



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



Original

## Diagnóstico microbiológico del virus chikungunya importado en España (2006–2007): detección de casos en viajeros

María Paz Sánchez-Seco<sup>a,\*</sup>, Ana Isabel Negredo<sup>a</sup>, Sabino Puente<sup>b</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Pinazo<sup>c</sup>, Isabelle Shuffenecker<sup>d</sup>, Antonio Tenorio<sup>a</sup>, Cesare Giovanni Fedele<sup>e</sup>, Cristina Domingo<sup>a</sup>, José Miguel Rubio<sup>f</sup> y Fernando de Ory<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>b</sup> Servicio de Enfermedades Tropicales, Hospital Carlos III, Madrid, España

<sup>c</sup> Sección de Medicina Tropical, Centro de Investigación en Salud Internacional Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

<sup>d</sup> French National Référence des Arbovirus Institut Pasteur, Lyon, France

<sup>e</sup> Servicio de Orientación Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Carlos III, Madrid, España

<sup>f</sup> Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 24 de abril de 2008

Aceptado el 10 de julio de 2008

On-line el 12 de junio de 2009

#### Palabras clave:

Virus chikungunya

Enfermedad importada

Diagnóstico microbiológico

### RESUMEN

**Introducción:** El virus chikungunya (CHIKV) es un claro ejemplo de patógeno emergente, como demuestran los importantes brotes que ha ocasionado en los últimos años en algunas islas del Océano Índico, en el subcontinente indio y en Italia. La aparición de un brote autóctono en Europa ha demostrado el acierto de las autoridades sanitarias internacionales en su preocupación ante la posibilidad de introducción y asentamiento de este arbovirus en países de clima templado en los que circulan los vectores apropiados.

**Métodos:** Se ha estudiado a 308 pacientes con sintomatología similar a la causada por la infección por este virus desarrollada durante la estancia o tras el regreso de una zona endémica. Se han buscado, mediante herramientas moleculares y/o serológicas, pruebas de infección por CHIKV.

**Resultados:** Se han diagnosticado 29 casos positivos. Las herramientas moleculares y serológicas son complementarias. Las técnicas moleculares son las que han generado resultados positivos en los inicios de la sintomatología y las técnicas serológicas son las que lo hacen en muestras con un mayor tiempo de evolución.

**Conclusión:** Se han detectado los primeros casos de infección por CHIKV en viajeros españoles. En España se cuenta con los medios necesarios para el correcto diagnóstico de la infección por este virus.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Microbiological diagnosis of chikungunya virus in Spain (2006–2007): Case detection in travelers

### ABSTRACT

#### Keywords:

Chikungunya virus

Imported illness

Microbiological diagnosis

**Introduction:** The chikungunya virus is a clear example of an emergent pathogen, as demonstrated by the important outbreaks reported in recent years on some islands in the Indian Ocean, on the Indian subcontinent, and in Italy. The autochthonous outbreak that took place in Europe has shown that the international health authorities were right in their concern about the possibility that this arbovirus could become established in countries with a temperate climate where the appropriate vectors circulate.

**Methods:** A total of 308 patients were studied to investigate symptoms consistent with infection by this virus occurring during their stay in, or after their return from, an endemic area. Molecular and/or serological methods were used to seek evidence of infection by chikungunya virus.

**Results:** Twenty-nine positive cases were diagnosed. The molecular and serological tools are complementary: molecular technology generated positive results at the onset of symptoms and serology provided positive testing in samples with a longer evolution time.

**Conclusion:** The first cases of infection by chikungunya virus in Spanish travelers have been detected. The tools necessary for correct diagnosis of infection by this virus are available in our country.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [paz.sanchez@isciii.es](mailto:paz.sanchez@isciii.es) (M.P. Sánchez-Seco).

## Introducción

El interés suscitado por el virus chikungunya (CHIKV) en los últimos años se ha debido, entre otras causas, al aumento del número y a la dimensión de algunos de los brotes que ha ocasionado. En la región del Índico Occidental produjo una situación epidémica grave, especialmente en la isla de Reunión, donde llegó a afectar a más de un tercio de la población (244.000 casos)<sup>1</sup>, con el pico de mayor actividad entre enero y febrero de 2006. Poco después, el CHIKV resurgió en el subcontinente indio después de 32 años<sup>2</sup>. La Organización Mundial de la Salud reconoció más de 1,38 millones de casos en 2006 y 56.365 casos sospechosos en 2007 (URL: [http://www.searo.who.int/en/Section10/Section2246\\_13975.htm](http://www.searo.who.int/en/Section10/Section2246_13975.htm)). Esta reaparición ha hecho que las autoridades sanitarias europeas manifestaran su preocupación ante la posible introducción del virus a través de viajeros infectados en fase aguda de viremia en aquellos países donde el mosquito vector estuviera presente, y han aconsejado la puesta en marcha de sistemas de vigilancia y detección<sup>3</sup>. Entre el 1 de abril de 2005 y el 28 de febrero de 2006 se identificaron 307 casos importados de infección por CHIKV en Francia<sup>4</sup>. También se declararon casos en otros países europeos, como Alemania, Suiza, Noruega e Italia<sup>5</sup> o en Estados Unidos<sup>6</sup>. Esta hipotética introducción del virus en países desarrollados se hizo realidad en Italia en agosto de 2007 con más de 200 personas afectadas<sup>7</sup>. El caso índice fue un viajero enfermo procedente de la India, que llegó a una zona colonizada por uno de los mosquitos que más eficazmente transmiten la enfermedad, el llamado mosquito tigre (*Aedes albopictus*), de origen asiático.

El CHIKV es un alfavírus que puede producir cuadros febriles acompañados de erupciones cutáneas y dolores articulares, en ocasiones incapacitantes y de larga duración<sup>8</sup>. Lo transmiten mosquitos del género *Aedes*. La expansión de *A. albopictus* así como el grado de viremia que este virus alcanza en el huésped humano son 2 de los factores causales de la aparición o reaparición del virus en diversas partes del mundo.

En España, el vector se halla presente, al menos, desde el año 2004<sup>9</sup> cuando se detectó por primera vez en Sant Cugat del Vallés (Barcelona). En la actualidad se ha expandido y se ha detectado también en otros puntos de Cataluña y, ocasionalmente, en Orihuela<sup>10</sup>. La necesidad de realizar un correcto diagnóstico de los viajeros que llegan a España, así como la posibilidad del establecimiento de ciclos autóctonos, ha hecho que en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) se acelera la puesta a punto de las herramientas diagnósticas. Así se han estudiado casos con sintomatología febril o con dolores articulares compatibles con la infección por CHIKV recibidos en 2006 y 2007, todos éstos en viajeros (inmigrantes, turistas, etc.) procedentes de zonas endémicas.

## Métodos

Se estudiaron muestras de suero y de sangre de 308 pacientes (87 pacientes en el año 2006 y 221 pacientes en el año 2007), remitidas al CNM, que cumplían los criterios clínicos y epidemiológicos para considerarse como casos sospechosos ( fiebre o dolores articulares tras visitar una zona endémica). Se realizaron detección molecular del ácido nucleico del virus (en las muestras agudas) y/o ensayos serológicos (en las muestras agudas, convalecientes y de seguimiento). Para este estudio y con el fin de no perder ningún resultado positivo, se consideraron muestras agudas a aquellas muestras con una evolución menor a un mes desde el inicio de los síntomas y convalecientes a las que tuvieron una evolución mayor; las muestras de seguimiento fueron

aquellas obtenidas subsiguientemente. Los tiempos de evolución de las muestras se proporcionaron en la ficha clínica.

El diagnóstico molecular se realizó mediante la utilización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada genérica en el gen *NSP4*<sup>11</sup>. Los resultados se confirmaron con una PCR específica en el gen *ENV* en formato semianidado<sup>12</sup>.

Las primeras muestras recibidas entre febrero y agosto de 2006 se diagnosticaron en el Instituto Pasteur de Lyon, Francia, mediante test caseros de la técnica de radioinmunoanálisis (ELISA) de captura de inmunoglobulina M (IgM) y ELISA indirecta para inmunoglobulina G (IgG) en sueros inactivados, según describen Murgue et al<sup>13</sup>. Para cada muestra analizada, se calculó la densidad óptica (DO) neta: se restó el valor de la DO de los pociños con control de antígeno de aquéllos con antígeno específico. Los valores por encima del punto de corte, definido como el valor medio de la DO de 3 sueros negativos más 3 desviaciones estándares, se consideraron positivos.

En el CNM se puso a punto un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y se empleó como antígeno células Vero E6 infectadas con el aislado 1721 del virus, proporcionado por el Dr. Grandadam, del Instituto de Medicina Tropical del Ministerio de Defensa, Marsella (Francia). El cultivo de virus se llevó a cabo en el laboratorio de seguridad biológica 3 del CNM. A partir del año 2007 se utilizó un método equivalente (anti-chikungunya virus IIFT), producido por Euroimmun.

Para la determinación de IgM, las muestras se ensayaron diluidas 1:10 para IgG y a una dilución de 1:20 después de eliminar la IgG de la muestra a fin de evitar las posibles interferencias derivadas de la presencia del factor reumatoide e IgG específica.

## Resultados

Se obtuvieron resultados positivos en 29 pacientes (tabla 1), un 9,4% de los pacientes estudiados (15 pacientes en 2006 y 14 pacientes en 2007). Casi la mitad de los casos positivos (14 casos, el 48,2%) procedían de India (7 casos en 2006 y 7 casos en 2007). En la región del Índico Occidental se infectaron 3 casos cada año, mientras que en la región del Golfo de Guinea 8 pacientes adquirieron la infección (en Guinea Ecuatorial 3 pacientes en 2006 y 2 pacientes en 2007, y en Camerún 2 pacientes en 2006 y un paciente en 2007) (fig. 1).

El mayor número de casos positivos detectados correspondía a los casos enviados desde las comunidades autónomas de Madrid (10 casos) y Cataluña (9 casos).

En cuanto al diagnóstico microbiológico de CHIKV se constató que no se obtuvieron resultados positivos por PCR cuando el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la toma de la muestra era superior a 7 días. Por el contrario, en ese período sólo se obtuvo un caso con resultado positivo en la detección de la IgM. La detección de la IgM varió según los casos y tenía un rango de desaparición de 45 a 210 días. En cuanto al isotipo de la IgG, se detectó en muestras con evolución de 5 a 540 días (no se estudiaron muestras con más tiempo de evolución).

El primer caso de 2006 correspondía a un paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el que el genoma del virus pudo detectarse más de un mes después de la aparición de los síntomas de la enfermedad.

## Discusión

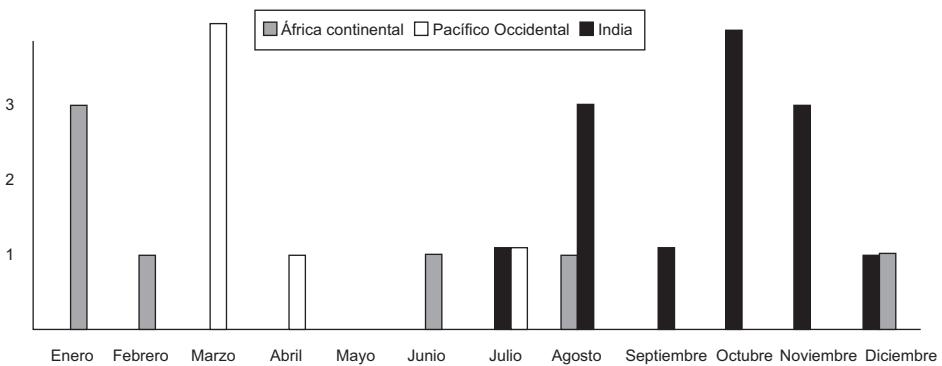
Los resultados presentados en este artículo corresponden a una serie de casos estudiados en la práctica asistencial del CNM, que aporta datos relevantes sobre la infección por CHIKV en viajeros

**Tabla 1**

Algunas propiedades de las muestras de los casos estudiados

		PCR	IgG	IgM	Hospital	Origen
1	>30 días 240 días	Pos	Nd	Nd	Clínic de Barcelona, Barcelona	Camerún
2	30 días 90 días	Neg	Pos	Pos	Clínic de Barcelona, Barcelona	Reunión
3	30 días 90 días	Nd	Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Mauricio
4	30 días >30 días	Nd	Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Mauricio
5	160 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Camerún
6	30 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	India
7	30 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Guinea Ecuatorial
8	110 días 540 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Guinea Ecuatorial
9	7 días 45 días	Pos	Neg	Neg	Universitario, Valencia	India
10	4 días >30 días	Pos	Neg	Neg	Carlos III, Madrid	India
11	30 días	Neg	Pos	Pos	Marina Baixa, Alicante	India
12	120 días	Nd	Pos	Pos	Clínic de Barcelona, Barcelona	India
13	4 días 120 días	Pos	Neg	Neg	Clínic de Barcelona, Barcelona	India
14	5 días 50 días	-	Pos	Pos	Carlos Haya, Málaga	India
15	2 días 45 días	Pos	Neg	Neg	General, Elche	Guinea Ecuatorial
1	365 días		Pos	Equi	Clínic de Barcelona, Barcelona	Camerún
2	30 días 60 días 90 días 60 días	Neg	Pos	Pos	Virgen del Rocío, Sevilla	Guinea Ecuatorial
3	60 días		Pos	Neg		
4	60 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	Seychelles
5	90 días		Pos	Pos	Institut Català de la Salut, Barcelona	Madagascar
6	10 días 210 días	Neg	Pos	Pos	Complejo Hospitalario, Pontevedra	Seychelles
7	45 días		Pos	Pos	Ramón y Cajal, Madrid	Guinea Ecuatorial
8	Ndías		Pos	Pos	Clínic de Barcelona, Barcelona	India
9	28 días 118 días		Pos	Pos	Son Dureta, Palma de Mallorca	India
10	13 días Nd	Neg	Pos	Neg	Carlos III, Madrid	India
11	>21 días		Pos	Pos	Carlos III, Madrid	India
12			Neg	Pos	Clínic de Barcelona, Barcelona	India
13			Pos	Pos	Clínic de Barcelona, Barcelona	India
14			Pos	Pos	Cruces, Vizcaya	India

Equi: Equívoco; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; Nd: No determinado; Neg: Negativo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; Pos: Positivo.

**Figura 1.** Representación de los casos de infección por virus chikungunya según el país de origen y el momento del viaje.

españoles. Los primeros casos descritos de infección en viajeros en España<sup>14,15</sup> están recogidos también en esta serie ya que en todos ellos el diagnóstico se realizó en el CNM, único centro del país en el que, hasta el momento y según el conocimiento de los autores de este artículo, se está realizando y que actúa como centro de referencia y diagnóstico primario de la infección en España.

Un aspecto importante del diagnóstico de la infección por CHIKV es el diagnóstico diferencial con virus del dengue en viajeros procedentes de áreas donde los 2 virus son endémicos, sin olvidar la gran similitud de la sintomatología que ambos producen. De igual manera, en el inicio de la enfermedad los síntomas observados son similares a los del paludismo,

enfermedad con la que también hay que hacer el diagnóstico diferencial. De los 308 casos, en 218 casos se estudió también dengue o malaria. El 12,3% de los 218 casos estudiados presentó marcadores compatibles con infección aguda por el virus del dengue (IgM o PCR positiva) mientras que el 1,8% fue positivo en pruebas de PCR para la detección directa del plasmodio. El porcentaje de casos positivos, obtenidos en la serie analizada, frente a CHIKV (9,4%) fue similar al que se obtenía cuando era el virus del dengue el que se diagnosticó y superior al que se obtuvo al buscar infección por plasmodio mediante PCR. Obviamente esto no significa que el CHIKV deba considerarse un agente tan extendido y con una carga de enfermedad similar a la producida por patógenos de la importancia sanitaria de la malaria o del virus del dengue, pero sí pone de manifiesto la necesidad de considerar al CHIKV en el diagnóstico diferencial de viajeros con cuadros febriles inespecíficos y, por supuesto, con una sintomatología más demostrativa de infección por este virus que tengan, además, una historia epidemiológica compatible. En 2 casos se detectaron simultáneamente títulos altos (mayores de 1.280) de anticuerpos isotípico de la IgG frente al parásito y marcadores compatibles con infección reciente por dengue, y sólo en un caso se observaron a la vez anticuerpos frente a malaria con alto título y presencia de CHIKV. Para determinar si se trataba de coinfecciones se hubiera necesitado disponer de las historias clínicas detalladas. Las coinfecciones de CHIKV y malaria ya se han descrito previamente mediante la utilización de técnicas de detección directa<sup>12</sup>.

El hecho de que el mayor número de casos positivos fuera el de los viajeros provenientes de India puede deberse a varios factores. Uno de éstos se refiere a la intensa actividad del virus en esta región en el momento de la realización de este estudio. Por otro lado, hay que considerar que, de aquellos países en el área de distribución del virus de los que se tienen datos disponibles, la India es el más visitado por viajeros españoles (45.247 viajeros en 2005 frente a, por ejemplo, 9.682 en la isla Mauricio) (datos proporcionados por el Departamento de Estadísticas y Evaluación Económica del Turismo de la Organización Mundial del Turismo, URL: <http://www.unwto.org/regional/europe/menu.htm>). Estos datos no están disponibles para Guinea Ecuatorial o Camerún, sin embargo, destaca que, en la serie estudiada, el número de infecciones detectadas en viajeros procedentes de esta zona es tan alto como los procedentes de la India. Obviamente, para establecer comparaciones con significado epidemiológico se debe saber cuántos de los casos estudiados corresponden a turistas, cuántos a inmigrantes o el tiempo de estancia en los países mencionados con el fin de corregir posibles sesgos. La circulación de este virus en Guinea Ecuatorial se describió previamente<sup>12</sup> en un trabajo en el que se demostraba la circulación del virus en 2006 (uno de los casos reflejados en el presente artículo), en 2002 y en 2003. En este estudio, al analizar 720 muestras de niños con enfermedad febril por PCR se detectó el virus en 8 muestras (1,1%). Se podría pensar que este porcentaje es mayor ya que se trataba de un estudio de detección molecular donde la ausencia de falsos negativos no podía excluirse, pero en cualquier caso es un porcentaje muy elevado. En otro país del Golfo de Guinea, Camerún, se vio que los mayores grados de seroprevalencia frente a diversos arbovirus correspondían a CHIKV y a otro alfavirus, el virus O'Nyong Nyong<sup>16</sup>. Por último, un trabajo realizado sobre cooperantes alemanes indica que la zona del Golfo de Guinea, así como en Tailandia, era donde se concentraba el mayor número de infecciones por el virus<sup>17</sup>. En esta serie destaca tanto el número de casos positivos provenientes de África Ecuatorial como la ausencia de casos de viajeros que han visitado el Sudeste asiático.

La PCR parece ser útil en muestras con una evolución inferior a 7 días mientras que posteriormente es la serología la herramienta que se utilizó y con la que se obtuvo el resultado positivo más temprano (a los 5 días) tras la aparición de los síntomas. Es

también a partir de este tiempo cuando pudo detectarse el isotipo de la IgG. Esta evolución de los marcadores diagnósticos es ligeramente diferente a la que indican Panning et al<sup>18</sup>, que observaron detección positiva por serología en algunos casos a partir del primer día tras el inicio de la sintomatología. En este caso, la falta de observación de este fenómeno podía deberse al bajo número de casos estudiados con evolución menor de una semana.

Resultó de especial interés el primer caso de 2006, un individuo immunodeprimido (infectado por VIH) con resultado positivo por PCR en una muestra tomada más de un mes tras la aparición de la sintomatología. Muy probablemente fue la propia inmunosupresión la que hizo que, en este caso, la viremia tuviera una duración no habitual en estas arbovirosis. En todos los casos en los que se pudo hacer serología en la muestra convaleciente o de seguimiento, los resultados fueron complementarios a los obtenidos mediante técnicas moleculares y se consiguió la confirmación de todos los resultados, por lo que se puede concluir que en el CNM se dispone de las capacidades necesarias para la correcta identificación de la infección por CHIKV.

En definitiva, como en otras arbovirosis, además de la información sobre el origen del viajero, resulta esencial conocer cuál es el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la toma de la muestra con el fin de realizar el correcto diagnóstico etiológico, datos que deberían estar recogidos de forma precisa en la ficha clínica para el óptimo procesamiento de las muestras de los pacientes. En conclusión, se puede resaltar el carácter complementario de las aproximaciones diagnósticas moleculares y serológicas actualmente disponibles en el CNM.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el excelente apoyo técnico de Noelia Reyes, Lourdes Hernández, María Angeles Bustillo, María José Malo y Teodora Minguito, y el apoyo de las doctoras Ximena Collao y Asia de la Loma.

La elaboración de este trabajo ha sido posible gracias a los datos que aportaron los microbiólogos y los clínicos de los diferentes hospitales, recogidos en la tabla 1, y Azucena Pernia, de la Oficina Mundial de Turismo (autorización UNWTO, 9284401408).

## Bibliografía

- Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:727–31.
- Lahariya C, Pradhan SK. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. *J Vector Borne Dis*. 2006;43:151–60.
- Depoortere E, Coulombier D, on behalf of the ECDC chikungunya risk assessment group. Chikungunya risk assessment for Europe: Recommendations for action. *Euro Surveill*. 2006;11:E060511.2. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?PublicationType=W&Volume=11&Issue=19&OrderNumber=2>
- Cordel H, Quatresous I, Paquet C, Couturier E. Imported cases of chikungunya in metropolitan France, April 2005–February 2006. *Euro Surveill*. 2006;11:060420. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2944>
- Pfeffer M, Löscher T. Cases of chikungunya imported into Europe. *Euro Surveill*. 2006;11:060316. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2922>
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Vélez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:764–7.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, CHIKV study group, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: An outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007;370:1840–6.
- Seneviratne SL, Gurugama P, Perera J. Chikungunya viral infections: An emerging problem. *J Travel Med*. 2007;14:320–5.
- Aranda C, Eritja R, Roiz D. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol*. 2006;20:150–2.

10. Roiz D, Eritja R, Melero-Alcibar R, Molina R, Marqués E, Ruiz S, et al. Distribución de Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) (Díptera, Culicidae) en España. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 2007;40: 523–6.
11. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods*. 2001;95:153–61.
12. Collao X, Negredo AI, Cano J, Tenorio A, De Ory F, Benito A, et al. First description of circulation of chikungunya virus in Equatorial Guinea. Vector borne and Zoonotic Disease. *Emerg Infect Dis*. En evaluación.
13. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand J-P, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:692–6.
14. Amador C, López-Perezagua MM, Arjona FJ, Martínez-Peinado C. Infección por virus de chikungunya en una viajera española. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:116–9.
15. Martín-Parfán A, Calbo-Torrecillas F, Pérez de Pedro I. Fiebre importada por el virus de Chikungunya. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:343–4.
16. Kuniholm MH, Wolfe ND, Huang CY, Mpoudi-Ngole E, Tamoufe U, Le Breton M, et al. Seroprevalence and distribution of flaviviridae, togaviridae, and bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:1078–83.
17. Eisenhut M, Schwarz TF, Hegenscheid B. Seroprevalence of dengue, chikungunya and sindbis virus infections in German aid workers. *Infection*. 1999;27:82–5.
18. 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;14:416–22.