T, Tsioka K, Tsatsaris A, et al. A novel AP92-like Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain, Greece. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5:590–3. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.008> PMID: 24953797
30. Papa A, Sidira P, Kallia S, Ntouska M, Zotos N, Doumbali E, et al. Factors associated with IgG positivity to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the area with the highest seroprevalence in Greece. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4:417–20. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.04.003> PMID: 23831367
31. Papa A, Tzala E, Maltezou HC. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, northeastern Greece. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:141–3. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100073> PMID: 21192882
32. Sargianou M, Panos G, Tsatsaris A, Gogos C, Papa A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: seroprevalence and risk factors among humans in Achaia, western Greece. *Int J Infect Dis* 2013; 17:e1160–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.015> PMID: 24084247
33. Sidira P, Nikza P, Danis K, Panagiotopoulos T, Samara D, Maltezou H, et al. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in Greek residents in the area where the AP92 strain was isolated. *Hippokratia* 2013; 17:322–5. PMID: 25031510
34. Bayram Y, Parlak M, Ozkacmaz A, Cikman A, Guducuoglu H, Kilic S, et al. Seroprevalence of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey's Van Province. *Jpn J Infect Dis* 2017; 70:65–8. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.675> PMID: 27169950
35. Christova I, Panayotova E, Trifonova I, Taseva E, Hristova T, Ivanova V. Country-wide seroprevalence studies on Crimean-Congo hemorrhagic fever and hantavirus infections in general population of Bulgaria. *J Med Virol* 2017; 89:1720–5. <https://doi.org/10.1002/jmv.24868> PMID: 28561377
36. Christova I, Gladnishka T, Taseva E, Kalvatchev N, Tsergouli K, Papa A. Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:177–9. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120299> PMID: 23260369

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the European region

37. Cikman A, Aydın M, Gulhan B, Karakeçili F, Kesik OA, Özcicek A, et al. Seroprevalence of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus in Erzincan Province, Turkey. Relationship with Geographic Features and Risk Factors. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2016; 16:199–204. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1879> PMID: 26808904
38. Ergönül Ö, Zeller H, Kılıç S, Kutlu S, Kutlu M, Cavusoglu S, et al. Zoonotic infections among veterinarians in Turkey: Crimean-Congo hemorrhagic fever and beyond. *Int J Infect Dis* 2006; 10:465–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.06.005> PMID: 16978897
39. Ertugrul B, Kırdar S, Ersoy OS, Ture M, Erol N, Öztürk B, et al. The seroprevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever among inhabitants living in the endemic regions of Western Anatolia. *Scand J Infect Dis* 2012; 44:276–81. <https://doi.org/10.3109/00365548.2011.621445> PMID: 22017179
40. Fajls L, Humolli I, Saksida A, Knap N, Jelovšek M, Korva M, et al. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in healthy population, livestock and ticks in Kosovo. *PLoS One* 2014; 9:e110982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110982> PMID: 25393542
41. Gargili A, Midilli K, Ergonul O, Ergin S, Alp HG, Vatanserver Z, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in European Part of Turkey: Genetic Analysis of the Virus Strains from Ticks and a Seroepidemiological Study in Humans. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:747–52. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0030> PMID: 21028961
42. Gazi H, Özkütük N, Ecemis Ö, Atasoylu G, Köroglu G, Kurutepe S, et al. Seroprevalence of West Nile virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Francisella tularensis and Borrelia burgdorferi in rural population of Manisa, western Turkey. *J Vector Borne Dis* 2016; 53:112–7. PMID: 27353580
43. Gergova I, Kamarinchev B. Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southeastern Bulgaria. *Jpn J Infect Dis* 2014; 67:397–8. <https://doi.org/10.7883/yoken.67.397> PMID: 25241694
44. Gozel MG, Dokmetas I, Oztop AY, Engin A, Elaldi N, Bakir M. Recommended precaution procedures protect healthcare workers from Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Int J Infect Dis* 2013; 17:e1046–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.005> PMID: 23816412
45. Gunes T, Engin A, Poyraz O, Elaldi N, Kaya S, Dokmetas I, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in high-risk population, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:461–4. <https://doi.org/10.3201/eid1503.080687> PMID: 19239765
46. Horváth LB. Precipitating antibodies to Crimean haemorrhagic fever virus in human sera collected in Hungary. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1976; 23:331–5. PMID: 829015
47. Koksali I, Yılmaz G, Aksoy F, Erensoy S, Aydın H. The seroprevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in people living in the same environment with Crimean-Congo haemorrhagic fever patients in an endemic region in Turkey. *Epidemiol Infect* 2014; 142:239–45. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001155> PMID: 23688370
48. Tekin S, Barut S, Bursalı A, Aydoğan G, Yuçe O, Demir F, et al. Seroprevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CHF) in risk groups in Tokat Province of Turkey. *African J Microbiol Res* 2010; 4:214–7.
49. Temocin F, Köse H, Sarı T, Duygu F, Şahin RO. Seroprevalence of Crimean–Congo hemorrhagic fever among health care workers in a hospital in an endemic region of Turkey. *J Infect Dev Ctries* 2018; 12:587–91. <https://doi.org/10.3855/jidc.9816> PMID: 31954009
50. Yağcı-Cağlayık D, Korukluoğlu G, Uyar Y. Seroprevalence and risk factors of Crimean-Congo hemorrhagic fever in selected seven provinces in Turkey. *J Med Virol* 2013; 86:306–14. <https://doi.org/10.1002/jmv.23699> PMID: 24037814
51. Abdıyeva K, Turebekov N, Dmitrovsky A, Tukhanova N, Shin A, Yerallyeva L, et al. Seroepidemiological and molecular investigations of infections with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Kazakhstan. *Int J Infect Dis* 2019; 78:121–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.015> PMID: 30522982
52. Greiner AL, Mamuchishvili N, Kakutia N, Stauffer K, Geleishvili M, Chitadze N, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Knowledge, Attitudes, Practices, Risk Factors, and Seroprevalence in Rural Georgian Villages with Known Transmission in 2014 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158049> PMID: 27336731
53. Magnaval J-F, Tolou H, Gibert M, Innokentiev V, Laborde M, Melnichuk O, et al. Seroepidemiology of Nine Zoonoses in Viljusk, Republic of Sakha (Northeastern Siberia, Russian Federation). *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:157–60. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0105> PMID: 20575641
54. Estrada-Peña A, de la Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res.* Elsevier; 2014; 108: 104–128. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2014.05.016> PMID: 24925264
55. Haines A, Ebi K. The Imperative for Climate Action to Protect Health. Solomon CG, editor. *N Engl J Med.* 2019; 380: 263–273. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1807873> PMID: 30650330

56. De la Fuente J, Estrada-Peña A. Ticks and tick-borne pathogens on the rise. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2012. pp. 115–116. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.001> PMID: 22609243
57. Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, Van Der Giessen J, Sprong H, Porter SR, et al. A clear and present danger: Tick-borne diseases in Europe. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2010. pp. 33–50. <https://doi.org/10.1586/eri.09.118> PMID: 20014900
58. Leblebicioglu H, Ozaras R, Fletcher TE, Beeching NJ. Crimean-Congo haemorrhagic fever in travellers: A systematic review. *Travel Med Infect Dis* 2016; 14:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.002> PMID: 26970396
59. Pshenichnaya NY, Leblebicioglu H, Bozkurt I, Sannikova IV, Abuova GN, Zhuravlev AS, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in pregnancy: A systematic review and case series from Russia, Kazakhstan and Turkey. *Int J Infect Dis* 2017; 58:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.02.019> PMID: 28249811
60. Nasirian H. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) seroprevalence: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2019; 196: 102–120. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.019> PMID: 31108083
61. Christova I, Younan R, Taseva E, Gladnisha T, Trifonova I, Ivanova V, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome and Crimean-Congo hemorrhagic fever as causes of acute undifferentiated febrile illness in Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13:188–92. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0938> PMID: 23421884
62. Németh V, Oldal M, Egyed L, Gyuranecz M, Erdélyi K, Kvell K, et al. Serologic Evidence of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection in Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2013; 13:270–2. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1011> PMID: 23421895
63. Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Coudrier D, Bouloy M. First Serologic Evidence for the Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Romania. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2012; 12:718–21. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0768> PMID: 22897346
64. Mertens M, Vatansever Z, Mrenoshki S, Krstevski K, Stefanovska J, Djadjovski I, et al. Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the Former Yugoslav Republic of Macedonia Revealed by Screening of Cattle Sera Using a Novel Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003519. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003519> PMID: 25742017
65. Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:179–80. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111040> PMID: 22261502
66. García Rada A. First outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in western Europe kills one man in Spain. *BMJ* 2016; 354:i4891. <https://doi.org/10.1136/bmj.i4891> PMID: 27609364
67. Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social. Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo en España [Internet]. Spain: Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019. Available: https://www.riojasalud.es/ri/ri/docs/ACTUALIZACIÓN_ER_FHCC_Julio_2019.pdf

ARTÍCULO SEGUNDO

OBJETIVO PRINCIPAL: Evaluar la presencia/ausencia del VFHCC en humanos de Castilla y León, España a través de un estudio serológico a escala representativa de la población local.

METODOLOGÍA: Estudio seroepidemiológico, realizado en una muestra significativa de la población de Castilla y León. Para la obtención de los individuos del estudio trabajamos en conjunto con el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, esto en vista de que los donantes de sangre representan un grupo de adultos sanos, asintomáticos. A todos los individuos incluidos se les explicó en qué consistía el estudio y se le solicitó un consentimiento informado.

PRINCIPALES RESULTADOS:

Desde un punto de vista descriptivo de los participantes:

Un total de 516 donantes de sangre fueron incluidos en este estudio. La mayoría de los participantes en el estudio fueron de sexo masculino (68,4%), y la media de edad calculada fue de 46,3 años. Asimismo, la mayoría de los participantes (86,8%) provinieron de zonas rurales y el 68,6% refirió tener contacto diario con animales (en sus actividades laborales o por recreación). De este 68,6%, el 20,9% realizaba prácticas ganaderas.

Uno de cada cinco participantes (109/516, 21,1%) se dedicaba a actividades profesionales de riesgo como agricultura y pastoreo, sacrificio, caza, veterinaria y asistencia sanitaria (principalmente personal de enfermería y técnicos de laboratorio). Y, un total de 15,3% de los participantes refirió haber sufrido una picadura por garrapata en los días o meses anteriores a la fecha de muestreo.

Principales evidencias encontradas:

Encontramos que la seroprevalencia fue del 1,1% (6/516). Asimismo, si consideramos la concordancia en al menos 2 de los métodos de serología usados la seroprevalencia calculada es de 0,58% (3/516). Dichos casos positivos provinieron de distintas provincias de Castilla y León, distribuidos geográficamente como se muestra en la siguiente

CONCLUSIONES:

Este estudio representa la primera evaluación seroepidemiológica en humanos realizada en España que sugiere una posible circulación del virus de Crimea Congo en individuos asintomáticos.

Nuestros resultados sugieren la necesidad de realizar estudios más extensos, incluyendo un estudio de seroprevalencia en animales silvestres y/o domésticos para establecer con mayor precisión la zona endémica en España peninsular. Asimismo, se necesitan más estudios para evaluar la pertinencia de las medidas de control para intervenciones clínicas en situaciones de un riesgo potencial de transmisión, como procedimientos de donación de sangre o de órganos.

RESEARCH

Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus-specific antibody detection in blood donors, Castile-León, Spain, summer 2017 and 2018

Lía Monsalve Arteaga¹, Juan Luis Muñoz Bellido^{2,3,4}, María Carmen Vieira Lista¹, María Belén Vicente Santiago⁴, Pedro Fernández Soto⁴, Isabel Bas⁵, Nuria Leralta⁵, Fernando de Ory Manchón⁶, Ana Isabel Negro⁵, María Paz Sánchez Seco⁵, Montserrat Alonso Sardón¹, Sonia Pérez González⁷, Ana Jiménez del Blanco⁷, Lydia Blanco Peris⁷, Rufino Alamo-Sanz⁸, Roger Hewson⁹, Moncef Belhassen-García¹, Antonio Muro¹

1. Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain
2. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, CSIC, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain
3. Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain
4. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain
5. Arbovirus and Imported Viral Diseases Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales, Madrid, Spain
6. Centro Nacional de Microbiología, Ciber en Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain
7. Center for Hemodonation and Hemotherapy of Castilla y León (CHEMICYL), Valladolid, Spain
8. Consejería de Sanidad Junta Castilla y León, Valladolid, Spain
9. Public Health England, Porton Down, Wiltshire, Salisbury, United Kingdom

Correspondence: Moncef Belhassen-García (belhassen@usal.es)

Citation style for this article:

Arteaga Lía Monsalve, Muñoz Bellido Juan Luis, Vieira Lista María Carmen, Vicente Santiago María Belén, Fernández Soto Pedro, Bas Isabel, Leralta Nuria, de Ory Manchón Fernando, Negro Ana Isabel, Sánchez Seco María Paz, Alonso Sardón Montserrat, González Sonia Pérez, Jiménez del Blanco Ana, Peris Lydia Blanco, Alamo-Sanz Rufino, Hewson Roger, Belhassen-García Moncef, Muro Antonio. Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus-specific antibody detection in blood donors, Castile-León, Spain, summer 2017 and 2018. Euro Surveill. 2020;25(10):pii=1900507. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.1900507>

Article submitted on 05 Aug 2019 / accepted on 07 Dec 2019 / published on 12 Mar 2020

Background: Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) is considered an emerging or even a probable re-emerging pathogen in southern Europe. Presence of this virus had been reported previously in Spain in 2010. **Aim:** We aimed to evaluate the potential circulation of CCHFV in western Spain with a serosurvey in asymptomatic adults (blood donors). **Methods:** During 2017 and 2018, we conducted a CCHFV serosurvey in randomly selected asymptomatic blood donors from western Spain. Three assays using specific IgG antibodies against CCHFV were performed: the VectoCrimea ELISA test, an in-house ELISA and indirect immunofluorescence (EuroImmun) test with glycoprotein and nucleoprotein. **Results:** A total of 516 blood donors participated in this cross-sectional study. The majority of the study participants were male (68.4%), and the mean age was 46.3 years. Most of the participants came from rural areas (86.8%) and 68.6% had contact with animals and 20.9% had animal husbandry practices. One in five participants (109/516, 21.1%) were engaged in at-risk professional activities such as agriculture and shepherding, slaughtering, hunting, veterinary and healthcare work (mainly nursing staff and laboratory technicians). A total of 15.3% of the participants were bitten by ticks in the days or months before the date of sampling. We detected anti-CCHFV IgG antibodies with two diagnostic assays in three of

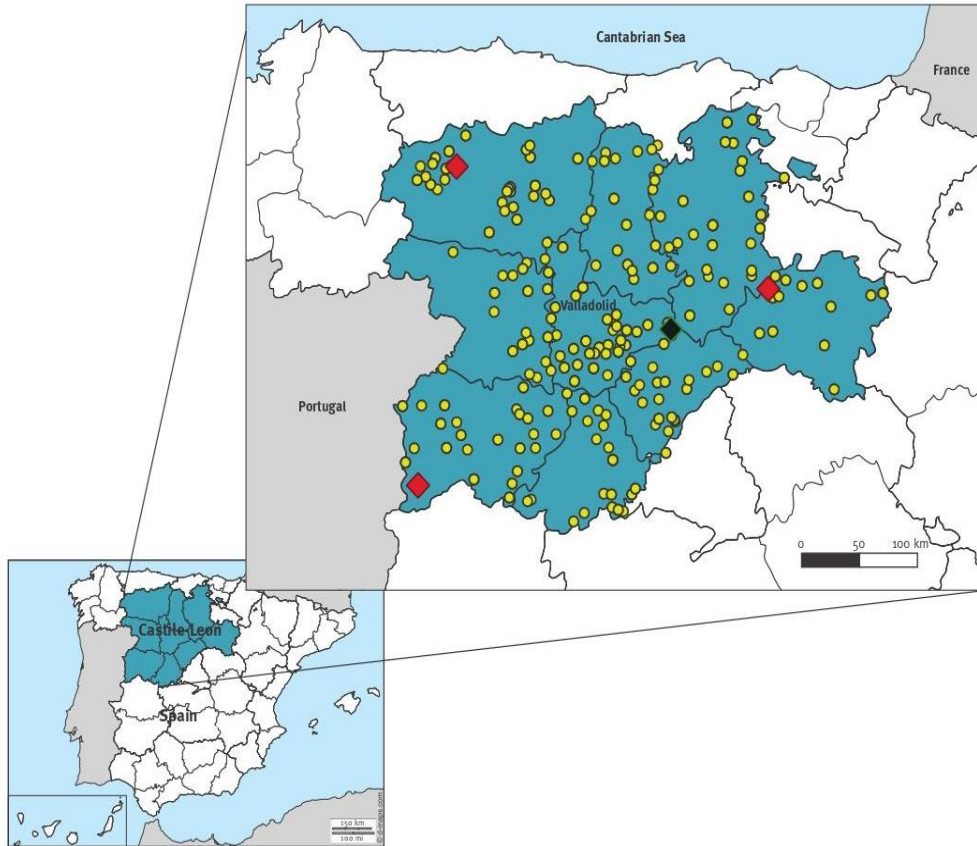
the 516 individuals and with one diagnostic assay in six of the 516 individuals. **Conclusion:** Seroprevalence of CCHFV was between 0.58% and 1.16% in Castile-León, Spain. This is the first study in western Spain that showed circulation of CCHFV in healthy people.

Introduction

Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne viral disease caused by the CCHF virus (CCHFV), an RNA negative single-stranded virus of the genus *Nairovirus* in the *Nairoviridae* family [1]. The virus has been identified in Africa, Asia and Europe in territories located south of the 50th North parallel, the area inhabited by the main vector, ticks of the genus *Hyalomma* spp. [2-5]. People living in rural areas, especially those involved in animal husbandry and slaughtering, are particularly at risk. Wild animals such as red deer and domestic animals including livestock can be reservoirs of the virus (they can become asymptotically infected or host the infected hard-body ticks). Since cattle serve as habitual hosts, people can become infected by tick bites or by manipulating CCHFV-infected animals or their body fluids [6,7]. It is well known that CCHFV is implicated in outbreaks with a very high mortality rate (10–40%) [5,8]. This potential risk is the reason why CCHFV was included

FIGURE

Geographical distribution of sample collection and positive results, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in blood donors, Castile-León, Spain, May–October 2017 and May–October 2018 (n = 516)



CCHFV: Crimean-Congo haemorrhagic fever virus.

Yellow circles: blood donors' places of residence; red diamonds: individuals with confirmed serology for IgG antibodies against CCHFV; black diamond: individual with a result concluded as indeterminate.

by the World Health Organization (WHO) as a priority pathogen for research and development [9-11].

CCHF is considered an emerging disease in southern Europe, with published reports from Albania, Bulgaria, Greece, Kosovo* and Turkey [12-19]. Moreover, imported cases have been detected in France and the United Kingdom (UK) in 2004 and 2013, respectively [20-22]. Filipe et al. reported the presence of IgG antibodies against CCHFV in asymptomatic individuals on the Iberian Peninsula in southern Portugal in 1984 [23]. Later, in 2010, CCHFV circulation was also identified for the first time in Spain, when the viral genome was detected in *Hyalomma* spp. ticks retrieved from wild red deer in Caceres (western Spain) [24]. In 2016, the first autochthonous human infection was recognised

in a man who travelled to the province of Ávila, 300 km south-west of Caceres where the infected ticks had been identified [25]. After an extensive effort of public health vigilance, the virus was identified in ticks feeding on domestic and wild animals in western Spain [26-28]. This could be attributed to the silent circulation of CCHFV introduced some time ago from West Africa by migratory birds [26,29].

A study carried out in the area did not find antibodies against the virus in humans [30], however, this could have been due to small sample size. The aim of our present study was to evaluate the potential circulation of CCHFV in Castile-León by a serosurvey performed in asymptomatic adults. We decided to work with blood donors because this group resembles the healthy

TABLE 1

Characteristics of serosurvey participants, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in blood donors, Castile-León, Spain, May–October 2017 and May –October 2018 (n = 516)

Characteristics	n	%
Age (years), mean \pm SD	46.3 \pm 11.2	
Male sex	353	68.4
Professional activities at risk	109	21.1
Agriculture/shepherding activities	81	15.7
Slaughtering	6	1.2
Hunting	2	0.4
Veterinarians	1	0.2
Healthcare workers (nurses and laboratory technicians)	10	1.9
Rural population	448	86.8
Contact with animals	354	68.6
Animal husbandry practices	108	20.9
History of a tick bite	79	15.3

SD: standard deviation.

population of a given zone and we can infer the real situation in a specific area from a prevalence value in this group.

Methods

Study design

A descriptive, cross-sectional study was carried out between May 2017 and May 2018 in the Castile-León Hemotherapy and Hemodonation Centre in Valladolid, Spain, the centre that centralises blood product collection for the Autonomous Community of Castile-León with an area of 94,225 km² and a total population of 2,409,164 inhabitants in 2018, according to the data provided by the National Institute of Statistics [31].

Sampling and data collection

We collected the blood donors' epidemiological data, including age, sex, rural or urban residency, occupational activity, recreational activities, animal husbandry (work or recreational) and exposure to tick bites. Sera were obtained prospectively and stored immediately at -20°C until serological assays were performed.

We estimated a total sample size of 440 participants, proportional to the population size of Castile-León according to the following criteria: an alpha value of 0.05 (95% confidence interval), a design effect of 1, assuming minimal household clustering, and a response rate of 90%. Finally, a representative group of 516 blood donors was selected for the serosurvey. The blood samples and epidemiological data were collected between May 2017 and May 2018 (Figure). The blood donors were healthy individuals between 18 and 65 years-old (they were not stratified by sex). The exclusion criteria were individuals with an established diagnosis of HIV infection, hepatitis B or C, syphilis, HTLV infection or malaria.

Immunological assay

Antibodies against CCHFV were detected by a commercial immunoenzymatic kit (Vector Best, Novosibirsk, Russia). The cut-off was calculated as the mean of the adjusted optical density of the negative control serum plus 0.2. All samples with CCHFV-positive serology were tested in triplicate using the Vector Best test and the mean values of absorbance/cut-off were used for analysis. These positives samples were confirmed by an in-house ELISA described in Dowall SD et al. [32], an immunofluorescence assay (IFA (Euroimmun, Lübeck, Germany)) using nucleoprotein (NP) and glycoprotein (GPC) antigens at 1:10 dilution. Likewise, we tested by all the above methods 50 randomly chosen samples that were initially negative from the 516 blood donors included in the study.

We considered samples as positively confirmed if they tested positive in at least two different tests. For IFA, we considered a result as indeterminate when the fluorescence result of the sample was not negative but less intense than that of the positive control incorporated in the test.

Data analysis

All data were statistically analysed using SPSS Statistics 23.0. For the qualitative variables, we calculated the proportions, and for the quantitative variables, we calculated the mean with standard deviation (SD) and median with interquartile range (IQR).

Ethical statement

The procedures described here were carried out in accordance with the ethical standards described in the Helsinki Declaration revised in 2013. The protocol was approved by the Bioethics Committees: Comité Ético de Investigación Clínica Área de Salud Valladolid-Este, with the number/ID BIO-2017–65.

All participants signed an informed consent form. Each participant received this form, which contained the objectives, the procedures, the study characteristics and a question if they wanted to be a part of the study. We always maintained the confidentiality of the personal data of the blood donors. All samples were identified by a code.

Results

A total of 516 blood donors participated in this study. The characteristics of the studied population are shown in Table 1.

More than two thirds of the study participants were male (68.4%; 353/516), the mean age was 46.3 years (SD \pm 11.2; range: 18–65 years). Most of the participants came from rural areas (86.8%; 448/516) and around two thirds had contact with animals (68.6%; 354/516) and one fifth were involved in animal husbandry (20.9%; 108/516). One in five participants (21.1%; 109/516) were engaged in at-risk professional activities

TABLE 2

Samples from blood donors positive for antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by ELISA and/or IFA, Castile-León, Spain, May–October 2017 and May–October 2018 (n = 6)

	ELISA IgG		IFA IgG		ELISA IgM		IFA IgM		Final result
	Vector Best ^a	In house ^b	GPC	NP	Vector Best ^a	In house ^b	GPC	NP	
1	10.01 (+)	3.4 (+)	–	–	0.50 (–)	0.3 (–)	–	–	+
2	10.01 (+)	0.1 (–)	–	–	0.01 (–)	Not done	Not done	Not done	–
3	10.01 (+)	6.4 (+)	Indeterminate	Indeterminate	0.01 (–)	Not done	Not done	Not done	+
4	2.59 (+)	0.2 (–)	–	–	0 (–)	Not done	Not done	Not done	–
5	0.90 (+)	0.5 (–)	+	Indeterminate	0.01 (–)	Not done	Not done	Not done	+
6	0.01 (–)	0.3 (–)	Indeterminate	+	0 (–)	Not done	Not done	Not done	Indeterminate

+: positive; –: negative; GPC: glycoprotein precursor construct; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IFA: immunofluorescence assay; NP: nucleoprotein.

ELISA results are expressed as a ratio sample absorbance/cut-off. IFA is expressed as a qualitative result obtained at 1:10 dilution.

^a This assay was performed in triplicate.

^b In-house ELISA performed at the National Centre of Microbiology.

such as agriculture and shepherding activities, slaughtering, hunting, veterinary and healthcare work (mainly nursing staff and laboratory technicians). Seventy-nine participants (15.3%) were bitten by ticks in the period 3 days to 3 months before the date of sampling.

Positive serological results are presented in Table 2. There were six samples in which we found antibodies in at least one of the performed assays (0.96%) and three samples in which we found agreement in at least two of the performed assays (3/516), establishing a seroprevalence between 0.58% and 1.16%.

The three individuals with positive IgG results were all men from rural areas in Castile-León (Figure). The ages of these individuals were 18, 44 and 60 years. None of them had a history of tick bites. Moreover, two of the three were involved in animal husbandry (either for professional or recreational reasons) and one performed outdoor activities putting them at risk of infection, such as trekking and mountain biking). It is important to mention that two other individuals were positive only by the VectoCrimea ELISA, and another one was positive only in the NP IFA with an indeterminate result in the GPC IFA (Table 2).

Discussion

To our knowledge, this is the first study conducted in healthy blood donors in Spain, which attempts to describe the prevalence of this disease and evaluate the potential circulation of CCHFV. This study shows that CCHFV has infected humans in western Spain who did not recall having had any suggestive symptoms in the past. None of the individuals with IgG antibodies against CCHFV remembered being bitten by a tick, but all of them reported living in rural areas and being involved in animal husbandry. The absence of

IgM antibodies in the three infected individuals suggests that there were no acute or recent infections in our sample population. However, our work had several limitations such as the small sample size. This could be involved in the fact that statistical significance was not reached when we looked for the possible risk factors implicated in the patients with positive serology. In addition, we did not perform all the serological tests available, for example seroneutralisation was not available in our laboratory at the time of the analysis, and we did not perform this test because it lacks sensitivity because of the weak neutralising antibody response to this virus [45,46].

The prevalence we found here (0.58–1.16%) is similar to that reported in the 1980s by Filipe et al. in southern Portugal [23]. It is also similar to the prevalence found in other European countries with a very low or null incidence, such as Hungary [35] or Greece [36]. Even though the seroprevalence in the general population in Greece is close to 3.5%, (with an unexpectedly high seroprevalence >15% in individuals involved in animal husbandry for work), these values contrast with the low incidence of the disease on the Greek territory (only one symptomatic and fatal case has been reported since 2008) [36].

The classification of positive results in low-prevalence diseases is difficult, especially when only limited information is available about the performance characteristics of the analytical tests. Previous studies, such as the one performed by Vanhomwegen et al. in 2012 [37], showed that both enzyme immunoassay (EIA) and IFA used in this study have an acceptable sensitivity (80–85%) and an excellent specificity >98% for both IgG and IgM. It is therefore unlikely that discrepancies between EIA and IFA results were due to the lack of specificity

of these techniques. We decided to consider as positive only those samples that showed positive results in most tests performed (at least two of the four assays performed), in order to perform an accurate classification of the cases as positive, negative or indeterminate in the absence of a gold standard (a procedure used, for example, when studies are carried out to compare different diagnostic methods [38]). Therefore, we assume that the presented seroprevalence range is adequate, in accordance with the above performance allocation criteria. Protocols of the Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide (an association developing standards for transfusion medicine), have so far not established the need to detect CCHFV in blood or other blood-derived products [39]. The currently available data are insufficient to make an evidence-based recommendation for excluding blood donation product because we have not seen an individual with acute infection [40]. Although our study suggests that CCHFV is circulating in Castile-León, the data are, in the absence of IgM-positive results, not sufficient to re-evaluate the current statements about the screening of CCHF in blood donors.

The geographical expansion to northern Europe of several vector-borne communicable diseases has increased in recent years. This phenomenon is associated with various factors including an increase in the global annual average temperature [41,42], human displacements, augmentation of population density in determined vulnerable zones [43,44], legal and illegal trade of animals and animal products [45] and patterns of land use for agriculture [46]. Recent cases associated with the African-III clade of CCHFV reported in Spain show that CCHF is not an exception [25]. The introduction of the virus in south-western Europe could be related to the transportation of infected larvae and nymphs of hard ticks by migratory birds from North Africa [24]. The ticks established their ecological environment in this zone where they became adults and fed on ungulates or human beings, maintaining an enzootic cycle [6]. Our results demonstrate the presence and circulation of the virus in western Spain, even with a low level of endemicity.

Conclusion

This is the first serosurvey conducted in Spain that suggests a possible circulation of the virus in asymptomatic individuals. Our results suggests the need for more extensive studies, including a seroprevalence survey in wild or domestic animals and other serosurveys in people living in other areas of Spain in order to learn more about the epidemiology of CCHFV in Spain and to evaluate the relevance of control measures for clinical interventions in situations with a potential risk of transmission, such as blood or organ donation procedures.

*Note

*This designation is without prejudice to positions on status, and is in line with United Nations Security Council Resolution 1244/99 and the International Court of Justice Opinion on the Kosovo declaration of independence.

Acknowledgements

We want to thank the “Biobanco del centro de Hemoterapia de Castilla y León” for the sample collection and storage and for conducting of the surveys needed for the analysis.

Funding:

This study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET RD16/0027/0018 (AM) and RD16/0003/0003 (MPSS), DTS16/00207 (AM), PI16/01784 (PFS), European Union co-financing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) ‘Una manera de hacer Europa’.

The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

None declared.

Authors’ contributions

Concept of study: LMA, JLMB, MBG, AM. Design of study and methodology: LMA, SPG, AJB, LBP, RAS. Collecting data: LMA, MCVL, MBVS, PFS, IB, NL, FOM, AIN, MPSS. Analysing data: MAS, RH. Writing draft: LMA, MBG, AM. Writing final version: LMA, MBG, AM. Review and approving final version: all authors.

References

1. Ballinger MJ, Medeiros AS, Qin J, Taylor DJ. Unexpected differences in the population genetics of phasmavirids (Bunyavirales) from subarctic ponds. *Virus Evol.* 2017;3(1):vex015. <https://doi.org/10.1093/ve/vex015> PMID: 28744370
2. Leblebicioglu H, Eroglu C, Erciyas-Yavuz K, Hokelek M, Acici M, Yilmaz H. Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(8):1331-4. <https://doi.org/10.3201/eid2008.131547> PMID: 25062428
3. Spengler JR, Bente DA. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Spain - New arrival or silent resident? *N Engl J Med.* 2017;377(2):106-8. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707436> PMID: 28700846
4. Estrada-Peña A, de la Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res.* 2014;108:104-28. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016> PMID: 24925264
5. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 2013;100(1):159-89. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006> PMID: 23906741
6. Aslam S, Latif MS, Daud M, Rahman ZU, Tabassum B, Riaz MS, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Risk factors and control measures for the infection abatement. *Biomed Rep.* 2016;4(1):15-20. <https://doi.org/10.3892/br.2015.545> PMID: 26870327
7. Kasi KK, Sas MA, Sauter-Louis C, Gethmann JM, Groschup MH, Conraths FJ. Risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Livestock in Pakistan. *Int J Infect Dis.* 2019;79:137. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.335>

8. Sidira P, Maltezos HCC, Haidich A-BA-B, Papa A. Seroepidemiological study of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, 2009-2010. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(2):E16-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03718.x> PMID: 22192082
9. World Health Organization (WHO). 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. Meeting report. Geneva, Switzerland: Informal consultation 24-25 Jan 2017. Available from: <https://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf?ua=1>
10. World Health Organization (WHO). An R&D Blueprint for Action to Prevent Epidemics: Plan of Action. Geneva: WHO; 2016. Available from: https://www.who.int/blueprint/about/r_d_blueprint_plan_of_action.pdf
11. World Health Organization (WHO). Blueprint for R&D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens. Funding & coordination models for preparedness and response. Geneva: WHO; 2016. Available from: https://www.who.int/blueprint/what/improving-coordination/workstream_5_document_on_financing.pdf
12. Gunes T, Engin A, Poyraz O, Elaldi N, Kaya S, Dokmetas I, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in high-risk population, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):461-4. <https://doi.org/10.3201/eid1503.080687> PMID: 19239765
13. Midilli K, Gargili A, Ergonul O, Sengöz G, Ozturk R, Bakar M, et al. Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul. *BMC Infect Dis.* 2007;7(1):54. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-54> PMID: 17553137
14. Eurosurveillance editorial team. Increase in cases of Crimean-Congo haemorrhagic fever, Turkey, 2006. *Euro Surveill.* 2006;11(7):E060720.2. PMID: 16966763
15. Papa A, Maltezos HC, Tsiodras S, Dalla VG, Papadimitriou T, Pierrousakos I, et al. A case of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, June 2008. *Euro Surveill.* 2008;13(33):18952. <https://doi.org/10.2807/ese.13.33.18952-en> PMID: 18761893
16. Christova I, Younan R, Taseva E, Gladnisha T, Trifonova I, Ivanova V, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome and Crimean-Congo hemorrhagic fever as causes of acute undifferentiated febrile illness in Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(3):188-92. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0938> PMID: 23421884
17. Roth C. Outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Kosovo – update. *Euro Surveill.* 2001;5(25):1731. <https://doi.org/10.2807/esw.05.25.01731-en>
18. Papa A, Bino S, Llagami A, Brahimaj B, Papadimitriou E, Pavlidou V, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania, 2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(8):603-6. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0770-9> PMID: 12226691
19. Dreshaj S, Ahmeti S, Ramadanani N, Dreshaj G, Humolli I, Dedushaj I. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel Med Infect Dis.* 2016;14(2):81-91. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.012> PMID: 27044611
20. Tall A, Sall AA, Faye O, Diatta B, Sylla R, Faye J, et al. [Two cases of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) in two tourists in Senegal in 2004]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2009;102(3):159-61. PMID: 19739410
21. Jauréguiberry S, Tattevin P, Tarantola A, Legay F, Tall A, Nabeth P, et al. Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4905-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4905-4907.2005> PMID: 16145173
22. Barr DA, Aitken C, Bell DJ, Brown CS, Cropley I, Dawood N, et al. First confirmed case of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the UK. *Lancet.* 2013;382(9902):1458. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61718-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61718-3) PMID: 24243135
23. Filipe AR, Callisher CH, Lazuick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol.* 1985;29(4):324-8. PMID: 2864836
24. Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(1):179-80. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111040> PMID: 22261502
25. Negrodo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al. Autochthonous Crimean-Congo hemorrhagic fever in Spain. *N Engl J Med.* 2017;377(2):154-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615162> PMID: 28700843
26. Cajimat MNB, Rodríguez SE, Schuster IUE, Swetnam DM, Ksiązek TG, Habela MA, et al. Genomic characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in hyalomma tick from Spain, 2014. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017;17(10):714-9. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2190> PMID: 28836897
27. Sierra MJ, García San Miguel L, García M, Vila B, Suárez B, Monge S, et al. Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) en España. [Status report and risk assessment of transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) in Spain]. Madrid: Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2019. Spanish. Available from: https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER_FHCC.pdf
28. Negrodo A, Habela MÁ, Ramírez de Arellano E, Diez F, Lasala F, López P, et al. Survey of Crimean-Congo hemorrhagic fever enzootic focus, Spain, 2011-2015. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):1177-84. <https://doi.org/10.3201/eid2506.180877> PMID: 31107219
29. Spengler JR, Estrada-Peña A. Host preferences support the prominent role of Hyalomma ticks in the ecology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(2):e0006248. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006248> PMID: 29420542
30. Palomar AM, Portillo A, Santibáñez S, García-Álvarez L, Muñoz-Sanz A, Márquez FJ, et al. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013-2015. *Emerg Infect Microbiol Clin.* 2017;35(6):344-7. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.009> PMID: 28291670
31. National Statistics Institute (INE). España en cifras 2019. Población. [Spain in numbers. Population]. Madrid: INE; 2019. Spanish. Available from: https://www.ine.es/produser/espaa_cifras/2019/10/#zoom=2
32. Dowall SD, Richards KS, Graham VA, Chamberlain J, Hewson R. Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen. *J Virol Methods.* 2012;179(2):335-41. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.020> PMID: 22155577
33. Tezer H, Polat M. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(5):555-66. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1021782> PMID: 25746112
34. Burt FJ. Laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Future Virol.* 2011;6(7):831-41. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.47>
35. Németh V, Oldal M, Egyed L, Gyuranecz M, Erdélyi K, Kvell K, et al. Serologic evidence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(4):270-2. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1011> PMID: 23421895
36. Papa A, Dalla V, Papadimitriou E, Kartalis GNN, Antoniadis A. Emergence of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):843-7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02996.x> PMID: 19845692
37. Vanhomwegen J, Alves MJ, Zupanc TA, Bino S, Chinikar S, Karlberg H, et al. Diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(12):1958-65. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120710> PMID: 23171700
38. de Ory F, Guisasaola M-E, Balfagón P, Sanz JC. Comparison of commercial methods of immunoblot, ELISA, and chemiluminescent immunoassay for detecting type-specific herpes simplex viruses-1 and -2 IgG. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1):e22203. <https://doi.org/10.1002/jcla.22203> PMID: 28332725
39. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009;49(Suppl 2):1S-29S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x> PMID: 19686562
40. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). Rapid risk assessment: Crimean-Congo haemorrhagic fever in Spain. Stockholm: ECDC; 2016. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-crimean-congo-haemorrhagic-fever-spain-9-september-2016>
41. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res.* 2013;98(2):248-60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.02.007> PMID: 23458713
42. López-Vélez R, Molina Moreno R. [Climate change in Spain and risk of infectious and parasitic diseases transmitted by arthropods and rodents]. *Rev Esp Salud Publica.* 2005;79(2):177-90. PMID: 15913053
43. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760> PMID: 22880140
44. Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. Epidemiology of chikungunya in the Americas. *J Infect Dis.*

2016;214(suppl 5):S441-5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390> PMID: 27920170

45. de La Rocque S, Balenghien T, Halos L, Dietze K, Claes F, Ferrari G, et al. A review of trends in the distribution of vector-borne diseases: is international trade contributing to their spread? *Rev Sci Tech*. 2011;30(1):119-30. <https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2018> PMID: 21809758
46. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*. 2012;380(9857):1946-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61151-9) PMID: 23200503

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2020.

ARTÍCULO TERCERO

OBJETIVO PRINCIPAL: Determinar la presencia/ausencia de VFHCC en pacientes que se presentaron con enfermedad febril al servicio de urgencias del Complejo Asistencial de Salamanca (CAUSA) durante los períodos de mayo a octubre en 2017 y 2018

METODOLOGÍA: Estudio descriptivo en el cual se incluyeron pacientes mayores de 18 años que acudieron a urgencias del CAUSA por fiebre como principal motivo de consulta. Se tomaron muestras de suero y plasma para determinar la presencia / ausencia de VFHCC, así como para la realización de rt-PCR anidada. Se realizó, además, un análisis filogenético de la muestra positiva al análisis de rt-PCR.

PRINCIPALES RESULTADOS:

Desde un punto de vista descriptivo de los participantes:

En este estudio se incluyeron ciento treinta y tres pacientes. La media de edad (\pm DE) fue de 67,63 años (\pm 18,8); 81 (60,9%) eran varones. La mayoría de estos individuos presentaban síntomas respiratorios y genitourinarios y fueron diagnosticados de síndrome febril inespecífico en el servicio de urgencias del CAUSA.

Principales evidencias encontradas:

El diagnóstico serológico y molecular detectó la presencia del VFHCC en siete pacientes. Un paciente (Caso 1) presentó anticuerpos IgM anti-VFHCC mediante dos ensayos serológicos. Este paciente también tuvo resultados positivos mediante RT-PCR anidada (tabla 2). Un segundo caso (Caso 2) también presentó resultados positivos de IgM por VectorBest EIA, pero no fue confirmado por el otro análisis realizado y el resultado por RT-PCR anidada fue negativo.

El análisis filogenético demostró que el paciente que presentó la rt-PCR anidada positiva presentaba una infección por el genotipo V, siendo este el primer caso en humanos por este genotipo detectado en España.

CONCLUSIONES:

- 1) Este estudio sugiere que la FHCC es una causa identificable de enfermedad febril en España; por tanto, es obligatorio sospechar esta enfermedad cuando un paciente acude al servicio de urgencias con fiebre, trombocitopenia y elevación de transaminasas, especialmente durante los periodos de primavera y verano, y en aquellos pacientes que presentan un riesgo laboral asociado.
- 2) Se describe el primer caso de FHCC en humanos en España asociado al genotipo V (originario de Turquía).
- 3) Se necesitan más estudios para establecer el mecanismo por el cual se ha establecido este nuevo genotipo en el territorio español.

Title

New circulation of genotype V of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in humans from Spain

Running title

New clade of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Spain.

Authors

1. **Lia Monsalve Arteaga M.D MSc** Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. Email: liacma@usal.es
2. **Juan Luis Muñoz Bellido M.D Ph.D.** Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, CSIC, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), Salamanca, Spain; Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain. Email: jlmubel@usal.es
3. **Jorge García Criado M.D** Servicio de Urgencias, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain. Email: jgarciacr@saludcastillayleon.es
4. **Ana Isabel Negro Ph.D.** Arbovirus and Imported Viral Diseases Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales, Madrid, Spain. Email: anabelnegredo@isciii.es
5. **María Carmen Vieira Lista.** Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. CIETUS. IBSAL, Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Salamanca, Spain. E-mail: carmelilla@usal.es
6. **Jesús Ángel Sánchez-Serrano M.D** Servicio de Urgencias, CAUSA, Salamanca, España. Email: jasanchezs@saludcastillayleon.es

7. **María Belén Vicente Santiago, Ph.D.** Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. CIETUS. IBSAL, Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Salamanca, Spain. E-mail: belvi25@usal.es
8. **Amparo López-Bernus, M.D, Ph.D.** Servicio de Medicina Interna. CAUSA. CIETUS. IBSAL, Salamanca, España. E-mail: albernus@hotmail.com
9. **Fernando de Ory Manchón PhD.** Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España; Ciber en Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, España. Email: fory@isciii.es
10. **Maria Paz Sánchez Seco PhD.** Arbovirus and Imported Viral Diseases Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales, Madrid, Spain. Email: paz.sanchez@isciii.es
11. **Montserrat Alonso Sardón M.D, Ph.D.** Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. Email: sardonm@usal.es
12. **Antonio Muro M.D, Ph.D.** Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. Email: ama@usal.es
13. **Moncef Belhassen-García M.D, Ph.D.** Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. Email: belhassen@usal.es

Corresponding authors

Moncef Belhassen-García. Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the

University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

Email: belhassen@usal.es

Antonio Muro M.D, Ph.D. Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO). IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

Email: ama@usal.es

Keywords

Crimean-Congo haemorrhagic fever virus; emerging disease; haemorrhagic fever; tick-borne disease; zoonosis; Spain.

Abstract

Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a widespread tick-borne viral disease caused by the Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV). CCHFV has been implicated in severe viral haemorrhagic fever outbreaks. During the summer of 2016, the first two cases with genotype III (Africa III) were reported in Spain. The first aim of our study was to determine the presence of CCHFV among patients with febrile illness during the spring and summer periods in 2017 and 2018. Finally, we perform a phylogenetic analysis to determine the genotype of the virus.

Methods

We prospectively evaluated patients older than 18 years who came to the emergency with fever. Specific IgM and IgG antibodies against CCHFV by ELISA and one immunofluorescence assay against two different proteins (nucleoprotein and glycoprotein C) was done. Moreover, a Real Time PCR was performed. A phylogenetic analysis was carried out to characterize the complete CCHFV genome.

Results

A total of 133 patients were selected. The mean age was 67.63 years and 60.9% were male. One-third of the patients presented an acute undifferentiated febrile illness. Three patients had anti-CCHFV IgG antibodies, suggesting a previous infection. One patient was found confirmed anti-CCHFV IgM antibodies and positive RT-PCR. Phylogenetic analysis indicated that the virus corresponds to the European genotype V. This patient came to the emergency in August 2018 presenting an acute febrile syndrome with thrombopenia and liver impairment.

Conclusions

We describe a new circulation of European genotype V CCHFV in Spain. Moreover, this study suggests that CCHFV is an identifiable cause of febrile illness of unknown aetiology in Spain. Thus, CCHF could be suspected in patients with fever, liver damage, and/or haemorrhagic disorders, particularly in people with risk activities who present in the spring or summer.

Introduction

Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a viral infectious disease caused by the homonymous microorganism, the Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV), a tick-borne virus of the genus *Nairovirus* and the *Nairoviridae* family. This virus is transmitted to humans by infected tick bites, by direct contact with humans or animals with a high viral load, and by direct contact with blood or other bodily fluids or tissues of viraemic humans or livestock [1,2]. To date, six viral genotypes have been identified. Genotypes I, II and III are mainly distributed in Africa, genotype IV in Asia, genotype V in East Europe, and genotype VI in Greece [3]. Genotype VI is the only one that seems to be non-pathogenic [4]. This is the reason why in Greece, where the AP92 strain circulates, it exists an elevated seroprevalence [5] with only 1 known case of mortality [6]; which differs with its neighbour country Turkey where the local viral strain is more aggressive in terms of morbidity and mortality [7].

In Europe, this virus has caused major outbreaks in the eastern region [8] (principally in Balkan countries, Turkey, and Russia). However, in recent years, its epidemiology has been changing, a fact that has been associated with climate change [9]. Due to this epidemiological modification, CCHFV is currently considered endemic in areas of Southwest Europe since human cases have been identified in western Spain since the summer of 2016 [10,11]. These cases were produced by the Africa III genotype, and it seems that it could be introduced from Morocco through migratory birds carrying premature forms of infected ticks. Currently, its enzootic cycle has been established in some areas of Spain, with infected ticks identified in wild and domestic animals [12], which makes epidemiological control more difficult [10,13]. No other CCHFV genotype has been described in humans in Spain.

From a clinical point of view, this infection can present with a wide clinical spectrum, from an asymptomatic or oligosymptomatic disease to a life-threatening infectious condition with fever, vomiting and diverse haemorrhagic manifestations that may lead to multi-organ failure and death [14]. Laboratory analyses are frequently altered, with leukopenia, thrombocytopenia and elevated transaminases [15]. A strong clinical suspicion is needed in order to obtain a clear and fast diagnosis, initiate supportive treatment if needed, and activate biosafety measures to prevent transmission.

The aim of this study was to evaluate whether CCHFV is a cause of acute febrile syndrome, to determine the risk factors and to describe the main clinical and laboratory characteristics of the acute cases identified. In this way, sequencing in samples with CCHFV were done.

Methods

Study type and sample collection

Descriptive, cross-sectional study that was carried out during the months of May to October in 2017 and 2018 at the emergency of University Salamanca Hospital (HUS) located in western Spain. It covers an area of 12,350 km² encompassing 362 municipalities with a population of 331,473 individuals. All patients with an age above 18 years who came to HUS for a febrile illness without an aetiologic diagnosis were eligible. Patients were evaluated by the emergency department and were

included if they presented with fever without an aetiological diagnosis. Serum and plasma samples were taken to determine the presence/absence of CCHFV. Details were collected from the medical records.

Immunological techniques

The antibodies for CCHFV were analysed according to methodology described previously [16] . Briefly, we used a commercial immunological kit (Vector Best, Novosibirsk, Russia) according to the manufacturer's instructions. The cut-off was calculated as the mean of the adjusted optical density (OD) of the negative control serum plus 0.2. All samples were tested in triplicate and the mean values were used for this study. Moreover, *in-house* ELISA and immunofluorescence assay (IFA) (Euroimmun, Germany) were used to confirm the positive results.

CCHFV detection by RT-PCR

Total RNA was extracted from the plasma samples using the QIAamp viral RNA Mini kit (QIAGEN, Germany) according to the recommendations of the supplier. The RNA was eluted in 60 µL of RNase-free water and stored at -80°C until needed. Furthermore, a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) described by Atkinson *et al.* [17] was used for the detection of the CCHFV genome in all the samples. This procedure consists in a nested PCR that reduces nonspecific amplification of RNA, it is performed by two successive PCR, including the conversion of the RNA to DNA at the first reaction, by the use of an inverse transcriptase.

Positive acute or previous cases of CCHFV

Acute cases were defined as the presence of confirmed IgM (by at least two different assays) and/or positive RT-PCR. Previous cases were characterized by the presence of IgG antibodies confirmed by two of the performed tests in the absence of markers of acute infection. Cases with a single IgG positive result, not confirmed by any other assay, were considered as probable.

Phylogenetic analysis

To characterize the complete CCHFV genome, we performed a phylogenetic analysis of the full S, M, and L segments

Ethics Statement

The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Investigation with Drugs of University Salamanca Hospital (HUS), Salamanca, Spain (CEIMC PI 91 09/2017). The procedures described here were carried out in accordance with the ethical standards described in the Revised Declaration of Helsinki in 2013. All clinical and epidemiological data were anonymized.

Statistical analysis

All the data were statistically analysed using the SPSS Statistics 23.0. software (*Statistical Package for the Social Sciences*). Proportions were calculated for the qualitative variables and standard deviation (SD) and interquartile range (IQR) was calculated for the mean and median respectively.

Results

One-hundred thirty-three patients were included in this study. The main epidemiological and clinical data are shown in **table 1**. The mean age (\pm SD) was 67.63 years (\pm 18.8), and 81 (60.9%) were male. Most of these individuals presented with respiratory and genitourinary symptoms and were diagnosed with nonspecific febrile syndrome in the emergency department from HUS.

Table 1. Main epidemiological and clinical characteristics of patients

Characteristics	N= 133, n (%)
Age mean \pm SD, years	67.6 (18.8)
Median age, years	73 (IQR, 54.5-82)
Male gender	81 (60.9)
Urban population	101 (68.7)
Emergency department initial diagnosis	
Respiratory syndrome	37 (27.8)
Genito-urinary syndrome	32 (24.0)
Febrile syndrome without focus	30 (22.5)
Fever after tick exposure	8 (6.0)
Neurological syndrome	6 (4.5)
Gastrointestinal syndrome	6 (4.5)
Biliary and hepatic infection	4 (3.0)
Cutaneous affectation	4 (3.0)
Mononucleosis syndrome	2 (1.5)
ENT infection	2 (1.5)
Fever associated to haemodialysis process	2 (1.5)

ENT: Ear, nose, and throat disorder

Serological and molecular diagnosis detecting CCHFV showed that seven patients had positive results in some test. One patient (Case 1) had anti-CCHFV IgM antibodies by two serologic assays. This patient also had positive results by Nested RT-PCR (**table 2**). Case 2 also presented IgM positive results by VectorBest EIA, but not confirmed by the other performed analysis and result by Nested RT-PCR was negative. However, case 2 and case 3 and 4 had anti-CCHFV IgG confirmed by 2 or more of the performed assays, indicating previous infection. Finally, other patient (case 5) presented a positive result for IgG in one assay while an undetermined result was obtained in another assay, being classified as indeterminate.

The nucleotide sequence of the different CCHFV segments from the confirmed acute infection (case 1) was done. Phylogenetic analyses were shown in **Figure 1**. The samples from Salamanca Spain 2018 (case 1) belong to genotype V, Europe. Is the first time that this genotype is described in human infected with CCHFV from Spain.

The main clinical data of patients with acute and previous CCHF are described in **table 3**. The patient with confirmed acute CCHF was a 53-years-old man, involved in cattle husbandry in Béjar, Salamanca province (coordinates: 40.38641 latitude -5.76341 longitude), a small city with 12,961 inhabitants, near to the Portuguese border. He presented in the emergency department at the beginning of August 2018 with a history of fever of 5 days, chills, mouth ulcerations (but not any haemorrhagic oral bullae) and acute leg myalgias with no bleeding symptomatology. Laboratory analysis revealed leukopenia, thrombopenia, increase of transaminases with an anicteric cholestasis, and prolongation of activated partial thromboplastin time. Also, an hemophagocytic syndrome was raised in order of the presence of hyperferritinemia (>10,000 ng/mL), hypertriglyceridemia and increase of lactate dehydrogenase (LDH) Also, it is important to asseverate that no nosocomial cases were reported.

Figure 1: Phylogenetic analysis

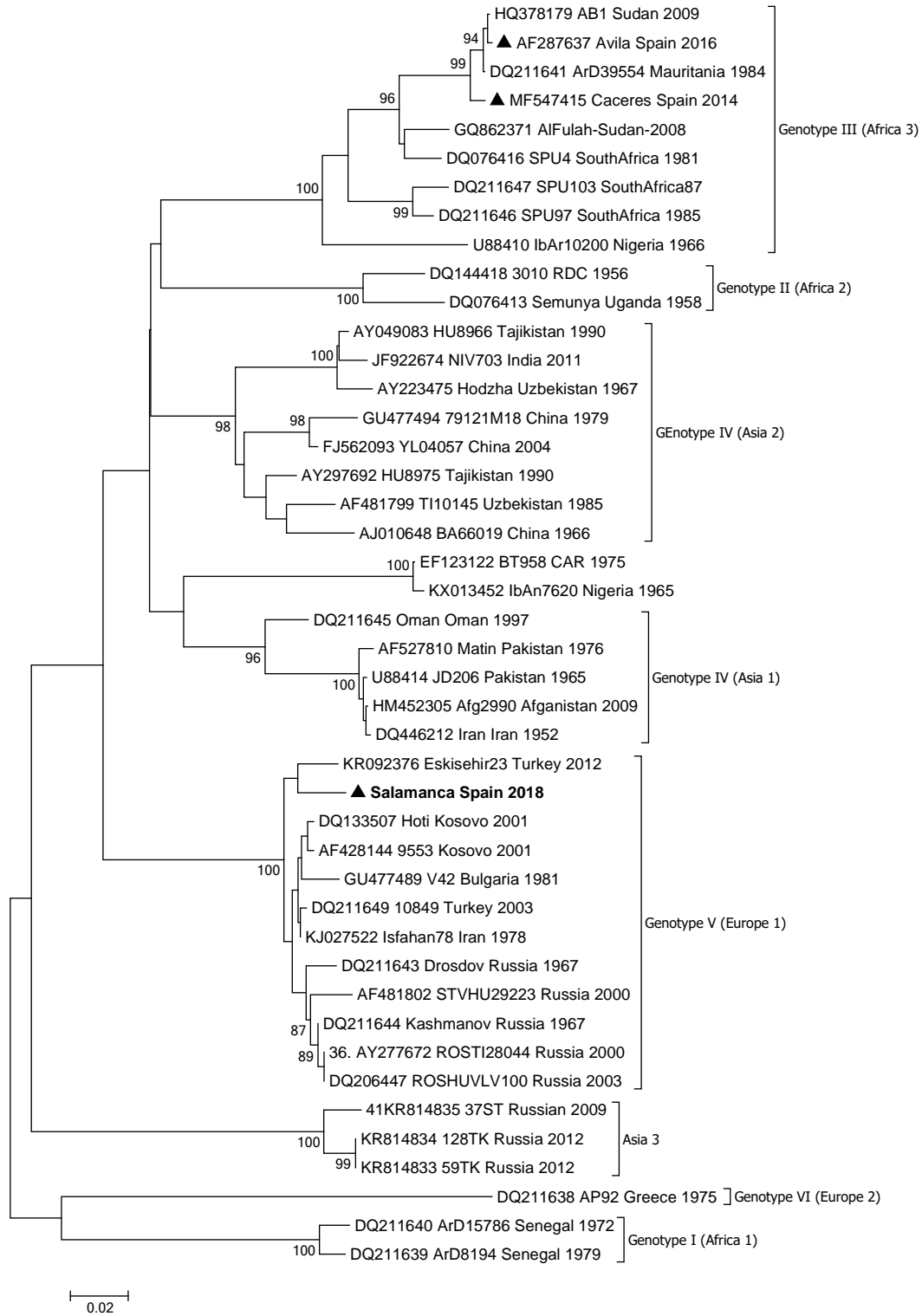


Table 2. Serological and nested RT-PCR results

Case	ELISA IgG		IFA (IgG)		ELISA IgM		IFA IgM		Nested RT - PCR	Final classification
	Vector Best	NCM*	GP**	NP***	Vector Best	NCM	GP	NP		
1	0.2 (-)	2 (+)	Negative	Negative	5.5 (+)	0.7 (-)	Negative	Positive	Positive	Confirmed acute infection
2	10 (+)	2.5 (+)	Negative	Negative	10.2 (+)	0.8 (-)	Negative	Negative	Negative	Confirmed previous infection (Undetermined acute infection)
3	10 (+)	9 (+)	Negative	Negative	0.02				Negative	Confirmed previous infection
4	1 (+)	1.3 (+)	Negative	Negative	0.01				Negative	Confirmed previous infection
5	3.3 (+)	0.9 (+/-)	Negative	Negative	0.01				Negative	Indeterminate previous infection
6	1.7 (+)	0.6 (-)	Negative	Negative	0.01				Negative	Negative
7	1.9 (+)	0.1 (-)	Negative	Negative	0.03				Negative	Negative

* NCM: National Centre of Microbiology

** GP: Glycoprotein

*** NP: Nucleoprotein

Table 3. Main clinical and laboratory data of patients with CCHFV

	Acute infection by CCHFV, N=1	Previous infection by CCHFV, N=3
Age mean \pm SD, years	53	68 \pm 28.2
Sex	Male	2 males / 1 female
Urban population	Yes	2/3
Comorbidity	Non	2/3 arterial hypertension 1/3 chronic renal failure, hypothyroidism, depressive syndrome, dyslipidemia and stroke 1/3 essential thrombocytosis
First clinical diagnosis	Acute viral hepatitis	2/3 genitourinary tract infection 1/3 acute pancreatitis
Range fever duration, days	5-10	3-7
Chills	Yes	2/3
Abdominal pain	Non	1/3
Cutaneous signs (suggesting tick bite)	Leg sore	0
Muscles soreness	Leg myalgias	1/3
Any bleeding symptomatology	Non	Non
Risk factors	Cattle husbandry	Non
Laboratory data		
Hemogram, \pmSD		
Haemoglobin, g/dL	14.1	9.6 \pm 2.4
White blood cells, x 10 ³ /mm ³	3.1	7.0 \pm 1.9
Polymorphonuclear leukocytes x 10 ³ /mm ³	8.1	5.4 \pm 1.5
Lymphocytes x 10 ³ /mm ³	3.6	1.1 \pm 5.6
Platelets, x 10 ³ /mm ³	41	207.6 \pm 158.5
Liver function tests, \pmSD		
C-Reactive Protein (CRP), mg/L	15.16	20.2 \pm 15.5
Activated Partial Thromboplastin Time, sec	43.8	34.2 \pm 5.1
Aspartate Aminotransferase (AST), U/L	347	151.3 \pm 110.2
Alanine Aminotransferase (ALT), U/L	161	74.7 \pm 50.1

Discussion

CCHFV was found in Spain for the first time in 2010, when it was detected in ticks feeding on wild animals at the margins of the Tajo River in the province of Cáceres [13] (that borders on the west with Portugal and on the north with the province of Salamanca, where this study was performed). CCHFV was probably introduced in this territory by migratory birds from North Africa [18]. Six years later, the first two human autochthonous cases, one of them with a fatal outcome, were reported [10]. More recently, infected ticks were reported in other territories in Spain, including ticks feeding on both wild animals and domestic animals, thus increasing the outbreak risk [12].

This study was performed to determine whether CCHFV could be a cause of acute febrile syndrome in Spanish emergency departments. To our knowledge, this study is the first conducted in Spain with this purpose. In terms of the impact of the disease, we found an elevated incidence and prevalence, with 0,75 % (1/133) of acute patients who were IgM-positive and with positive (RT-PCR) and an additional 2.2% (3/133) of patients who were IgG positive, suggesting previous infections. According to these results, testing for CCHFV in Spain should be performed before other tick-borne diseases such as Lyme disease, tularaemia, babesiosis or anaplasmosis, that have a lower incidence [19,20].

Likewise, in our hospital two new cases of CCHFV were diagnosed during May-July 2020. The first of them also presented a CCHVF compatible with genotype V. We do not have a clear explanation about the spreading of CCHVF in our area, some theories could be assessed: i) transport/import of animals for livestock use, ii) migratory birds from eastern Europe and iii) immigrants from these countries. Nevertheless, it has recently been detected the presence of CCHFV genotype Europe V in *Hyalomma lusitanicum* and *Dermacentor marginatus* ticks collected from red deer, fallow deer and Eurasian wild board, suggesting that genotype V introduction in Spain was probably from Eastern Europe [21]

Our positive acute case was a middle-aged man, involved in livestock husbandry. Clinical findings were characterised by fever, chills, myalgias, with thrombopenia and prolonged coagulation times, with no evidence of bleeding or hepatomegaly. These features are similar to those found in previous studies conducted in other endemic countries such as Georgia and Bulgaria [22–24]. The main

differences found between our patient with acute CCHFV and those reported in other endemic countries were the lack of any bleeding history or bleeding stigma and the lack of hepatomegaly or splenomegaly at the clinical examination.

According to our data, patients with CCHFV could present to the emergency department with a febrile syndrome, with thrombopenia, prolonged coagulation times, elevated transaminases levels, even without any haemorrhagic signs or symptoms. Spanish physicians should have this clinical suspicion when they face a patient with a similar clinical picture (especially in the period between May and October). All of this in order to rapidly start the supportive and biosafety measures, to avoid complications linked to the patient morbidity, and the possible nosocomial outbreaks [14,25].

Conclusion

A new genotype virus circulation was described in human from Spain. More studies will be required to establish the mechanism of dissemination and distribution of these virus. Moreover, this study suggests that CCHF is an identifiable cause of febrile illness in Spain; therefore, it is mandatory to suspect this disease when a patient comes to the emergency department with fever, thrombocytopenia and transaminase elevation, especially in spring and summer, and when patients have an occupational risk, following the protocols already established for this purpose. All of this is intended to initiate supportive treatment and isolation measures as soon as possible, thus reducing the mortality risk and avoiding the risk of a nosocomial outbreak.

Funding

This study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET, RD16/0027/0018, CNM/ISCIII-D, with European Union co-financing by FEDER (*Fondo Europeo de Desarrollo Regional*) '*Una manera de hacer Europa*'.

Conflict of interest

All authors declare no potential conflicts of interest and no sources of supporting.

Ethical considerations

The procedures described here were carried out in accordance with the ethical standards described in the Helsinki Declaration revised in 2013. Additionally, this study was approved September 7th, 2017 by the Bioethics Committee of CAUSA with the code *Cómite Ético CEIC: PI9109/2017*. At all times, we maintained the confidentiality of the patients' personal data.

Informed consent

Non relevant.

References

- [1] Bente DA, Fkorrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* 2013;100:159–89. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006>.
- [2] Whitehouse CA. Crimean Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004;64:145–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.001>.
- [3] Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 2006;80:8834–42. <https://doi.org/10.1128/JVI.00752-06>.
- [4] Papa A, Chaligiannis I, Kontana N, Sourba T, Tsioka K, Tsatsaris A, et al. A novel AP92-like Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain, Greece. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:590–3. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.008>.
- [5] Sidira P, Maltezou HCC, Haidich A-BA-B, Papa A. Seroepidemiological study of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, 2009–2010. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E16–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03718.x>.
- [6] Salehi-Vaziri M, Baniasadi V, Jalali T, Mirghiasi SM, Azad-Manjiri S, Zarandi R, et al. The first fatal case of Crimean-Congo hemorrhagic fever caused by the AP92-like strain of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis* 2016;69:344–6. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.533>.
- [7] Karakecili F, Cikman A, Aydin M, Binay U, Kesik O, Ozcicek F. Evaluation of

- epidemiological, clinical, and laboratory characteristics and mortality rate of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in the northeast region of Turkey. *J Vector Borne Dis* 2018;55:215. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.249479>.
- [8] Leblebicioglu H. Crimean–Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:S43–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.020>.
- [9] López R, Molina R. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev Esp Salud Publica* 2005;79:177–90. <https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000200006>.
- [10] Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al. Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med* 2017;377:154–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615162>.
- [11] Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social. Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo en España. Spain: Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019.
- [12] Negredo A, Habela MÁ, Ramírez de Arellano E, Díez F, Lasala F, López P, et al. Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Focus, Spain, 2011–2015. *Emerg Infect Dis* 2019;25:1177–84. <https://doi.org/10.3201/eid2506.180877>.
- [13] Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 2012;18:179–80. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111040>.
- [14] Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006;6:203–14. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70435-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70435-2).
- [15] Mostafavi E, Pourhossein B, Chinikar S. Clinical symptoms and laboratory findings supporting early diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *J Med Virol* 2014;86:1188–92. <https://doi.org/10.1002/jmv.23922>.
- [16] Monsalve Arteaga L, Muñoz Bellido J, Vieira Lista C, Vicente Santiago B, Fernández Soto P, Bas, I et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus-specific antibody detection in blood donors, Castile-León, Spain, summer 2017 and 2018. *Eurosurveillance*. 2020 Mar 12;25(10):1900507. do JLM, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus-specific antibody detection in blood donors, Castile-León, Spain, summer 2017 and 2018. *Eurosurveillance* 2020;25:1900507. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.1900507>.

- [17] Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, Cook N, Bruce C, Dowall SD, et al. Development of a Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2012;12:786–93. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0770>.
- [18] Leblebicioglu H, Eroglu C, Erciyas-Yavuz K, Hokelek M, Acici M, Yilmaz H. Role of Migratory Birds in Spreading Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1331–4. <https://doi.org/10.3201/eid2008.131547>.
- [19] Ministerio de Sanidad Consumo e Igualdad. Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Guía de actuación ante picadura de garrapata. Spain: 2016.
- [20] Vázquez-López ME, Pego-Reigosa R, Díez-Morrondo C, Castro-Gago M, Díaz P, Fernández G, et al. Epidemiología de la enfermedad de Lyme en un área sanitaria del noroeste de España. *Gac Sanit* 2015;29:213–6. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2015.01.008>.
- [21] Moraga-Fernandez A, Royo-Hernandez L, Habela MA, Ruiz Fons F, Calero-Bernal R, Gortazar C, et al. Detection of New Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genotypes in Ticks Feeding on Deer and Wild Boar, Spain. *Transbound Emerg Dis* 2020;Preprint. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3314445>.
- [22] Kuchuloria T, Imnadze P, Chokheli M, Tsertsvadze T, Endeladze M, Mshvidobadze K, et al. Viral hemorrhagic fever cases in the country of Georgia: Acute Febrile Illness Surveillance Study results. *Am J Trop Med Hyg* 2014;91:246–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0460>.
- [23] Christova I, Younan R, Taseva E, Gladnishka T, Trifonova I, Ivanova V, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome and Crimean-Congo hemorrhagic fever as causes of acute undifferentiated febrile illness in Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13:188–92. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0938>.
- [24] Bower H, El Karsany M, Alzain M, Gannon B, Mohamed R, Mahmoud I, et al. Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever cases in a severe undifferentiated febrile illness outbreak in the Federal Republic of Sudan: a retrospective epidemiological and diagnostic cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007571. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007571>.
- [25] Fletcher TE, Gulzhan A, Ahmeti S, Al-Abri SS, Asik Z, Atilla A, et al. Infection prevention and control practice for Crimean-Congo hemorrhagic fever—A multi-center cross-sectional survey in Eurasia. *PLoS One* 2017;12:e0182315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182315>

5. CONCLUSIONES

Primera: La fiebre hemorrágica de Crimea Congo es una enfermedad ampliamente distribuida en Europa siendo las zonas más afectadas Turquía y sus países vecinos pertenecientes a la península de los Balcanes

Segunda: Se establece la circulación del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo en donantes sanos de Castilla y León.

Tercera: Creemos necesario el despistaje de fiebre hemorrágica de Crimea Congo en individuos que acuden por fiebre y alteración de pruebas hepáticas y/o de coagulación durante los períodos de primavera y verano, en zonas endémicas-

Cuarta: Describimos el primer caso en humanos de FHCC causada por la cepa Europa V en España, recientemente descrita también en garrapatas extraídas de animales salvajes del sudoeste del territorio peninsular.

Quinta: El impacto actual para la Salud Pública se considera bajo, sin embargo, el riesgo que se produzcan más casos esporádicos en nuestro entorno nos obliga a recomendar la difusión de la información de este estudio para reforzar la prevención y vigilancia activa de la enfermedad en humanos con el fin de detectar precozmente los casos y limitar su propagación.

6. ANEXOS:

Anexo 1:

Anexo metodológico:

ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DEL VFHCC EN CASTILLA Y LEÓN:

Diseño

Estudio descriptivo, transversal, coordinado e interdisciplinario en el cual han participado de manera conjunta la Unidad de Investigación e-INTRO (Unidad de Investigación Consolidada de Castilla y León UIC-079, España), el laboratorio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) y el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

Población de estudio

La población en estudio fueron todos aquellos individuos que acudieron al Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León para donación de sangre durante el período de un año (abril 2017-marzo 2018) (aproximadamente 100.000 personas/año). La población donante está constituida por individuos entre 18 y 65 años con peso mayor a 50 Kg.

El cálculo del tamaño muestral se ha realizado según la fórmula para universos finitos

$$n = 4 \times p \times q \div E^2 \times (N - 1) + 4 \times p \times q$$

Donde: n = Tamaño de la muestra. N = Elementos del universo. E = Error calculado. p = Porcentaje de población estimada. q = 100-p. (se utiliza la hipótesis p = q lo que significa que ambas son 50). Población de Castilla y León entre 18 y 65 años: 1.518.522 personas.

$$n = 4 \times 1.518.522 \times (50 \times 50) \div 5^2 \times (1.518.522 - 1) + 4 (50 \times 50)$$

$$n = 399 (1\%). \text{ Error: } 5\%. \text{ Nivel de confianza: } 95\%$$

Se seleccionaron aleatoriamente 516 individuos (cifra que supera a la estimada) que fueron estratificados por edad y sexo. Se reclutaron de manera equitativa durante los 12 meses del año, alrededor de 40 individuos mensualmente.

Los participantes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. Cada participante recibió una hoja explicativa de todos los objetivos, procedimientos y características del estudio y se le preguntará si desea ser incluido en el mismo. En todo momento se mantuvo una estricta confidencialidad a lo largo del estudio y las muestras se trataron anónimamente. Se procedió a la toma de muestras biológicas (sangre) para la realización de prueba de serología tipo ELISA.

Este estudio involucró el uso de los datos médicos de pacientes que acuden para donación de sangre al Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León. En este cuestionario, se requirió un Compromiso de Confidencialidad firmado. Todos los datos fueron anonimizados e identificados por el Biobanco.

Los procedimientos descritos aquí se realizaron de acuerdo con los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki revisada en 2013.

Los datos personales manejados en la investigación y cualquier anexo a la misma fueron recogidos en un fichero con titularidad del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, con domicilio en *Paseo de Filipinos s/n 47007* Valladolid. Este fichero tiene únicamente la finalidad de proceder a la gestión adecuada de las muestras.

Los investigadores identificarán las muestras con un código de manera tal que se desconozca directamente los datos personales de las muestras procesadas.

Muestras biológicas: obtención y procesamiento

A todos los participantes se les realizó: i) una encuesta clínico-epidemiológica, ii) hemograma, y iii) se tomó una alícuota de 2 ml de sangre previamente obtenida para el proceso de donación de sangre.

Realización de pruebas diagnósticas

Diagnóstico inmunológico

Se realizaron mediante ELISA para la detección de IgG utilizando un kit comercial VectoCrimea-CHF-IgG ELISA (Vector Best, Novosibirsk, Rusia).

El punto de corte del ELISA se estableció como la media de la densidad óptica del control negativo más 0,2. Todas las muestras con serología positiva para el VFHCC se analizaron por triplicado utilizando la prueba Vector Best y se utilizaron para el análisis los valores medios de absorbancia / corte. Estas muestras positivas se confirmaron mediante tres procedimientos distintos: un ELISA

interno descrito por Dowall SD et al. (136), y dos ensayos de inmunofluorescencia (IFA) (Euroimmun, Lubeca, Alemania)) usando los antígenos de nucleoproteína (NP) y glicoproteína (GPC) a una dilución 1:10.

Asimismo, analizamos mediante todos los métodos anteriores 50 muestras elegidas al azar que fueron inicialmente negativas.

Consideramos las muestras como confirmadas positivas si dieron positivo en al menos dos pruebas diferentes. Para IFA, se consideró un resultado como indeterminado cuando el resultado de la intensidad de la fluorescencia de la muestra no fue completamente negativo sino ligeramente menos intenso que el del control positivo incorporado en la prueba.

ESTUDIO DE FHCC COMO CAUSA DE FIEBRE EN PACIENTES QUE ACUDEN A URGENCIAS EN SALAMANCA:

Diseño

Estudio descriptivo, transversal, coordinado e interdisciplinario en el cual participarán de manera conjunta la Unidad de Investigación e-INTRO (IIMD-09 del IBSAL, Unidad de Investigación Consolidada de Castilla y León UIC-079, España), el Servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) y el grupo de investigación IIMD-16 del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Población de estudio

Todos los individuos que acudan por fiebre sin foco aparente al servicio de Urgencias del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre el 1 de marzo y el 31 de octubre de 2019.

Los procedimientos descritos aquí se realizaron de acuerdo con los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki revisada en 2013.

Los datos personales manejados en la investigación y cualquier anexo a la misma serán recogidos en un fichero con titularidad del Servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Este fichero tiene únicamente la finalidad de proceder a la gestión adecuada de las muestras.

Los investigadores identificarán las muestras con un código de manera tal que se desconozca directamente los datos personales de las muestras procesadas.

Muestras biológicas: obtención y procesamiento

A todos los participantes se les realizará: i) una encuesta clínico-epidemiológica, ii) hemograma, y iii) se tomará una alícuota de 2 ml de la sangre previamente obtenida para el proceso de realización de analíticas.

Realización de pruebas diagnósticas

Mediante hoja de protocolo de recogida de datos que incluirá datos demográficos, datos laborales/aficiones y datos clínicos si se diera el caso.

Diagnóstico inmunológico

Se realizaron mediante ELISA para la detección de IgG utilizando un kit comercial VectoCrimea-CHF-IgG ELISA (Vector Best, Novosibirsk, Rusia) y la comprobación de resultados positivos se hizo siguiendo el mismo protocolo del estudio de seroprevalencia.

Diagnóstico virológico

La amplificación génica mediante RT-PCR fue llevada a cabo en el Instituto de Salud Carlos III, siguiendo el protocolo descrito por Negro et al, 2017 (9) que se describe detalladamente a continuación:

	x 1	X25	X50
H ₂ O nuclease free	30,2	755	1510
5X AMV/Tfl reaction buffer, kit Acces	10,0	250	500
dNTP, Pharmacia (25mM)	0,4	10	20
MgSO ₄ , (25 mM, kit)	2	50	100
CriCon_1+ (100 pmol/μl)	0,2	5	10
CriCon_1-(100 pmol/μl)	0,2	5	10
AMV reverse transc. 5 u/μl, kit	1	25	50
Tfl DNA polymerase, 5 u/μl, kit	1	25	50

Alicuotar a 45 µl en tubos de PCR de 200 µl . Congelar en vertical (-80°C)

Identificar fecha de preparación en la caja.

CrCon1+: 5'(123)- RWA-AYG-GRC-TTR-TGG-AYA-CYT-TCA-C-3'(147)

CrCon1-: 5'(764)-TRG-CAA-GRC-CKG-TWG-CRA-CWA-GWG-C-3'(740)

PROGRAMA: *CrCongo1*

Bloque con temperatura calculada

48 °C x 45 min + 94 °C x 2 min + (94 °C x 30 seg + 50°C x 1,5 min + 72 °C x 30 seg) x 40 + 72 °C 5 min + 4 °C.

TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN ESPERADO: 642 pb

PREPARACIÓN DE LOTES

PCR Nairovirus 2ª reacción

CRICONGO_2

	X1	X25	X50
H ₂ O nuclease free	32,9	822,5	1645
10X Buffer Perkin Elmer SIN Cl ₂ Mg	5	125	250
dNTP, Farmacia (25mM) kit	0,4	10	20
Cl ₂ Mg (25mM) kit	6	150	300
CriCon_2+ (100 pmol/μl)	0,1	2,5	5
CriCon_2- (100 pmol/μl)	0,1	2,5	5
Taq, 5 ul , Perkin Elmer	0,5	12,5	25

Alicuotar a **45 ul** en tubos de PCR de 200 u l. Congelar en vertical (-80°C)

Identificar fecha de preparación en la caja.

CriCon2+: (450) 5´ - ART-GGA-GRA-ARG-AYA-TWG-GYT-TYC-G -3´ (474)

CriCon2-: (674) 5´ - CYT-TGA-YRA-AYT-CYC-TRC-ACC-ABT-C -3´ (650)

PROGRAMA: *CrCon2*

Bloque con temperatura calculada

94 °C x 2 min + (94 °C x 15seg + 60°C x 1 min) x 40 + 72 °C 5 min + 4 °C.

TAMAÑOS DE AMPLIFICACIÓN ESPERADOS: 225 pb

VISUALIZACIÓN: Agarosa MS8 al 2%, cargando PM, muestras, control negativo y controles positivos

SECUENCIACIÓN: 20 pmol de primer. Programa SEQAUT 50. Se pide 200 pb en la plantilla de secuencias.

Anexo 2

Índices de calidad de las publicaciones

ARTÍCULO PRIMERO:

Publicado en **Plos Neglected Tropical Diseases**

ÍNDICES DE CALIDAD DE LA REVISTA

Cuartil: **Q1**

Factor de impacto: **2.669** (SCImago Journal Rank, 2018)

H Index: **110**

21/489 en la categoría: Medicina. Subcategoría: Salud Pública, Medio Ambiente y Salud Laboral.

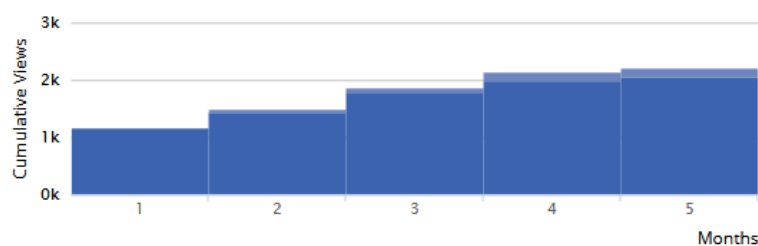
24/272 en la categoría: Medicina. Subcategoría: Enfermedades Infecciosas

MÉTRICAS DEL ARTÍCULO

Métricas del artículo (al día 30 de julio de 2020):

Total Article Views		HTML Page Views	PDF Downloads	XML Downloads	Totals
2,214 <small>Mar 02, 2020 (publication date) through Jul 30, 2020 *</small>	PLOS	774	532	763	2,069
	PMC	102	43	n.a.	145
	Totals	876	575	763	2,214

65.64 % of article views led to PDF downloads



*Although we update our data on a daily basis, there may be a 48-hour delay before the most recent numbers are available. PMC data is posted on a monthly basis and will be made available once received.

ARTÍCULO SEGUNDO:

Publicado en **Eurosurveillance** (*órgano de publicación del Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades – ECDC*)

ÍNDICES DE CALIDAD DE LA REVISTA:

Cuartil: **Q1**

Factor de impacto: **3.876** (SCImago Journal Rank, 2018)

H Index: **110**

Rankings:

7/66 Categoría: Inmunología y Microbiología. Subcategoría: Virología

10/89 Categoría: Medicina. Subcategoría: Epidemiología

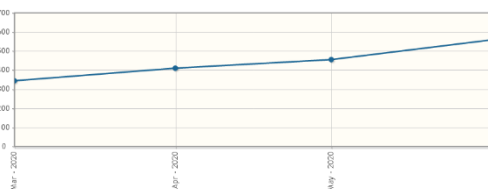
13/489 Categoría: Medicina. Subcategoría: Salud pública, salud ocupacional y ambiental

MÉTRICAS DEL ARTÍCULO

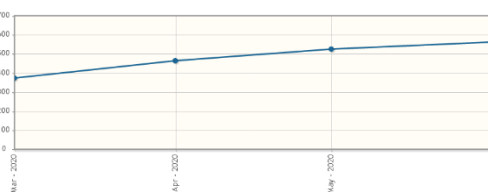
Métricas del artículo (al día 30 de julio de 2020):



Abstract views over time



Fulltext views over time



Anexo 2

Presentaciones en Congresos



***Innovation in Pharmacy:
Advances and Perspectives.***

Poster presentation certificate

This is to certify that

LÍA MONSALVE ARTEAGA

has presented the poster entitled: "*Crimean Congo Haemorrhagic Fever in the WHO European Region*" of the authors: Lía Monsalve Arteaga, at the the 1st *Global Congress of Pharmacy Faculties. Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives (IPAP2018)*, held at the University of Salamanca, Spain, from September 25th to 28th, 2018.

We wish to express our gratitude for sharing your valuable contribution.

Salamanca, September 28th, 2018

Sincerely,




Antonio Muro Álvarez
IPAP2018 Conference Chair

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain 2018



**XI Congreso
Sociedad Española de
Medicina Tropical y
Salud Internacional
(SEMTSI)**

Ávila, 28-30
octubre de 2019



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEMTSI)**

Certifica que el trabajo

SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE CRIMEA CONGO EN DONANTES EN ESPAÑA

de los autores

Lia Monsalve Arteaga, Moncef Belhassen García, Juan Luis Muñoz Bellido, Ana Isabel Negredo Antón, María Paz Sánchez Seco, Fernando de Ory Manchón, María Carmen Vieira Lista, Julio López Abán, Isabel Bas, Nuria Leralta, Montserrat Alonso Sardón, Sonia Pérez González, Lydia Blanco Peris, María Belén Vicente Santiago, Pedro Fernández Soto, Rufino Álamo-Sanz, Roger Hewson, Antonio Muro

ha sido presentado como póster en el **XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) – Retos en Salud Global**, celebrado del 28 al 30 de octubre de 2019 en Ávila.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Ávila a 30 de octubre de 2019.

**María Dolores Bargues Castelló
Presidenta de la SEMTSI**

**Israel Cruz Mata
Presidente del Comité Científico**

www.semtsi.org



XXI Congreso de la Sociedad Española de Parasitología

Pontevedra, Pazo da Cultura, 3-5 julio 2019

D. Raúl Iglesias Blanco, en calidad de *Secretario del Comité Organizador* del **XXI Congreso de la Sociedad Española de Parasitología**, celebrado del 3 al 5 de julio de 2019, en el Pazo da Cultura de la ciudad de Pontevedra,

CERTIFICA

Que **D^a. Lia Monsalve Artega** figura como coautora de la comunicación en formato póster titulada “**Detección del virus de Crimea-Congo en garrapatas del género *Hyalomma* retiradas de individuos en Castilla y León**”, que fue presentada durante la sesión de paneles de dicho Congreso por D. Julio López-Abán.

Y para que así conste, se expide este certificado en Vigo, a 21 de noviembre de 2019.

**IGLESIAS
BLANCO
RAUL -
36071506P**

Firmado digitalmente por
IGLESIAS BLANCO RAUL -
36071506P
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=dCNES-36071506
P.government=RAUL,
sn=IGLESIAS BLANCO,
o=IGLESIAS BLANCO RAUL -
36071506P
Fecha: 2019.11.21 17:08:36
+01'00'

Raúl Iglesias Blanco
Secretario del Congreso

Anexo 3

Autorizaciones Comités de Ética de la Investigación Clínica

<p>COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA Paseo de San Vicente, 58-182 37007 Salamanca Comité Ético de Investigación Clínica Teléfono: 923 29 11 00 – Ext. 55 515</p>	 E-mail: comite.etico.husa@saludcastillayleon.es
---	---

EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL AREA DE SALUD DE SALAMANCA,

INFORMA

Que el Proyecto de Investigación presentado por D. MONCEF BELHASSEN GARCÍA,

Titulado:

"PROYECTO SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA CONGO EN DONANTES DE CASTILLA Y LEÓN".

Que presenta como Investigador responsable, SE AJUSTA A LAS NORMAS ÉTICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.


Y para que conste lo firma en Salamanca con fecha 27 de marzo de 2017.

EL SECRETARIO



Fdo.: D. Ignacio ~~Belhasse~~
Secretario CEIC

CONSEJO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS





**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE (CEIC-VA-ESTE-HCUV)**

Valladolid a 27 de Abril de 2017

En la reunión del CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE del 27 de abril de 2017, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto presentado al **Biobanco del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León** con el fin de obtener muestras/material biológico para la realización de la investigación.

BIO- 2017-65	SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA CRIMEA CONGO EN DONANTES DE CASTILLA Y LEÓN	CENTRO DE HEMOTERAPIA Y HEMODONACIÓN DE CASTILLA Y LEÓN. I.P.: MONCEF BELHASSEN GARCIA, EQUIPO: SONIA PÉREZ GONZÁLEZ, LÍA MONSALVE ARTEAGA, ANA ISABEL JIMENEZ DEL BIANCO, LYDIA BLANCO PERIS, RECIBIDO: 20-03-2017
-----------------	--	--

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC ÁREA DE SALUD VALLADOLID - ESTE en relación a dicho Proyecto:

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Este.

Un cordial saludo.

F. Javier Álvarez

Dr. F. Javier Álvarez.
CEIC Área de Salud Valladolid Este -
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología
Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7, 47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es jalvarezgo@saludcastillayleon.es tel.: 983 423077



**COMPLEJO
ASISTENCIAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA**
Paseo de San Vicente, 58-162
37007 Salamanca
Comité Ético de Investigación Clínica
Teléfono: 923 29 11 00 - Ext. 55 515



E-mail: comite.etico.hasa@saludcastillayleon.es

**EL COMITE DE ETICA DE LA INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL AREA
DE SALUD DE SALAMANCA,**

INFORMA

Que el Proyecto de Investigación presentado por D. MONCEF BELHASSEN GARCÍA,

Titulado:

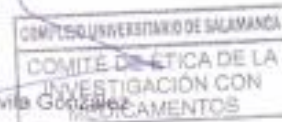
**"FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA-CONGO COMO CAUSA DE FIEBRE SIN
FOCO APARENTE EN PACIENTES QUE ACUDEN A URGENCIAS DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE SALAMANCA DURANTE EL VERANO DE 2017".**

Que presenta como Investigador responsable a la Convocatoria de la Gerencia Regional de Salud, SE AJUSTA A LAS NORMAS ÉTICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.
Código CEIC: PI9109/2017.

Y para que conste lo firma en Salamanca con fecha 7 de septiembre de 2017

EL SECRETARIO

Fdo: D. Ignacio Davila González
Secretario CEIC



Abstracts 2020

Abstract 16

Crimean-Congo haemorrhagic fever in an emergency department in Spain

Lia Monsalve-Arteaga^{1*}, Moncef Belhassen García^{1,2}, Juan-Luis Muñoz-Bellido^{1,2}, Montserrat Alonso Sardón¹, Anabel Negrodo³, María Paz Sánchez-Seco³, Fernando De Dry Manchón³, Nuria Leralta³, Isabel Bas García³, Jesús Sánchez Serrano², Jorge García Criado², Antonio Muro Álvarez², Amparo López Bernús²

¹Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, ²Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, ³Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain

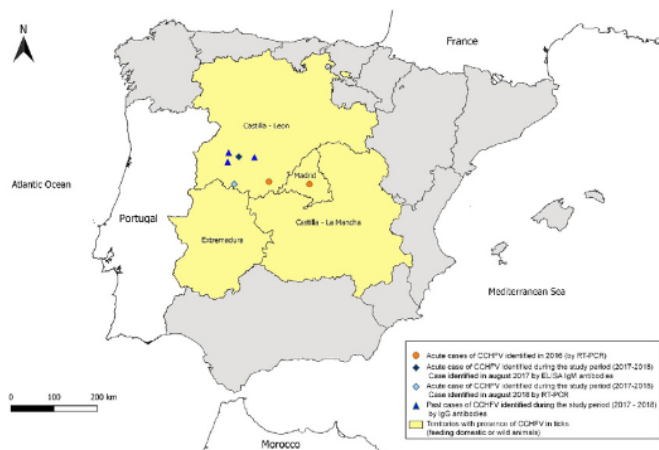
Background: Crimean Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a widespread tick-borne viral disease caused by the homonymous virus (CCHFV), a *Nairovirus* of the *Nairoviridae* family. It has been implicated in severe viral haemorrhagic fever outbreaks. During the summer of 2016, the first two cases of this disease were reported in Spain. Nowadays, this disease is difficult to get eradicated because of its enzootic life cycle. The aim of this study was to determine the presence of CCHF among patients coming for a febrile illness to Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), Salamanca, western Spain, during the spring-summer periods in 2017 and 2018.

Materials/methods: We evaluated prospectively patients older than 18 years, who came to the Emergency Department of CAUSA presenting fever as the only or main symptom. We determined specific IgM and IgG antibodies against CCHFV by the Vectors-Crimea ELISA kit-test (Vector-Best, Russia), an in-house ELISA and two immunofluorescence assays (Euroimmun, Germany) against two different glycoproteins (nucleoprotein and glycoprotein), and an in-house nested RT-PCR. Details were collected from the medical records.

Results: 133 patients were selected for the study. Mean age (\pm SD) was 67.63 years (\pm 18.8). 81 patients (60.9%) were male. Most patients were diagnosed as genitourinary or respiratory syndromes. The 3rd most frequent diagnosis was acute undifferentiated febrile illness. Three patients had anti-CCHFV IgG antibodies, suggesting a past infection. Two patients were found to have anti-CCHFV IgM antibodies, and one of them was also positive by RT-PCR. Both patients lived in the province of Salamanca (western Spain). One patient was involved in animal husbandry. None of these two cases were associated to a nosocomial outbreak.

Conclusions: This study suggests that CCHF is an identifiable cause of febrile illness in Spain, and therefore should be suspected when a patient comes to the emergency department with fever and hepatic impairment, and/or haemorrhagic phenomena, especially in spring and summer seasons, and if they have risk activities. All of this, in order to establish support treatment and isolation measures as soon as possible, thus reducing the risk of mortality and nosocomial outbreaks.

Figure 1: Acute and past infections by CCHFV identified in Spain



Presenter email address: liacma@usal.es