

GIÁ TRỊ CỦA KỸ THUẬT RT-PCR CHẨN ĐOÁN VIRUT DENGUE TẠI KHOA CẤP CỨU, BỆNH VIỆN QUÂN Y 103 NĂM 2017

Nguyễn Giang Hòa*; Lê Thị Bảo Quyên**; Ngô Quý Lâm***
Phạm Văn Tiến*; Hoàng Xuân Sứ***

TÓM TẮT

Mục tiêu: đánh giá hiệu quả của kỹ thuật RT-PCR trong chẩn đoán virus Dengue (DENV) tại Khoa Cấp cứu, Bệnh viện Quân y 103 năm 2017. **Đối tượng và phương pháp:** 75 mẫu huyết thanh của bệnh nhân (BN) được chẩn đoán lâm sàng nghi nhiễm dengue trong giai đoạn cấp thu thập tại Khoa Cấp cứu, Bệnh viện Quân y 103 tháng 8 - 9 năm 2017. Xét nghiệm các mẫu huyết thanh phát hiện NS1 Ag-IgM/IgG, sử dụng xét nghiệm nhanh OnSite Duo Dengue Ag-IgG/IgM rapid test-CTK Biotech (Mỹ). Kỹ thuật RT-PCR được tối ưu để phát hiện và giải trình tự xác định týp DENV. **Kết quả:** trong số 75 BN nghi nhiễm DENV xét nghiệm bằng test nhanh NS1-Ag, phát hiện 50/75 BN (66,7%), xét nghiệm bằng RT-PCR phát hiện được 52/75 BN (69,3%) nhiễm DENV, trong đó 6/25 BN (24%) xét nghiệm RT-PCR (+) nhưng có xét nghiệm NS1 (-). Kết hợp các chỉ số xét nghiệm, hiệu quả chẩn đoán cao nhất quan sát thấy ở 59/75 BN (78,67%) khi có một trong bốn chỉ tiêu xét nghiệm RT-PCR hoặc NS1-Ag hoặc IgM hoặc IgG dương tính. Kết quả xác định týp dengue cho thấy 33/50 BN (66%) nhiễm dengue týp I và 17/50 BN (34%) nhiễm dengue týp II. **Kết luận:** kỹ thuật RT-PCR có giá trị và độ nhạy cao trong chẩn đoán nhiễm DENV, đặc biệt trong giai đoạn sớm của bệnh khi các xét nghiệm kháng nguyên NS1 và huyết thanh học IgM hoặc IgG cho kết quả âm tính. Kết hợp RT-PCR với xét nghiệm kháng nguyên NS1 và huyết thanh học cho hiệu quả chẩn đoán cao hơn khi sử dụng riêng rẽ. RT-PCR còn sử dụng cho giải trình tự gen xác định được 33/50 BN (66%) týp dengue I và 17/50 BN (34%) týp dengue II phục vụ công tác giám sát và kiểm soát dịch dengue ở khu vực Hà Nội.

<http://www.kimhung.vn>

* Từ khóa: Virus Dengue; Kỹ thuật RT-PCR; NS1-Ag.

Efficacy of RT-PCR Assay for Detecting Dengue Virus in Emergency Department, 103 Military Hospital

Summary

Objectives: To evaluate clinical performance of RT-PCR assay for detecting Dengue virus in acute febrile illness. **Subjects and methods:** A total of 75 sera samples collected from suspected patients infected with Dengue virus in Emergency Department of 103 Military Hospital. NS1 Ag-IgM/IgG tested using OnSite Duo Dengue Ag-IgG/IgM Rapid test-CTK Biotech, USA, whereas RT-PCR was optimized for detecting RNA and sequenced for typing of Dengue virus. **Results:** Among tested patients, RT-PCR positive was observed in 52/75 cases (69.33%),

* Bệnh viện Quân y 103

** Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*** Học viện Quân y

Người phản hồi (Corresponding): Hoàng Xuân Sứ (hoangxuansu@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 07/02/2018; **Ngày phản biện đánh giá bài báo:** 20/03/2018

Ngày bài báo được đăng: 06/04/2018

whereas 50/75 cases (66.7%) were detected positive with NS1-Ag. Interestingly, among 25 cases negative with NS1Ag, 6 cases had RT-PCR positive. In combination with any two diagnostic assays, the best diagnostic performance was observed in 59/75 cases (78.67%) either one or in four tests with positive result. The study results detected 33/50 cases (66%) infected with dengue type I and 17/50 cases (34%) infected with dengue type II. Conclusion: This study indicated that RT-PCR is valuable tool for early detection of dengue virus infection. The combination of RT-PCR and NS1-Ag or serology IgM/IgG lead to high performance for diagnosis and monitoring dengue in emergency setting. RT-PCR used for sequencing to identify type dengue was observed in 33/50 cases (66%) infected with dengue type I and 17/50 cases (34%) were infected with dengue type II. This will help for surveillance and control of Dengue virus infection in Hanoi.

* Keywords: Dengue virus; RT-PCR assay; NS1-Ag.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt dengue và sốt xuất huyết (SXHD) do DENV gây ra, lây truyền qua muỗi đốt (*Aedes aegypti* và *Aedes albopictus*) là vấn đề y tế công cộng mang tính toàn cầu, hiện nay ước tính có khoảng 390 triệu trường hợp mắc mỗi năm ở 128 quốc gia thuộc các khu vực có khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới như vùng Đông Nam Á, Tây Thái Bình Dương, châu Mỹ, và châu Phi [3].

Tại Việt Nam, dịch bệnh sốt dengue và SXHD là bệnh truyền nhiễm lưu hành phổ biến khắp cả nước, trong đó Hà Nội là khu vực trọng điểm của dịch bệnh trong suốt thập kỷ qua, với hàng chục nghìn người mắc bệnh hàng năm. Đặc biệt năm 2017, Hà Nội là nơi có số ca mắc cao nhất với > 20.000 trường hợp mắc bệnh và 7 trường hợp tử vong được báo cáo.

Bệnh sốt dengue và SXHD do DENV gây ra có 4 týp là 1, 2, 3 và 4. Ở Việt Nam gặp cả 4 týp, nhưng gặp chủ yếu là týp 1 và 2. Bệnh có biểu hiện lâm sàng đa dạng, từ nhiễm virut không triệu chứng đến sốt dengue, SXHD và hội chứng shock dengue.

Chẩn đoán nhiễm DENV hiện nay chủ yếu dựa vào các xét nghiệm test nhanh như dengue NS1-Ag (nonstructural protein 1 antigen: NS1-Ag) dengue NS1 Ag + Ab Combo và huyết thanh học MAC-ELISA. Tuy nhiên, các xét nghiệm này chỉ có độ nhạy 90% đối với nhiễm DENV lần đầu hay nhiễm DENV tiên phát, độ nhạy giảm xuống 50 - 80% khi nhiễm DENV lần hai (hay nhiễm dengue thứ phát) [3, 4]. Do đó, để chẩn đoán chính xác nhiễm DENV trong giai đoạn sớm của bệnh, kỹ thuật RT-PCR với ưu điểm có độ nhạy và độ đặc hiệu cao được nhiều phòng xét nghiệm chẩn đoán trên thế giới sử dụng để khẳng định nhiễm DENV, xác định các phân týp dengue [6, 7]. Ở Việt Nam, RT-PCR chưa được sử dụng thường quy ở các phòng xét nghiệm để chẩn đoán sớm nhiễm DENV khi BN vào khoa khám cấp cứu. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Đánh giá hiệu quả của xét nghiệm RT-PCR chẩn đoán DENV ở các khoa cấp cứu - nơi tiếp nhận nhiều trường hợp nghi nhiễm DENV khi có vụ dịch bùng phát xảy ra.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu thực hiện trên 75 mẫu huyết thanh của BN ở giai đoạn cấp trong dịch sốt xuất huyết năm 2017 vào Khoa khám Cấp cứu, Bệnh viện Quân y 103.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Mô tả phòng thí nghiệm từ tháng 8 đến 9 - 2017 tại Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y. Chẩn đoán lâm sàng BN sốt dengue và SXHD theo Hướng dẫn của Bộ Y tế, gồm: sốt cao đột ngột, liên tục 2 - 7 ngày và có ít nhất 2 trong các dấu hiệu sau:

- Biểu hiện xuất huyết: nghiệm pháp dây thắt dương tính, chấm xuất huyết ở dưới da, chảy máu chân răng hoặc chảy máu cam.

- Nhức đầu, chán ăn, buồn nôn.

- Da xung huyết, phát ban.

Thu thập mẫu huyết tương: lấy 5 ml máu tĩnh mạch ngoại vi của BN vào ống chứa chất chống đông EDTA-K3, sau đó ly tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút, thu huyết tương làm xét nghiệm test nhanh hoặc bảo quản ở -80°C cho tới khi xét nghiệm RT-PCR.

* Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Xét nghiệm chẩn đoán nhanh: phát hiện đồng thời và phân biệt kháng thể IgM, kháng thể IgG kháng DENV và kháng nguyên DENV-NS1 trong máu toàn phần, huyết thanh hoặc huyết tương của người sử dụng kit OnSite Duo Dengue Ag-IgG/IgM rapid test-CTK Biotech (Mỹ).

- Kỹ thuật RT-PCR:

+ Tách chiết ARN: tách chiết ARN từ 200 μl huyết tương mẫu bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất (High pure ARN viral kit, Roche, Thụy Sĩ). Hòa ARN trong 50 μl elution buffer và bảo quản lâu dài ở -80°C .

+ RT-PCR: thực hiện onestep RT-PCR, sử dụng bộ kit QIAGEN onestep RT-PCR (Đức) với các cặp mồi do Lanciotti và CS công bố. Trình tự mồi xuôi: 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAA-CCG-3'; mồi ngược: 5'-TTGCACCAACAA-TCAATGTCTTCTGGTTC-3'. Chạy phản ứng RT-PCR trên máy Master cycler PCR, Eppendorf (Đức) với chu trình nhiệt của phản ứng bao gồm: $50^{\circ}\text{C}/30$ phút, $95^{\circ}\text{C}/15$ phút, 35 chu kỳ $94^{\circ}\text{C}/15$ giây, $56^{\circ}\text{C}/30$ giây, $72^{\circ}\text{C}/30$ giây, $72^{\circ}\text{C}/10$ phút (4°C , $+\infty$). Sản phẩm onestep RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,2%, nhuộm EtBr 30 phút và soi UV để kiểm tra kích thước sản phẩm là 511 bp. Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự gen để xác định týp dengue bằng phân tích loài, sử dụng phần mềm MEGA 7.0.

+ Chứng dương ARN: chứng dương ARN của DENV được tổng hợp *in vitro*, sau đó tinh sạch và đo nồng độ sử dụng Nanodrop (Thermoscientific, Mỹ) 657,3 ng/ μl , chuyển đổi thành số bản copy dựa theo hệ số Avogadro và kích thước sản phẩm tương ứng với 2.192×10^{12} copies/ μl . Từ dung dịch ARN ban đầu, tiến hành pha loãng trong dung dịch TE tới nồng độ 10^4 copies/ml sử dụng làm đối chứng dương trong phản ứng onestep RT-PCR.

* *Phân tích số liệu:* thông tin BN và kết quả xét nghiệm được mã hóa và nhập liệu bằng phần mềm Excel. Phân tích số liệu sử dụng phần mềm SPSS 13.0. Tính tỷ lệ, so sánh từng cặp sử dụng kiểm định χ^2 hoặc Fisher đối với biến định tính và kiểm định t-student test và Mann-Whitney U test đối với biến định lượng. $p < 0,05$ được coi có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1: Thông tin chung của nhóm BN nghiên cứu.

Thông số	n
Tuổi trung bình	32,84 ± 13,83
Giới (nam/nữ)	34/41
Sốt	74/75 (98,66%)
Ban xuất huyết	22/75 (29,33%)
Bạch cầu < $4,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	37/75 (49,33%)
Tiểu cầu < $100 \times 10^3/\mu\text{l}$	22/75 (29,33%)

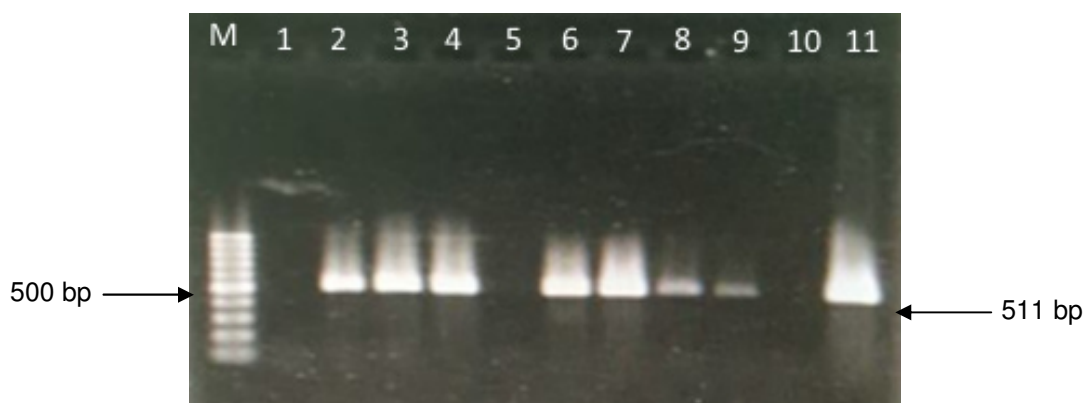
Trong 75 BN nghi nhiễm DENV được đưa vào nghiên cứu gồm 34 nam và 41 nữ, độ tuổi trung bình của BN 32,84. Hầu hết BN có biểu hiện sốt: 74/75 BN (98,66%), 22/75 BN (29,33%) xuất hiện ban xuất huyết, kết quả xét nghiệm cho thấy giảm tiểu cầu < $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ gặp 22/75 BN (29,33%) và giảm bạch cầu < $4,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ gặp 37/75 BN (29,33%).

<http://www.kimhung.vn>

Bảng 2: So sánh xét nghiệm nhanh NS1-Ag và RT-PCR chẩn đoán dengue.

NS1-Ag	RT-PCR		Tổng
	(n = 52)	(n = 23)	
(n = 50)	46	4	50/75 (66,7%)
(n = 25)	6	19	25/75 (33,33%)
Tổng	52/75 (69,3%)	23 (30,66%)	

Kết quả xét nghiệm khẳng định nhiễm DENV bằng xét nghiệm nhanh NS1-Ag phát hiện 50/75 BN (66,7%), trong đó xét nghiệm bằng RT-PCR phát hiện 52/75 BN (69,3%) nhiễm DENV. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Anand và CS, Huang và CS với tỷ lệ lần lượt 68,1% và 71,94% [8, 9]. Đặc biệt, trong số 25 BN xét nghiệm âm tính với NS1-Ag, phát hiện 6/25 BN (24%) dương tính với RT-PCR, trong khi nghiên cứu của Anand chỉ phát hiện 2/18 BN (11,11%), Huang và CS phát hiện 51/392 BN (13,01%). Do đó, nếu chỉ sử dụng xét nghiệm nhanh NS1-Ag sẽ bỏ sót đáng kể BN nhiễm DENV trong giai đoạn cấp. Nếu xem RT-PCR như tiêu chuẩn vàng chẩn đoán nhiễm DENV, xét nghiệm nhanh NS1-Ag có độ nhạy 88,5% và độ đặc hiệu 82,6%.



Hình 1: Điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 1,2%.

(M: Marker 100 bp, 1: Đối chứng âm, 2: Đối chứng dương, 3 - 11: Các mẫu bệnh phẩm)

Khi so sánh giá trị của hai xét nghiệm sử dụng trong chẩn đoán nhiễm DENV theo thời gian xuất hiện triệu chứng sốt, xét nghiệm RT-PCR có tỷ lệ phát hiện dương tính trong ba ngày đầu (23/31 BN = 74,19%), cao hơn so với xét nghiệm nhanh NS1 (18/31 BN = 58,06%), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong nhiễm DENV, có thể kháng nguyên NS1 được phát hiện ngay từ ngày đầu tiên sốt, có thể kéo dài đến ngày thứ 9, trong khi đó tải lượng của DENV trong máu có thể phát hiện 1 - 2 ngày trước khi xuất hiện triệu chứng sốt. Do đó, trong giai đoạn sớm của nhiễm dengue, xét nghiệm RT-PCR có vai trò quan trọng trong chẩn đoán sớm nhiễm dengue, có giá trị giúp công tác giám sát và kiểm soát dịch khi các xét nghiệm khác và biểu hiện lâm sàng chưa giúp chẩn đoán dengue. Chẩn đoán nhiễm DENV khi một trong số các xét nghiệm RT-PCR hoặc realtime RT-PCR, NS1-Ag, phân lập virut, chuyển đảo huyết thanh IgM, chuyển đảo huyết thanh IgG dương tính [10].

Bảng 3: Giá trị chẩn đoán của xét nghiệm chẩn đoán dengue theo thời gian sốt.

Chỉ số	Thời gian sốt		Tổng (n = 75), n (%)
	< 3 ngày (n = 31) n (%)	4 - 9 ngày (n = 44) n (%)	
NS1 (+)	18 (58,06%)	32 (72,72%)	50 (66,66%)
PCR (+)	23 (74,19%)	29 (65,90%)	28 (37,33%)
IgM/IgG (+)	11 (35,48%)	17 (38,63%)	46 (61,33%)
PCR (+), NS1 (+)	17 (54,84%)	29 (65,90%)	56 (74,67%)
PCR (+) hoặc NS1 (+)	24 (77,42%)	32 (72,72%)	55 (73,33%)
PCR (+) hoặc IgM (+)	24 (77,42%)	31 (70,45%)	47 (62,66%)

PCR (+) hoặc IgG/IgM (+)	24 (77,42%)	23 (52,27%)	50 (66,66%)
NS1 (+) hoặc IgG/IgM (+)	18 (58,06%)	32 (72,72%)	51 (68%)
NS1 (+) hoặc IgM (+)	30 (96,77%)	21 (47,73%)	56 (74,67%)
PCR (+) hoặc NS1 (+) hoặc IgM (+)	24 (77,42%)	32 (72,72%)	59 (78,67%)
PCR (+) hoặc NS1 (+) hoặc IgM (+) hoặc IgG (+)	24 (77,42%)	35 (79,54%)	30 (40%)
PCR (+), NS1 (+), IgM (+)	10 (32,26%)	20 (50,00%)	27 (36%)
PCR (+), IgG/IgM (+), NS1 (+)	10 (32,26%)	17 (38,64%)	15 (20%)
PCR (+), IgG/IgM (-), NS1 (+)	7 (22,58%)	8 (18,18%)	4 (5,33%)
PCR (+), IgG/IgM (-), NS1 (-)	4 (12,90%)	0 (0%)	0 (0%)
PCR (+), IgG/IgM (+), NS1 (-)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,33%)
PCR (-), IgG/IgM (+), NS1 (+)	1 (3,23%)	0 (0%)	1 (1,33%)
PCR (-), IgG/IgM (-), NS1 (+)	0 (0%)	1 (2,27%)	0 (0%)
PCR (-), IgG/IgM (+), NS1 (-)	0 (0%)	0 (0%)	
	p > 0,05		

Chúng tôi kết hợp các xét nghiệm NS Ag, RT-PCR, huyết thanh học IgM và IgG để đánh giá hiệu quả chẩn đoán nhiễm DENV. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chỉ số xét nghiệm giữa các nhóm theo thời gian sốt ($p > 0,05$). Tỷ lệ chẩn đoán cao nhất khi có 4 chỉ số xét nghiệm cho kết quả dương tính (59/75 BN = 78,67%). Đặc biệt, khi kết hợp với xét nghiệm huyết thanh học IgM và IgG, hiệu quả chẩn đoán giảm dần theo từng tổ hợp xét nghiệm. Khi kết hợp cả RT-PCR (+) và NS1-Ag (+), 46/75 BN (61,33%) được chẩn đoán dengue. Điều này có thể giải thích, ở giai đoạn sau khởi phát sốt, lượng DENV trong máu giảm, tiếp theo là IgM và IgG xuất hiện dẫn đến làm giảm cả NS1-Ag do gắn với kháng thể tạo phức hợp miễn dịch. Điểm đáng chú ý trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện 4/31 BN (12,90%) có kết quả RT-PCR dương tính ở BN có cả 2 xét nghiệm NS1-Ag và IgM/IgG âm tính trong giai đoạn cấp với thời gian sốt < 3 ngày. Kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Huang và CS (2013) ở Đài Loan (12,90% so với 21,05% [9]). Như vậy, khi sử dụng RT-PCR sẽ giúp chẩn đoán sớm dengue trong giai đoạn cấp của bệnh. RT-PCR còn giúp xác định tít của DENV giúp theo dõi tiên lượng điều trị cũng như giám sát dịch tễ học. Trong nghiên cứu này, 50 mẫu dương tính với DENV bằng RT-PCR được giải trình tự xác định tít dengue.

* Tỷ lệ týp dengue trong nhóm nghiên cứu:

Týp dengue	n	%
Týp I	33	66 %
Týp II	17	34%
Týp III	0	0%
Týp IV	0	0%
Tổng	50	100%

Týp I và II dengue lưu hành phổ biến tại miền Bắc Việt Nam [2].

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu chúng tôi cho thấy RT-PCR là phương pháp có giá trị trong chẩn đoán dengue ở Khoa Cấp cứu, Bệnh viện Quân y 103 với độ nhạy 69,33%. Khi sử dụng kết hợp RT-PCR với xét nghiệm nhanh NS1-Ag-IgM/IgG làm tăng hiệu quả chẩn đoán dengue lên 78,67% so với sử dụng riêng lẻ từng xét nghiệm, RT-PCR phát hiện thêm 4/31 BN dương tính có xét nghiệm NS1 và IgM/IgG âm tính ở giai đoạn cấp của bệnh.

Lời cảm ơn: nghiên cứu được hỗ trợ của chương trình hợp tác, nghiên cứu về các căn nguyên gây sốt xuất huyết với GS. Jonas Schmidt Chanasit, Viện Y học Nhiệt đới Bernhard Nocht, Hamburg, Đức, Trung tâm hợp tác và tham chiếu của Tổ chức Y tế Thế giới về nghiên cứu virut sốt xuất huyết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Trung Kiên, Trần Thanh Dương và CS. So sánh số ca mắc và tử vong do sốt xuất huyết dengue tại Việt Nam năm 2011 và 2012 so sánh với trung bình 5 năm 2006 - 2010.

Tạp chí Phòng chống Bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng. 2013, 4, tr.67-74.

2. Lê Thị Ngân. Nghiên cứu chẩn đoán sốt dengue/sốt xuất huyết dengue bằng kỹ thuật PCR và huyết thanh học tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 01- 2006 đến 06 - 2007. Luận văn Thạc sỹ. Trường Đại học Y Hà Nội. 2007.

3. Guzman M.G, Harris E. Dengue. Lancet. Lond Engl. 2015, Jan, 31, 385 (9966), pp.453-65.

4. Simmons CP, Farrar J.J, Nguyen van V.C, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012, Apr 12, 366 (15), pp.1423-1432.

5. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New Edition - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2018 Jan 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762963>

6. Muller D.A, Depelzenaire ACI, Young P.R. Clinical and laboratory diagnosis of Dengue virus infection. J Infect Dis. 2017, Mar 1, 215 (suppl_2), S.89-95.

7. Peeling R.W, Artsob H, Pelegrino J.L, Buchy P, Cardoso M.J, Devi S et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol. 2010, 8 (12 suppl), S.30-38.

8. Anand AM, Sistla S, Dhodapkar R, Hamide A, Biswal N, Srinivasan B. Evaluation of NS1 antigen detection for early diagnosis of Dengue in a tertiary Hospital in Southern India. J Clin Diagn Res JCDR. 2016, Apr; 10 (4), DC01-04.

9. Huang C.H, Kuo L.L, Yang K.D, Lin P.S, Lu P.L, Lin C.C et al. Laboratory diagnostics of dengue fever: an emphasis on the role of commercial dengue virus nonstructural protein 1 antigen rapid test. J Microbiol Immunol Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi. 2013, Oct, 46 (5), pp.358-365.

10. Guzman M.G, Gubler D.J, Izquierdo A, Martinez E, Halstead S.B. Dengue infection. Nat Rev Dis Primer. 2016, 18 (2),16055.