

KIT MOLECULAR ZC D-TIPAGEM

Bio-Manguinhos

TESTE PARA DETECÇÃO DE ZIKA, CHIKUNGUNYA E
DENGUES (1,2,3,4)

(32 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

KIT MOLECULAR ZC D-TIPAGEM

Bio-Manguinhos

TESTE PARA DETECÇÃO DE ZIKA, CHIKUNGUNYA E DENGUES (1-2-3-4)
(32 Reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

KIT MOLECULAR ZC D-TIPAGEM

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular ZC D-TIPAGEM Bio-Manguinhos, baseia-se na tecnologia de PCR em tempo Real e é indicado para o processamento de amostras clínicas, previamente submetidas a etapa de extração de ácidos nucleicos. O produto desenvolvido é um ensaio triplex de 3 reações distintas que detectam e diferenciam:

- (i) Zika (Z), Chikungunya (C) e RNAse P (RP/ gene constitutivo humano endógeno);
- (ii) Dengue 1 (D1), Dengue 2 (D2) e Controle interno (CI/);
- (iii) Dengue 3 (D3), Dengue 4 (D4) e CI. O Kit Molecular ZC D-TIPAGEM - Bio-Manguinhos se destina ao diagnóstico e vigilância epidemiológica

Produto para uso em diagnóstico *in vitro*.

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E MANUSEIO

Módulo Reagente: -30 °C a -10 °C.

Módulo Acessórios: 10 °C a 44 °C.

Obs.: Todos os reagentes deverão ser armazenados nas temperaturas indicadas no rótulo externo, observando a data de validade.

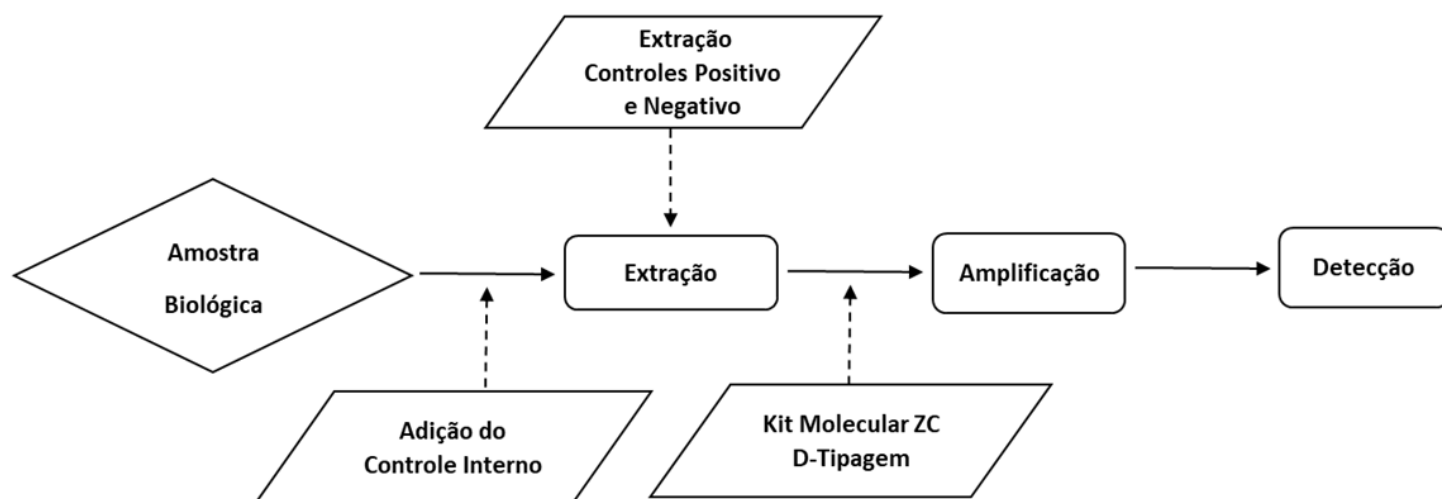
4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

A metodologia para detecção molecular dos vírus Zika, Chikungunya, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4 tem como base a plataforma de PCR em tempo real.

O fluxo metodológico segue abaixo:

- Etapa prévia de extração de ácido nucléico da amostra biológica com inserção dos controles interno, negativo e positivo
- Amplificação do ácido nucléico
- Detecção do ácido nucléico por RT-PCR em tempo real.

Esquema do Teste



- Etapa de Extração
- Vide Manual de Instruções do fabricante do Kit de Extração.
- É obrigatória a extração dos controles negativo (CN) e positivo (CP).
- Notas: ¹A etapa de extração é de responsabilidade do usuário do kit;

- Adição da Controle Interno (CI)

A adição do CI nas amostras de pacientes tem como objetivo controlar a reação (intra-ensaio) validando o resultado das determinações.

- Alvo RP

O alvo RP é utilizado para avaliar a amostra do paciente.

- Etapa de Amplificação e Detecção

A transcrição reversa do RNA em cDNA antecede à amplificação. A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência é usada para determinar a presença, discriminatória, dos alvos Z, C, D1, D2, D3, D4, RP e CI. Os equipamentos que podem ser utilizados na etapa de amplificação e de detecção são: o ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), QuantStudio 6 FLEX ou QuantStudio 7 FLEX, somente em placas de 96 poços.

5. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

- O Kit Molecular ZC D-TIPAGEM Bio-Manguinhos se destina a amostras coletadas em tubos contendo anticoagulante K2 EDTA (com gel de poliéster ou não) e/ou tubos de soro (com gel de poliéster ou não). Amostras de urina só devem ser destinadas para a detecção do alvo Zika.

- Durante a avaliação de desempenho do Kit Molecular ZC D-TIPAGEM Bio-Manguinhos, foram utilizadas amostra de plasma e/ou soro humano com até 5 anos da data de coleta.
- A temperatura do espaço físico destinado ao teste deve ser monitorada e mantida entre 10 e 25 °C.

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

6.1 Relação dos componentes fornecidos com o produto

		Componentes	Volume
Módulo Reagente	Controles	Controle Negativo	1 frasco com 400 µL
		Controle Positivo	1 frasco com 400 µL
		Controle Interno	1 frasco com 400 µL
	Amplificação	Mistura de PCR ZC	1 frasco com 150 µL
		Mistura de PCR D1/D2	1 frasco com 150 µL
		Mistura de PCR D3/D4	1 frascos com 150 µL
		MIX ZC	1 frasco com 55 µL
		MIX D1/D2	1 frasco com 55 µL
		MIX D3/D4	1 frasco com 55 µL
Módulo Acessórios	Placa óptica	1 unidade	
	Selo óptico	1 unidade	

6.2 Materiais necessários não fornecidos

- Kit de extração de ácido nucléico
- Acessórios para automação das etapas de extração e de preparo da Mistura de RT-PCR.
- Luva descartável sem talco
- Sacos de descarte de lixo biológico
- Microcentrífuga para microtubos de 1,5/2 mL
- Ponteiros para uso único, com filtro e estéreis, de 20 µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL
- Pipetas de 20 µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL
- Placa óptica de 96 reações utilizado no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System Fast
- Vortex
- Microcentrífuga para microplacas de PCR

6.3 Versão do Software BioLaudos

A partir da versão 2.0.0

7. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A temperatura de armazenamento e transporte do módulo reagente deve ser entre -30 °C a -10 °C. O módulo acessório deve ser armazenado a temperatura ambiente.

Obs.: Os reagentes deverão ser armazenados na temperatura indicada desde o ato do recebimento até a sua utilização.

Não são de responsabilidade do fabricante:

- Insumos armazenados fora da temperatura especificada;
- Os procedimentos da etapa de extração;
- Ocorrência de contaminação ambiental (*amplicon*);

Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização do kit de acordo com os procedimentos de cada Laboratório.

8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO

8.1 Procedimento para Utilização dos Controles

- O CI deve ser homogeneizado (com auxílio de uma pipeta) e a cada amostra, antes do início da extração, devem ser adicionados 10 µL de CI;
- Homogeneizar os controles negativo e positivo e extrair juntamente com as amostras clínicas.

8.2 Procedimento de Amplificação - Real Time 7500

- Retirar do freezer os reagentes descritos abaixo e aguardar o descongelamento dos mesmos à temperatura ambiente;
- Antes do preparo das misturas de RT-PCR ZC, D1/D2 e D3/D4, centrifugar (*spin*) os microtubos de todos os insumos.
- Homogeneizar em vórtex a Mistura de PCR.

Preparo Manual das misturas de RT-PCR ZC, D1/D2 e D3/D4:

- Identificar os microtubos de mistura de PCR para cada uma das reações: ZC, D1/D2 e D3/D4
- Adicionar a cada microtubo de mistura de PCR, o volume de mix de acordo com as tabelas abaixo:

Mistura de RT-PCR ZC

	Volume (µL)
Reagentes	32 reações
Mistura de PCR ZC	150
Mix ZC	50

Mistura de RT-PCR D1/D2

	Volume (µL)
Reagentes	32 reações
Mistura de PCR D1/D2	150
Mix D1/D2	50

Mistura de RT-PCR D3/D4

	Volume (µL)
Reagentes	32 reações
Mistura de PCR D3/D4	150
Mix D3/D4	50

*Valores com volume morto de reação

- Homogeneizar as misturas de RT-PCR ZC, D1/D2 e D3/D4 com uma pipeta (evitando formação de bolhas);
- Manter a misturas de RT-PCR refrigeradas.
- Distribuir a mistura de RT-PCR ZC, D1/D2 e D3/D4 na placa de amplificação, de acordo com o esquema abaixo:

- Adicionar 5 µL da mistura de RT-PCR ZC nos poços da placa óptica compreendidos entre A1 e H4;
- Adicionar 5 µL da Mistura de RT-PCR D1/D2 nos poços da placa óptica compreendidos entre A5 ao H8.
- Adicionar 5 µL da Mistura de RT-PCR D3/D4 nos poços da placa óptica compreendidos entre A9 ao H12.
- Distribuição do CN, do CP e das amostras dos pacientes:
 - Adicionar 10 µL de CN nos poços A1; A5; A9
 - Adicionar 10 µL de CP nos poços B1; B5; B9
 - Adicionar 10 µL de amostras de paciente nos poços C1 a H4;
 - Adicionar 10 µL de amostras de paciente nos poços C5 a H8;
 - Adicionar 10 µL de amostras de paciente nos poços C9 a H12;

Placa de amplificação:

	MIX ZC				MIX D1/D2				MIX D3/D4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

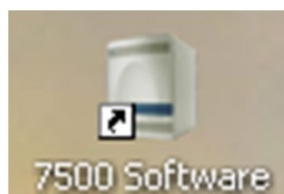
Legenda:

	CN
	CP
	Reação ZC: Amostras de pacientes
	Reação D1/D2: Amostras de pacientes
	Reação D3/D4: Amostras de pacientes

- Após a adição na placa ótica das misturas de RT-PCR ZC, D1/D2 e D3/D4, dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa ótica com selo ótico e utilizar o vortex para homogeneizar as misturas;
- Centrifugar (*spin*) a placa selada e iniciar a reação de RT-PCR no equipamento 7500 Real Time PCR System.

8.3 AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO

- Ligar o computador do equipamento 7500 Real Time PCR System;
- Ligar o equipamento 7500 Real Time PCR System;
- Colocar a placa ótica no equipamento de detecção 7500 Real Time PCR System;
- Evitar tocar no fundo da placa. Certificar-se de que a posição A1 da placa está no canto superior esquerdo;
- Clicar no ícone **7500 Software**;



- Após a inicialização do software, clicar no ícone *Template* (abaixo). Na janela que abrirá, selecionar o template **ZC D-Tipagem _bio_manguinhos.edt**;



- Abrir o template **ZC D-Tipagem _bio_manguinhos.edt** e **salvá-lo**, antes de iniciar a corrida. Conferir se a ciclagem da reação de RT-PCR é a mesma como descrita abaixo;
- Clicar no ícone **Start Run**;



Para instruções de instalação e utilização do *Template* (.edt) necessário para a corrida do equipamento de PCR em tempo real e para geração de laudo (*software* BioLaudos), entrar em contato com o SAC/DIACM de Bio-Manguinhos pelo e-mail moleculares@bio.fiocruz.br ou telefone 08000 210 310.

9. OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

9.1 Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

Abaixo estão relacionados os critérios de aceitação para aprovação da rotina de RT-PCR para os controles negativo e positivos.

Controle	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado para os alvos Z, C, D1, D2, D3 e D4	Rotina válida
	Ct ≤ 40 para ao menos um dos alvos (Z, C, D1, D2, D3 e D4)	Rotina inválida. Repetir o teste. Possível contaminação.
Positivo	Ct ≤ 28 para D1; Ct ≤ 29 para D4; Ct ≤ 31 para D2 e D3; Ct ≤ 28 para Z; Ct ≤ 28 para C;	Rotina válida
	Ct > 28 para D1; Ct > 29 para D4; Ct > 31 para D2 e D3; Ct > 28 para Z; Ct > 28 para C;	Rotina inválida. Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

9.2 Interpretação dos Resultados

Na tabela, abaixo, estão descritos os critérios de aceitação para detecção dos alvos com relação ao valor de Ct obtido no ensaio de RT-PCR, onde se pode definir a análise como conclusivo ou inconclusivo.

Alvos	Valor de Ct	Resultado
CI	$Ct \leq 35$	Válido
	$Ct > 35$	Inválido
	Não Detectado	Inválido
Zika	$Ct \leq 38$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado
Chikungunya	$Ct \leq 40$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado
Dengue 1	$Ct \leq 40$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado
Dengue 2	$Ct \leq 40$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado
Dengue 3	$Ct \leq 40$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado
Dengue 4	$Ct \leq 40$	Detectado
	Não Detectado	Não Detectado

Na tabela, abaixo, estão descritos os critérios de interpretação de cada alvo para com relação ao diagnóstico (detectado ou não-detectado).

Resultado	Interpretação
Amostra não detectada Z e/ou C. RP Detectado.	Não detectado (ND)
Amostra não detectada D1 e/ou D2. CI detectado.	Não detectado (ND)
Amostra não detectada D3 e/ou D4. CI detectado.	Não detectado (ND)
Amostra detectada Z e/ou C.	Detectado para Z ou C
Amostra detectada D1 e/ou D2. CI não detectado.	Detectado para D1 ou D2
Amostra detectada D3 e/ou D4. CI não detectado.	Detectado para D3 ou D4
Amostra não detectada Z e/ou C. RP não Detectado.	Repetir a partir da extração da amostra
Amostra não detectada D1 e/ou D2. CI não detectado.	Repetir a partir da extração da amostra
Amostra não detectada D3 e/ou D4. CI não detectado.	Repetir a partir da extração da amostra
Amostra não detectada e CI com $Ct > 35$	Repetir a partir da extração da amostra
CN com resultado detectado para ao menos um dos alvos (Z, C, D1, D2, D3 e D4)	Repetir o teste. Possível contaminação.
CP com resultado Não detectado para todos ou ao menos um dos alvos (Z, C, D1, D2, D3 e D4)	Repetir o teste. Se não for positivo para nenhum alvo, possível perda de amostra. Se for positivo para algum dos alvos, pode ter havido problema durante a preparação das misturas de RT-PCR para detecção de ZC e/ou D1/D2 e/ou D3/D4.

- O **alvo CI** é o controle interno utilizado para validar individualmente cada resultado do Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos;
- Quando o **alvo CI** apresentarem o resultado “**Não detectado**” e os **alvos ZC, D1/D2 e D3/D4** também forem **não detectados**, é **imprescindível que a repetição do ensaio seja realizada a partir de uma nova extração e uma nova amplificação**. Todos os resultados deverão ser analisados de acordo com os critérios descritos no item 11.1 -Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo e 11.2 - Interpretação de Resultados”;
- O alvo RP não é utilizado como critério para geração de laudo.

10. USUÁRIO PRETENDIDO

Profissional técnico capacitado para processamento de amostras clínicas, com base na tecnologia de PCR em Tempo Real e na utilização de insumos/kit e equipamentos necessários para o diagnóstico molecular.

11. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

Não utilizar tubos com anticoagulante heparina, pois interferem na etapa de PCR.

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

12.1 Especificidade analítica e clínica

Não houve reação cruzada quando analisadas amostras verdadeiras positivas para HIV, HCV, HBV, Malária, febre amarela, doença de Chagas, sífilis, HTLV e Mayaro.

O Kit Molecular ZC D-Tipagem apresentou especificidade analítica de 100% e especificidade clínica de 99,9%.

12.2 Sensibilidade Analítica

O teste é capaz de detectar, na reação 200 cópias/mL para o alvo Z, 100 cópias/mL para o alvo C, 100 cópias/mL para o alvo D1, 100 cópias/mL para o alvo D2, 100 cópias/mL para o alvo D3 e 100 cópias/mL para o alvo D4.

As análises PROBIT (IBM SPSS Statistics Subscription), considerando uma taxa de 95% de positividade e um intervalo de confiança (IC) de 95%, apresentaram sensibilidade estimada em 75,99 cópias/mL para o alvo Z, 47,41 cópias/mL para o alvo C, 34,6 cópias/mL para o alvo D1, 15,4 cópias/mL para o alvo D2, 51,2 cópias/mL para o alvo D3 e 3,3 cópias/mL para o alvo D4 quando avaliadas amostras de cultura.

* A quantificação da amostra do painel foi realizada através da técnica de PCR digital ou kit de quantificação (PCR em tempo real) comercial. E, as diluições seriadas foram extraídas utilizando o equipamento extrator Chemagic Prime (Perkin Elmer). Sendo, os resultados obtidos aplicáveis somente a este kit e os números de cópias definidos por outros métodos não são necessariamente equivalentes.

12.3 Sensibilidade Clínica

Quando testadas amostras verdadeiras positivas, o Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos apresentou 100% de concordância para Zika, Chikungunya e Dengue 1, 2, 3 e 4.

12.4 Precisão

Para cálculo e avaliação da precisão do teste, foram obtidos os valores do coeficiente de variação (CV) de 2 diluições para cada um dos alvos Zika, Chikungunya e Dengues 1, 2, 3 e 4.

Concentração (cópias/mL)	Zika		Chikungunya		Dengue 1		Dengue 2		Dengue 3		Dengue 4	
	3,68E+02	1,84E+02	1,43E+01	7,17E+00	2,65E+01	1,33E+01	2,45E+01	1,23E+01	5,40E+01	2,70E+01	2,45E+01	1,23E+01
CV (%)	3,32	0,35	1,67	3,62	2,48	2,09	1,98	2,43	2,34	1,72	2,11	1,80

12.5 Exatidão

Conforme esperado, os valores de exatidão expressos pelo Erro Padrão Relativo (EPR %) mínimo foi de 0,63% e máximo de 4,12% para o alvo zika, mínimo foi de 0,05 e máximo de 2,25% para o alvo Chikungunya, mínimo foi de -0,05% e máximo de -6,31% para o alvo dengue 1, mínimo foi de -1,28% e máximo de -6,27% para o alvo dengue 2, mínimo foi de -1,00% e máximo de -5,72% para o alvo dengue 3 e mínimo foi de -0,13% e máximo de 4% para o alvo dengue 4.

13. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Ao manusear qualquer um dos reagentes observe as precauções necessárias. A qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento às boas práticas de laboratório tais como:

- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI): luvas descartáveis (sem talco) e jaleco em todas as etapas do teste;
- Após o uso, desprezar ponteiros, tubos, placas, reagentes, insumos/produtos no descarte de risco biológico;
- Desprezar a placa óptica, após a amplificação e detecção, em descarte biológico;
- Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização de cada kit, de acordo com os procedimentos de cada laboratório;
- Não usar reagentes com a validade vencida;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- O teste deve ser usado somente para monitoramento in vitro e USO PROFISSIONAL, de acordo com as instruções fornecidas no kit.

14. DESCARTE DO PRODUTO

Após o uso, os componentes do produto devem ser descartados em recipientes destinados ao lixo biológico.

Os reagentes da etapa de extração (manual ou automatizada) devem ser descartados de acordo com a orientação do fabricante.

15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e em instalações de acordo com normas internas de Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório. O fabricante garante a qualidade do kit mediante seu uso adequado, descrito nestas Instruções de Uso, bem como orientações dadas durante o treinamento fornecido ao usuário.

16. RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Anvisa MS 80142170061

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES n°: 21433-02

Fabricante:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro- RJ

CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira

Regularizado por:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

CNPJ 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao:
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ
CNPJ 33.781.055/0001-35
Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ
SAC: 08000.210.310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

PROIBIDA VENDA AO COMERCIO

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ansumana R, Jacobsen KH, Leski TA, et al. Reemergence of chikungunya virus in Bo, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(7):1108-1110.
- Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2321-2334.
- de Oliveira Poersch C, Pavoni DP, Queiroz MH, et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol.* 2005;32(4):272-277.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4977-4983.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):764-767.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-1239.
- Marisa O. Ribeiro, Daniela T. Godoy, Marcela Fontana-Maurell, Elaine M. Costa, Elisabete F. Andrade, Daniele R. Rocha, Antônio G.P. Ferreira, Rodrigo Brindeiro, Amilcar Tanuri, Patricia Alvarez. Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, Dengue and Chikungunya viruses in blood. *Braz J Infect Dis Mar-Apr 2021;25(2).*
- Mar-Apr 2021;25(2):101542* Marks PW, Epstein JS, Borio LL. Maintaining a Safe Blood Supply in an Era of Emerging Pathogens. *J Infect Dis.* 2016;213(11):1676-1677.
- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487-524.
- Ngwe Tun MM, Inoue S, Thant KZ, et al. Retrospective seroepidemiological study of chikungunya infection in South Asia, Southeast Asia and the Pacific region. *Epidemiol Infect.* 2016;144(11):2268-2275.
- Panning M, Charrel RN, Donoso Mantke O, Landt O, Niedrig M, Drosten C. Coordinated implementation of chikungunya virus reverse transcription-PCR [published correction appears in *Emerg Infect Dis.* 2009 Aug;15(8):1334. Mantke, Oliver D [corrected to Donoso Mantke, Oliver]]. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):469-471.
- Panning M, Charrel RN, Donoso Mantke O, Landt O, Niedrig M, Drosten C. Coordinated implementation of chikungunya virus reverse transcription-PCR [published correction appears in *Emerg Infect Dis.* 2009 Aug;15(8):1334. Mantke, Oliver D [corrected to Donoso Mantke, Oliver]]. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):469-471.
- Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):416-422.